



**Programa de Pós-graduação em Patologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais**

Avaliação da expressão gênica e produção recombinante de CXCR4 e CD26, correlacionados ao marcadores de transição epitélio mesenquimal, células-tronco tumorais e de proliferação celular em amostras de tumores de cólon e reto humano

Jéssica Vieira de Assis

**Belo Horizonte
2020**



**Programa de Pós-graduação em Patologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais**

**Avaliação da expressão gênica e produção recombinante de CXCR4 e CD26,
correlacionados a marcadores TEM, CTT e de proliferação celular em amostras de
tumores de cólon e reto humano**

Jéssica Vieira de Assis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Patologia – área de concentração em Patologia Oncológica.

Orientadora: Profa. Dra. Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz

Co-orientadora: Profa. Dra. Mônica Maria D. Álvares Cabral

Co-orientador: Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali

**Belo Horizonte
2020**

043

Assis, Jéssica Vieira de.

Avaliação da expressão gênica e produção recombinante de CXCR4 e CD26, correlacionados a marcadores EMT, CSC e de proliferação celular em amostras de tumores de cólon e reto humano [manuscrito] / Jéssica Vieira de Assis. - 2020.

146 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz. Coorientadores: Profa. Dra. Mônica Maria Demas Álvares Cabral e Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Neoplasias Colorretais. 2. Receptores CXCR4. 3. Dipeptidil Peptidase 4. 4. Transição Epitelial-Mesenquimal. 5. Células-Tronco Neoplásicas. 6. Biomarcadores. I. Queiroz, Rafaella Fortini Grenfell e. II. Cabral, Mônica Maria Demas Álvares. III. Cassali, Geovanni Dantas. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 616

FOLHA DE APROVAÇÃO

“AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE CXCR4 E CD26, CORRELACIONADOS A MARCADORES EMT, CSC E DE PROLIFERAÇÃO CELULAR EM AMOSTRAS DE TUMORES DE CÓLON E RETO HUMANO”

JÉSSICA VIEIRA DE ASSIS

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em **PATOLOGIA**, área de concentração **PATOLOGIA ONCOLÓGICA**.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Jaqueline Germano de Oliveira
FIOCRUZ

Prof. Marcelo Antônio Pascoal Xavier
Faculdade de Medicina/UFMG

Profa. Mônica Maria Demas Alvares Cabral
Faculdade de Medicina/UFMG - COORIENTADORA

Profa. Rafaela Fortini Grenfell e Queiroz
FIOCRUZ - ORIENTADORA

Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2020.

Dedico este trabalho aos que tem ou tiveram suas vidas cruzadas pelo câncer e em especial ao meu tio Jó, que lutou até o fim. O convívio diário com esta doença, tão desafiador quanto cruel, possibilita-me conhecer pessoas que ensinam coragem, resiliência e o real valor das coisas, das pessoas e dos saberes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir viver cada dia desses dois últimos anos em prol de descobertas que auxiliarão ao próximo. A Ele dedico meu esforço, amor e fé que sustentaram esse trabalho.

Agradeço imensamente à minha orientadora Dra. Rafaella Fortini pela oportunidade dada em 2016, por me receber como aluna e me tornar uma pesquisadora. Sou grata por cada oportunidade, por cada conselho, sejam eles pessoais ou profissionais, mas acima de tudo pela confiança depositada em minhas mãos. Obrigada por acreditar em mim todos os dias e fazer tanta questão de deixar isso claro. Agradeço por todas as viagens, cursos, eventos e treinamentos que me encorajou a fazer. Obrigada por ter guiado meus passos e me ensinado a voar.

Ao meu querido professor Dr. Geovanni Dantas Cassali, agradeço por ter acreditado no meu projeto e dado vazão a ele. Obrigada por me receber em seu laboratório e disponibilizar seu tempo e conhecimento comigo. São de valores imensuráveis.

À minha estimada professora Dra. Mônica Demas, me faltam palavras pra descrever por ti o meu afeto. Sou grata pela confiança, pelo carinho com o qual sempre me tratou, pelas infinitas ligações e por dividir seu conhecimento tão enriquecedor que tanta diferença fez nesse trabalho. Obrigada por acreditar que iríamos muito longe, e fomos.

Ao meu querido amigo e companheiro de jornada Dr. Wander Jeremias, em meu coração existe apenas gratidão por cada palavra proferida, cada ensinamento e esquemas de biologia molecular em papeis filtro sobre a bancada. A sua inteligência e humildade para semear o que sabe são memoráveis. Eu tive muita sorte em poder contar com você durante esse tempo e pelos que ainda virão.

À meiga e doce Dra. Viviane Fernandes, obrigada pelo auxílio incontestável e extremamente necessário. Você tem o dom de fazer as coisas parecerem mais fáceis e isso nos dá ainda mais coragem. Obrigada pelas muitas explicações pelo telefone, por sempre me receber com carinho e pelo cuidado com o meu projeto. Você foi peça fundamental.

À Lucélia, grande amiga e companheira de produção, sou extremamente feliz pelo laço que criamos e confesso que não sei como será não dividir mais os experimentos e bancadas com você. Você me ensinou tanto, acho que nem sabe disso. Finalizo o meu mestrado com grandes conquistas e todas elas foram alcançadas juntamente com você. Obrigada pela amizade e carinho. Obrigada por todas as horas gastas discutindo protocolos e fazendo contas de diluições. Sempre vou precisar de você. Voe alto, você merece o mundo e eu estarei sempre na sua torcida.

Minha querida amiga Natália, nada que eu disser chegará perto do quanto eu sou grata por toda ajuda prestada. Você sempre me fazia acreditar que daria certo, mesmo quando as chances eram mínimas. Obrigada por todos os dias em que ficou até altas horas comigo no laboratório, empenhada nas produções. Ter você do meu lado me fazia querer avançar. A sua

amizade foi uma grande conquista e a sua dedicação sempre me orgulhava. Esse trabalho é tão seu quanto meu.

Agradeço a minha estimada amiga Alana, também companheira de pesquisa, pelo carinho, amizade, por todos os sábios conselhos dirigidos a mim e todos os fins de tarde no nosso querido CDF. Obrigada por ser minha incentivadora, desejar o melhor aos meus planos e se frustrar quando algo de ruim me acontece. A sua amizade tem valor inestimado pra mim. A sua coragem e capacidade te levarão muito longe e não tenho nenhuma dúvida de que se tornará uma pesquisadora reconhecida. Você é incrível.

Thaís, minha querida amiga, seus abraços, mesmo de longe, me mostravam que o caminho certo sou eu quem faz. Sua certeza da minha capacidade e sua felicidade nas minhas conquistas sempre demonstraram o ser humano elevado que é. Desejo a você tudo que deseja aos outros, com esse coração enorme que cabe todo o universo dentro. Obrigada por ser e estar.

À minha equipe do DATA, tem um pouquinho de todos vocês nas páginas que se seguirão. Obrigada pelo acalento, pelos abraços fortes, pelas palmas e por todo amor que sempre senti vendo todos nós unidos. Obrigada por ser a melhor equipe de pesquisa que já se ouviu falar. Obrigada pelas risadas, pelos cafés e Jussara, obrigada pelas músicas de meditação, me ajudaram a concentrar.

À minha família, entrego meus mais sinceros agradecimentos. Obrigada pelo orgulho que sentem, por me parabenizarem e por segurarem a minha mão, a vida toda. Dedico também meus agradecimentos aos meus sobrinhos, que eu tanto amo: Davi e Valentina, vocês são a minha fonte de coragem e determinação diária. Titia ama muito vocês.

Ao meu namorado Cleyson, muito obrigada por acreditar em mim, por me incentivar e por me fazer entender que eu posso ser e fazer o que eu quiser, que meus sonhos são grandes e que eu posso realizar cada um deles. Obrigada por todo amor e respeito dedicado ao meu trabalho e por me desejar um futuro incrível, ajudando a tantas pessoas quanto sonhamos. Eu te amo!

Por fim, agradeço àqueles que tornam reais esses projetos mirabolantes rascunhados em papéis. Aos pacientes cuja presença neste trabalho, de novas descobertas e de outras questões, impelem ao estudo para o avanço da pesquisa do câncer colorretal. Vocês são a peça mais importante dos estudos em humanos, que nos possibilitam aprender e desvendar. Minha dedicação não termina aqui, esse é o meu compromisso com vocês. Muitos enfrentam uma batalha onde, infelizmente, outros perderam a guerra. Assumo meu total respeito a vocês e agradeço a todos aqueles que compartilharam comigo suas histórias pelo telefone. Obrigada por permitirem que nossos planos sejam reais.

“Aliviar seus efeitos é uma tarefa diária, curá-la, uma ardente esperança.”

- William Castle, descrevendo a leucemia em 1950.



Programa de Pós-graduação em Patologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Diagnóstico e Terapia de Doenças Infecciosas e Câncer do Instituto René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz, com apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG, CAPES, Fundação Oswaldo Cruz e *Foundation Merieux*.

RESUMO

A estimativa de ocorrência de novos cânceres, para o Brasil, triênio 2020-2022, apontou cerca de 625 mil novos casos, sendo que a segunda neoplasia de maior incidência para homens e mulheres é o câncer colorretal (CCR). As novas diretrizes de consenso da Sociedade Europeia de Oncologia Médica (ESMO), estabelecidas em 2016, predizem que é preciso avaliar o perfil de expressão gênica do tumor, uma vez que evidências recentes demonstram a heterogeneidade molecular do CCR. Isto porque a compreensão da relação de marcadores moleculares e como eles conduzem, baseados nas características do paciente e do tumor, à progressão e/ou regressão tumoral não é bem esclarecida. Dos marcadores estudados na atualidade, o receptor de quimiocina CXCR4 que é conhecido por habilitar a metástase em CCR e a peptidase CD26 com função na regulação da progressão tumoral metastática são alvos de estudo em paralelo. Assim como eles, os marcadores TEM e CTT, responsáveis pela perda da diferenciação celular e auto renovação das células tumorais, respectivamente, tem suas aplicações constantemente discutidas no contexto tumoral. Adicionalmente, o perfil proliferativo do tumor tem grande importância prognóstica, uma vez que conduz ao evento metastático. Dados de associação de marcadores às variáveis do tumor e do paciente são escassos, e a sua compreensão pode assegurar maiores chances de cura e sobrevida livre da doença buscando tornar a abordagem mais assertiva. Desta forma, o objetivo do estudo é determinar o perfil de expressão dos genes CXCR4, CD26, CD133, GAPDH, Vimentina, E-caderina e Ki67 em tumores de cólon e reto correlacionando-os às variáveis do paciente e do tumor. Para tais análises, a avaliação do perfil de expressão gênica dos marcadores propostos foi realizado por meio da qPCR utilizando fragmentos tumorais congelados e os dados gerados foram correlacionados com variáveis do tumor e dos pacientes. As produções de CXCR4 e CD26 recombinantes foi realizada obtendo, ambas, rendimento de cerca de 1 mg/mL. Resultados intergrupos apontam que a superexpressão de CD26 está intimamente relacionada ao aumento da expressão de GAPDH, assim como vimentina, e-caderina, CD133 e Ki67 tem sua expressão regulada positivamente conforme CXCR4. Achados demonstram que a condição patológica eleva a expressão de GAPDH, CXCR4 e vimentina, uma vez que são marcadores relacionados à diferenciação e proliferação celular. Observou-se que GAPDH tem expressão positiva em amostras peri-tumorais do sítio esquerdo de acometimento, bem como vimentina, uma vez que trata-se de uma região em intenso processo inflamatório. Nove pacientes foram contatados para dados de desfecho, onde apenas um evento foi óbito. Os dados gerados apontam a associação de CD26 e GAPDH, bem como CXCR4 e CD133, vimentina e e-caderina no desenvolvimento e progressão do CCR.

Palavras-chave: Câncer colorretal; CXCR4 e CD26; TEM, CTT, proliferação, biomarcadores

ABSTRACT

The estimate of the occurrence of new cancers, for Brazil, 2020-2022, pointed to about 625 thousand new cases, with the second neoplasia of higher incidence for men women being colorectal cancer (CRC). The new consensus guidelines of the European Society of Medical Oncology (ESMO), established in 2016, predict that it is necessary to evaluate the profile of gene expression of the tumor, since recent evidence demonstrates the molecular heterogeneity of the CRC. This is because the understanding of the relationship of molecular markers and how they lead, based on the characteristics of the patient and the tumor, to tumor progression and/or regression is not well understood. Among the markers studied today, the chemokine receptor CXCR4, which is known to enable metastasis in CRC and CD26 peptidase with function in regulating metastatic tumor progression, are targets for study in parallel. Like them, the MET and CSC markers, responsible for the loss of cell differentiation and self-renewal of tumor cells, respectively, have their applications constantly discussed in the tumor context. Additionally, the proliferative profile of the tumor has great prognostic importance, since it leads to the metastatic event. Data on the association of markers with tumor and patient variables are scarce, and their understanding may ensure greater chances of cure and disease-free survival, seeking to make the approach more assertive. Thus, the aim of the study is to determine the expression profile of the CXCR4, CD26, CD133, GAPDH, Vimentin, E-cadherin and Ki67 genes in colon and rectum tumors by correlating them to the patient and tumor variables. For such analyzes, the evaluation of the gene expression profile of the proposed markers was performed using qPCR using frozen tumor fragments and the data generated were correlated with tumor and patient variables. The production of recombinant CXCR4 and CD26 was performed, obtaining, both, yield of about 1 mg/mL. Intergroup results indicate that CD26 overexpression is closely related to increased GAPDH expression, as well as vimentin, e-cadherin, CD133 and Ki67 have their expression regulated positively according to CXCR4. Findings demonstrate that the pathological condition increases the expression of GAPDH, CXCR4 and vimentin, since they are markers related to cell differentiation and proliferation. It was observed that GAPDH has positive expression in peritumor samples from the left site of involvement, as well as vimentin, since it is a region in intense inflammatory process. Nine patients were contacted for outcome data, where only one event died. The data generated point to the association of CD26 and GAPDH, as well as CXCR4 and CD133, vimentin and e-cadherin in the development and progression of CRC.

Keywords: Colorectal cancer; CXCR4 and CD26; MET, CSC, proliferation, biomarkers

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Estadiamento clínico do câncer colorretal adaptado de AJCC 8ª Edição.	31
TABELA 2 Iniciadores usados na qPCR.....	62
TABELA 3 Iniciadores utilizados no sistema Gateway® de expressão de CXCR4 e CD26 recombinantes com e sem os sítios de recombinação.....	67
TABELA 4 Amostras fixadas em formol e incluídas em parafina no Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, Faculdade de Medicina/UFMG.....	77
TABELA 5 Distribuição das variáveis categóricas e anatomopatológicas dos adenocarcinomas primários proveniente de tecido incluído em parafina.	79
TABELA 6 Distribuição baseada no estadiamento TNM.	80
TABELA 7 Amostras preservadas em RNAlater a -80°C advindas do Banco de Tumores e Tecidos do Instituto Alfa de Gastroenterologia – HC/UFMG.	81
TABELA 8 Distribuição das variáveis categóricas e anatomopatológicas dos adenocarcinomas primários provenientes do Banco de Tumores e Tecidos – HC/UFMG.....	82
TABELA 9 Distribuição baseada no Estadiamento TNM.....	83
TABELA 10 Valores encontrados, durante a padronização da curva padrão da técnica, para <i>slope</i> , R ² e eficiência da reação.	85
TABELA 11 Dosagem em NanoDrop 2000® UV-Vis Spectrophotometer de amostras parafinadas.....	87
TABELA 12 Dosagem em NanoDrop 2000® UV-Vis Spectrophotometer de amostras congeladas.	91
TABELA 13 Distribuição de informações de evolução e desfecho da doença	109

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Anatomia normal do cólon.	28
FIGURA 2 Estadiamento de tumores colorretais.	32
FIGURA 3 Dados mundiais de incidência de câncer em 2018.	33
FIGURA 4 Dados mundiais de morte devido ao câncer em 2018.	34
FIGURA 5 Dados de distribuição de câncer para o Brasil no triênio 2020-2022.	34
FIGURA 6 Proteína CXCR4.	46
FIGURA 7 Proteína CD26.	48
FIGURA 8 Perfil eletroforético da amplificação de CXCR4, CD26, CD133, Ki67, E-caderina, Vimentina, β -actina e GAPDH.	84
FIGURA 9 Eletroferograma dos RNAs advindos de amostras parafinadas.	86
FIGURA 10 Curvas de amplificação obtidas na qPCR.	88
FIGURA 11 Eletroferograma dos RNAs advindos de amostras congeladas.	90
FIGURA 12 Curva de amplificação obtidas na qPCR.	92
FIGURA 13 Perfil eletroforético da amplificação de CXCR4 e CD26 por PCR.	119
FIGURA 14 Perfil eletroforético da amplificação por PCR de CXCR4 e CD26 contendo sítios <i>att</i>	120
FIGURA 15 Perfil eletroforético dos clones de entrada.	121
FIGURA 16 Perfil eletroforético dos clones de destino.	122
FIGURA 17 Perfil eletroforético dos clones de destino.	122
FIGURA 18 Perfil da expressão de CXCR4 em membrana de Western Blot.	123
FIGURA 19 Perfil da expressão de CD26 em membrana de Western Blot.	124
FIGURA 20 Western Blot anti-his das eluições do produto da purificação de CXCR4.	125
FIGURA 21 Western Blot anti-his das eluições do produto da purificação de CD26.	125

GRÁFICO 1 Valores da mediana de RQ e intervalo interquartis para CXCR4 (A), Vimentina (B) e GAPDH (C).	94
GRÁFICO 2 Valores da mediana de RQ e intervalo interquartis para CD26 (A), Ki67 (B), E-caderina (C) e CD133 (D).....	95
GRÁFICO 3 Valores da mediana de RQ e intervalos interquartis para CXCR4 (A), Ki67 (B), CD26 (C), E-caderina (D), CD133 (E), Vimentina (F) e GAPDH (G) em amostras positivas ao CCR.....	97
GRÁFICO 4 Valores da mediana de RQ e intervalos interquartis para GAPDH (A) e Vimentina (B).....	98
GRÁFICO 5 Valores da mediana de RQ e intervalos interquartis para CXCR4 (A), CD26 (B), Ki67 (C), CD133 (D) e E-caderina (E) em amostras negativas ao CCR.	99
GRÁFICO 6 Valores da mediana de RQ e intervalos interquartis para CXCR4 (A), CD26 (B), CD133 (C), Ki67 (D), E-caderina (E), Vimentina (F) e GAPDH (G).	101
GRÁFICO 7 Coeficiente de correlação de Spearman dos marcadores propostos para as amostras positivas com significância estatística.....	104
GRÁFICO 8 Coeficiente de correlação de Spearman dos marcadores propostos para as amostras negativas com significância estatística.	106
GRÁFICO 9 Teste de Wilcoxon comparativo com os valores de mediana e intervalos interquartis dos marcadores propostos para as amostras positivas e negativas no caso de serem dependentes com significância estatística.	107
GRÁFICO 10 Gráfico de estadiamento TNM vs. valor da mediana geral dos RQs de todos os marcadores.	108
GRÁFICO 11 Valores da mediana de RQ e intervalos interquartis para CXCR4 (A), CD26 (B), CD133 (C), Ki67 (D) e E-caderina (E) em amostras positivas ao CCR quanto à faixa etária.	111
GRÁFICO 12 Valores da mediana de RQ e intervalos interquartis para CXCR4 (A), CD26 (B), CD133 (C), Ki67 (D) e E-caderina (E) em amostras positivas ao CCR quanto ao sexo dos pacientes.	113

GRÁFICO 13 Valores da mediana de RQ e intervalos interquartis para CXCR4 (A), CD26 (B), CD133 (C), Ki67 (D) e E-caderina (E) em amostras positivas ao CCR ao histórico familiar de CCR..... 115

ABREVIATURAS E SIGLAS

A Adenina

ADA Adenosina deaminase

AJCC Comitê Conjunto Americano em Câncer - *American Joint Committee on Cancer*

APC Polipose adenomatosa coli

ASCO Sociedade Americana de Oncologia Clínica. *American Society of Clinical Oncology*

BCA Ácido bicinchonínico

BCR Oncoproteína

BCRJ Banco de Células do Rio de Janeiro

BTT Banco de Tecidos e Tumores HC/UFMG

C Citosina

CCHNP Câncer Colorretal Hereditário Não-Polipose

CCR Câncer colorretal

cDNA DNA complementar

CD133 Proeminina-1

CD26 Dipeptil-peptidase 6

CD26r Dipeptil-peptidase 6 recombinante

CEP Comitê de Ética em Pesquisa

c-Myc proto-oncogene

v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog

Ct Threshold cycle

CTTs células tronco tumorais

CXCL12 *Stroma cell-derived factor 1*

CXCR4 Receptor 4 da quimiocina CXC

CXCR4r Receptor 4 da quimiocina CXC recombinante

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DNA Ácido desoxirribonucleico

DO Densidade óptica

EDTA ácido etilenodiamino tetra-acético

EGFR Receptor do fator de crescimento epidérmico. *Epidermal growth factor receptor*

TEM Transição epitélio-mesenquima. *Epithelial-mesenchymal transition*

ESMO Sociedade Europeia de Oncologia Médica. *European Society for Medical Oncology*

EUA Estados Unidos da América

G Guanina

g Força gravitacional

GAPDH Endógeno/normalizador. *Proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*

GIP Peptídeo inibidor gástrico -*Glucose-dependent insulintropic peptide*

GLP-1 Peptídeo semelhante a Glucagon-1 -*Glucagon-like peptide*

HER-2 Oncogene

Hes1 *hes family bHLH transcription factor 1*

HIF1 α mecanismos dependentes de fatores induzidos por hipóxia alfa

HNPCC Câncer colorretal hereditário não associado à polipose

HT29 Células de adenocarcinoma humano

IARC Agência Internacional de Pesquisa em Câncer – *International Agency for Research in Cancer*

Ig Imunoglobulina

INCA Instituto Nacional de Câncer

IPTG isopropil tio- β -d-galactosídeo

HER2 Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano

kD Kilodaltons

Ki67 Proteína nuclear

KLF4 *Krüppel-like factor 4*

LB *Luria Bertani*

M Metástase

mAb anticorpo monoclonal – *monoclonal antibody*

MET *Mesenchymal-Epithelial Transition*

mRNA RNA mensageiro

N Gânglios linfáticos acometidos

NANOG *Nanog homeobox*

NCBI *National Center for Biotechnology Information*

NL Nitrogênio líquido

Oct3/4 *Octamer-binding transcription factor 4*

OMS Organização Mundial de Saúde. *World Health Organization*

NPS Estudo nacional de pólipos - *The National Polyp Study*

PAF Polipose Adenomatosa Familiar

PAs Pólipos adenomatosos

PCR Reação em cadeia da polimerase
qPCR Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RE Receptor de estrógeno
RNA Ácido ribonucleico
rRNA RNA ribossômico
RQ Quantificação relativa. *Relative quantification*
RP Receptor de progesterona
RPM Rotação por minuto
sCD26 CD26 solúvel
SDF-1 Fator 1 derivado de células estromais – *Stromal cell-derived factor 1*
SDS-PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida - Dodecil sulfato de sódio
SN Sobrenadante
SNAI2 *snail family transcriptional repressor 2*
SNAIL *Zinc Finger Factor Snail*
SNC Sistema Nervoso Central
SOX2 Fator de transcrição - *sex determining region Y-box 2*
T Tumor primário
T Timina
TAE Tampão Tris-Acetato-EDTA
TB *Terrific Broth*
T0 Tempo zero
T1 Tempo um
T2 Tempo 2
T3 Tempo três
T4 Tempo quatro
TBS Tampão tris-salina. *Tris-buffer saline*
TBS-T 1% Tampão tris-salina com 0,05 % de Tween. *Tris-buffered saline and Tween*
TE Tampão Tris-EDTA
TM Temperatura de *melt*
tRNA RNA transportador
TWIST $\frac{1}{2}$ *twist family bHLH transcription factor 1/2*
UFMG Universidade Federal de Minas Gerais
UICC União Internacional de Controle do Câncer - *Union for International Cancer Control*
VEGF fator de crescimento endotelial e vascular - *Vascular endothelial growth factor*

WB Ensaio imunoenzimático de *Western blotting*

Zeb1 Homeobox 1 de ligação à E-box do dedo de zinco - *Zinc Finger E-box Binding*

Homeobox-1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. JUSTIFICATIVA	26
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	28
3.1 Câncer colorretal e localização anatômica.....	28
3.2 Epidemiologia do câncer colorretal	33
3.3 Carcinogênese e história natural do câncer colorretal.....	35
3.4 Rastreamento.....	37
3.5 Diagnóstico.....	40
3.6 Tratamento.....	42
3.7 Marcadores tumorais.....	44
3.7.1 CXCR4	45
3.7.2. CD26	48
3.7.3 TEM e CTT.....	50
3.7.4 GAPDH	53
3.7.5 Ki67.....	54
4. OBJETIVOS.....	57
4.1 Objetivo Geral	57
4.2 Objetivos Específicos.....	57
5. MATERIAIS E MÉTODOS	59
5.1 Aspectos éticos.....	59
5.2 Obtenção das amostras e critérios de inclusão e exclusão.....	59
5.3 Extração do RNA total de células HT29.....	60
5.4 Obtenção do cDNA.....	60
5.5 Expressão gênica por qPCR	61
5.5.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores.....	61
5.5.2 Validação dos iniciadores	63
5.5.3 Extração do RNA total das amostras parafinadas	63
5.5.4 Extração do RNA total das amostras congeladas.....	63
5.5.5 Padronização da curva de eficiência dos <i>primers</i> para qPCR.....	64
5.5.6 Expressão gênica por qPCR	65
5.6 Determinação da correlação entre os dados de expressão gênica e variáveis do paciente e do tumor	65
5.7 Produção das proteínas CXCR4 e CD26 recombinantes.....	66
5.7.1 Amplificação e purificação dos genes de interesse	66
5.7.2 Clonagem.....	69

5.7.3 Reação de recombinação BP e obtenção do clone de entrada.....	69
5.7.4 PCR de colônia.....	70
5.7.5 Reação de recombinação LR e obtenção do clone de expressão	70
5.7.6 Expressão de CXCR4r E CD26r	71
5.7.7 Purificação das proteínas recombinantes CXCR4r e CD26r	73
5.8 Análises estatísticas.....	74
6. RESULTADOS	76
6.1 Amostras de adenocarcinoma humano	76
6.2 Expressão gênica por qPCR	83
6.2.1 Validação dos oligonucleotídeos iniciadores	83
6.2.2 Curva de eficiência de primers na amplificação por <i>real time</i> – PCR.....	84
6.2.3 Extração de RNA total dos grupos amostrais	85
6.3 Análise da expressão gênica.....	93
6.3.1 Correlação da expressão gênica dos marcadores com características do tumor	93
6.3.2 Correlação da expressão gênica dos marcadores com características do paciente	110
6.4 Produção das proteínas CXCR4 e CD26 recombinantes.....	115
6.4.1 Amplificação e purificação dos genes de interesse	115
6.4.2 Reação de recombinação BP e obtenção do clone de entrada.....	120
6.4.3 Reação de recombinação LR e obtenção do clone de expressão	121
6.4.4 Expressão e purificação de CXCR4 e CD26 recombinantes.....	123
7. DISCUSSÃO.....	127
8. CONCLUSÃO.....	133
9. PERSPECTIVAS	135
10. PRODUÇÃO OBTIDA	136
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
Amara S. et al. Stromal cell derived factor-1 and CXCR4 expression in colorectal cancer promote liver metastasis. Cancer Biomark. 2015;15(6):869-79. doi: 10.3233/CBM-150531.	139
Bajetto A. et al. CXCR4 and SDF1 expression in human meningiomas: A proliferative role in tumoral meningotheial cells in vitro' CXCR4 and SDF1 expression in human meningiomas: A proliferative role in tumoral meningotheial cells in vitro' Neuro-oncol. 2007 Jan; 9(1): 3–11.....	139
Becerra AZ. et al. Variation in Hospital-Specific Rates of Suboptimal Lymphadenectomy and Survival in Colon Cancer: Evidence from the National Cancer Data Base. Ann Surg Oncol. 2016 Dec;23(Suppl 5):674-683. Epub 2016 Sep 9.	139

Brasil. Ministério da Saúde. Caderno de diretrizes: objetivos, metas e indicadores 2013-2015. 1ª edição. 2013	139
Chao X. et al. CXCR4 overexpression is correlated with poor prognosis in colorectal cancer. Life Sciences Volume 208, 1 September 2018, Pages 333-340	140
Havre PA. et al. The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. Front Biosci. 2008 Jan 1;13:1634-45.....	141
Kim J. et al. Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival. J Clin Oncol. 2005 Apr 20;23(12):2744-53.	141
Kobayashi N. et al. Cancer stem cells: a new approach to tumor development. Rev Assoc Med Bras 2015; 61(1):86-93.....	141
Kruizinga RC. et al. Difference in CXCR4 expression between sporadic and VHL-related hemangioblastoma. Fam Cancer. 2016; 15(4): 607–616.	141
Liu S. et al. Role of microR.....	142
NAs in the regulation of breast cancer stem cells. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 17, 15-21	142
Ottaiano A. et al. Overexpression of both CXC chemokine receptor 4 and vascular endothelial growth factor proteins predicts early distant relapse in stage II-III colorectal cancer patients. Clin Cancer Res. 2006 May 1;12(9):2795-803.....	143
Pollack A. et al. Ki-67 staining is a strong predictor of distant metastasis and mortality for men with prostate cancer treated with radiotherapy plus androgen deprivation: Radiation Therapy Oncology Group Trial 92-02. J Clin Oncol. 2004 Jun 1;22(11):2133-40. 144	
Rasmussen HB. et al. Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV/CD26 in complex with a substrate analog. Nat Struct Biol. 2003 Jan;10(1):19-25.....	144
Rondinelli RH et al. Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in late pathological stage human prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis. 1997 Dec;1(2):66-72.....	144
Savarin-Vuailat et al. Chemokines and chemokine receptors in neurological disease: raise, retain, or reduce? Neurotherapeutics. 2007 Oct;4(4):590-601.....	144
Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017. CA Cancer J Clin 2017; 67:177-93.	144
Staller P. et al. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. Nature. 2003 Sep 18;425(6955):307-11.....	145
Xinfeng Y. et al. CXCL12/CXCR4 promotes inflammation-driven colorectal cancer progression through activation of RhoA signaling by sponging miR-133a-3p. J Exp Clin Cancer Res. 2019; 38: 32.....	146
Zagzag D et al. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. Lab Invest. 2006 Dec;86(12):1221-32. Epub 2006 Oct 30.	146

1. INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) apresenta etiopatogenia multifatorial e complexa, ainda não totalmente elucidada (Petrarca, 2016). A sub-tipificação é reconhecida como critério relevante de classificação da doença. As novas diretrizes de consenso da Sociedade Europeia de Oncologia Médica (ESMO), estabelecidas em 2016, predizem que é preciso avaliar o perfil de expressão gênica do tumor para marcadores específicos, uma vez que evidências recentes demonstram a heterogeneidade molecular do CCR (Van Cutsem et al., 2016). No entanto, a utilização destes marcadores na prática clínica ainda não é completamente aceita e esclarecida (Martin, 2013). Isto porque alguns desafios permanecem para o controle da patologia como a compreensão da relação destes marcadores e como eles conduzem, baseados nas características do paciente e do tumor, à progressão e/ou regressão tumoral (Pendlebury et al., 2003).

A identificação molecular de mutações e polimorfismos genéticos traduz-se para a saúde pública como possibilidade de caracterização da suscetibilidade individual ao câncer, podendo no futuro conduzir a novas perspectivas para a prevenção e o diagnóstico precoce, bem como para o aconselhamento genético e o desenvolvimento de terapêutica gênica (McMichael, 1994).

A fim de elucidar questões que envolvam genes em eventos tumorais, vários marcadores são propostos atualmente. Dentre eles, o receptor de quimiocina CXCR4, que é conhecido por habilitar a metástase em CCR, e a peptidase CD26, com função na regulação da progressão tumoral, (Cutler et al., 2015) são alvos de estudo de modo paralelo. Além destes, dois grupos de marcadores tumorais vêm atraindo a atenção dos pesquisadores. São eles: marcadores de transição epitélio-mesenquimal (TEM) e marcadores de células tronco neoplásicas (CTT). Embora sejam tratados como distintos, eles estão intimamente relacionados, já que, ambos estão associados à perda da diferenciação celular e resistência aos tratamentos convencionais (Junqueira et al., 200). De acordo com Wu et al., 2019, a superexpressão de Ki67 está significativamente correlacionada ao pior prognóstico em pacientes com CCR, colocando-o como importante marcador de sobrevida global. Por fim, GAPDH sofre regulação da sua transcrição e sua diversidade funcional é altamente afetada por modificações pós-traducionais em diferentes resíduos de amino ácidos (Colell et al., 2009). Além disso, moléculas reguladoras regulam não apenas os níveis de RNA mensageiro (mRNA), mas também afetam funções de GAPDH relacionadas ao câncer como proliferação, formação tumoral, quimiorresistência (Nicholls et al., 2012).

Vários trabalhos sugerem que a alta expressão do gene CXCR4 está intimamente associada ao elevado risco de reincidência, baixa sobrevida (Ottaiano et al., 2006) e ocorrência de metástase hepática (Kim et al., 2005). Achados pré-clínicos evidenciam que o bloqueio do eixo de CXCR4 é um possível alvo terapêutico no tratamento de metástases do CCR (Murakami et al., 2012).

Por outro lado, o gene CD26 codifica uma proteína multifuncional, de superfície celular, que é variavelmente expressa entre diferentes cânceres e desempenha importante função na regulação da progressão tumoral e metástase (Blay et al., 2009). Segundo Beckenkamp e colaboradores (2016), CD26 foi descrita como uma proteína associada à invasão, caracterizando-a como marcador de malignidade e importante alvo terapêutico.

Cutler et al. (2015) trataram células HT29 de adenocarcinoma humano com quimioterápicos convencionais, e demonstraram uma diminuição progressiva da proporção de CXCR4 expresso e elevação considerável de CD26 na população celular. E ainda, que os diferentes perfis gênicos, para os marcadores citados, necessitam de distintos protocolos de tratamentos antineoplásicos a fim de assegurarem maiores chances de cura. Tais diferenças sugerem que as concentrações dos quimioterápicos a serem administradas, podem ser diferentes conforme perfil gênico de cada paciente.

A transição epitélio-mesenquimal (TEM) também é descrito em processos neoplásicos (Huang et al., 2012), onde está relacionado com a capacidade de migração, invasão, resistência a apoptose, metástase e perda da adesão célula-célula (Liu et al., 2012). Juntamente as células-tronco tumorais (CTT) são caracterizadas pela capacidade indefinida de auto renovação e diferenciação, estão em pequeno número em uma população de células neoplásicas, são resistentes à quimioterapia e radioterapia, possuem alta capacidade metastática e expressam marcadores de células tronco, como CD133 (Kobayashi et al., 2015).

Embora o mecanismo da expressão de Ki67 no tumor ainda tenha valor prognóstico incerto, alguns estudos clínicos forneceram evidências interessantes da utilidade da expressão deste marcador como uma ferramenta preditiva para o prognóstico clínico em pacientes com diferentes tipos tumorais, por câncer de próstata, carcinoma de tireoide e tumor renal (Pollack et al., 2004).

A GAPDH é uma enzima chave que catalisa a reação redox na via glicolítica por meio de conversão de gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bisfosfoglicerato, juntamente com a redução de NAD⁺ para NADH. Embora GAPDH seja expresso na maioria dos tipos celulares como uma enzima e é frequentemente usada como molécula de controle para a expressão de outras genes em vários contextos experimentais. Estudos recentes mostraram que, além de sua

função conhecida como enzima glicolítica, o GAPDH pode desempenhar papéis importantes em diversos processos celulares e pode afetar as funções de múltiplas moléculas que interagem com GAPDH (Nicholls et al., 2011). A elevação do mRNA de GAPDH e expressão proteica foi observado no câncer de pâncreas e no pulmão (Tokunaga et al., 1987; Mikuriya et al., 2007), indicando que o aumento de sua expressão pode estar associado com proliferação celular e tumorigênese. Consistentemente, verificou-se que a expressão do gene GAPDH é regulada em oncogene e no câncer de próstata humano de diagnóstico tardio (Persons et al., 1989; Rondinelli et al., 1997), sugerindo que o aumento da expressão de GAPDH pode estar relacionada à progressão do tumor.

Estudos indicam a relação de marcadores moleculares com características anatomopatológicas do tumor, além de dados individuais dos pacientes. Isso porque a regulação da expressão de transcritos ocorre de forma desordenada de difícil previsão no ambiente tumoral. A correlação de dados de expressão gênica às variáveis de análise podem ser importantes para um melhor entendimento da função dos biomarcadores no desenvolvimento e progressão do CCR.

2. JUSTIFICATIVA

Dados divulgados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2020) indicaram o CCR como o segundo tipo de neoplasia maligna mais comum em mulheres e terceiro em homens no Brasil. O desenvolvimento de metástase é frequente, especialmente em estágio avançado, colocando-o como um grave problema de saúde pública mundial. Pacientes requerem intensa quimioterapia que geralmente oferece baixa efetividade e significativa morbidade e/ou encaminhamento cirúrgico de alta complexidade. A dificuldade de tomada de decisão por direcionamentos eficazes contra a neoplasia é representada pela falta de informações moleculares de marcadores genéticos do câncer e em como ele conduz as características clínicas e pessoais de cada paciente.

CXCR4 e CD26 são marcadores que vem sendo estudados em diferentes tipos tumorais, uma vez que são conhecidos por permitirem a progressão e metástase de câncer de cólon e reto. Além deste, os marcadores TEM e CTT vêm ganhando espaço, por facilitarem a diferenciação celular elevando o risco de metástases e auto renovação, respectivamente. Tumores com alta taxa proliferativa tendem a ser mais agressivos, levando o paciente a um pior quadro prognóstico e menores chances de sobrevida global. Além disso, tumores que apresentam prognósticos desfavoráveis são pouco responsivos aos tratamentos antineoplásicos comumente utilizados, conforme protocolo estabelecido e apresentam maiores chance de recidiva e elevado risco de metástase. O estadiamento tumoral é um fator prognóstico importante, especialmente ao diagnóstico primário que são comumente associados a maiores chances de cura. A determinação da relação entre os marcadores propostos com as características de tumores primários de cólon e do paciente pode indicar um importante fator prognóstico e/ou preditivo de comportamento tumoral a nível molecular. Desta forma, o trabalho proposto tem por objetivo avaliar o perfil de expressão gênica de CXCR4, CD26, E-caderina, vimentina, ki67, CD133 e GAPDH associados aos tumores de cólon e reto em amostras humanas, bem como produzir CXCR4 e CD26 por tecnologia recombinante para posterior análise imunistoquímica, a fim de garantir melhor entendimento entre os marcadores e a progressão da doença.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Câncer colorretal e localização anatômica

Anatomicamente, o trato gastrintestinal é constituído pelo esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso, reto e canal anal. O intestino grosso tem cerca de 1,5 metros de comprimento, e é assim denominado porque seu diâmetro, em muitas regiões, é bem maior do que o do intestino delgado. O intestino grosso começa numa dilatação cega chamada ceco, que se comunica com o íleo. A parede do intestino que se estende pra cima a partir do ceco é chamada colo ascendente. Logo abaixo do fígado, o colo ascendente faz uma curvatura, atravessa a parede abdominal e passa a ser denominado colo transverso. Próximo ao baço, o colo transverso faz uma curvatura para baixo e forma o colo descendente. Quando o colo descendente atinge o limite superior da pelve, forma o colo sigmóide em formato de “S” alongado. Em seguida ao colo sigmóide, tem-se o reto, uma porção do intestino a frente do osso sacro. Os últimos 3 a 4 cm do trato gastrintestinal recebem o nome de canal anal (Cutait et al., 2002). A Figura 1 apresenta a divisão anatômica do intestino grosso (Li et al., 2009).

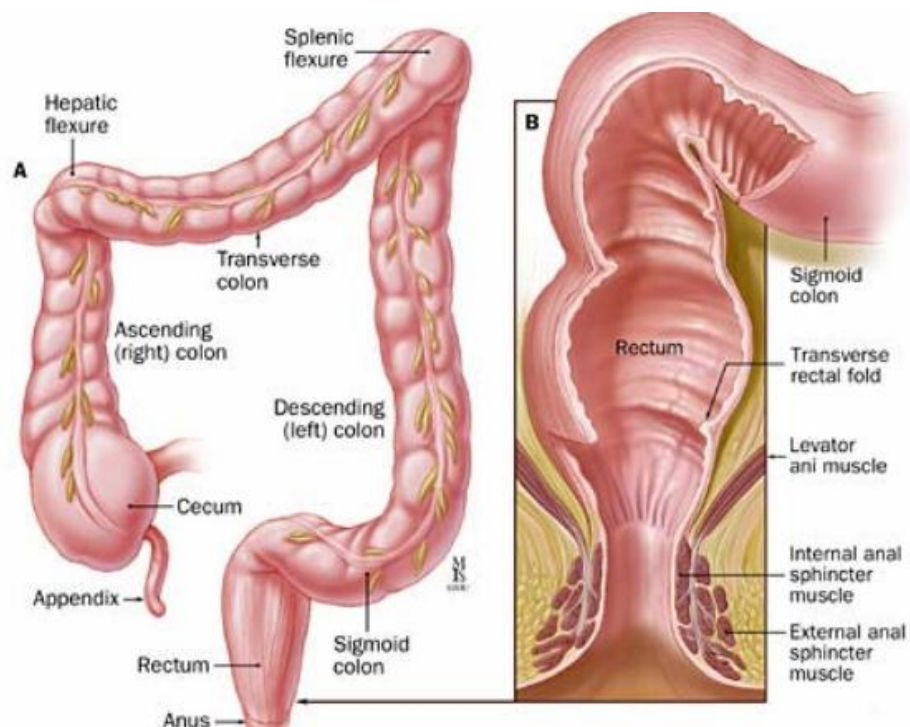


FIGURA 1 Anatomia normal do cólon. Imagem representativa do cólon (A) e reto (B). (Fonte: Johns Hopkins Medicine)

Os tumores colorretais têm origem na mucosa do intestino grosso e apresentam-se com um largo espectro de neoplasias, variando de tumores benignos a câncer invasivo e sendo predominantemente, tumores de origem epitelial (adenomas ou adenocarcinomas) (Li et al., 2009). Basicamente existem dois tipos de câncer colorretal: o esporádico, que corresponde a 75% do total de casos, e o hereditário com cerca de 25% dos casos, destacando-se a Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) e o Câncer Colorretal Hereditário Não-Polipose (CCHNP) (Li et al., 2009). O termo esporádico é normalmente usado para diferenciar tipos de câncer que ocorrem em indivíduos que não possuem uma mutação que confira a eles a susceptibilidade ao tumor daqueles tipos que acometem indivíduos que carregam uma mutação conhecida associada a esta doença (Tamas et al., 2015). Contudo, esta diferença não é absoluta, uma vez que o fator genético parece influenciar a probabilidade do surgimento do câncer, mesmo na presença de uma mutação específica (Tamas et al., 2015). O termo também é usado para descrever tumores em indivíduos que não possuem histórico familiar de câncer.

A PAF é uma doença autossômica dominante caracterizada por numerosos pólipos adenomatosos colorretais que têm uma tendência intrínseca para avançar a adenocarcinoma (Siegel et al., 2017). Usualmente, os pólipos são benignos durante a adolescência e o risco de formação de adenoma aumenta com a idade (Lee et al., 2015). Estes pólipos, geralmente menores que 1 cm, progridem a carcinoma por volta dos 35 anos de idade sendo o risco de desenvolver a doença proporcional ao tamanho e ao número de pólipos (Lee et al., 2015).

A PAF representa menos de 1% dos tumores colorretais, acomete igualmente homens e mulheres e nela as neoplasias ocorrem preferencialmente no cólon esquerdo. O CCHNP, também conhecido como síndrome de Lynch I e II, é uma doença autossômica dominante caracterizada pelo desenvolvimento de carcinoma colorretal como também por neoplasias no endométrio, intestino delgado, ureter ou pelve renal (Siegel et al., 2017) e é a forma mais frequente de câncer colorretal hereditário. No CCHNP, as neoplasias ocorrem preferencialmente no cólon direito, precocemente por volta dos 45 anos de idade e têm taxa elevada de tumores metacrônicos e sincrônicos (Lee et al., 2015). Como não existem sinais clínicos que possam predizer a susceptibilidade à síndrome, foram estabelecidos critérios (conhecidos como critérios de Amsterdã II e de Bethesda) a partir da história familiar para identificar pacientes de risco (Lee et al., 2015). Entre famílias com CCHNP, assim como com PAF, não somente a incidência de câncer colorretal é elevada, como também a neoplasia surge em idades mais jovens do que na população em geral, na qual 90% ocorre após 50 anos de idade (Sjo, 2008).

Dentre os principais fatores de risco para o desenvolvimento do CCR, destacam-se a predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino, histórico familiar de CCR e idade superior a 50 anos, uma vez que tanto a incidência quanto a mortalidade aumentam com a idade. Além disso, uma dieta baseada em gordura animal com baixa ingestão de frutas, vegetais e cereais, o consumo excessivo de álcool, o tabagismo e o sedentarismo contribuem para o aparecimento da doença (Wilschut et al., 2010; Brasil, 2013). As doenças intestinais inflamatórias, como a colite ulcerativa e a doença de Crohn, também são fatores de risco importantes; nesse caso, o risco para o CCR aumenta proporcionalmente com a gravidade e o tempo de doença inflamatória (Ueno, et al, 2010). Apesar disso, a maioria dos cânceres colorretais (cerca de 75%) ocorre de forma esporádica, surgindo de mutações somáticas e evolução do clone celular tumoral (Brasil, 2018).

O CCR pode se apresentar de maneira assintomática ou sintomática. O diagnóstico em pacientes assintomáticos normalmente ocorre durante a realização de exame de rastreio (pesquisa de sangue oculto, retossigmoidoscopia ou colonoscopia), recomendado para todos os pacientes acima dos 50 anos de idade (Lieberman, 2009). Os sintomas mais frequentes ao diagnóstico são presença de dor abdominal, alteração do hábito intestinal e hematoquezia ou melema, entre outros (Walling et al., 2014).

A história natural dessa neoplasia propicia condições ideais à sua detecção precoce, pois apresenta uma transição de criptas normais a adenoma e, posteriormente, a adenocarcinoma, durante um período de 10 a 20 anos, podendo chegar a 25 anos (Ogino et al., 2011). Evidências demonstram a redução da morbimortalidade associada à detecção precoce de lesões invasivas e precursoras de pólipos adenomatosos (PAs). Contudo, os sintomas podem não ser aparentes até o final do curso da doença e por essa razão o CCR é frequentemente diagnosticado em fase avançada (Tanaka, 2009).

O estadiamento do câncer colorretal segue o sistema TNM da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). A tabela 1 lista as classificações de T, N e M e o agrupamento em estádios (Gunderson et al., 2010) e estes são ilustrados na figura 2.

TABELA 1 Estadiamento clínico do câncer colorretal adaptado de AJCC 8ª Edição.

Estadio	Tumor Primário	Linfonodos Regionais	Metástases
0	Tis	N0	M0
I	T1-T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
	T3-T4a	N1	M0
IIIB	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4b	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	qqT	qqN	M1a
IVB	qqT	qqN	M1b

Tis: doença em estágio inicial, denominado carcinoma *in situ*; T1: o tumor se desenvolveu através da muscular da mucosa até a submucosa; T2: o tumor cresceu através da submucosa e se estende até a muscular própria; T3: o tumor cresceu através da muscular própria e nas camadas mais externas do cólon ou do reto; T4a: o tumor cresceu através da serosa, o revestimento externo dos intestinos; T4b: o tumor cresceu através da parede do cólon ou do reto ou invade os tecidos e órgãos próximos; N0: os linfonodos estão livres; N1: presença de células cancerosas em 1 a 3 gânglios linfáticos; N1a: presença de células cancerosas em 1 linfonodo; N1b: presença de células cancerosas em 2 a 3 linfonodos; N2: presença de células cancerosas em 4 ou mais linfonodos próximos; N2a: presença de células cancerosas em 4 a 6 gânglios linfáticos; N2b: presença de células cancerosas em mais de 7 linfonodos; M0: ausência de metástase à distância; M1a: a doença se disseminou para um órgão ou conjunto de linfonodos distantes; M1b: a doença se disseminou para mais de um órgão ou conjunto de linfonodos distantes ou se disseminou à partes distantes do peritônio.

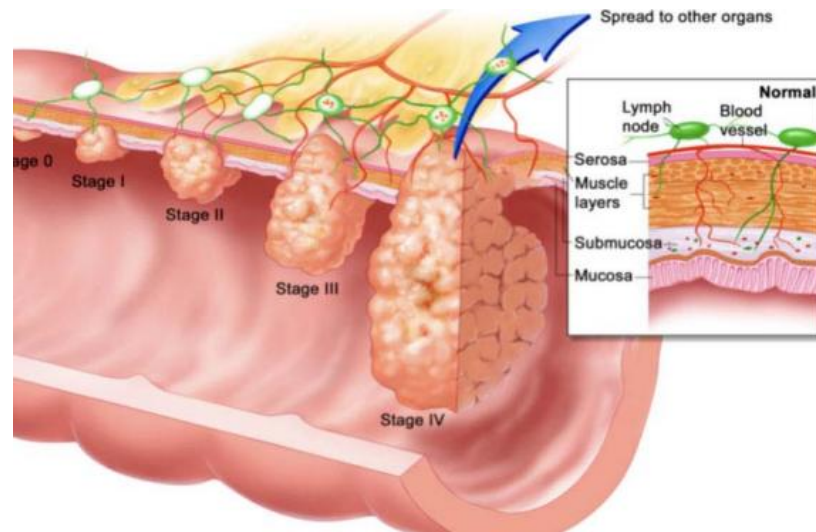


FIGURA 2 Estadiamento de tumores colorretais. O desenho ilustra uma seção do cólon com tumores em diferentes estadiamentos (0-IV; Figura: *National Cancer Institute*, EUA).

De forma resumida, no estádio 0, a doença está localizada somente na parte interna do cólon ou do reto, denominado carcinoma *in situ*; no estádio I, o tumor cresceu dentro da parte interna do cólon ou reto, mas não atravessou a parede intestinal; no estádio II, o tumor se estende mais profundamente dentro e na parede do cólon ou reto, mas as células cancerosas não infiltraram os gânglios linfáticos; no estádio III, o câncer se disseminou aos gânglios linfáticos próximos, mas não para outras partes do corpo e no estádio IV já houve disseminação para outros órgãos.

De acordo com o sistema de Estadiamento AJCC (2017), o prognóstico do CCR varia de acordo com a extensão da doença no momento do diagnóstico; 74% dos pacientes sem metástase (estádio I), perante 6% dos que apresentam a doença metastática (estádio IV), tem uma sobrevivência de 5 anos (Santos et al., 2019).

As modalidades terapêuticas disponíveis para o tratamento do CCR incluem a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia, sendo a maioria dos casos tratada cirurgicamente. Pacientes em estágio I a III são bons candidatos à ressecção cirúrgica com o objetivo de proporcionar cura, que dessa forma, é considerada a primeira opção de tratamento (Kordatou et al., 2014). Entretanto, sem tratamento adicional, 50% dos pacientes submetidos à ressecção cirúrgica apresentam recidiva e progressão da doença metastática. Assim, o uso de quimioterapia adjuvante é indicado nos pacientes estágio III e, em pacientes estágio II de alto risco de recidiva, com o objetivo de erradicar células tumorais residuais após a cirurgia (Jorgensen et al., 1995).

3.2 Epidemiologia do câncer colorretal

Foi publicado em 2018, pela IARC (*International Agency for Research on Cancer*), o último relatório contendo estimativas de incidência de cânceres no mundo, que coloca o CCR como a terceira neoplasia de maior incidência e a segunda maior causa de morte dentre os tumores, excetuando-se o câncer de pele não melanoma (Figuras 3 e 4).

Segundo Ferlay, et al., 2018, os tumores que acometem os pulmões, as mamas e o intestino grosso são os de maior incidência, logo após os tumores de pele não melanoma. No entanto ressalta que outros fatores podem influenciar os dados de incidência da doença.

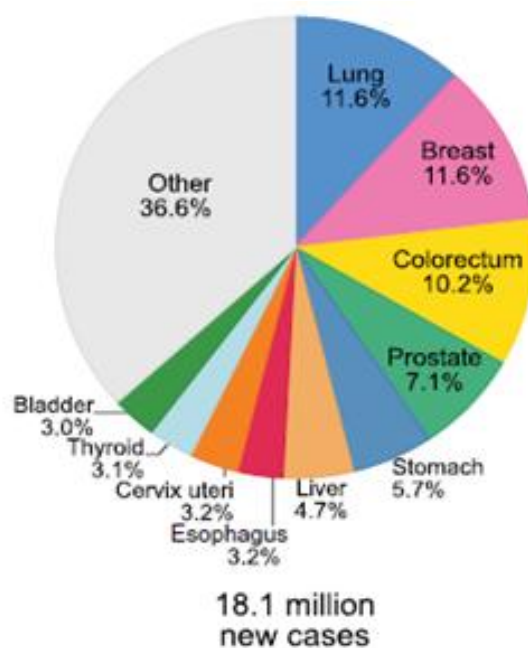


FIGURA 3 Dados mundiais de incidência de câncer em 2018. Dados GLOBOCAN quanto à incidência de novos casos para 2018, ambos os sexos. (GLOBOCAN, 2018)

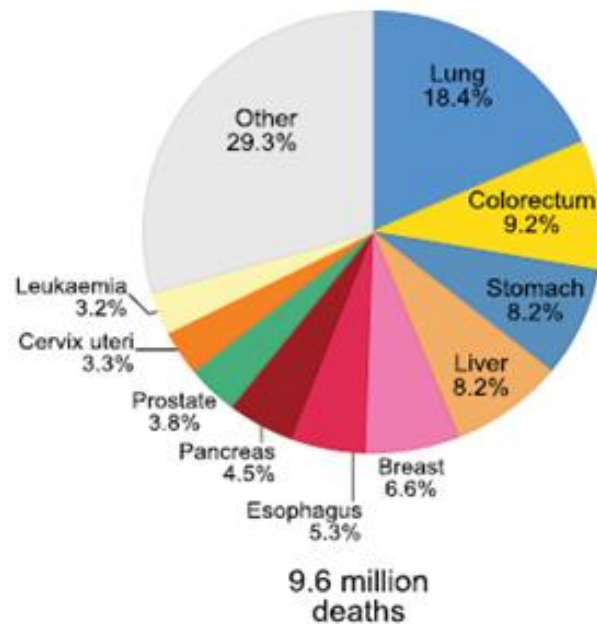


FIGURA 4 Dados mundiais de morte devido ao câncer em 2018. Dados GLOBOCAN quanto à incidência de morte para 2018, ambos os sexos. (GLOBOCAN, 2018)

No Brasil, segundo as estimativas da incidência de câncer para o triênio 2020-2022 (Brasil, 2020) o câncer colorretal constituirá a segunda neoplasia mais frequente para homens e mulheres, com uma estimativa de cerca de 20.520 (9,1%) e 20.470 (9,2%), respectivamente, de novos casos diagnosticados (Figura 5).

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esófago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

FIGURA 5 Dados de distribuição de cânceres para o Brasil no triênio 2020-2022. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma. (Brasil, 2019).

3.3 Carcinogênese e história natural do câncer colorretal

Os tumores colorretais constituem um excelente sistema para estudar tanto a carcinogênese quanto os eventos moleculares envolvidos no desenvolvimento do câncer devido à possibilidade de se obter material de uma variedade de pequenos adenomas até de tumores completamente desenvolvidos e com metástases (Tamas et al., 2015). A associação entre carcinoma e adenomas colorretais foi descrita inicialmente em 1978 por Hill, Morson e Bussey, com base em observações clínicas, epidemiológicas e histopatológicas, sendo conhecida atualmente como sequência “adenoma-carcinoma”. Segundo os autores, os adenomas são inicialmente causados por um agente ambiental que atua sobre as células colorretais de pessoas propensas a desenvolver adenomas, sendo que um novo agente ambiental faz com que pequenos adenomas cresçam, enquanto um outro agente faz com que os grandes adenomas tornem-se malignos (Brasil, 2004).

Pólipo é um termo genérico para qualquer excrescência ou crescimento saliente acima de uma membrana mucosa. Os pólipos podem ser pedunculados ou sésseis e são facilmente vistos por exame macroscópico ou endoscopia digestiva baixa convencional (Siege, et al., 2017). Os pólipos colorretais são histologicamente classificados em: neoplásicos (adenomas/adenocarcinomas), hamartomatosos (pólipo Juvenil, pólipo Peutz-Jeghers), inflamatórios (pólipo linfóide benigno) e sem-classificação (metaplásico ou hiperplásico) (Kleinbaum, 1995).

Adenoma é definido como uma lesão benigna circunscrita composta por estruturas tubulares e/ou vilosas mostrando neoplasia intraepitelial (Siegel et al., 2017). Os adenomas colorretais são tumores circunscritos bem demarcados compostos por células que apresentam as características de displasia epitelial e podem ser categorizados em três tipos histológicos: tubular, túbulo-viloso e viloso (Kleinbaum, 1995). São considerados como uma etapa intermediária da carcinogênese colônica (Kleinbaum, 1995; Carvalho et al., 2011), ou seja, muitos cânceres do cólon e do reto originam-se de adenomas benignos. O potencial de transformação maligna de um pólipo adenomatoso correlaciona-se com três fatores independentes: tamanho do pólipo, arquitetura histológica e grau de displasia epitelial (R: The R Project, 2017). Na sequência adenoma-carcinoma, em média, são necessários 5,5 anos para a transformação de um grande pólipo adenomatoso (> 1 cm) em câncer e, já para os pequenos pólipos, 10 anos em média. Na CCHNP, esta sequência encontra-se acelerada por mutações genéticas específicas (Lee et al., 2015; Sjo et al., 2008).

Neoplasia é um termo aplicado a ambos adenoma e carcinoma e a sequência adenoma-carcinoma engloba os estágios pré-invasivos e invasivos da neoplasia (Kleinbaum,

1995). No modelo de tumorigênese colorretal, os passos necessários para o desenvolvimento do câncer muitas vezes envolvem a ativação mutacional de um oncogene combinado à perda de vários genes que normalmente suprimem a tumorigênese (Therneau et al., 2017), denominados genes supressores de tumor. Neste modelo, a inativação destes genes é predominante (Santos Silva, 1999). Mutações em no mínimo 4 a 5 genes são necessárias para a formação de um tumor maligno enquanto poucas mudanças bastam para a tumorigênese benigna. Embora alterações genéticas frequentemente ocorram a uma sequência preferida, a acumulação total das alterações, em vez da sua ordem cronológica de alteração, é responsável pela determinação das propriedades biológicas do tumor. Em alguns casos, genes supressores de tumores mutantes surgem para exercer o efeito fenótipo (Santos Silva, 1999). No desenvolvimento do CCR, estudos mostram que existem no mínimo quatro vias de instabilidade genética que culminam com a transformação de uma célula normal em câncer. As principais vias são: a) via da instabilidade cromossômica – decorrente da inativação dos genes supressores de tumor e da ativação de proto-oncogenes – que engloba em torno de 85% dos casos de CCR esporádicos e os hereditários originados da PAF; b) via da hipermutabilidade – decorrente da inativação de um dos alelos dos genes envolvidos com o reparo do DNA – e é a base molecular da síndrome do câncer colorretal hereditário não associado à polipose (HNPCC) e de cerca de 15% dos CCR esporádicos (O’Connell et al., 2004; Nahas et al., 2015)

As alterações genéticas somáticas observadas nos oncogenes de tumores colorretais são do tipo: mutação pontual no gene ras (frequente nos adenomas maiores do que 1 cm), amplificação dos genes neu, c-myc e c-mycb, rearranjo nos genes trk (*Tropomyosin receptor kinase A*). Já as perdas de regiões cromossômicas específicas também são frequentes nestes tumores, tais como: 5q (alterando o gene APC), 17p (alterando o gene p53), 18q (alterando o gene DCC) (Santos Silva, 1999). Tanto fatores ambientais quanto hereditários contribuem para o desenvolvimento das neoplasias colorretais, permitindo o estudo de ambas alterações genéticas somáticas e hereditárias (Santos Silva, 1999).

A associação entre alimento, nutrição, atividade física e risco de CCR tem sido bastante estudada (Gold et al., 1965). Existe evidência convincente de que a atividade física protege contra o câncer de cólon e que o consumo de alimentos que contêm fibra dietética contra o câncer de cólon e de reto. Em contrapartida, são considerados como fatores de risco a ingestão de carne vermelha e carne processada, consumo de etanol proveniente de bebidas alcoólicas (em homens e, provavelmente, em mulheres), e à obesidade (exceções de gorduras corporal e abdominal) (Becerra et al., 2016).

É provável que o consumo de alho, leite e cálcio exerça proteção contra a doença (Thirunavukarasu et al., 2011). A evidência é limitada em relação ao caráter protetor contra o câncer colorretal dos vegetais sem amido, frutas e alimentos que contenham vitamina D (Nahas et al., 2015). A associação desta neoplasia ao consumo de queijos ou de alimentos que contenham ferro, gorduras animais ou açúcares também é limitada (Nahas et al., 2015). A evidência é menos consistente para alimentos que contenham ácido fólico, peixes e selênio.

O tabagismo está associado tanto à incidência quanto à mortalidade por CCR em ambos os sexos, sendo esta associação mais forte para o câncer de reto do que para o câncer de cólon (Hine et al., 1984; Laohavinij et al., 2010). O risco de morte em decorrência da neoplasia pode ser 20% a 30% maior entre fumantes comparado aos não-fumantes (Hemminki et al., 2020; Ostfeld et al., 2013).

Em relação ao consumo de álcool, uma revisão sistemática apontou um risco de adenocarcinoma colorretal 16% maior entre pessoas que consumiam bebidas alcoólicas comparado aos que não consumiam (Pelser et al., 2014). Também foi observado um gradiente dose-resposta no risco de acordo com o grau de consumo (7% no consumo leve, 23% no moderado e 37% no pesado) (Pelser et al., 2014).

O risco de desenvolver o CCR aumenta entre portadores de Diabetes Mellitus e é consistente em ambos os sexos (Rutter et al., 2012; Angell-Andersen et al., 2004). Uma revisão sistemática demonstrou um aumento de 30% no risco de desenvolver a doença e de 26% no risco de morte por ela comparado aos que não possuíam a comorbidade (Rutter et al., 2012). A insulino terapia esteve associada à neoplasia, com um risco 61% maior comparado aos que não utilizavam a terapia (Angell-Andersen et al., 2004). Estes resultados fornecem evidências para o possível papel da hiperinsulinemia ou fatores relacionados à resistência à insulina na carcinogênese colorretal (Rutter et al., 2012).

3.4 Rastreamento

Rastreamento ou *screening* é o exame de indivíduos assintomáticos buscando a identificação presuntiva de doença não reconhecida anteriormente. Com a utilização de exames clínicos e laboratoriais, em geral de realização rápida, os indivíduos são classificados em suspeitos ou não de ter determinada doença. Aqueles classificados como suspeitos devem se submeter a outros exames para um diagnóstico final. Os casos confirmados seriam então tratados (Eluf-Neto et al., 2000).

O rastreamento pode ser classificado em oportunístico ou populacional de acordo como é realizado (Brasil, 2010). No modelo oportunístico, buscando rastrear uma doença ou

um determinado fator de risco, os profissionais de saúde aproveitam o momento e oferecem exames às pessoas que procuram os serviços de saúde por algum outro motivo. Já no organizado, também conhecido como modelo de base populacional, instituições de saúde de abrangência nacional realizam ações sistematizadas e voltadas para a detecção precoce de uma determinada doença, condição ou risco. Estas ações são oferecidas à população-alvo assintomática e são disponibilizados meios diagnósticos complementares e tratamento dos casos de câncer confirmados, além de controle de qualidade em todas as fases do processo de rastreamento implementado (Brasil, 2010).

O câncer colorretal é susceptível ao rastreamento por se tratar de um grave problema de saúde com elevada incidência, morbidade e mortalidade. Possui história natural conhecida que possibilita a utilização de estratégias para a detecção precoce da neoplasia, uma vez que a maior parte dos cânceres nesta localidade evolui a partir de lesões benignas (pólipos adenomatosos) em um período pré-clínico de cerca de 10 a 15 anos (Brasil, 2003; López et al., 2014). Além do mais, o tratamento é mais efetivo quando a lesão é diagnosticada precocemente (Lopez et al., 2014).

Baseados nesta prerrogativa, diferentes estudos têm buscado avaliar as estratégias de rastreamento para o CCR. Destaca-se o pioneiro “*The National Polyp Study*” (NPS), um ensaio clínico multicêntrico randomizado realizado entre 1980 e 1985 nos Estados Unidos que buscou avaliar estratégias para a vigilância de pacientes após a polipectomia e para controle do câncer do intestino grosso, além de dar subsídios para a compreensão da história natural da doença (Winawer et al., 1992).

As estratégias são recomendadas de acordo com o grupo de risco para o desenvolvimento da neoplasia. O grupo de risco moderado, ou grupo esporádico, inclui homens e mulheres com 50 anos de idade ou mais sem outros fatores de risco associados. O grupo de risco elevado inclui pessoas com doença intestinal inflamatória, PAF ou CCHNP (Winawer et al., 1999).

Alguns métodos detectam tanto pólipos quanto câncer, enquanto outros detectam apenas o câncer (Levin et al., 2008). Os primeiros métodos são: colonoscopia, sigmoidoscopia flexível, enema opaco com duplo contraste ou enema opaco com contraste de ar e colonoscopia virtual (tomografia computadorizada do cólon e do reto). Já aqueles que apenas detectam o câncer são: pesquisa de sangue oculto nas fezes tradicional, teste de imunológico fecal (FIT) e DNA nas fezes.

A colonoscopia é realizada com um endoscópio que permite a visualização da superfície mucosa de todo o cólon. Quando realizada de maneira completa, atinge o ceco

(visualizando a válvula ileocecal ou orifício apendicular). Geralmente, exige sedação com administração de drogas intravenosas, dieta pobre em resíduos nos dias que antecedem o exame, lavagem intestinal, administração de laxantes e ingestão de muita água. A exploração completa do cólon deve ser feita durante a retirada do aparelho. O procedimento dura entre 20 e 40 minutos. Um resultado positivo significa ter que reexaminar completamente o cólon por colonoscopia em um outro momento (López et al., 2014; Levin et al., 2008).

A colonoscopia é considerada o método padrão-ouro para o rastreamento, embora até o momento não tenha sido realizado ensaio clínico randomizado para avaliar a sua efetividade. Está associada a alto custo, desconforto, complicação e necessidade de capacitação. A sigmoidoscopia flexível também é realizada com um endoscópio que permite a visualização da superfície mucosa até 60 cm da borda anal (reto, sigmóide e parte do cólon descendente) (Leavin et al., 2008).

Uma revisão sistemática investigou o efeito do rastreamento por sigmoidoscopia e por colonoscopia na incidência e na mortalidade por CCR em uma população com risco moderado (Brenner et al., 2014). Observou-se, com a sigmoidoscopia, redução importante nas taxas do CCR distal, mas não nas do proximal. Já com a colonoscopia, a mesma redução nas taxas do CCR distal foi observada somada a uma significativa redução na mortalidade por CCR proximal. O rastreamento do câncer colorretal entre homens e mulheres com mais de 50 anos de idade aumentou nas últimas três décadas nos Estados Unidos (Yang et al., 2009). Concomitante ao ocorrido observou-se redução nas taxas de incidência da neoplasia tanto em estádios precoces (in situ ou localizado ao diagnóstico) quanto em avançados (com metástases regionais ou à distância) neste grupo etário. Os autores estimaram uma prevenção entre 236.000 e 550.000 casos da doença no período (Brenner et al., 2014).

A relação custo-efetividade dos diferentes métodos de rastreamento para o CCR tem sido avaliada e mostra-se eficaz quando comparado à ausência de rastreamento (Lansdorp-Vogelaar et al., 2011). Não existe concordância em relação a qual método implementado seja mais eficaz ou tenha maior custo benefício por ano de vida ganho. Houve concordância de que os métodos recém-desenvolvidos (testes de DNA nas fezes, colonoscopia por tomografia computadorizada e cápsula endoscópica) ainda não foram eficazes em termos de custos em comparação com as opções de rastreamento já consagradas. No Brasil, a implantação de programas populacionais de rastreamento para câncer colorretal não é considerada viável e custo-efetiva (Brasil, 2010). Porém, recomenda-se fortemente que a estratégia de diagnóstico precoce seja implementada com todos os seus componentes: ampla divulgação dos sinais de alerta para a população e profissionais de saúde acesso imediato aos procedimentos de

diagnóstico dos casos suspeitos (o que implica ampliação da oferta de serviços de endoscopia digestiva e demais suportes diagnósticos) e acesso ao tratamento adequado e oportuno. Implantar um programa de rastreamento populacional organizado para o CCR tem sido a estratégia planejada para diferentes países para alterar o perfil epidemiológico da doença.

3.5 Diagnóstico

Um aspecto desfavorável ao câncer colorretal trata-se do seu desenvolvimento silencioso e o seu diagnóstico tardio, devido ao longo período em que as lesões e o tumor permanecem assintomáticos. Geralmente, quando a localização da neoplasia situa-se no cólon direito, mais tardio será o surgimento dos primeiros sintomas (Santos Junior, 2008).

De acordo com Silva e colaboradores (2008), o câncer colorretal é frequentemente diagnosticado em fase avançada, inclusive por pessoas assintomáticas submetidas ao rastreamento por colonoscopia.

Estudos avaliaram os métodos mais eficientes para o diagnóstico de lesão precursoras (pólipos), mais especificamente os adenomatosos. O diagnóstico clínico de pequenos pólipos é praticamente inexistente, pois são completamente assintomáticos. Raramente ocorrem cólicas ou sangramento, exceto quando as lesões apresentam-se maiores, mesmo assim dificilmente são prontamente diagnosticadas (Lopes et al., 2008).

A detecção precoce de pólipos adenomatosos colorretais e de cânceres localizados é possível pela pesquisa de sangue oculto nas fezes e através de métodos endoscópicos. Mesmo em países com recursos abundantes, como os EUA, têm-se encontrado dificuldades na realização de avaliação diagnóstica por exames endoscópicos em pacientes com presença de sangue oculto nas fezes, impossibilitando a implantação de rastreamento populacional. O objetivo dessa estratégia não é diagnosticar mais pólipos ou mais lesões planas, mas sim diminuir a incidência e a mortalidade por esse tipo de câncer na população-alvo. A história natural dessa neoplasia propicia condições ideais à sua detecção precoce (Brasil, 2018).

O exame proctológico quando realizado de forma sistemática pode influenciar os índices de mortalidade por câncer colorretal, especialmente quando este está localizado no segmento retal. Essa investigação deveria fazer parte da atividade do médico generalista. Neste cenário, o estudo de Santos Junior (2007) mostra que este não tem sido incorporado à prática médica, pois nos 330 pacientes com câncer colorretal que buscaram assistência na rede pública de saúde, deparou-se com os seguintes fatos: 78% foram orientados para tratamento de verminose ou hemorróidas, ausência de exames comprobatórios; 75% não foi solicitado para realizarem o exame proctológico; 69% tinham câncer retal e no cólon sigmóide distal;

82% dos tumores localizados no reto foram tocados, via anal. Esses pacientes buscaram os serviços de um hospital universitário ou clínica privada onde identificou-se que o retardo no tratamento foi de 8,5 meses, tempo suficiente para que a lesão neoplásica atingisse $\frac{1}{4}$ do intestino grosso. Sabe-se que 80% dos tumores colorretais localizam-se no segmento retal, com possibilidade serem detectados pelo toque retal, porém exames complementares devem ser solicitados (Santos Junior, 2007).

O enema opaco ou clister opaco foi, durante muitos anos, o exame padrão ouro para a investigação de doenças do intestino grosso. Atualmente tem seu uso restrito a um número menor e mais específico de casos, mas, realizado junto com a colonoscopia, ainda guarda valiosa importância em alguns casos (Brasil, 2018).

Em 1970, a colonoscopia revolucionou a propedêutica do intestino grosso, tornando-se um exame com maior sensibilidade e especificidade para a detecção precoce das lesões inflamatórias, neoplásicas e outras, complementa ainda os achados radiológicos duvidosos, permite a realização de biópsias em lesões não alcançadas pela retossigmoidoscopia. Exige para sua realização rigor no preparo mecânico intestinal, isto é, esvaziamento prévio de todo o conteúdo intestinal e sedação moderada (Brasil, 2018).

A colonoscopia é o método ideal para examinar todo intestino grosso. Além da detecção de pólipos, possibilita a remoção, prevenindo sua evolução para a malignidade e tornando-se também um método terapêutico (Lopes et al., 2008). A desvantagem principal da colonoscopia é não ser viável para a população em geral devido ao alto custo e pela necessidade de equipamentos e recursos humanos especializados. Sendo assim, deve ser indicada principalmente para pacientes que apresentam fatores de risco individuais ou familiares (Lopes et al., 2008).

Está cientificamente comprovado quanto à eficácia e segurança do exame colonoscopia periódica, auxiliada pelo exame proctológico e pesquisa de sangue oculto nas fezes, para todas as pessoas acima de 50 anos de idade, para todas as menores de 50 anos com história familiar de CCR ou na presença de sintomas e sinais intestinais suspeitos e para pessoas portadoras de doença intestinal inflamatória ou outros fatores de risco identificados (Santos Junior., 2007).

A biópsia é a retirada de um pequeno fragmento do tecido que se deseja determinar a natureza, com posterior análise minuciosa por patologista. A ultrassonografia, a tomografia computadorizada e a ressonância magnética são exames cuja utilidade se volta mais para estudo do estágio da doença, ou seja, do seu grau de evolução (Brasil, 2003).

3.6 Tratamento

A cirurgia foi o tratamento pioneiro que alterou o curso da área de oncologia, considerado até hoje um dos principais métodos terapêuticos. Estima-se que 60% dos pacientes oncológicos necessitem de cirurgia para o seu tratamento. Esta pode ser realizada para fins diagnóstico, preventiva, curativa ou paliativa (Brasil, 2008).

A cirurgia com finalidade curativa é indicada nos casos iniciais da maioria dos tumores sólidos. A ressecção curativa é possível quando todo câncer visível pode ser removido com suas margens cirúrgicas livres de lesão. Enquanto que a cirurgia paliativa tem o objetivo de reduzir a população de células neoplásicas ou controlar os sintomas que expõe o paciente ao risco de morte ou compromete a sua qualidade de vida. Pode-se citar como exemplos de tratamento paliativo a descompressão de estruturas vitais, o controle de hemorragias e perfurações, o controle da dor, o desvio aéreo, digestivo e urinário e, a retirada de uma lesão de difícil convivência devido ao seu aspecto e odor (Brasil, 2008).

Atualmente, houve uma grande evolução quanto a técnica cirúrgica aplicada no tratamento do câncer colorretal. Estudos têm demonstrado um benefício significativo em relação a aspectos como mortalidade operatória, preservação esfinteriana, recorrência local e sobrevida (Pinho et al., 2006).

A cirurgia de ressecção do intestino está indicada para a maioria das lesões colorretais, desde as com estadiamento 0 até IIIC, e algumas vezes recomendada para o estágio IV (presença de metástase), entretanto, neste caso considera-se uma cirurgia de cunho paliativa (Smeltzer et al., 2005).

Com o advento das cirurgias por meio da videolaparoscopia, esta oferece uma perspectiva inovadora em relação ao estadiamento laparoscópico e ultrassonográfico de lesões avançadas, procedimentos paliativos aos pacientes com câncer colorretal. Também permite a completa inspeção da cavidade, facilita a realização de ressecções limitadas ou derivações intestinais e a inserção de cateteres arteriais para infusão regional de drogas antineoplásicas (Campos, 2004). Ademais, associa-se as técnicas laparoscópicas com a menor morbidade e rápida recuperação, provendo palição efetiva em pacientes com a expectativa de vida limitada e grandes riscos de complicações relacionadas as condições nutricionais e reservas funcionais comprometidas pela neoplasia (Campos, 2004).

Geralmente, é possível interligar novamente as porções sadias do cólon ou do reto. Quando o procedimento é realizado em tumores da porção baixa do reto muitas vezes é necessária a realização de uma colostomia temporária ou permanente. Colostomia é um procedimento cirúrgico de exteriorização do cólon na parede abdominal (estoma) fornecendo

assim um novo trajeto para a saída do material fecal (isto é, um ânus artificial). Após a realização de uma colostomia, o paciente utiliza uma bolsa especial para a coleta do material fecal (Brasil, 2003).

Já a quimioterapia antineoplásica consiste no emprego de substâncias químicas, isoladas ou combinadas, com objetivo de atingir as neoplasias, entretanto, atua de forma não-específica ocasionando lesões tanto nas células benignas quanto malignas. Sua aplicação baseia-se na cinética do ciclo celular, na qual inclui o ciclo de vida celular, o tempo do ciclo celular, a fração de crescimento e o tamanho da massa tumoral. De acordo com a finalidade da quimioterapia antineoplásica, esta pode ser classificada em: curativa (almeja a erradicação da neoplasia); paliativa (melhorar a qualidade de vida atenuando os sintomas decorrentes da proliferação neoplásica e aumentar sua sobrevida); potencializadora (administrada simultaneamente com a radioterapia, buscando melhorar a relação dose terapêutica/dose tóxica do tratamento); adjuvante (realizada posteriormente ao tratamento principal, que pode ser cirúrgico ou radioterápico) e; neo-adjuvante (administrada previamente ao tratamento principal) (Brasil, 2008).

Após o estadiamento anatomopatológico da peça cirúrgica, deve-se iniciar a quimioterapia adjuvante de forma padrão para os tumores estágio III (com linfonodos metastáticos). No entanto, para tumores classificados com estágio II, porém com alto risco de recidiva (dosagem do antígeno carcinoembrionário no pré-operatório maior que 5ng/ml, lesões T4, presença de embolização tumoral vascular linfática ou venosa, infiltração tumoral perineural, tumores indiferenciados), a indicação de quimioterapia adjuvante também é adotada (Lopes et al., 2008).

Os significantes avanços realizados na pesquisa clínica oncológica sobre a prevenção, o tratamento, a sobrevivência e qualidade de vida puderam ser evidenciados por meio do relatório anual elaborado pela *American Society of Clinical Oncology* (ASCO). Em 2009, debateram-se grandes estudos clínicos sobre o tratamento do câncer colorretal e mama, sendo os principais temas da oncologia clínica.

As drogas antineoplásicas usualmente administradas no tratamento quimioterápico para o cancer colorretal são 5-fluorouracil (administrado antes ou depois da cirurgia para o tratamento metastático, comumente associado a radioterapia); oxaliplatina (administrada após a cirurgia ou em tratamento para doença metastática); irinotecano (frequentemente administrado quando presença de doença metastática) (*The American Cancer Society*, 2018).

Os principais efeitos colaterais da terapia antineoplásica para o câncer colorretal podem incluir a fadiga, náusea e vômito, diarreia, anorexia, alopecia, edema em membros,

erupções e feridas na garganta e boca. Devido a quimioterapia danificar a produção de células sanguíneas pela medula óssea, alguns pacientes podem apresentar baixa contagem de células sanguíneas, fator este que aumenta a predisposição a infecção, sangramento ou hemorragias e hematomas por pequenas injúrias (*The American Cancer Society*, 2018).

Na radioterapia, utilizam-se os radioisótopos em doses elevadas visando seu efeito deletério da radioatividade sobre determinados tecidos. O objetivo principal da radioterapia é alcançar um índice terapêutico favorável, conduzindo as células malignas a perderem sua clonogenicidade e, simultaneamente, preservando os tecidos normais. A radioterapia pode ser realizada com as fontes emissora de radiação a curta distância do paciente, aproximadamente 1 metro, conceituada essa técnica como teleterapia. Enquanto que, a braquiterapia é quando as fontes emissoras de radiação são inseridas dentro de reservatório metálico e aplicados a poucos centímetros dos tumores (Brasil, 2008). Sendo assim, a radiação pode ser feita através de uma máquina externa (radiação externa) ou de um implante (um pequeno dispositivo composto por material radioativo) colocado diretamente no interior ou próximo ao tumor (radiação interna) (Brasil, 2003).

A dose de radioterapia deve ser calculada entre 4.500 cGy e 5.040 cGy, com duração de 4 a 5 semanas associada a quimioterapia sistêmica (Lopes et al., 2008). Os efeitos colaterais da radioterapia para o câncer colorretal incluem irritação cutânea leve, náuseas, diarreia, irritação retal, urgência em defecar, irritação urinária, fadiga ou problemas sexuais. Esses efeitos colaterais frequentemente desaparecem após o tratamento completo (*The American Cancer Society*, 2018).

Destaca-se ainda que os tratamentos aos quais os pacientes com câncer colorretal são submetidos, acarretam consequências como colostomia, alteração da imagem corporal e auto-estima, dificuldades da manutenção de atividades sociais, laborativas e de lazer, comprometendo a reabilitação e a qualidade de vida do paciente e seus familiares (Sonobe et al., 2002).

3.7 Marcadores tumorais

Biomarcadores são definidos como moléculas biológicas encontradas no sangue, outros fluidos corpóreos ou tecidos que sinalizam processos normais e anormais, condições ou doenças e sua utilização em diferentes campos da prática clínica tem crescido (Langan, et al. 2013). A definição de biomarcadores comumente se referem às moléculas de DNA, RNA, microRNA (Mirna), alterações epigenéticas ou anticorpos (Gustaw, et al. 2016). O termo marcador tumoral se refere à substâncias como proteínas e glicolipídeos, que representam

estruturas biológicas, nas quais podem ser atribuídas ao desenvolvimento de células normais ou tumorais. Para alguns tipos tumorais, os marcadores são considerados importantes indicadores no monitoramento da progressão do tratamento, eficácia da terapia neo-adjuvante, cirurgia, quimioterapia adjuvante, radioterapia e possibilidade de recorrência (Gustaw, et al. 2016).

3.7.1 CXCR4

A descoberta de que a disseminação metastática de células tumorais compartilha o mesmo sistema de sinalização quimiotática (Müller et al., 2001; Zlotnik et al., 2006) utilizado no tráfico de leucócitos revelou um importante papel das quimiocinas na progressão e malignização tumoral (Kruizinga et al., 2009).

Alterações na expressão das quimiocinas ou de seus receptores são frequentemente evidenciadas em diversas condições patológicas como doenças neurodegenerativas e tumores cerebrais (Balkwill, 2004; Savarin-Vuillat et al., 2007). Receptores de quimiocinas foram identificados em gliomas e diversos relatos sobre suas funções no desenvolvimento tumoral estão descritos da literatura (Bajetto et al., 2002).

As quimiocinas são pequenas citocinas quimiotáticas caracterizadas pela sua habilidade de induzir a migração celular em direção a um gradiente de quimiocinas (quimiotaxia) por meio da ligação com um receptor. Existem aproximadamente 50 ligantes e 20 receptores divididos em quatro subfamílias de acordo com o número e posição dos resíduos de cisteínas na porção N-terminal: C, CC, CXC e CX₃C. As quimiocinas também são classificadas como homeostáticas ou inflamatórias de acordo com sua expressão constitutiva ou induzida por inflamação, respectivamente. Os receptores de quimiocinas são receptores transmembranares acoplados à proteína G que captam sinais extracelulares e ativam vias de transdução de sinal no interior da célula. Interessantemente esta grande família de proteínas exercem seus efeitos pleiotrópicos não somente na migração dos leucócitos, mas também em outras células originárias de diversos tipos de tecidos que expressem receptores de quimiocinas. Atuam também em vários aspectos do desenvolvimento cardíaco e neuronal, homeostasia e funcionamento do sistema imune. São amplamente expressos no sistema nervoso central (SNC), nos neurônios e nas células da glia (Zagzag et al., 2006).

A proteína CXCR4 (Figura 6) é um receptor de quimiocina e um provável marcador da disseminação de células neoplásicas para órgãos específicos. As quimiocinas (do grego, *kinos* = movimento) são uma família de citocinas ou proteínas secretadas por células. Seu nome é derivado da sua habilidade de induzir quimiotaxia em células responsivas. A função

principal das quimiocinas é agir como quimio-atraente para guiar a migração celular. Células que são atraídas por quimiocinas seguem um sinal de aumento da concentração até o local fonte. Muitas quimiocinas controlam células do sistema imune durante o processo de imunovigilância. Outras têm um papel importante no desenvolvimento, promovendo angiogênese ou guiando células para tecidos específicos. Ainda há quimiocinas que são inflamatórias, liberadas a partir de uma ampla variedade de células em resposta a infecções bacterianas, virais, e após a inoculação de agentes que causam danos físicos tais como sílica ou cristais de urato. O receptor CXCR4 desencadeia seus efeitos biológicos por meio da interação com a quimiocina ligante, CXCL12 (SDF-1), uma molécula endógena com potente atividade quimiotática (Muller et al., 2001; Dontu et al., 2003; Balkwill, 2004; Kulbe et al., 2004; Laurence, 2006) O complexo CXCR4- SDF1 induz uma mudança de conformação do receptor resultando na ativação da proteína G. Este mecanismo ativa uma série de vias de sinalizações intracelulares que desencadeiam inúmeros efeitos biológicos, como sobrevivência, proliferação e invasão celular contribuindo com o desenvolvimento do câncer. Estes efeitos podem resultar de uma ação autócrina, parácrina ou indireta (Luker et al., 2006). A expressão de CXCR4 em células tronco tumorais (CTTs) tem sido sugerida como um mecanismo importante para a disseminação metastática (Muller et al., 2001; Murphy, 2001). Ele é o receptor de quimiocinas mais comumente expresso por células tumorais e foi identificado em mais de 20 tipos de tumores (Zlotnik, 2004). O seu ligante está altamente expresso em linfonodos que são sítios frequentes de metástase do carcinoma da mama.

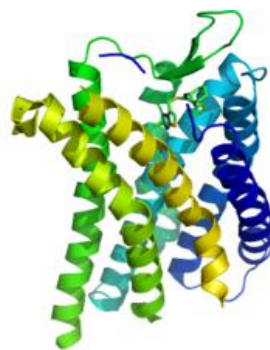


FIGURA 6 Proteína CXCR4. Estrutura tridimensional de CXCR4 (Pawig et al., 2015).

Adicionalmente, o bloqueio do CXCR4 inibe a disseminação metastática *in vivo* e a sua expressão está relacionada com pior prognóstico em pacientes com câncer de mama sem metástase para linfonodos axilares (Smith et al., 2004; Liang et al., 2005). A expressão nuclear da proteína CXCR4 é positiva em 22% das células ductais normais, em 45% dos

tumores ductais *in situ* e 67% dos carcinomas invasivos da mama. A elevada expressão nuclear do CXCR4 esteve associada com metástase à linfonodos, e, a forte marcação citoplasmática de CXCR4 esteve associada a tumores de maior grau histológico, RE (receptor de estrógeno) negativo, RP (receptor de progesterona) negativo e HER2 positivo. Uma menor sobrevida foi observada em pacientes com forte expressão nuclear e citoplasmática deste receptor (Salvucci et al., 2006).

Pesquisas com marcadores moleculares de metástases mostraram a migração direcionada de células tumorais de mama, que superexpressam a proteína CXCR4, a órgãos-alvo que expressam altos níveis de CXCL12. Constataram também que esta quimiocina induz a polimerização da actina e, que a incubação das células tumorais com anticorpo anti-CXCR4 ou anti-CXCL12 bloqueia a capacidade de quimiotaxia e invasão mediada pelo CXCL12 (Muller et al., 2001).

CXCR4 é altamente expressa em diversos tipos de câncer, tais como adenocarcinomas de cólon e reto, câncer gástrico, tumor de esôfago, de pâncreas, tumores hepáticos, tireóide e mama e está associado com a proliferação, metástase e invasão, especialmente contribuindo para a carcinogênese e progressão tumoral (Staller et al., 2003; LV et al., 2014).

Trabalhos indicam que CXCR4 participa da metástase e invasão em tumores de cólon e reto. Chao e colaboradores (2018), demonstraram que CXCR4 está intimamente relacionada à metástase linfonodal. Até o momento, estudos apontam que a função quimiotática de CXCR4 é um alvo efetivo para o tratamento de metástases tumorais. No CCR, o acometimento de linfonodos é um parâmetro prognóstico de extrema importância clínica (Rossler, 2017). A AJCC e UICC (*Union for International Cancer Control*) recomendam o uso de terapia adjuvante em paciente com linfonodos metastáticos (Engstrom, 2009). A alta expressão de CXCR4, tanto nuclear quanto citoplasmática podem estar, significativamente, correlacionada à invasão linfática, na qual pode promover a metástase hepática a partir de tumores primários de cólon e reto (Amara et al., 2015), sendo a causa predominante de mortalidade em decorrência da doença (Kim et al., 2005). Estudos prévio indicam a alta concentração de CXCL12, ligante de CXCR4, em células extraídas do parênquima hepático (Muller et al., 2001). Vias de sinalização como Wnt/ β -catenina e PI3K-AKT são relatadas por contribuir na invasão e angiogênese em cânceres quando relacionados à CXCR4 (Hu et al., 2014). Segundo Xinfeng (2019), apesar de miRNAs estarem envolvidos na invasão e metástase guiados por CXCR4, estes eventos permanecem pouco explorados.

3.7.2. CD26

A exoprotease CD26 é uma glicoproteína constituída pelos domínios extracelular, transmembrana e citoplasmático, expressa na forma dimérica em uma variedade de tipos celulares (Figura 7) (Rasmussen et al., 2003; Havre et al., 2008; Cordero et al., 2009). Embora seja encontrada principalmente ancorada na membrana das células, esta proteína também possui uma forma solúvel (sCD26) enzimaticamente ativa em fluidos biológicos (Havre et al., 2008). A sCD26 não possui a região transmembrana e os resíduos citoplasmáticos, e também é expressa na forma dimérica (Lambeir et al., 2001).

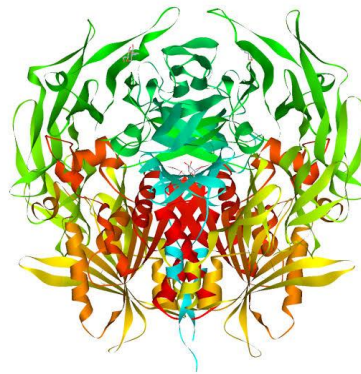


FIGURA 7 Proteína CD26. Estrutura tridimensional de CD26. (Protein Data Bank, 2006)

As diferentes funções da CD26 se relacionam com processos envolvidos na progressão tumoral. Tendo em vista a diversidade de substratos clivados por ela, esta regula diversos processos fisiológicos como migração, adesão, invasão, apoptose e imunomodulação (Havre et al., 2008). O fator derivado de células estromais (SDF-1 ou CXCL12) tem sido descrito como um dos principais substratos da CD26 relacionado com a carcinogênese.

Por meio da ativação do receptor CXCR4, SDF-1 atua promovendo metástases, e desempenha um papel importante na angiogênese, recrutando células endoteliais progenitoras da medula óssea, além de promover o crescimento tumoral e contribuir para vias de imunossupressão (Mukherjee et al., 2013).

Além disso, o complexo CD26-adenosina deaminase (ADA) facilita a degradação da adenosina no meio extracelular. Alguns tipos de câncer são acompanhados por uma baixa expressão da CD26, causando assim uma redução nas atividades da CD26 e da ADA. Esta redução por sua vez, leva a conseqüente diminuição na degradação local de SDF-1 e de adenosina. Foi demonstrado que o nucleosídeo adenosina promove angiogênese, estimula a motilidade e crescimento celular, suprime o sistema imunológico e facilita a sobrevivência de

tumores (Mujoondar et al., 2004; Tan et al., 2004; Antonioli et al., 2013). Ainda, ao interagir com proteínas da matriz extracelular, como colágeno e fibronectina (Cheng et al., 2003), CD26 se relaciona com processos de adesão, migração celular e metástase. Também participa de diferentes vias de sinalização através da associação com o receptor CXCR4 (Herrera et al., 2001; Thompson et al., 2007; Havre et al., 2008).

Regula a expressão de diversas moléculas de adesão, proteínas relacionadas à transição epitelial-mesenquimal (TEM) e invasão, como as metaloproteinases (Kajiyama et al., 2003; Pang et al., 2010). Tendo em vista estas funções, CD26 pode controlar a transformação neoplásica regulando diversos processos biológicos como a diferenciação celular, adesão, imunomodulação e apoptose (Arscott et al., 2009). Embora a relação entre a CD26 e a progressão tumoral já tenha sido amplamente estudada, a expressão desta enzima em diferentes tipos de tumores ainda é contraditória, apresentando níveis aumentados em alguns tumores e diminuídos em outros (Havre et al., 2008; Beckenkamp et al., 2016).

Alguns estudos descrevem que a expressão da CD26 está associada com a malignidade tumoral, como descrito para neoplasias hematológicas (Sato et al., 2005; Havre et al., 2009), câncer colorretal (Pang et al., 2010), mesotelioma maligno (Okamoto et al., 2014), sarcoma de Ewing (Lu et al., 2011), câncer de mama (Choi et al., 2015), carcinoma urotelial (Liang et al., 2017) e de tireóide (Lee et al., 2017). Também tem sido descrita recentemente como um marcador de células tronco tumorais (Davies et al., 2015).

Por outro lado, diversos estudos indicam que a CD26 atua como um supressor tumoral, como demonstrado em câncer de ovário (Kajiyama et al., 2002; Kikkawa et al., 2003), próstata (Wesley et al., 2005), não-pequenas células de pulmão (Wesley et al., 2004), endometrial (Mizokami et al., 2004), melanoma (Wesley et al., 1999), neuroblastoma (Arscott et al., 2009) e glioma (Busek et al., 2012).

A presença de sCD26 em fluidos biológicos está relacionada com a secreção ou extravasamento desta proteína por diferentes tipos celulares, especialmente pelos linfócitos T, porém ainda não se sabe se este processo é regulado ou não (Cordero et al., 2009). Em alguns tipos celulares foi demonstrado que a liberação da ssCD26 ocorre por meio da clivagem desta proteína da membrana celular por metaloproteinases (Rohrbom et al., 2014).

Recentemente, diversos estudos tem demonstrado que sCD26 apresenta-se como um promissor biomarcador em diferentes neoplasias. Estudos demonstraram que pacientes com carcinoma colorretal apresentam elevados níveis desta enzima no soro quando comparados a indivíduos saudáveis (de la Haba et al., 2002). Além disso, foi demonstrado que pacientes com metástases apresentavam níveis ainda mais elevados de sCD26.

Assim, esta proteína tem seus níveis aumentados, de forma gradativa, acompanhando os estágios da doença, o que a caracteriza como um indicador de malignidade (Lam et al., 2014). A presença de células tumorais CD26+ circulantes também foi associada ao pior prognóstico e maiores taxas de recorrência em pacientes com câncer colorretal (Lieto et al., 2015). Já em melanoma foi demonstrado que a perda de expressão de CD26 é um evento importante para o desenvolvimento deste tipo de câncer. Pacientes com melanoma apresentam baixa expressão desta proteína e reduzida atividade enzimática no soro (Roesch et al., 2006; Matic et al., 2012). Da mesma forma, pacientes com câncer de próstata metastático apresentam baixos níveis de atividade de sCD26 quando comparados com pacientes com a doença localizada e indivíduos saudáveis (Nazarian et al., 2014). A sCD26 também já foi proposta como um marcador auxiliar no diagnóstico e prognóstico de pacientes com câncer de pulmão (Blancoprieto et al., 2015), gástrico (Boccardi et al., 2015) e mesotelioma maligno (Fujimoto et al., 2014).

Tendo em vista a relação da CD26 com diferentes tipos de câncer, esta proteína vem sendo explorada como um possível alvo terapêutico para o tratamento desta doença. Estudos tem demonstrado que pacientes diabéticos com leucemia mielóide crônica que utilizam inibidores de CD26 apresentam maior sobrevida e redução nos níveis da oncoproteína BCR/ABL1 (Herrmann et al., 2014). Além disso, foi descrito que o uso de vildagliptina pode reduzir a ocorrência de metástases em um modelo *in vivo* de camundongos com câncer colorretal (Jang et al., 2015). Ainda foi demonstrado que a sitagliptina é capaz de reduzir a proliferação celular, a formação de colônias e a tumorigênese em modelos de câncer de mama (Choi et al., 2015).

Recentemente um estudo com carcinoma de tireóide revelou que o tratamento com sitagliptina é capaz de reduzir a formação de colônias, a migração e invasão, *in vitro*, bem como dificultar o crescimento tumoral *in vivo* (Lee et al., 2017). O uso de anticorpos anti-CD26 também vem sendo avaliado, e em carcinoma renal, linfoma e mesotelioma maligno já foi demonstrado seus efeitos reduzindo o crescimento tumoral e aumentando a sobrevivência (Ho et al., 2001; Ohnuma et al., 2002; Inamoto et al., 2006 e 2007; Angevin et al., 2017).

3.7.3 TEM e CTT

A característica que confere a malignidade das neoplasias e que também é a principal causa por mais de 90% das mortes associadas ao câncer, está relacionada à habilidade das

células neoplásicas de invadir, migrar e colonizar outros tecidos, gerando sítios tumorais secundários (metástases) em órgãos distantes (Diepenbruck, 2016).

A TEM é caracterizada pela capacidade das células epiteliais sofrerem transição mesenquimal. Este processo é conhecido fisiologicamente na embriogênese e cicatrização de feridas, mas também é descrito em processos patológicos como as neoplasias. Em neoplasias, este processo está relacionado à aquisição de características que permitam a migração, invasão e metástases, como, perda da adesão célula-célula e de polaridade, aquisição de motilidade, invasividade e características de células tronco (Li et al., 2015).

A TEM pode ser revertida, e essa reversão tem sido implicada no estabelecimento das metástases, ou seja, as células sofrem TEM, adquirem características favoráveis para a migração, invasão e evasão à resposta imune, migram para o tecido alvo, e sofre o processo inverso e readquire características epiteliais. Portanto, TEM provavelmente é sustentada por modificações moleculares transitórias induzidas por fatores do microambiente tumoral, como hipóxia, por exemplo (Li et al., 2015). Cannito e colaboradores (2008) demonstraram em linhas celulares de hepatoblastoma humano, carcinoma pancreático, carcinoma de colón e carcinoma mamário, que, ao serem submetidas a condições de hipóxia, todas as linhas celulares estudadas sofreram modificações clássicas da TEM, tais como, fenótipo mesenquimal com translocação nuclear de *Zinc Finger Factor Snail* (SNAIL) e β -catenina, e aumento das características de motilidade e invasividade. Além disso, os autores observaram que os eventos iniciais da TEM foram dependentes do aumento transitório de espécies reativas de oxigênio intracelular, enquanto, migração e invasividade foram sustentadas por mecanismos dependentes de fatores induzidos por hipóxia alfa (HIF1 α) e fator de crescimento endotelial e vascular (VEGF) (Rotzschke et al., 1993). Dessa maneira, a reversibilidade da TEM vem sendo cada vez mais relacionada a mecanismos reguladores epigenéticos, os quais permitem a reprogramação celular de maneira eficiente e facilmente reversível (Li et al., 2015; Bottoni et al., 2016).

A proteína vimentina tem mostrado participação em grande número de funções críticas, frequentemente relatada na organização das proteínas envolvidas na adesão, migração e sinalização celular além de ancorar o núcleo das células e o posicionamento de suas organelas no citoplasma, sendo, portanto, uma molécula integradora mecânica do citoplasma celular. Apesar de diversas funções terem sido descobertas por meio de estudos dirigidos para a regulação da vimentina associada à sua fosforilação, suas funções são ainda desconhecidas. (Weber, 1980; Ivaska et al., 2007; Lazarides, 1980).

Já o conceito de CTT, também conhecidas como células iniciadoras de tumor, foi primeiramente introduzido em leucemias, no entanto, sua existência em tumores sólidos também tem sido relatada (Maccalli et al., 2014). As CTT são caracterizadas pela capacidade indefinida de auto renovação e diferenciação, estão em pequeno número em uma população de células neoplásicas, são resistentes à quimioterapia e radioterapia, permanecem na fase estacionária do ciclo celular, possuem alta capacidade metastática e expressam marcadores de células tronco (Ishiwata, 2016). Dois principais modelos tentam explicar a hierarquia tumoral: o modelo estocástico ou da evolução clonal, e o modelo de células tronco cancerosas. No modelo estocástico acredita-se que qualquer célula dentro de um tumor seja capaz de dar origem a outros tumores e possibilitar a progressão tumoral. Já o modelo de CTT propõe que estas células representam um conjunto biologicamente distinto da população total de células cancerosas. São as CTT que mantêm o tumor através da sua capacidade de auto renovação e são elas a explicação para a resistência à quimioterapia/radioterapia (Plaks, Kong et al. 2015). Embora sejam extensivamente estudadas, um ponto importante na existência das CTT permanece por esclarecer: a sua origem. Há especulações de que as CTT são originadas de células tronco adultas teciduais que sofreram transformações por agentes carcinogênicos originando CTT e levando a formação do tumor, ou são células adultas que ao se transformarem adquiriram as características de células tronco (Islam et al., 2015). No entanto, a relação entre TEM e CTT é inquestionável. É descrito que células tumorais circulantes coexpressam marcadores de TEM e CTT (Plaks et al., 2013; Plaks et al., 2015). O estado de pluripotência celular é mantido por fatores conhecidos como *stem cell factors*, os quais são fisiologicamente silenciados durante a diferenciação celular como consequência da metilação do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) ou remodelamento da cromatina.

Alguns dos fatores descritos são *sex determining region Y-box 2* (SOX2), *Octamer-binding transcription factor 4* (Oct3/4), *Krüppel-like factor 4* (KLF4), *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog* (c-Myc), *hes family bHLH transcription factor 1* (Hes1) e *Nanog homeobox* (NANOG), e ambos têm sido identificados em diferentes tipos de neoplasias e relacionados às características de pluripotência celular (Vlashi et al., 2015). Já o estado pós TEM é caracterizado pela redução ou ausência de marcadores epiteliais como E-caderina e β -catenina, e aquisição de marcadores mesenquimais como N-caderina e vimentina. Além desses marcadores, diferentes fatores de transcrição estão relacionados a manutenção deste estado, como, *Zeb 1/2*, *SNAIL*, *snail family transcriptional repressor 2* (SNAI2) e *twist family bHLH transcription factor 1/2* (TWIST 1/2). Interessantemente, a indução da superexpressão destes fatores de transcrição de TEM induzem o estado de

pluripotência celular. Ainda, alguns autores sugerem que CTT representam um estado intermediário de TEM, onde expressam baixo a moderado nível de marcadores epiteliais, mas ao mesmo tempo, expressam marcadores mesenquimais exibindo suas características (Abell et al., 2014; Lin et al., 2015). Muitas outras vias de sinalização são ainda relacionadas à TEM e CTT. A sinalização mediada por tirosinas quinases não receptoras Src, por exemplo, tem sido associada a ambas (Ungefroren, Sebens et al. 2011; Thakur, Trivedi et al. 2015). Diante de tantas reprogramações genéticas sofridas que resultam em alterações fenotípicas, a imunogenicidade destas células também sofre alterações. A TEM e CTT podem favorecer a evasão a resposta imune tumoral através de diferentes mecanismos, levando a imunossupressão (Chen et al., 2014).

Para a identificação das CTT, um dos primeiros marcadores utilizados foi a glicoproteína transmembranar CD133, também conhecido como prominin-1, cuja expressão prediz fortemente um pior prognóstico (O'Brien et al., 2007; Ricci et al., 2007). Os níveis de CD133 são inversamente correlacionados com a sobrevida global em 5 anos e as taxas de sobrevida livre de doença em pacientes com câncer incluindo câncer colorretal (CRC) (Chen et al., 2013). Estudos mostraram que pacientes com perfil genético positivo para CD133 combinado a CD44, em tumores gástricos, apresentam taxa de sobrevida menor do que os pacientes com expressão negativa para ambos marcadores (Yoshino et al., 2012).

3.7.4 GAPDH

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) é uma enzima glicoproteica que cataliza a conversão reversível de *glyceraldehyde-3-phosphate* (G-3-P) para *1,3-diphosphoglycerate*. GAPDH participa de numerosas funções celulares, além dos efeitos glicolíticos, como por exemplo, replicação e reparo do DNA, endocitose, exocitose, organização do citoesqueleto, metabolismo do ferro, carcinogênese, morte celular além de contribuir para o transporte do tRNA ao citoplasma (Colell et al., 2009; Sheokand et al., 2014). Apesar de GAPDH ser comumente usado como controle interno, sua expressão varia em diferentes linhagens celulares humanas (Caradec et al., 2010). Aumento dos níveis de expressão de GAPDH foi observado em diversos tipos de câncer e frequentemente estão relacionados à redução de sobrevida (Altenberg et al., 2010; Guo et al., 2013). GAPDH é também considerado um agente pró-apoptótico (Colell et al., 2009; Nakajima et al., 2007), portanto, sua desregulação em tumores indica funções inconsistentes dessa enzima na determinação do destino celular (Colell et al., 2009; Guo et al., 2013). Entretanto, os

mecanismos envolvidos na regulação de GAPDH relacionados ao câncer, permanecem pouco claros.

GAPDH é regulado em um nível transcricional e sua diversidade funcional é altamente afetada por modificações pós-traducionais em diferentes resíduos de amino ácidos (Colell et al., 2009). Além disso, muitas moléculas regulam não apenas os níveis de mRNA, mas também afetam funções de GAPDH relacionadas ao câncer (proliferação, formação tumoral, quimiorresistência, etc) (Nicholls et al., 2012).

Embora o GAPDH seja expresso na maioria dos tipos de células com função enzimática, é frequentemente usada como molécula de controle para a expressão de outros genes em vários contextos experimentais. Estudos recentes mostraram que, além de sua função conhecida como enzima glicolítica, o GAPDH pode desempenhar papéis importantes em diversos processos celulares que pode afetar as funções de múltiplas moléculas que interagem com ele mesmo (Nicholls et al., 2011). Análises gênica e proteica de GAPDH no câncer de pâncreas e pulmão, indicaram sua alta taxa de expressão (Tokunaga et al., 1987; Schek et al., 1988; Mikuriya et al., 2007), indicando que o aumento da expressão de GAPDH pode estar associado com proliferação celular e tumorigênese. Consistentemente, verificou-se que a expressão do gene GAPDH é regulada em células transformadas em oncogene e no câncer de próstata humano de diagnóstico tardio (Persons et al., 1989; Rondinelli et al., 1997), sugerindo que o aumento da expressão de GAPDH pode estar relacionada à progressão do tumor.

3.7.5 Ki67

O Ki67 é uma proteína nuclear expressa em todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e M), e que, todavia, está ausente na fase G0 (não ciclantes). A função precisa do antígeno Ki67 ainda é pouco conhecida, mas tem sido sugerido que esta proteína está possivelmente associada ao nucléolo e aos componentes fibrilares, e ainda parece desempenhar um papel essencial na síntese de ribossomos durante a divisão celular. Estudos têm demonstrado que a expressão imuno-histoquímica da proteína Ki67 apresenta correlação com o potencial proliferativo de tumores sólidos malignos (Zheng et al., 2009; Rapidis et al., 2009). A determinação do índice de proliferação celular em neoplasias através do anticorpo monoclonal Ki67 constitui um meio rápido e simples de avaliação da fração de crescimento das populações celulares humanas normais e neoplásicas (Hal et al., 1988).

Estudos indicam que o índice de expressão de Ki67 prevê a progressão do câncer incluindo o CCR, no entanto, não é utilizado como preditor de prognóstico ou terapias quando sua avaliação não inclui a correlação com outros marcadores, uma vez que não indica um estágio preciso e não é caracterizado como um marcador de tratamento (Melling et al., 2016).

Ki67 estabelece correlação com o alto ou baixo grau histológico de inúmeras neoplasias, associa-se a altas taxas de proliferação celular e favorece um menor tempo de sobrevida livre de doença e tem sido utilizado como um índice importante na avaliação do prognóstico do câncer de mama (Yi et al., 2019). Apresenta elevado nível de expressão em células malignas, no entanto, é pouco detectada em células normais. Sua análise combinada a outros marcadores moleculares pode torná-lo um importante biomarcador para diagnóstico e uso terapêutico.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliação do perfil de expressão gênica e produção recombinante de CXCR4, CD26, associados à marcadores TEM, CTT e de proliferação celular, associados aos tumores de cólon e reto, em amostras de adenocarcinoma humano, com lesão primária, em diferentes estádios .

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão gênica de CXCR4, CD26, marcadores de diferenciação celular (e-caderina e vimentina), de iniciação tumoral (CD133) e proliferação celular (Ki67 e GAPDH) em biópsia de tumores de cólon e reto;
- Determinar a correlação entre os dados de expressão gênica gerados e variáveis dos pacientes e do tumor;
- Produzir e purificar as proteínas CXCR4 e CD26 por tecnologia recombinante *Gateway*® em sistema procarioto.

MATERIAIS E MÉTODOS

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob o número 34778, emenda 2015 número 1.030.401. A transferência do material foi autorizada de acordo com o termo TTMB 0002/2019, do Banco de Tumores e Tecidos (BTT) do Instituto Alfa de Gastroenterologia - HC/UFMG. O projeto encontra-se registrado na plataforma Brasil, sob a identificação CAAE – 02177612.0.0000.5149. As informações dos pacientes e dos tumores foram obtidas pela análise e coleta de dados das solicitações e laudos de biópsia anatomopatológica dos segmentos colônicos. Para obtenção de dados de evolução e desfecho da doença, os pacientes, cujas amostras se encontram arquivadas no BTT, foram contatados.

5.2 Obtenção das amostras e critérios de inclusão e exclusão

Trata-se de um estudo retrospectivo de casos de adenocarcinoma colorretal humano diagnosticados entre 2011 e 2016, no Hospital das Clínicas/UFMG, Belo Horizonte.

Foram selecionadas 35 amostras positivas para o tumor de estudo, fixadas em formol e incluídas em parafina no Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG, através da análise dos laudos emitidos, entre 2016 e 2018, e de protocolos anatomopatológicos devidamente revisados. A revisão foi realizada pela patologista especialista Dra. Mônica Demas, co-orientadora do projeto. Foram incluídas nas análises margens de ressecção cirúrgica livres de tumor de 10 pacientes positivos selecionados anteriormente com a finalidade de comparação.

Foram também analisadas 32 amostras positivas de tumores de cólon e reto diagnosticados entre 2011 e 2016, advindas do BTT do Instituto Alfa de gastroenterologia – HC/UFMG preservadas em *RNA later* e mantidas à -80°C. A seleção foi realizada através da análise da requisição anatomopatológica do tecido tumoral e dos laudos emitidos. Foram inclusos no estudo as margens de ressecção cirúrgica livres de tumor, de todos os pacientes então selecionados, com a finalidade de comparação.

As amostras deveriam obrigatoriamente tratar-se de: adenocarcinoma colônico e ter um dos segmentos do cólon como sítio tumoral primário, apresentar dados clínicos suficientes para as avaliações pretendidas, estarem disponíveis para manuseio e passarem por crivo analítico de um patologista.

Foram excluídas do estudo as amostras que não se tratavam de adenocarcinoma, as poliposes e aquelas que não apresentavam dados anatomopatológicos suficientes para alimentação do banco de dados.

5.3 Extração do RNA total de células HT29

Para obtenção do RNA total de células HT29, foi realizada a extração e purificação a partir de 1×10^6 células de adenocarcinoma humano HT29 (BCRJ) armazenadas em nitrogênio líquido (NL), pelo emprego do reagente Tryzol (Invitrogen, cat15596-026), segundo as especificações do fabricante, com modificações: 1×10^6 células foram ressuspensas em 1 ml de Tryzol e homogeneizadas utilizando sonicador ajustado para 3 ciclos de 15 s na intensidade de 40%. Após adição de clorofórmio, o lisado foi incubado por 20 min e centrifugado a 12.000 g por 10 min a 4°C. O RNA total foi precipitado e incubado a -20°C por 1 h. Foram realizadas duas lavagens com 500 µL de etanol 75%, preparado com água livre de nucleases e a suspensão foi centrifugada a 12.000 g por 5 min a 4°C. O RNA total foi, por fim, ressuspensado em 100 µL de água livre de nucleases e mantida em equipamento termociclador (*MiniAmp Thermal Cycler*, Applied Biosystems) por 30 min.

5.4 Obtenção do cDNA

O RNA isolado, foi previamente purificado seguindo o protocolo do kit Purificação do RNA total (*Cleanup*) com sistema RNeasy (Invitrogen). Ao final, uma alíquota de 2 µl, foi empregada na análise prévia de pureza em *NanoDrop 2000*[®] UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific).

A síntese do cDNA foi realizada através do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems[™]), seguindo as especificações do fabricante, sendo a reação composta por 2 µl de tampão da enzima, 0,8 µl de dNTP Mix, 2 µl de RT *Random* iniciadores, 1µl da enzima Transcriptase reversa, 4,2µl de água Nuclease *free* e 10µl de RNA (1.000ng/µl), com volume final de 20µl. A amplificação das sequências foi realizada utilizando o termociclador (*MiniAmp Thermal Cycler*, Applied Biosystems) com o seguinte programa: etapa inicial de 25°C por 10 min, 37°C por 120 min, seguido de uma etapa final de 85°C por 5 min.

5.5 Expressão gênica por qPCR

5.5.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Foram utilizados pares de iniciadores específicos para a amplificação de éxons de CXCR4, CD26, Ki67, E-caderina, Vimentina, CD133 e dois normalizadores, GAPDH e β -actina (Tabela 2), desenhados com a utilização do software Primer3 Plus. Os oligonucleotídeos apresentam *amplicons* com tamanho máximo de 150 pares de bases e foram desenhados em regiões de junção éxon-éxon. Além disso, a ausência de tendência à formação de estruturas secundárias (*hairpin loops*, *inner loops* e *dimers*) e a % de GC nas condições da reação e análise de especificidade através do *software* Blast, comprovam a adequação dos *primers* aos critérios da técnica.

TABELA 2 Iniciadores usados na qPCR.

Marcador	Referência NCBI	Iniciadores	Amplicon (pb)	%CG	TM
CXCR4	NM_001008540.2	Direto: AGCAAGGGTGTGAGTTTG Reverso: CTCCAAGGAAAGCATAGAG	109	50%	60
CD26	NM_001935.3	Direto: TCACTGCTCCTGCTTCTA Reverso: CTGAGCCACTGCAAAGAA	91	50%	60
ki-67	NM_002417.4	Direto: CACGGATGAATGGAGCTTAC Reverso: CCTGTGCAGATGTCCAATAG	88	50%	53
E-caderina	NM_004360.4	Direto: CCCTTCACAGCAGAACTAAC Reverso: CACCTCTAAGGCCATCTTTG	108	50%	53
Vimentina	NM_003380.4	Direto: TCACTCCCTCTGGTTGATAC Reverso: GTCATCGTGATGCTGAGAAG	105	50%	53
CD133	XM_024454276.1	Direto: GACAAGCCCATCACACA Reverso: GTCCTTGTAGACCCAGAAAC	108	50%	60
GAPDH	NM_001289745.2	Direto: TGGGTGTGAACCATGAGA Reverso: GTCCTTCCACGATACCAAAG	123	50%	53
β -Actina	NM_001101.4	Direto: CTTCCAGCAGATGTGGATCA Reverso: CACCTTCACCGTTCCAGTTT	149	50%	53

*TM: Temperatura de anelamento; pb (pares de bases); %GC (guanina-citosina)

5.5.2 Validação dos iniciadores

Os iniciadores foram empregados para amplificação dos alvos por PCR convencional, utilizando como molde o cDNA de células de adenocarcinoma humano em cultura da linhagem HT29 . As reações foram preparadas para um volume final de 25 µl, com a seguinte composição: 16,4 µl de água DNase e RNase free, 2,5 µl de tampão da enzima, 2,5 µl de magnésio (MgCl₂ 100 µM) do kit, 0,5 µl de dNTP (10 µM), 1 µl de cada iniciador (10µM), 0,1 µl de Taq DNA polimerase (5 U/µl) (Invitrogen), 2 µl de cDNA (100 ng). As condições de ciclagem utilizadas foram 94°C por 30 s, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s de desnaturação, 60°C por 30 s para anelamento dos *primers* e 72°C por 1 min de extensão, seguidos da extensão final de 72°C por 10 mins. Após as reações de PCR, foram adicionados 2,5 µl de Blue green em 25 µl de produto amplificado, e o conteúdo foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% contendo tampão Tris-Acetato-EDTA 1x (TAE), em tensão de 80 volts, por aproximadamente 90 min.

5.5.3 Extração do RNA total das amostras parafinadas

Para obtenção do RNA total das amostras incluídas em parafina foi utilizado o PureLink™ FFPE *Total RNA Isolation Kit* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Ao final do processo, 3 µl foram empregados nas análises de quantificação de pureza em NanoDrop 2000® UV-Vis *Spectrophotometer* (Thermo Scientific), outros 3µl na análise da qualidade do RNA extraído, por observação da integridade do rRNA por eletroforese capilar em 2100 *Bioanalyser*® *Agilent Technologies* e 1 µl para dosagem em sistema Qubit de maior precisão, por empregar fluorescência. O restante foi armazenado a -70°C até uso posterior. A purificação do RNA e síntese do cDNA foram realizadas conforme item 5.4.

5.5.4 Extração do RNA total das amostras congeladas

Para obtenção do RNA total, foi realizada a extração e purificação a partir das amostras de adenocarcinoma de cólon e reto armazenadas em *RNAlater* a -80°C, anteriormente selecionadas, pelo emprego do reagente TRIzol (Thermo Fisher), seguindo as especificações do fabricante com modificações: as amostras, de aproximadamente 0,5 cm, foram maceradas em nitrogênio líquido (NL) e o tecido ressuspense em 3 ml de Tryzol e homogeneizadas utilizando sonicador ajustado para 3 ciclos de 15 segundos na intensidade de 40%. Após adição de clorofórmio, o lisado foi incubado por 20 minutos e centrifugado a 12.000 g por 10 min a 4°C. O RNA total foi precipitado e incubado a -20°C por 1 h. Foram realizadas duas lavagens com 500 µL de etanol a 75%, preparado com água livre de nucleases

e a suspensão foi centrifugada a 12.000 g por 5 min a 4°C. O RNA total foi, por fim, ressuspenso em 100 µL de água livre de nucleases e mantida em equipamento termociclador (*MiniAmp Thermal Cycler*, Applied Biosystems) por 30 min.

Ao final do processo, 3 µl do material obtido foram empregados nas análises de quantificação e pureza em *NanoDrop 2000*[®] UV-Vis *Spectrophotometer* (Thermo Scientific[®]), 3 µl em análise da qualidade do RNA extraído, por observação da integridade do *rRNA em 2100 Bioanalyser*[®] Agilent Technologies e 1 µl para dosagem em sistema Qubit, de maior precisão por empregar fluorescência. O restante foi armazenado a -70°C até uso posterior. A purificação do RNA e síntese do cDNA foram realizadas conforme item 5.4.

5.5.5 Padronização da curva de eficiência dos *primers* para qPCR

O método qPCR requer uma série de padronizações para que os experimentos a serem realizados ocorram com alta eficiência e uma delas é a concentração dos oligonucleotídeos iniciadores. Foram testadas as concentrações de 200, 400 e 600 nmol dos iniciadores (senso e anti-senso) e como molde da reação utilizou-se 100 ng do cDNA de uma das amostras congeladas positivas para o CCR. Todas as reações foram feitas em triplicata, com controles negativos (sem DNA molde) para cada combinação de iniciadores. O gene utilizado como normalizador dos experimentos foi a β -Actina e as reações foram realizadas no equipamento *QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) no formato 384-wells, utilizando o fluoróforo SYBR *green*. A molécula do fluoróforo se intercala entre duas fitas pareadas de DNA a cada ciclo de amplificação. Após a determinação da concentração dos oligonucleotídeos, utilizou-se esta concentração inicial de 100 ng de cDNA para construir uma curva padrão, a fim de determinar a eficiência de amplificação da reação. O parâmetro paralelismo entre as curvas dos genes alvo e endógeno (*slope*) de uma curva padrão é utilizado para calcular a eficiência de amplificação da reação, conforme equação:

$$E = (10^{-1/slope} - 1) \times 100$$

A curva padrão é obtida pela regressão linear do valor do ciclo de amplificação Ct (*cycle threshold*) sobre o log da quantidade inicial de cDNA. Um coeficiente angular da curva padrão de -3,32 indica uma reação com 100% de eficiência. São consideradas válidas as reações em que as eficiências de amplificação do gene alvo e do gene endógeno estejam entre 90 e 110%. Para utilizar o método descrito por Livak e Schmittgen em 2001 é necessário que além de apresentar eficiência entre 90 e 110%, a variação de eficiência entre os genes

analisados não pode ser superior a 10%. Desta forma, para obter a curva de eficiência de amplificação da reação de PCR quantitativa foram utilizadas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,562 ng de cDNA de HT29.

As reações foram ajustadas para um volume final de 10,0 µl, contendo: 5,0 µL do *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 1 µL de cada um dos iniciadores, 2 µL de água livre de nucleases e 1 µL do DNA. O programa da reação seguiu as recomendações do fabricante e está descrito a seguir:

- Ativação inicial da enzima UDG a 50°C por 2 min;
- Ativação da enzima DNA polimerase a 95°C por 2 min;
- 40 ciclos de amplificação sendo: 95°C por 15 s (desnaturação) e 60°C por 1 min (anelamento, extensão e aquisição de fluorescência);
- Ao término das amplificações foi adicionado o estágio referente à curva de dissociação (*Melt curve*).

As reações foram realizadas em parceria com a Plataforma de PCR em Tempo Real - RPT09D PDTIS - do Instituto Rene Rachou (Fiocruz MG).

5.5.6 Expressão gênica por qPCR

Foram utilizados 100 ng de cDNA, acrescidos de 5µl do *SYBR Green PCR master mix* (Applied Biosystems), 0,5 µl (400nmol) de cada iniciador (senso e anti-senso), completando-se com água para um volume final de 10 µl. O programa da reação seguiu as recomendações do fabricante e está descrito a seguir:

- Ativação inicial da enzima UDG a 50°C por 2 min.
- Ativação da enzima DNA polimerase a 95°C por 2 min.
- 40 ciclos de amplificação sendo: 95°C por 15 s (desnaturação) e 60°C por 1 min (anelamento, extensão e aquisição de fluorescência).
- Ao término das amplificações foi adicionado o estágio referente à curva de dissociação (*Melt curve*).

5.6 Determinação da correlação entre os dados de expressão gênica e variáveis do paciente e do tumor

A partir dos dados de quantificação relativa gerados por meio da técnica de qPCR, os mesmos foram correlacionados à informações dos pacientes provenientes de requisições e laudos anatomopatológicos como: sexo, faixa etária, sítio primário de acometimento,

linfonodos metastáticos, estadiamento TNM, histórico familiar tumoral, grau de diferenciação celular, presença de pólipos e aspecto macroscópico da lesão.

5.7 Produção das proteínas CXCR4 e CD26 recombinantes

As proteínas CXCR4 (NCBI: NM_003467.2) e CD26 (NCBI: NM_001935.4) foram selecionadas para a produção recombinante, por serem alvos de diversos estudos sobre seus efeitos em eventos tumorais, em especial em tumores de cólon e reto, demonstrando potencialidade no emprego destas proteínas em testes diagnósticos, análise prognóstica e utilização terapêutica. Os genes foram clonados utilizando a plataforma Gateway® (Invitrogen, 2003) e as proteínas expressas em sistema heterólogo de bactérias.

5.7.1 Amplificação e purificação dos genes de interesse

Para a geração de produtos de PCR adequados a serem usados utilizados nas reações de recombinação no sistema Gateway® de expressão com o vetor de entrada (DONOR), é necessária a incorporação dos sítios *attB* nos *amplicons* gerados. O desenho dos iniciadores, para amplificação dos genes de interesse, é crucial para a construção do DNA recombinante (Invitrogen, 2003). Para a expressão eficiente das proteínas nativas, é necessária a inclusão das sequências de Shine-Delgarno (SD) e Kozak nos *primers*. A sequência de SD recruta o ribossomo ao mRNA para iniciar a síntese proteica, alinhando o ribossomo ao códon de início. A sequência de Kozak representa um consenso entre as bases nucleotídicas encontradas mais frequentemente próximas ao códon AUG de início do mRNA. A sequência é reconhecida pelo ribossomo, sendo importante para o início da tradução no contexto da biossíntese de proteínas (Kozak, 2002).

Para tornar a clonagem eficiente é necessário que contenha no iniciador direto, quatro resíduos de guanina (G) na porção 5' terminal, seguidas de 25 bases da sequência específica do sítio *attB1* de recombinação e as sequências específicas de Shine-Delgarno e Kozak, respectivamente. Por fim, adiciona-se a sequência específica do gene de interesse. No iniciador reverso, quatro resíduos de G são seguidas de 22 bases da sequência específica do sítio *attB2* e por fim, insere-se a sequência nucleotídica do gene de interesse.

Os genes CXCR4 e CD26 foram amplificados com iniciadores do próprio gene e, posteriormente, com iniciadores contendo as especificações acima (Tabela 3). A tabela demonstra ainda os tamanho dos dos *amplicons* gerados para CXCR4 e CD26, além da % de GC e a temperatura de anelamento (TM).

TABELA 3 Iniciadores utilizados no sistema Gateway® de expressão de CXCR4 e CD26 recombinantes com e sem os sítios de recombinação.

Marcador	Referência NCBI	Iniciadores	Amplicon (pb)	%G	T
CXCR4	NM_003467.2	Direto: ATGGAGGGGATCAGTATATACAC Reverso: GCTGGAGTGAAAACCTGAAGACT	1.691	50%	60
CXCR4 GW*	NM_003467.2	Direto: GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT TCGAAGGAGATAGAACC <u>ATG</u> GAGGGGATCAGTATATACAC Reverso: GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CGC TGGAGTGAAAACCTGAAGACT	1.691	50%	70
CD26	NM_001935.4	Direto: CATGGACGGGGAAAGAAGATA Reverso: ACAGTTGGATTCACAGCTCCTG	3.573	50%	60
CD26 GW*	NM_001935.4	Direto: GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT TCGAAGGAGATAGAACC <u>ATG</u> GACGGGGAAAGAAGATA Reverso: GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTCA CAGTTGGATTCACAGCTCCTG	3.573	50%	60

* Os iniciadores direto (CXCR4 GW e CD26 GW) contendo as sequências de recombinação apresentam quatro resíduos de G, seguidos pelo sítio *attB1* destacado em vermelho. Em seguida, as sequências de Shine-Delgarno e Kozak em azul e preto, respectivamente. O códon ATG de iniciação para a proteína de interesse está sublinhado, seguido pela sequência específica de cada gene de estudo. Os iniciadores reverso apresentam os quatro resíduos de G, o sítio de recombinação *attB2* em vermelho e a sequência dos nucleotídeos do gene de interesse em verde. TM: temperatura de anelamento.

Inicialmente, a reação foi feita com 10 µl de 10X *PCR Buffer*, 3 µl de 50mM MgCl₂, 2 µl de 10 mM dNTP mix, 2 µl de 10 µM de cada iniciador, 2 µl de cDNA de HT29 (187,2 ng/µl), 1 µl de DNA polimerase (*PlatinunTM Taq DNA Polymerase* – Thermo Fisher) e volume de água suficiente para 100µl de reação. A variação de temperatura na amplificação foi uma etapa inicial de 94°C por 2 min, seguido por 40 ciclos com etapa de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 60°C por 30 s, extensão a 72°C por 30 s e extensão final a 72°C por 10 min. Todo o produto final da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da amplificação e observação do tamanho do fragmento referente a cada alvo. Como controle positivo da reação, foi amplificado o gene TSP8 e como negativo, a água foi adicionada em substituição ao DNA molde. Como padrão de peso molecular foi utilizado o marcador “1 kDa DNA Ladder” (Promega). Após as reações de PCR, foram adicionados 2,5 µl de *Blue green* em 25 µl de produto amplificado, e o conteúdo foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% contendo tampão Tris-Acetato-EDTA 1x (TAE), em tensão de 80 volts, por aproximadamente 90 min. Os geis foram visualizados através de incidência de luz ultravioleta em transiluminador (GE Healthcare Life Science) e a foto documentada através do próprio equipamento confirmando a presença do gene de interesse. Todo o DNA presente no gel foi extraído com emprego do kit *QIAquick gel Extraction*, seguindo as orientações do fabricante e quantificado em *NanoDrop 2000[®] UV-Vis Spectrophotometer* (Thermo Scientific).

Posteriormente, o produto amplificado na PCR descrita acima foi utilizado como DNA molde para a reação onde os sítios de recombinação foram inseridos. A PCR foi realizada a partir 20µl de 5x *Phusion HF or GC Buffer*, 2µl de 10mM dNTP, 5 µl de 10 µM cada iniciador (CXCR4=5,3 ng/µl) e 5,37 µl (CD26=5,0 ng/µl), 6,7µl de amplicon previamente produzido, 1µl de *Phusion DNA Polymerase* (BioLabs) e volume de água suficiente para 100µl de reação. A variação de temperatura na amplificação foi uma etapa inicial de 98°C por 30 s, seguido por 35 ciclos com etapa de desnaturação a 98°C por 10 s, anelamento a 70°C por 30 s, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 10 min. Todo o produto final da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% para confirmação da amplificação e tamanho do fragmento referente a cada alvo. Como controle positivo da reação, foi amplificado o gene TSP8, e como negativo, adicionou-se água em substituição ao *template* DNA. Como padrão de peso molecular foi utilizado o marcador “1 kDa DNA Ladder” (Promega). Os geis foram visualizados através de incidência de luz ultravioleta em transiluminador (GE Healthcare Life Science) e a foto documentada através do próprio equipamento confirmando a presença do gene de interesse. Todo o DNA presente no gel foi

extraído pelo emprego do kit *QIAquick gel Extraction Kit*, seguindo as orientações do fabricante e quantificado em *NanoDrop 2000*[®] UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific[®]).

5.7.2 Clonagem

Após a amplificação do gene alvo, contendo o sítio de recombinação *attB*, e sua purificação, foi então realizada a clonagem através dos sítios específicos presentes nos *amplicons* gerados e nos vetores de entrada (pDONR221) e de destino (pEXP1-DEST), utilizado para construção do clone de entrada e clone de expressão, respectivamente.

5.7.3 Reação de recombinação BP e obtenção do clone de entrada

Seguindo as instruções da tecnologia gateway[®], para a obtenção do clone de entrada, houve a inserção dos produtos de PCR contendo os sítios *attB* no vetor doador pDONR221, de modo independente, contendo os sítios *attP* por ação da enzima BP clonase (*Gateway BP Clonase II Enzyme mix*, Invitrogen) para ambos os genes. As reações se deram a partir 1 µl de pDONR221 150 ng/µl, 3 µl (150ng) do produto de PCR, 2 µl da BP clonase e 4 µl de tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0) em gelo e posteriormente alocadas em ThermoMixer F15 (Eppendorf) a 25°C por 6 h sem agitação. Após o período de incubação, 1 µl da enzima proteinase K 100 µM (Invitrogen) foi adicionada a cada reação por 10 min à 37°C, para inibir a ação enzimática.

Dez µl de cada reação de BP clonase foram dispensados em dois tubos (50 µl) de bactérias *E. coli* da sublinhagem DH5α, competentes, e incubados em gelo por 30 s e posteriormente em ThermoMixer F15 (Eppendorf) a 42°C também por 30 s favorecendo a permeabilidade da membrana bacteriana através de choque térmico. Para a transformação, as células foram cultivadas em 250 µl de meio SOC (Invitrogen) sob agitação de 225 RPM, durante 60 min a 37°C. Para ambos os genes, um volume de 100 µl e dois de 50 µl de bactérias foram plaqueados em meio *Luria Bertani* (LB) ágar contendo canamicina (50 µg/ml) e incubadas a 37°C *overnight*. Os mesmos processos foram realizados para as reações de controles negativos, onde não houve inserções dos genes alvos nos plasmídeos e dois volumes de 120 µl foram também plaqueados na presença e na ausência de canamicina (50 µg/ml).

5.7.4 PCR de colônia

As colônias formadas foram lisadas através de choque térmico (30 s em gelo e 2 min em água à 100°C) e centrifugadas a 14.0000 RPM por 10 min, para extração do DNA. O SN contendo o DNA bacteriano foi coletado e submetido à PCR de colônia para confirmação da clonagem. A reação se deu a partir de 9,8µl de H₂O RNase free, 2µl da solução tampão presente no kit, 1µl de dNTP 10mM, 0,5µl de cada iniciador a 10mM, 2µl de MgCl₂, 0,2µl de *AmpliTaq goldTM DNA Polymerase* e como *template* da reação, 4µl de DNA bacteriano de cada colônia. A variação de temperatura na amplificação foi uma etapa inicial de 95°C por 5 min, seguido por 40 ciclos com etapa de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 60°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 5 min. Após confirmação das colônias positivas, o DNA extraído foi dosado e enviado para a Plataforma de Sequenciamento de DNA – BH-RPT01E/IRR/FIOCRUZ-MG, utilizando os iniciadores senso M13 e reverso específicos para CXCR4 e CD26 para verificar a inserção do gene de interesse ao plasmídeo pDONR221.

5.7.5 Reação de recombinação LR e obtenção do clone de expressão

Após a análise de sequenciamento e seleção da colônia a ser utilizada na etapa seguinte, realizou-se a purificação do plasmídeo contendo o inserto de interesse, empregando o kit *PureLink[®] Quick Plasmid Miniprep*, conforme recomendações do fabricante e seguindo as instruções da tecnologia Gateway[®] para a obtenção do clone de expressão para produção de CXCR4r e CD26r. Esta etapa deu-se através da recombinação dos sítios *attL* que flanqueiam o gene de interesse no clone de entrada, e os sítios *attR* presentes no vetor de destino pEXP1-DEST pela ação da LR clonase (*Gateway LR Clonase II Enzyme mix*, Invitrogen). A reação LR se deu a partir de 0,88 µl de clone de entrada para CXCR4 (169,2 ng/µl) e 0,37 µl para CD26 (397,8 ng/µl), 1 µl de pEXP1-DEST 150 ng/µl, 2 µl da LR clonase, e tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0) suficiente para 10 µl, em gelo e posteriormente alocadas em ThermoMixer F15 (Eppendorf) a 25°C por 6 h sem agitação. Após a incubação, 1 µl da enzima proteinase K 100 µM (Invitrogen) foi adicionada a cada reação por 10 min à 37°C, para inativar a ação enzimática.

Dez µl de cada reação de LR clonase foram dispensados em dois tubos (50 µl) de bactérias *E. coli* da sublinhagem DH5α, competentes, e incubados em gelo por 30 s e posteriormente em ThermoMixer F15 (Eppendorf) a 42°C, também por 30 s, favorecendo a permeabilidade da membrana bacteriana através de choque térmico. Para a transformação, as

células foram cultivadas em 950 µl de meio SOC (Invitrogen) sob agitação de 225 RPM, durante 60 min a 37°C. Volumes de 20, 100, 200 e 300 µl de bactérias foram plaqueados em meio LB ágar contendo ampicilina (100 µg/ml) e incubadas a 37°C *overnight*. Os mesmos processos foram realizados para as reações de controles negativos, onde não houve inserções dos genes alvos nos plasmídeos e dois volumes de 400 µl foram também plaqueados na presença e na ausência de ampicilina (100 µg/ml).

A PCR de colônia foi realizada conforme item 4.3.4.2 e após confirmação das colônias positivas, DNA destas foram dosadas e enviadas para a Plataforma de Sequenciamento de DNA – BH-RPT01E/IRR/FIOCRUZ-MG, utilizando os iniciadores direto T7 e reverso específicos para CXCR4 e CD26 para verificar a inserção do gene de interesse ao plasmídeo pEXP1-DEST.

5.7.6 Expressão de CXCR4r E CD26r

Após a análise do sequenciamento e purificação do plasmídeo contendo os insertos de interesse usando o kit *PureLink® Quick Plasmid Miniprep*, células competentes de expressão BL21 AI (BL21-AITM *One ShotTM Chemically Competent E. coli* – ThermoFisher) foram transformadas com o clone pEXP1-DEST-CXCR4 e pEXP1-DEST-CD26 conforme as informações do fabricante e descritas anteriormente.

No dia seguinte, 10 colônias para cada proteína recombinante foram selecionadas para realização do pré-inóculo, armazenamento e posterior utilização. Foi também realizado o controle negativo, onde bactérias que não receberam o inserto foram plaqueadas na presença e na ausência do antibiótico. O pré-inóculo foi realizado a partir da adição de cada colônia selecionada em 10 mL de meio *Terrific Broth* (TB) líquido adicionado de ampicilina (100 µg/ml) e incubado *overnight* a 37°C sob agitação (225 RPM). No dia seguinte, foram feitas quatro alíquotas de cada colônia contendo 700 µl do inóculo adicionadas de 300 µl de glicerina estéril (NEON) 50% e armazenadas em freezer -80°C.

Foi escolhida, de modo randômico, apenas uma colônia de cada proteína para avaliar a solubilidade das proteínas expressas em três diferentes condições. A primeira condição consistiu em manter 3 mL do meio TB, 300 µl do inóculo e 3 µl de ampicilina a 37°C sob agitação (180 RPM) por 3h; a segunda, contendo as mesmas quantidades da anterior, permaneceu a 30°C a 180 RPM por 2 h e; a terceira condição se assemelha à segunda, também mantendo os mesmos volumes, no entanto a incubação foi *overnight*. A BL21 AI sem ser transformada também foi submetida às mesmas condições, como controle negativo do teste.

O crescimento bacteriano foi monitorado para as três situações, em espectrofotômetro 600 nm até a densidade óptica (DO) alcançar 0,4 a 0,6 para então iniciar indução da expressão proteica. Após atingido o limiar, foi adicionado 0,75 mM de isopropil tio- β -d-galactosídeo (IPTG) que é usado para induzir a expressão de proteínas onde o gene está sob o controle do operador *lac*, exceto o controle do teste. Após o término dos tempos determinados em cada condição, o material foi centrifugado a 14.000 RPM por 5 min e o SN desprezado. O precipitado foi ressuspensão em 500 μ l de tampão TE 1X (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0) e homogeneizado utilizando sonicador ajustado para 5 ciclos de 10 s. Logo após, o material foi novamente centrifugado a 14.000 RPM por 5 min e as frações solúveis e insolúveis foram reservadas separadamente.

As amostras de CXCR4r e CD26r foram aquecidas à 100°C por 15 min e incubadas em tampão de corrida 1X e submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE a 15%, em sistema *Mini-Protean TGX™ Precast gel* (BioRad), com voltagem de 110 volts, por 2 h, sendo por fim, corado com solução de Comassie. Em gel idêntico, foi realizado Western Blot, utilizando anticorpo monoclonal (mAb) anti cauda de histidina (Anti-HIS6X), para avaliar a especificidade das proteínas recombinantes produzidas. Os géis foram submetidos à transferência em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF), incubadas em tampão de transferência, em condições refrigeradas, por 2 h. Logo após, realizou-se o bloqueio *overnight* da membrana, para evitar ligações inespecíficas, transferindo a mesma para solução tampão adicionada de 5% de caseína.

As membranas foram então lavadas em tampão TBS1X por 10 mins, três vezes. Em seguida, as membranas foram incubadas por 1 h na presença do mAb Anti-HIS6X (CXCR4: 1:5.000/CD26:1:7.500) (Sigma), novamente lavadas e então, conjugadas com o mAb-antiIgG-humano (1:10.000) (Sigma). A etapa final consistiu da revelação da membrana através do Kit ECL de Quimioluminescência, em proporção 1:2, de ambos os reagentes.

Após a determinação das temperaturas de produção, foi avaliada a concentração ideal de IPTG (Ludwig Biotec) para a indução a expressão proteica. Um novo pré-inóculo foi realizado, conforme descrito anteriormente. Trinta mL de meio TB mais 3 mL do inóculo e 30 μ l de ampicilina foram submetidos à agitação (180 RPM) à 37°C por 4 h, após verificar e registrar a OD600 entre 0,4 e 0,6. O IPTG foi adicionado nas concentrações 0,25, 0,50, 0,75 e 1 mM para colônias de ambas as proteínas. BL21 AI, sem o inserto e sem indução por IPTG, também foi submetida à cinética.

Foi então coletado 1 ml do cultivo denominado amostra não induzida (T0) e foi verificado e registrado a OD600, sendo ao restante adicionadas as concentrações citadas de

IPTG, visando observar o crescimento a partir do tempo 0 (sem indução com IPTG) até o tempo 4 (4 horas após a indução com IPTG). Novas alíquotas foram coletadas e registradas a OD600 após 1, 2, 3 e 4 h de indução (T1, T2, T3 e T4) para realização da cinética de expressão. Posteriormente, o restante do inóculo (aproximadamente 90 ml), foi centrifugado a 13.000 RPM por 10 min. O precipitado foi ressuspensão em 1 ml de PBS estéril e realizou-se a lise desta suspensão celular, por cinco sonicações de 30 s intercalando com descanso de 1 min, sempre em gelo. O lisado foi centrifugado e o SN separado do *pellet*.

As alíquotas (T0-T4) foram centrifugadas a 13.000 RPM por 10 min, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensão em 300 µl de *Lysis buffer I* (29,2 g de NaCl 0,5 M, 0,075 g de EDTA 0,2 mM, 30g de sacarose 3%, 10 mL de Triton x 100, 6,055 g de Tris Base e 1 L de água tipo 1). O lisado foi novamente centrifugado e o SN (proteínas solúveis) separado do precipitado (proteínas insolúveis). Ambos foram submetidos à análise por SDS-PAGE 15% e WB anti cauda de histina (WB-his).

5.7.7 Purificação das proteínas recombinantes CXCR4r e CD26r

Confirmada a expressão das proteínas, foram produzidos volumes finais de 1 L para a obtenção de maiores quantidades das proteínas recombinantes. Após esta etapa, os meios de cultura foram centrifugados a 12.000 g 45 min a 4°C e os *pellets* pesados e lisados em tampão apropriado (*Lysis Buffer I* – 300 ml para 25 g de precipitado, adicionado de Lisozima 200 µg/ml, PmSF 1 mM, DNase 20 µg/ml) para purificação em Profinity™ IMAC Ni-Charged Resin (Bio-Rad), seguindo as orientações do fabricante.

Todas as etapas de lise foram realizadas através de aparelho sonicador ajustado para 30s e 1 min de descanso em gelo à amplitude de 30%. As suspensões celulares foram novamente centrifugadas a 13.000 g por 40 min a 4°C. Os *pellets* foram novamente ressuspensos em tampão *Lysis buffer I* (200 ml para 25 g de precipitado, adicionado de Lisozima 200 µg/ml, PmSF 1 mM, DNase 20 µg/ml) e incubado em gelo, sob agitação por 15 min. Os cultivos foram novamente lisados, centrifugados e ressuspensos em *Lysis buffer II* (29,2 g de NaCl 0,5 M, 0,075 g de EDTA 0,2 mM, 6,055 g de Tris Base, 180,3 g de Ureia 3 M 1 L de água tipo) para lavagem dos corpos de inclusão (100 mL para cada 25 g de precipitado, adicionado de Lisozima 200 µg/ml, PMSF 1 mM, DNase 20 µg/ml) e novamente incubados em gelo sob agitação. Uma nova lise foi realizada e posterior centrifugação para ressuspensão do *pellet* em tampão *Lysis buffer III* (20 mL para cada 25 g de precipitado, adicionado de 100 µl de 2-mercapto-etanol para cada 100 mL de *Lysis buffer III*) para a

solubilização dos corpos de inclusão. O lisado foi incubado *overnight* em agitador horizontal, a TA. Todos os SN das etapas de lise e centrifugação foram armazenados e aplicados em gel SDS-PAGE.

No dia seguinte, a suspensão foi centrifugada, o *pellet* armazenado a -20°C para verificação de perda proteica e o SN transferido para a ProfinityTM IMAC Ni-Charged Resin (Bio-Rad). A etapa de purificação através da coluna de níquel se deu conforme orientação do fabricante, sendo o material lavado 3 vezes em 15 mL de tampão de lavagem Wash Buffer 1 pH 7,8, 2 vezes em 15 mL de tampão Wash Buffer 2 pH 6.3 e 10 vezes eluído em 10 mL de *Elution Buffer* pH 4,3. Os três tampões utilizados apresentam a mesma composição (2,9 mL de tampão fosfato monobásico 200 mM, 47,1 mL de fosfato dibásico 200 mM, 0,34 g de Imidazol (10 mM), 240g de Ureia (8 M), 0,5 mL de beta-mercaptoetanol (BetOH), com quantidade suficiente de água tipo 1 para 500 mL), tendo variação apenas do valor de pH. Os produtos finais foram concentrados por centrifugação em filtro Vivaspin com *cut off* de 10 kDa (Millipore) e as dosagens proteicas foram realizadas por kit ácido bicinchonínico (BCA) (ThermoFhiser), seguindo as instruções do fabricante.

5.8 Análises estatísticas

Para as variáveis categóricas foram apresentadas as frequências e proporções. Para as variáveis contínuas apresentamos a média, desvio padrão, mediana, quartis, mínimo e máximo. Utilizamos o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados, os quais não apresentaram distribuição normal, dessa forma utilizou-se o teste de Mann Whitney para análises não pareadas e Wilcoxon para avaliar os grupos pareados positivo e negativo. Para avaliar a correlação entre as variáveis em cada grupo utilizamos o coeficiente de Spearman. Todas as análises foram realizadas no *software* Stata 13.0 considerando 5% de significância.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Amostras de adenocarcinoma humano

Amostras humanas de tumor, advindas de análise anatomopatológica, fixadas em solução formalina e incluídas em parafina foram previamente selecionadas e revisadas pela Profa. Dra. Mônica Maria Demas, co-orientadora do projeto, no Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG, para inclusão no trabalho (Tabela 4). Foram selecionadas 35 amostras de pacientes com diagnóstico positivo ao CCR (1 a 35) e 10 amostras de margens cirúrgicas livres de tumor (36 a 45). Os dados que constavam na solicitação da análise por biópsia e laudos emitidos pelo setor, para cada paciente, também foram considerados.

TABELA 4 Amostras fixadas em formol e incluídas em parafina no Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, Faculdade de Medicina/UFMG.

ID/Ano do diagnóstico	Identificação amostras positivas	Identificação amostras negativas	Sexo	Idade no diagnóstico	Estadiamento TNM
MSCM/18	1	*	F	69	pT3pN1pMx
JA/16	2	36	M	57	pT3pN2pMx
MLBD/18	3	37	F	76	pT4pN1pMx
AAA/18	4	38	F	57	pT3pN1pMx
VCN/17	5	*	F	64	pT3pN0pMx
JN/16	6	*	M	60	pT4pN2pMx
FGM/18	7	39	M	91	pT4pN1pMx
VBL/17	8	40	F	60	pT3pN1pMx
NSS/17	9	*	F	69	pT4pN1pMx
EG/17	10	*	F	76	pT3pN0pMx
ALS/17	11	*	F	81	pT3pN2pMx
JMS/16	12	*	M	61	pT3pN1pMx
CJR/17	13	*	M	55	pT4pN0pMx
EC/16	14	*	M	37	pT3pN2pMx
LMA/17	15	*	F	81	pT2pN0pMx
ALO/16	16	*	M	75	pT4pN1pMx
MLV/16	17	41	F	62	pT2pN0pMx
AGS/16	18	42	M	90	pT2pN0pMx
NSG/17	19	*	M	56	pT1pN0pMx
NGS/16	20	*	M	69	pT3pN2pMx
MOPP/18	21	*	F	57	pT4pN1pMx
ECS/18	22	*	F	49	pT4pN0pMx
SAV/16	23	*	F	61	pT3pN1pMx
ZMC/16	24	43	F	85	pT2pN0pMx
MLAS/17	25	*	F	66	pT1pN0pMx
WCF/16	26	44	F	85	pT3pN1pMx
OGR/16	27	*	F	82	pT3pN1pMx
RSM/16	28	*	F	90	pT3pN1pMx
AMSC/17	29	*	F	54	pT3pN1pMx
IPB/17	30	45	F	86	pT3pN2pMx
LERC/17	31	*	M	68	pT4pN2pMx
JSS/17	32	*	M	83	pT3pN0pMx
TRS/17	33	*	F	61	pT4pN1pMx
WSP/17	34	*	M	67	pT3pN0pMx
FJCR/17	35	*	M	53	pT3pN0pMx

* – Não de aplica

Foram realizadas análises estatísticas para as variáveis categóricas e anatomopatológicas, conforme tabela 5, apresentando a categoria da variável, além da sua frequência e percentagem.

Os tumores acometendo ceco, cólon ascendente, flexura hepática e cólon transversos foram classificados como localizados no sítio primário direito e os tumores envolvendo o ângulo esplênico, cólon descendente, sigmoide e reto foram agrupados como localizados no sítio primário esquerdo.

Os tumores que infiltravam até a muscular própria são classificados como pT1 e pT2 e os tumores que infiltravam além da muscular própria foram designados pT3 e pT4. A invasão linfonodal foi classificada em pN0, quando não houveram linfonodos acometidos por células tumorais, pN1 quando até 3 linfonodos dissecados apresentaram infiltrado tumoral e pN2, quando mais de 4 linfonodos apresentavam essa infiltração. As metástases foram classificadas em pMx, quando não há dados de invasão a órgãos distantes e pM1 quando é possível observar a presença de tumores secundários.

TABELA 5 Distribuição das variáveis categóricas e anatomopatológicas dos adenocarcinomas primários proveniente de tecido incluído em parafina.

Variável	Categoria	Freq. (n)	Percent. (%)
<i>Sexo</i>	F	21	60
	M	14	40
<i>Idade</i>	37 a 60	11	31,5
	61 a 91	24	68,5
<i>Sítio primário</i>	Direito	16	45,71
	Esquerdo	19	54,29
<i>Linfonodos metastáticos</i>	0	13	37,14
	≥ 1	22	62,86
<i>pT</i>	pT1	2	6,26
	pT2	4	11,81
	pT3	19	53,48
	pT4	20	28,45
<i>pN</i>	pN0	13	36,81
	pN1	15	42,37
	pN2	7	20,82
<i>pM</i>	pMx	35	100
	pM1	0	0

A tabela 6 demonstra a distribuição baseada no Estadiamento TNM das amostras parafinadas. É possível inferir que pT3pN1pMx é o estadiamento mais prevalente.

TABELA 6 Distribuição baseada no estadiamento TNM.

pT	Sexo		Total
	F	M	
pT1	1	1	2
pT2	3	1	4
pT3	12	7	19
pT4	5	5	10
Total	21	14	35

pN	Sexo		Total
	F	M	
pN0	7	6	13
pN1	12	3	15
pN2	2	5	7
Total	21	14	35

pM	Sexo		Total
	F	M	
pM1	0	0	0
pMx	21	14	35
Total	21	14	35

pT	pN			Total
	pN0	pN1	pN2	
pT1	2	0	0	2
pT2	4	0	0	4
pT3	5	9	5	19
pT4	3	5	2	10
Total	14	14	7	35

Através da autorização concedida pelo Banco de Tumores e Tecidos do Instituto Alfa de gastroenterologia – HC/UFGM, 31 amostras positivas de adenocarcinoma de cólon e reto foram também analisadas, bem como suas margens cirúrgicas, consideradas negativas. Na tabela 7 é possível observar dados dos pacientes presentes na solicitação da biópsia anatomopatológica e nos laudos emitidos. As identificações de 1 a 31 representam os casos positivos e do 38 ao 69, os casos negativos correspondentes.

TABELA 7 Amostras preservadas em *RNAlater* a -80°C advindas do Banco de Tumores e Tecidos do Instituto Alfa de gastroenterologia – HC/UFMG.

ID/Ano do diagnóstico	Identificação amostras positivas	Identificação amostras negativas	Sexo	Idade no diagnóstico	Estadiamento TNM
OFS/12	1	38	M	64	pT3pN2pMx
MSQB/13	2	39	F	53	pT3pN1pM1
VSS/13	3	40	F	59	pT3pN2pMx
DMJ/13	4	41	F	65	pT4pN1pM1
FVS/13	5	42	F	63	pT3pN1pMx
LHRS/14	6	43	F	57	pT3pN0pMx
GRR/14	7	44	M	73	pT2pN0pMx
MLJ/14	8	45	F	75	pT4pN2pMx
MCCS/14	9	46	F	55	pT3pN1pMx
RLBF/14	10	47	M	59	pT3pN0pMx
ARS/14	11	48	M	70	pT3pN0pMx
LETC/15	12	49	M	72	pT2pN0pMx
AMJ/11	13	50	F	67	pT3pN2pMx
EPAR/14	14	51	F	72	pT3pN0pMx
DTA/13	15	52	M	69	pT3pN0pMx
OJCF/13	16	53	M	61	pT4pN1pMx
JFS/13	17	54	M	47	pT3pN1pMx
EMSM/13	18	55	F	44	pT3pN0pMx
RMB/13	19	56	F	61	pT4pN2pMx
JSR/13	20	57	M	49	pT3pN0pMx
GPB/13	21	58	F	61	pT3pN0pMx
EBSA/16	22	59	F	65	pT3pN0pMx
WCF/14	23	60	F	81	pT3N1pMx
MEOS/14	24	61	F	56	pT2pN0pMx
HDL/14	25	62	F	84	pT3pN0pMx
CTS/14	26	64	M	33	pT2pN2pMx
MC/14	27	65	M	36	pT4pN2pMx
MCR/14	28	66	F	54	pT3pN0pMx
GVM/15	29	67	M	67	pT3pN0pMx
HCT/15	30	68	F	73	pT3pN0pMx
NGS/16	31	69	F	65	pT3pN2pMx

Foram realizadas análises estatísticas para as variáveis categóricas e anatomopatológicas, conforme tabela 8, apresentando a categoria da variável, além da sua frequência e percentagem.

TABELA 8 Distribuição das variáveis categóricas e anatomopatológicas dos adenocarcinomas primários provenientes do Banco de Tumores e Tecidos – HC/UFMG.

Variável	Categoria	Freq. (n)	Percent. (%)
<i>Sexo</i>	F	20	58,82
	M	11	41,18
<i>Idade</i>	37 a 60	11	41,18
	61 a 91	20	58,82
<i>Sítio primário</i>	Direito	11	38,24
	Esquerdo	20	61,76
<i>Linfonodos metastáticos</i>	0	17	55,88
	≥ 1	14	44,12
<i>pT</i>	pT1	0	0
	pT2	5	14,71
	pT3	21	70,59
	pT4	5	14,71
<i>pN</i>	pN0	16	50
	pN1	7	26,47
	pN2	8	23,53
<i>pM</i>	pMx	29	94,12
	pM1	2	5,88

A tabela 9 demonstra a distribuição baseada no Estadiamento TNM das amostras provenientes do Banco de Tecidos e Tumores - HC/UFMG. É possível inferir que pT3pN0pMx é o estadiamento mais prevalente.

TABELA 9 Distribuição baseada no Estadiamento TNM.

pT	Sexo		Total
	F	M	
pT2	12	3	5
pT3	15	6	21
pT4	3	2	5
Total	20	11	31

pN	Sexo		Total
	F	M	
pN0	10	6	16
pN1	5	2	7
pN2	5	3	8
Total	20	11	31

pM	Sexo		Total
	F	M	
pM1	2	0	2
pMx	18	11	29
Total	20	11	31

pT	pN			Total
	pN0	pN1	pN2	
pT2	4	0	1	5
pT3	12	5	3	20
pT4	0	3	3	6
Total	16	8	7	31

6.2 Expressão gênica por qPCR

6.2.1 Validação dos oligonucleotídeos iniciadores

Os iniciadores foram validados para a capacidade de amplificação dos genes: CXCR4, CD26, CD133, E-caderina, Vimentina, Ki67 e dois normalizadores, GAPDH e Beta-Actina, através da técnica de PCR convencional (Figura 8). cDNA das células de adenocarcinoma HT29, foi utilizado como *template* da reação. Os tamanhos dos *amplicons* encontrados correspondem ao previsto, com tamanho máximo de 149 bp, apropriado para técnica de PCR em tempo real.

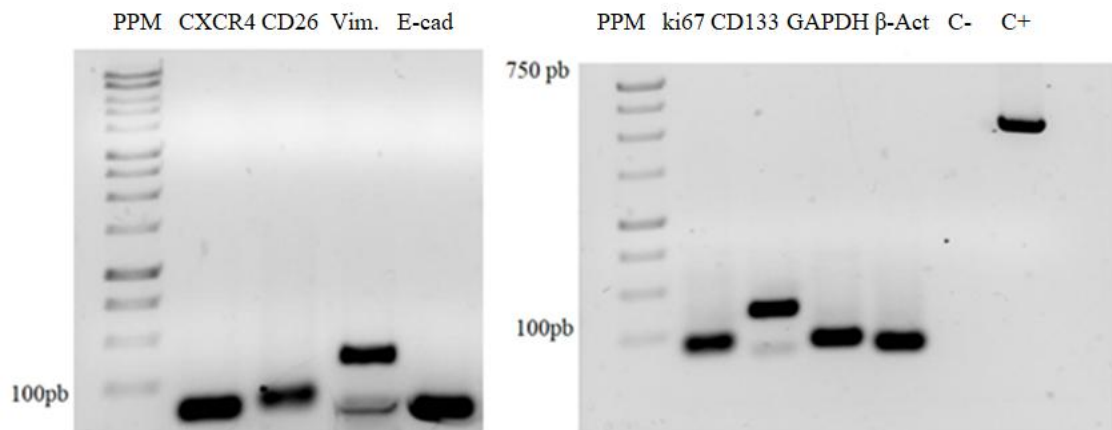


FIGURA 8 Perfil eletroforético das ampliações de CXCR4, CD26, CD133, Ki67, E-caderina, Vimentina, β-actina e GAPDH. Amplificação dos pares de primers e visualização eletroforética em gel de agarose 1%. PPM= padrão de peso molecular 1kb; Vim.=vimentina; E-cad=e-caderina; C-= controle negativo; C+= controle positivo (TSP *gene* 730bp).

6.2.2 Curva de eficiência de primers na amplificação por *real time* – PCR

Para a padronização, foram utilizados 400 nmol de cada par de oligonucleotídeos por apresentarem menor valor de CT e 100 ng de cDNA da célula HT29 de adenocarcinoma, por ser considerado após análise, a concentração ideal de DNA molde.

Os valores de *slope*, eficiência e R^2 , para os genes estudados, estão apresentados na tabela 10. Reações com eficiência variando entre 90 a 110% são consideradas precisas para realização de quantificação relativa da expressão gênica, já que a premissa de que a quantidade de produto dobra a cada ciclo, assumida no desenvolvimento do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, é real quando se obtém reações com eficiência próximas a 100% (BUSTIN et al., 2009). O *slope* da curva padrão deve ser o mais próximo possível de -3,32 ($-1 / \log_2$), o que significa que, para cada ciclo de PCR, a quantidade de DNA presente na reação foi duplicada. Esse parâmetro tem relação direta com a eficácia da PCR: em uma eficiência de 90%, sua inclinação será $-1 / \log_{1.9} = -3.58$; se a eficiência for 110%, a inclinação será -3.1 e mede quão bem as condições da técnica são capazes de replicar os fragmentos de DNA. O valor de coeficiente de correlação (R^2) também deve ser considerado nas análises, e mensura a precisão com a qual os pontos das réplicas se ajustam. Reflete a linearidade da curva padrão e é recomendado que esteja acima de 0,99. A não reprodutibilidade das réplicas também interfere nas inferências de expressão, pois podem diminuir o valor de R^2 , prejudicando a linearidade da curva.

TABELA 10 Valores encontrados para *slope*, R^2 e eficiência da reação dos iniciadores, durante a padronização da curva padrão da técnica.

Marcador	<i>SLOPE</i>	R^2	Eff. (%)
CXCR4	-3,192	0,98	105%
CD26	-3,426	0,96	95%
CD133	-3,416	0,98	96%
E-Caderina	-3,467	0,99	94%
Vimentina	-3,493	0,98	98%
Ki67	-3,335	0,99	99%
β -Actina	-3,132	0,97	103%
GAPDH	-3,37	0,98	94%

6.2.3 Extração de RNA total dos grupos amostrais

O *Bioanalyzer* permitiu uma análise qualitativa e quantitativa de cada amostra de RNA extraído (Figura 9). O valor de Número de Integridade de RNA (RIN) foi calculado por um algoritmo que analisa os resultados obtidos e atribui uma pontuação às amostras, que varia de 1 a 10 e o rRNA Ratio mensura a proporção entre rRNA 28s e rRNA 18s.

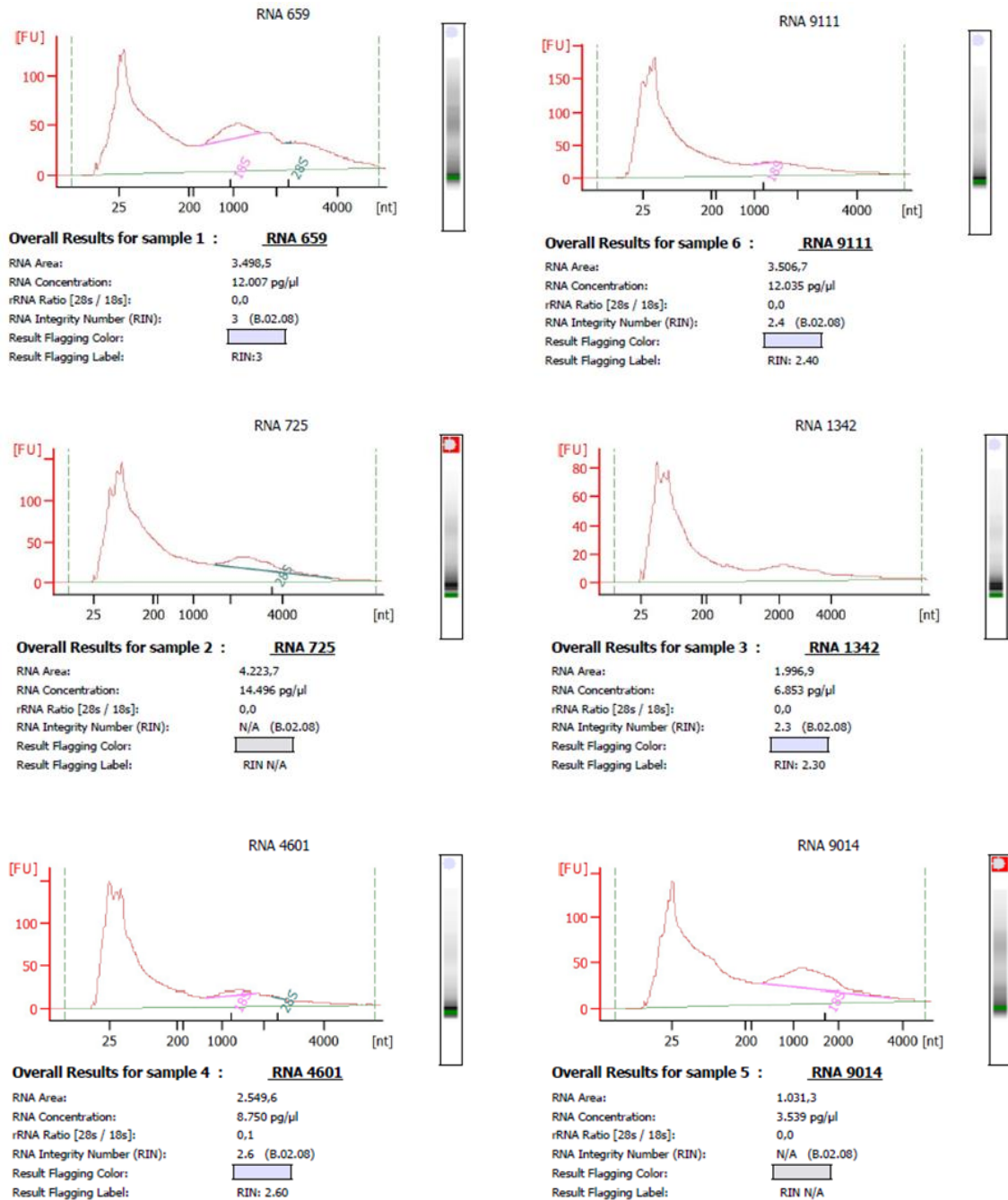


FIGURA 9 Eletroferograma dos RNAs extraídos de amostras parafinadas de CCR. Imagem demonstrando intensa degradação dos rRNAs provenientes de blocos parafinados, indicado pelo aumento do pico de 25 nt. N/A: não há integridade.

Para confirmação da concentração dos RNAs descritos acima, os mesmos foram submetidos à quantificação através do QubitTM RNA BR Assay Kit, que por fluorimetria, fornece uma acurada dosagem de ácidos nucleicos em comparação ao *NanoDrop 2000*[®] UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific[®]). Os resultados demonstraram não haver

divergências nos valores de quantificação de RNAs pelos dois métodos. Sendo assim, foi adotada a análise quantitativa dos transcritos através do equipamento nanoDrop.

Todas as amostras parafinadas selecionadas foram submetidas à extração do RNA total e suas dosagens estão apresentadas na tabela 11. As amostras 8 e 27 obtiveram baixo rendimento de RNA, impossibilitando a utilização de 100 ng em volume máximo de 4 µl.

TABELA 11 Dosagem de RNA total extraído, em NanoDrop 2000® UV-Vis Spectrophotometer, de amostras parafinadas.

ID	[ng/ul]	ID	[ng/ul]	ID	[ng/ul]
1	381	16	38	31	459
2	323	17	236	32	122
3	208	18	682	33	338
4	111	19	1308	34	246
5	157	20	740	35	238
6	528	21	785	36	279
7	427	22	707	37	119
8*	16*	23	69	38	251
9	542	24	168	39	59
10	189	25	281	40	415
11	932	26	129	41	186
12	103	27*	11*	42	215
13	422	28	923	43	162
14	255	29	358	46	237
15	370	30	133	47	255

* baixa concentração de RNA total.

Após análises de qualidade e integridade, as amostras foram submetidas à PCR em tempo real para análise do perfil de expressão e o nível de fluorescência captado pelas amostras não foram suficientes para alcançar um limiar (*threshold cycle*), que revela o nível de detecção em que uma reação atinge uma intensidade acima dos níveis dos ruídos (*background*). Desta forma, como esperado devido ao excesso de degradação, a amplificação dos genes não foi satisfatória, impedindo sua utilização nas próximas etapas (Figura 10).

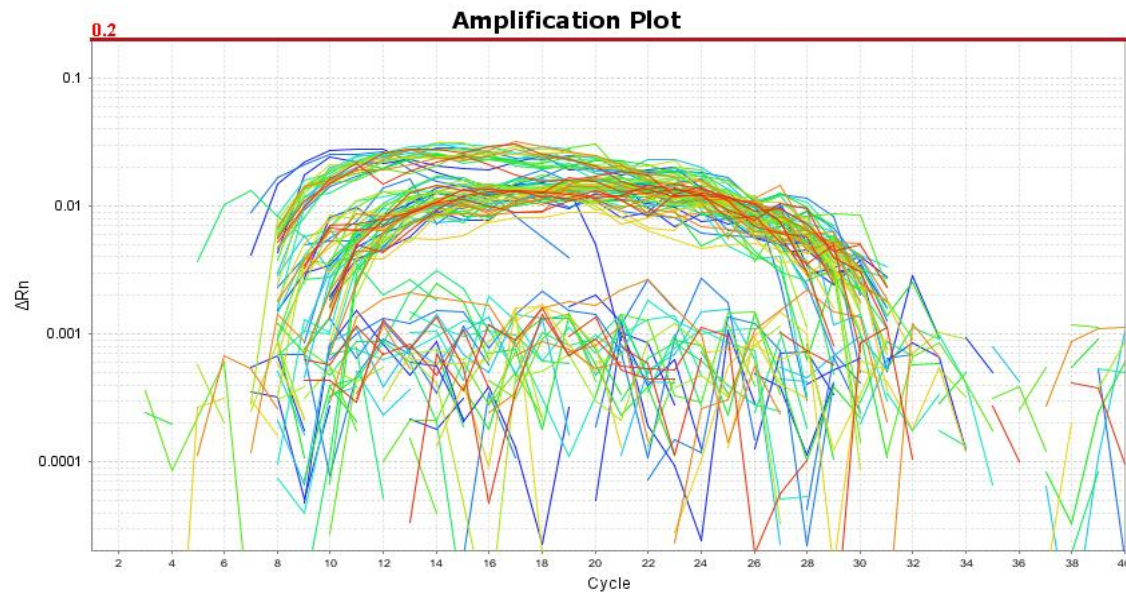
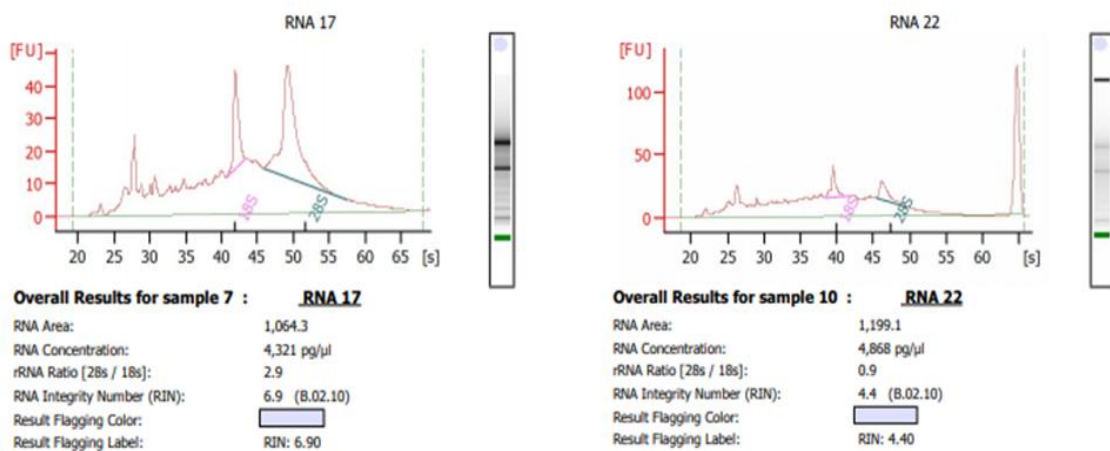
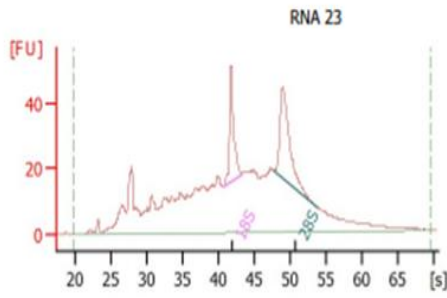


FIGURA 10 Curvas de amplificação obtidas na qPCR. Perfil observado a partir de amostras parafinadas com uso de 400nmol dos iniciadores CXCR4, CD26, CD133, Ki67, E-caderina, Vimentina, GAPDH, BETA-ACTINA. Foram utilizados 100ng de cDNA das amostras parafinadas. Controles negativos (sem DNA) foram utilizados. As amostras não superaram o *threshold*.

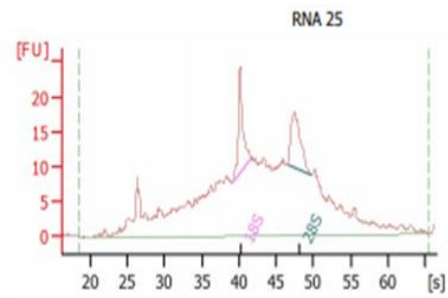
As mesmas análises foram realizadas para as amostras mantidas em *RNAlater* e armazenadas a -80°C . Sabe-se que o congelamento de tecido a fresco, coletado durante o ato cirúrgico, preserva o RNA, permitindo que seja utilizado para estudos de biologia molecular. O *Bioanalyzer* permitiu uma análise qualitativa e quantitativa de 14 amostras congeladas (Figura 11).





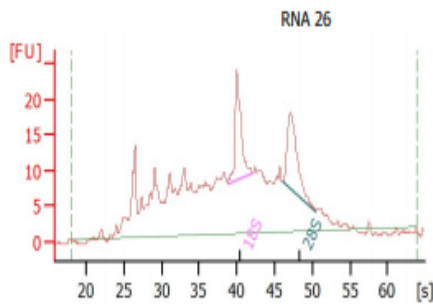
Overall Results for sample 11 : RNA 23

RNA Area: 1,148.0
 RNA Concentration: 4,661 pg/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
 RNA Integrity Number (RIN): 5.5 (B.02.10)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 5.50



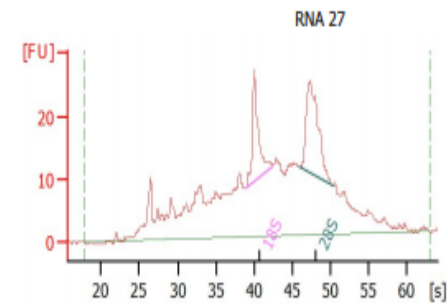
Overall Results for sample 2 : RNA 25

RNA Area: 569.5
 RNA Concentration: 5,826 pg/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.0
 RNA Integrity Number (RIN): 4.5 (B.02.10)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 4.50



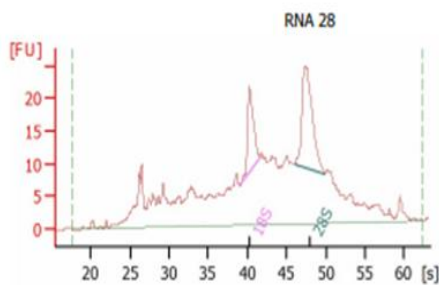
Overall Results for sample 3 : RNA 26

RNA Area: 551.5
 RNA Concentration: 5,642 pg/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.0
 RNA Integrity Number (RIN): 5.1 (B.02.10)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 5.10



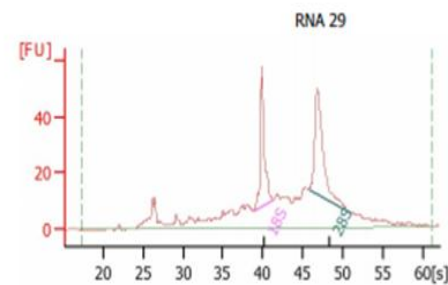
Overall Results for sample 4 : RNA 27

RNA Area: 661.1
 RNA Concentration: 6,762 pg/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.4
 RNA Integrity Number (RIN): 5.8 (B.02.10)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 5.80



Overall Results for sample 5 : RNA 28

RNA Area: 572.8
 RNA Concentration: 5,860 pg/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.8
 RNA Integrity Number (RIN): 5.6 (B.02.10)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 5.60



Overall Results for sample 6 : RNA 29

RNA Area: 639.0
 RNA Concentration: 6,537 pg/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.4
 RNA Integrity Number (RIN): 7.4 (B.02.10)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 7.40

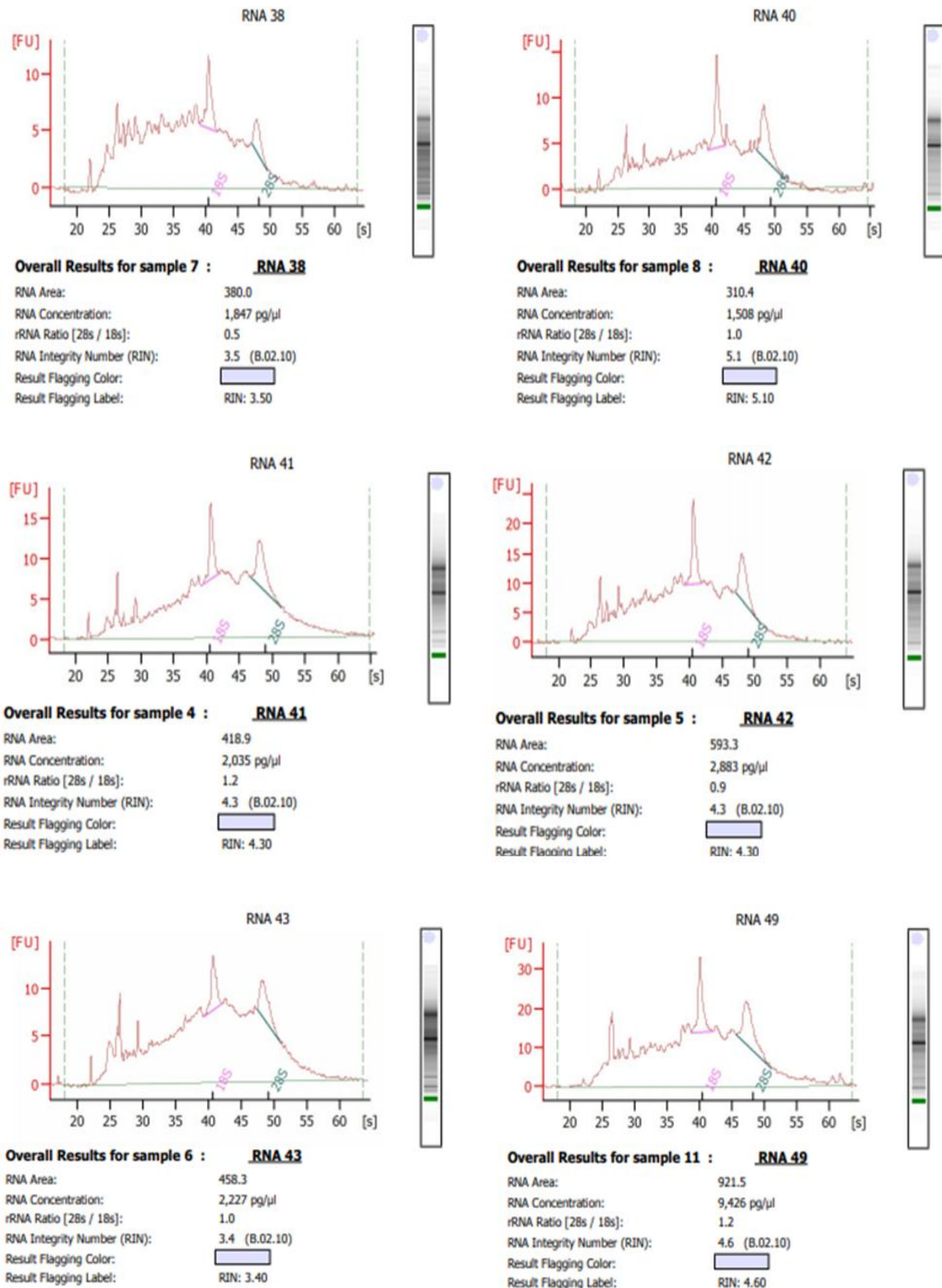


FIGURA 11 Eletroferograma dos RNAs extraído de amostras congeladas. Imagem demonstrando integridade dos rRNAs provenientes de amostras arquivadas no BTT, evidenciado pelos elevados picos dos RNAs ribossomais 18 e 28S. N/A: não há integridade.

O painel de corrida por eletroforese capilar apresentou RNA íntegro de 14 amostras analisadas. As duas bandas correspondentes às unidades ribossomais do RNA são visualizadas, indicando a qualidade do material.

Todas as amostras congeladas a -80°C foram submetidas à extração do RNA total e suas dosagens estão apresentadas na tabela 12.

As amostras 61, 67, 69, 70 e 71 obtiveram baixo rendimento de RNA, impossibilitando a utilização de 100 ng em cada replicata e para os oito alvos. As amostras 67 e 50 não foram enviadas pelo BTT – HC/UFMG e a amostra 18 foi perdida durante o processamento do RNA total.

TABELA 12 Dosagem de RNA total extraído, em NanoDrop 2000® UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific®), de amostras congeladas.

ID Amostra positiva	[ng/ul]	ID Amostra negativa	[ng/ul]	ID Amostra positiva	[ng/ul]	ID Amostra negativa	[ng/ul]
1	1328	38	149,2	17	369,6	53	632
2	1627	39	311	*	Excluída	54	808,2
3	1108	40	159,8	18	1038,7	55	1814,1
4	576	41	199,5	19	123,3	56	156,4
5	121,2	42	227,9	20	906,7	*	4,8*
6	1141,1	43	334,7	21	1468,7	57	1388,2
7	1578,6	44	402,3	22	1139,7	58	407
8	1271,8	45	398,3	23	1891,3	*	3,6*
9	642	46	447,9	24	1300	59	945,9
10	43,3	47	148,9	25	197,9	60	146,4
11	326	48	245,1	26	111,8	61	265,9
12	1169,8	49	389,6	27	168,3	*	Excluída
13	781,1	*	Excluída	28	1097,1	62	341,2
14	577,6	50	325,3	29	331,4	*	21*
15	759,1	51	684,9	30	107,2	70*	43,8*
16	1071,9	52	886,1	31	773,1	71*	23,7*

* baixa concentração de RNA total.

Após análises de qualidade e integridade, 13 amostras de material congelado foram submetidas à PCR em tempo real para análise do perfil de expressão e amplificação dos genes foi satisfatória, possibilitando sua utilização nas próximas etapas (Figura 12).

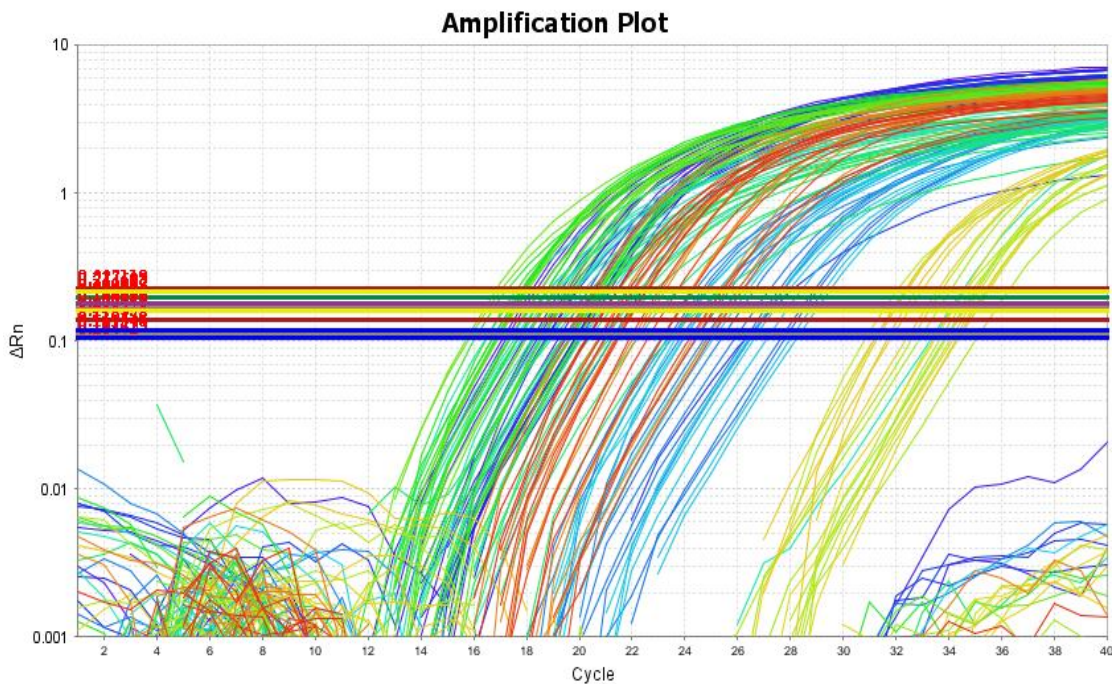


FIGURA 12 Curva de amplificação obtidas na qPCR. Curvas encontradas a partir de 400nmol dos iniciadores CXCR4, CD26, CD133, Ki67, E-caderina, Vimentina, GAPDH, β -actina. Foram utilizados 100ng de cDNA de 13 amostras congeladas. Controles negativos (sem DNA) foram utilizados. Todas as amostras atingiram o *threshold*.

A quantificação relativa é uma abordagem comumente adotada através da qual a expressão gênica é normalizada através de um controle gênico endógeno. A escolha do gene controle determina a confiabilidade dos dados gerados. Um bom gene de controle endógeno é expresso em todos os tecidos de interesse e com mínima variabilidade de expressão relativa em todas as amostras do estudo (tempo, condições, estímulos, etc.).

No presente estudo, analisamos dois genes comumente empregados em análises de expressão gênica em tumores intestinais como controles endógenos: o gene β -Actina, que codifica proteínas altamente conservadas envolvidas na motilidade celular, estrutura, integridade e sinalização intercelular e o gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), onde o produto desse gene, a enzima GAPDH, catalisa uma importante etapa produtora de energia no metabolismo de carboidratos, a fosforilação oxidativa reversível de gliceraldeído-3-fosfato na presença de fosfato inorgânico e dinucleotídeo de adenina nicotinamida (NAD).

Os dados de expressão gerados demonstraram a variabilidade do gene GAPDH frente às diferentes condições testadas e até mesmo dentro do mesmo grupo, apresentando desvios-padrões elevados. Vertentes como heterogeneidade amostral, por se tratar de fragmentos de tecido humano, dificultam a escolha de um bom normalizador. Considerando que a oscilação

do gene β -Act foi menor e que foi possível amplificá-lo em um número maior de amostras, ele foi escolhido como normalizador.

6.3 Análise da expressão gênica

Um ensaio de quantificação relativa é utilizado para analisar alterações na expressão gênica em uma determinada amostra relativa à outra amostra de referência. (Embrapa, 2014).

O gene GAPDH foi incluso na análise como alvo, não mais como controle endógeno, com a finalidade de compreender sua variabilidade. A análise estatística da expressão dos transcritos dos genes CXCR4, CD26, CD133, Ki67, E-caderina, Vimentina e GAPDH foi realizada e as variáveis estão dispostas na figura 26.

6.3.1 Correlação da expressão gênica dos marcadores com características do tumor

De acordo com o teste de Shapiro-Wilk, os dados não apresentaram distribuição normal e o teste de Mann Whitney foi adotado para análises comparativas. A figura 13 apresenta as análises comparativas em que os alvos demonstraram diferença estatística e, a figura 14, para os alvos que não apresentaram esta diferença entre os grupos positivo e negativo. Os dados encontrados demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos positivos para CCR e negativos para presença do tumor para os genes CXCR4, vimentina e GAPDH.

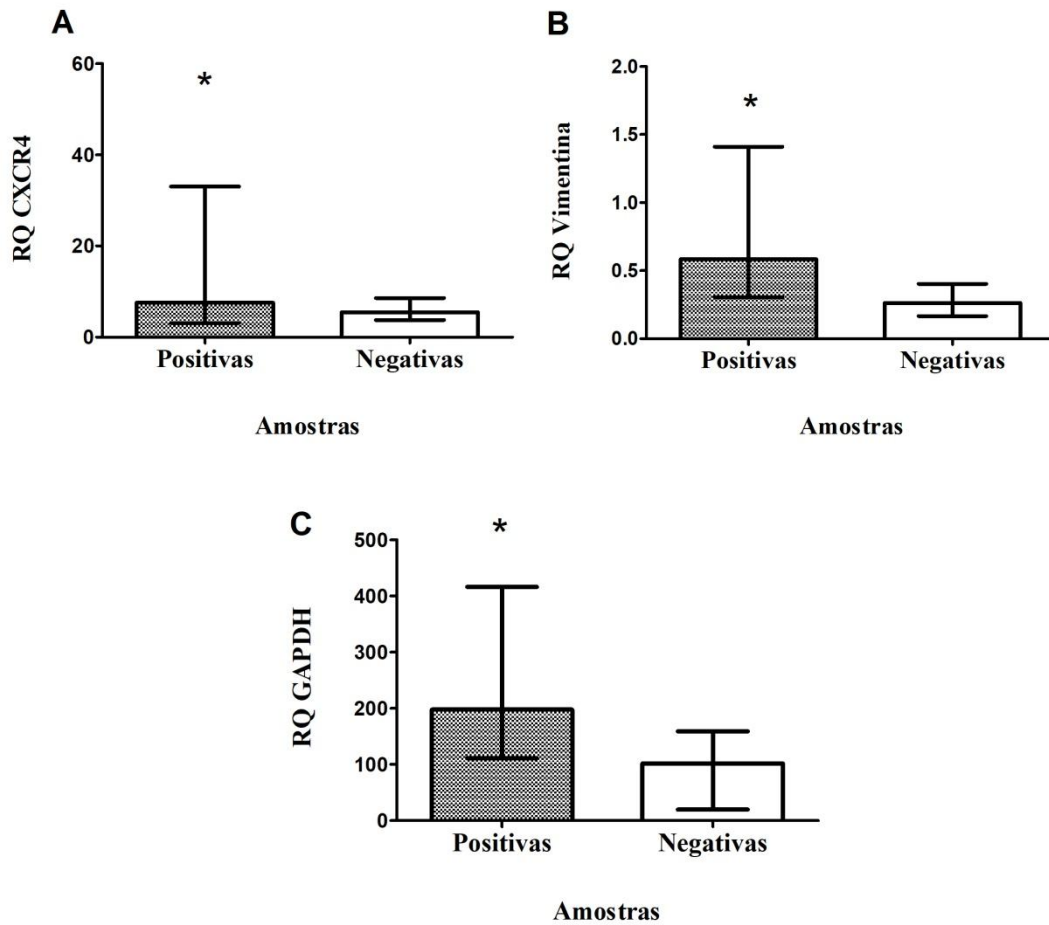


FIGURA 13 Valores da mediana de RQ e intervalo interquartis para CXCR4 (A), Vimentina (B) e GAPDH (C). Os gráficos representam as análises comparativas entre os grupos positivo e negativo para os alvos que demonstraram diferenças estatisticamente significativas.

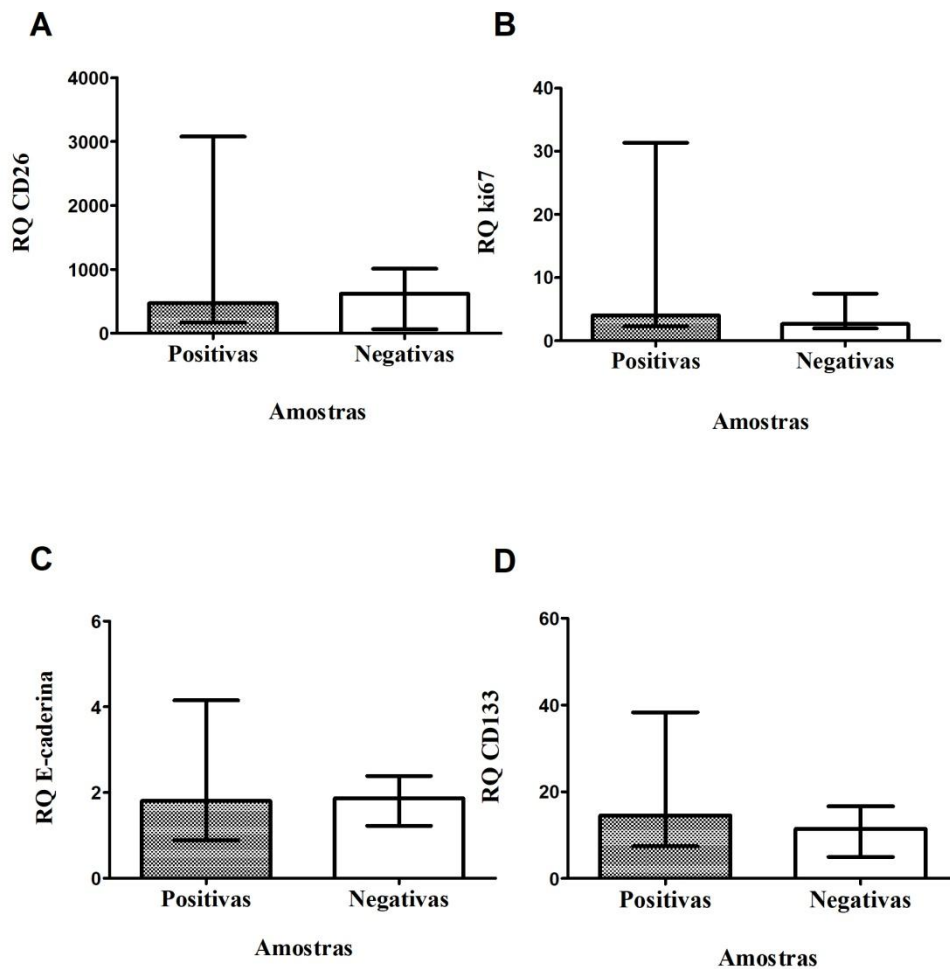
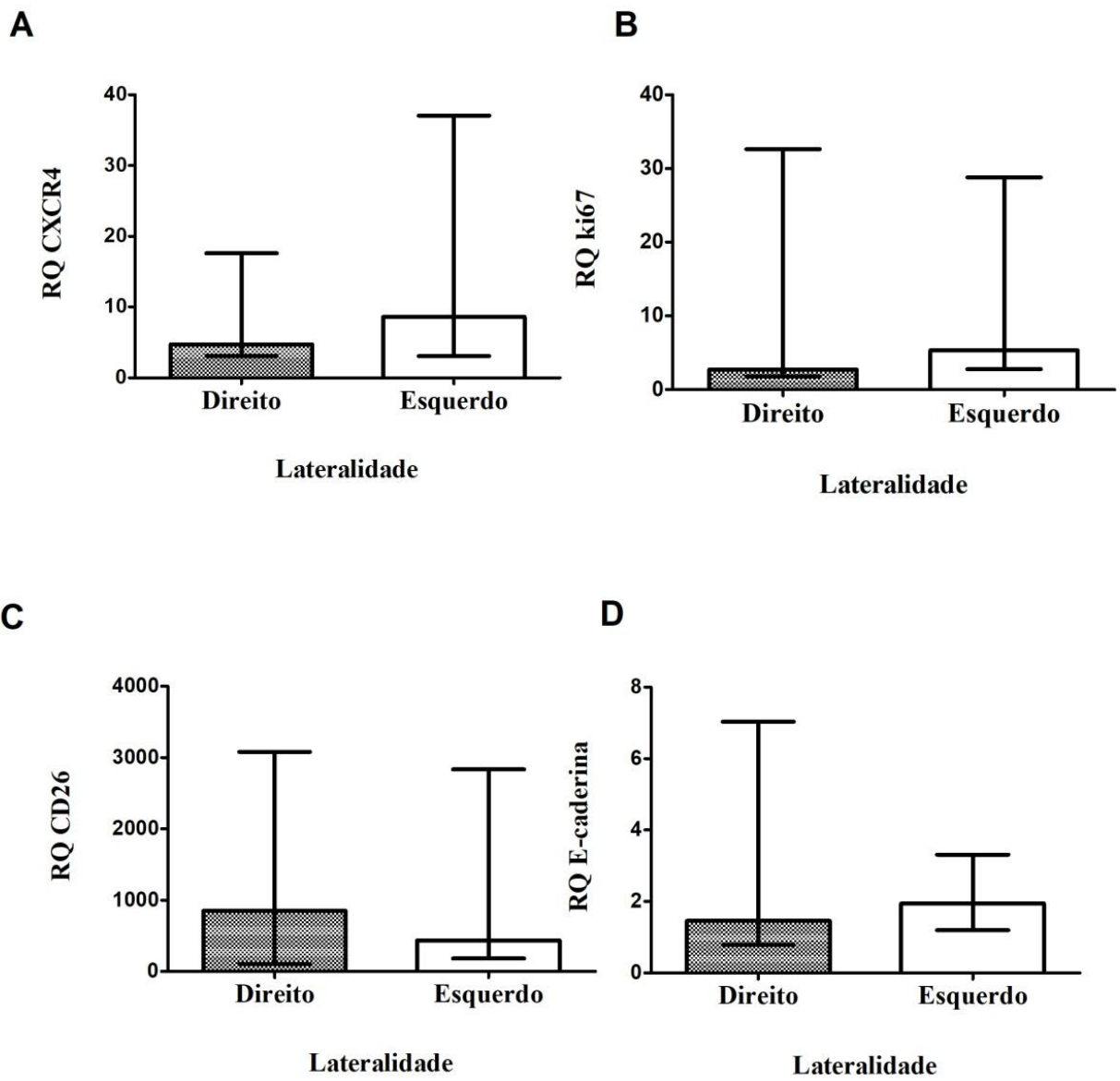


FIGURA 14 Valores da mediana de RQ e intervalo interquartis para CD26 (A), Ki67 (B), E-caderina (C) e CD133 (D). Os gráficos representam as análises comparativas entre os grupos positivo e negativo para os alvos que não demonstraram diferenças estatisticamente significativas.

Amostras positivas analisadas por meio do teste de Mann Whitney não apresentaram diferenças estatísticas quanto ao lado acometido pela neoplasia (Figura 15). Em contrapartida, os genes vimentina e GAPDH apresentaram diferentes perfis de expressão nas amostras negativas quando analisadas quanto à lateralidade (Figura 16) enquanto que os outros alvos não apresentaram diferença na expressão gênica (Figura 17).



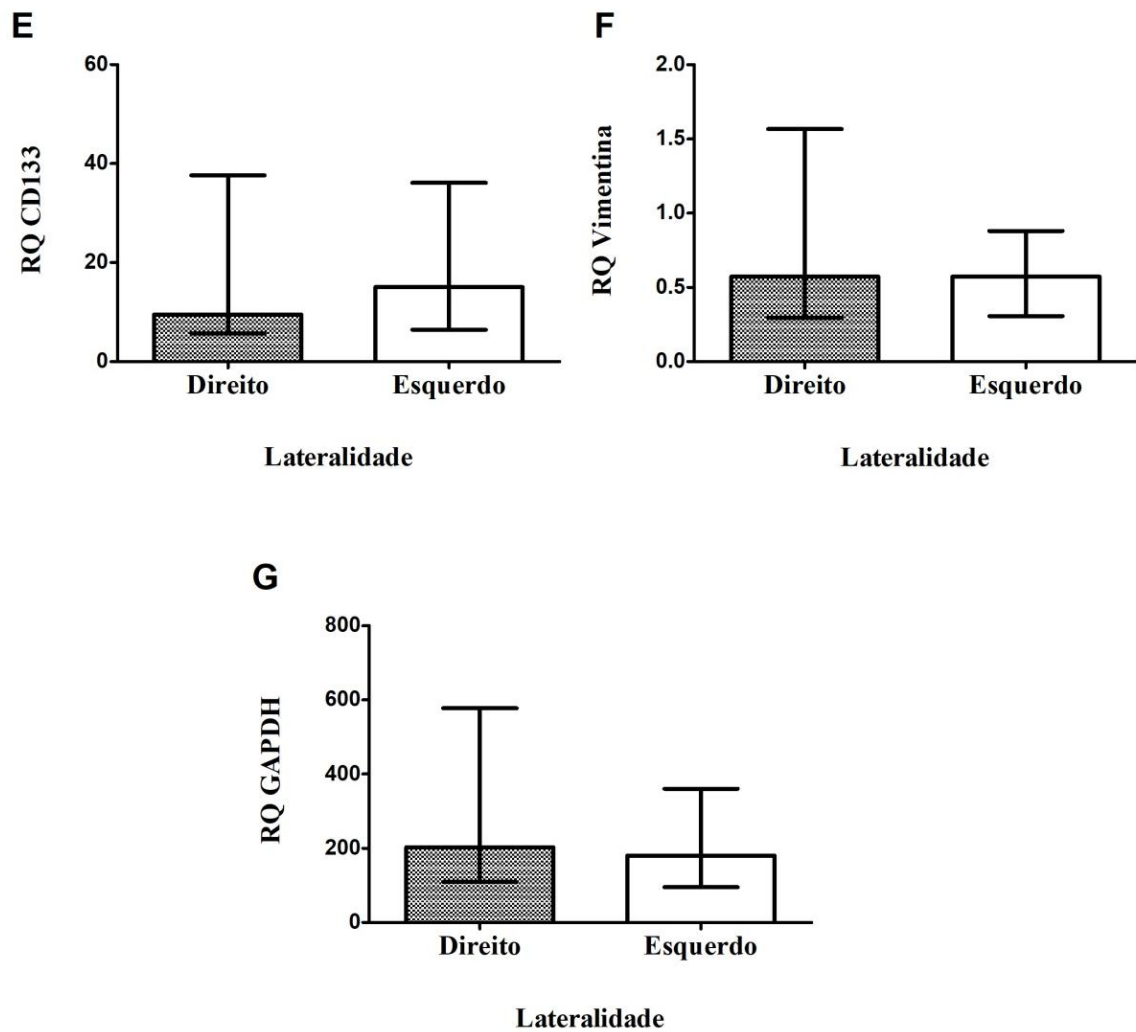


FIGURA 15 Valores da mediana de RQ e intervalos interquartis para CXCR4 (A), Ki67 (B), CD26 (C), E-caderina (D), CD133 (E), Vimentina (F) e GAPDH (G) em amostras positivas ao CCR. Os gráficos representam as análises comparativas entre os grupos positivos do lado direito do cólon.

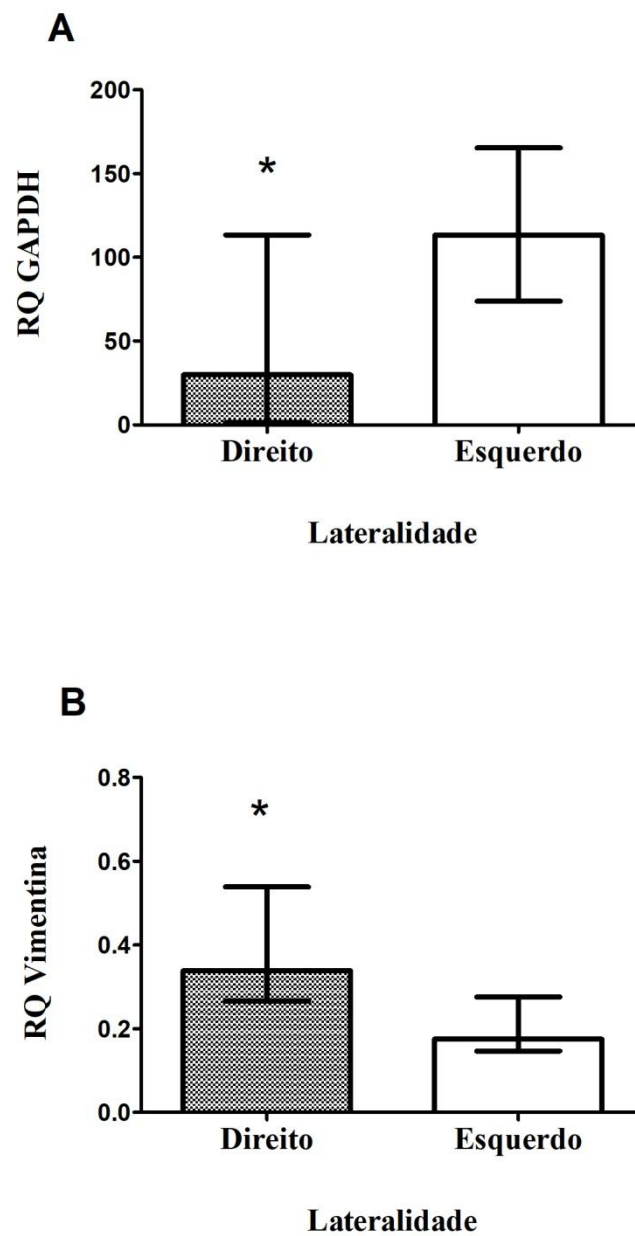


FIGURA 16 Valores da mediana de RQ e intervalos interquartis para GAPDH (A) e Vimentina (B). Os gráficos representam as análises comparativas entre os grupos negativos com sítios de acometimento direito e esquerdo para os alvos que demonstraram diferenças estatisticamente significativas.

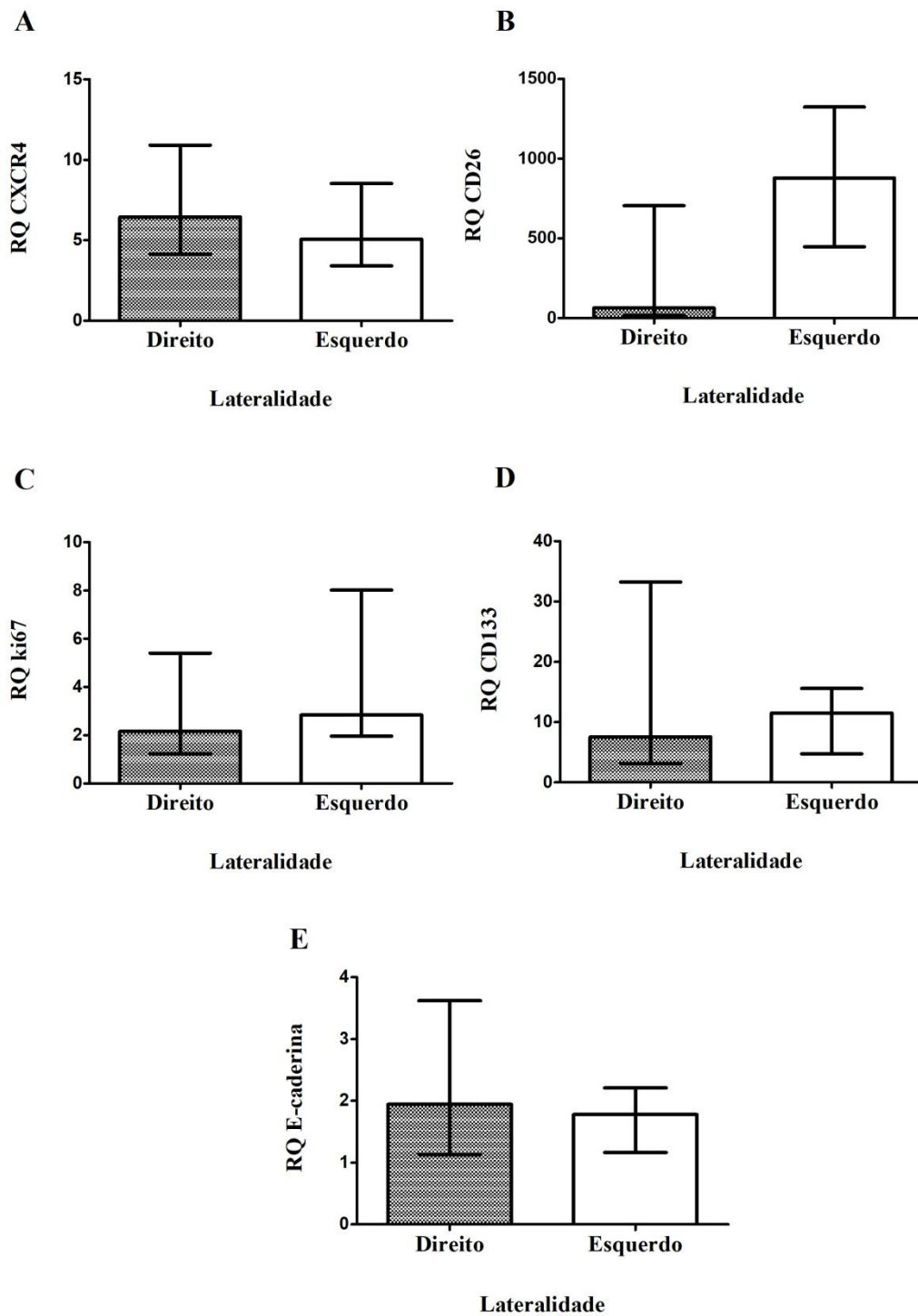
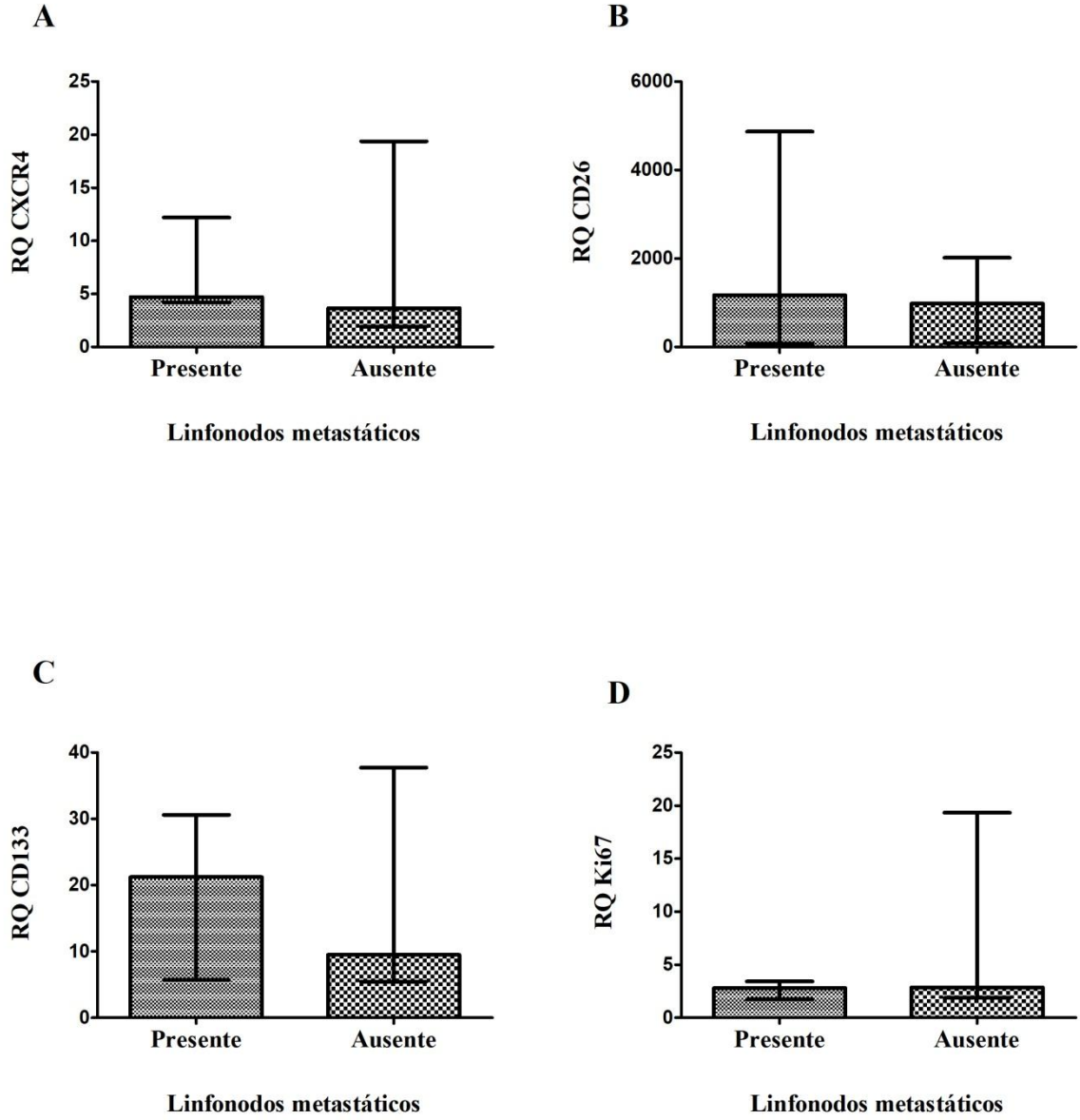


FIGURA 17 Valores da mediana de RQ e intervalos interquartis para CXCR4 (A), CD26 (B), Ki67 (C), CD133 (D) e E-caderina (E) em amostras negativas ao CCR. Os gráficos representam as análises comparativas entre os grupos negativos para os sítios direito e esquerdo para os alvos que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Não foram observadas diferenças estatísticas quando a expressão dos marcadores foi avaliada em relação à presença de metástase em linfonodos (Figura 18).



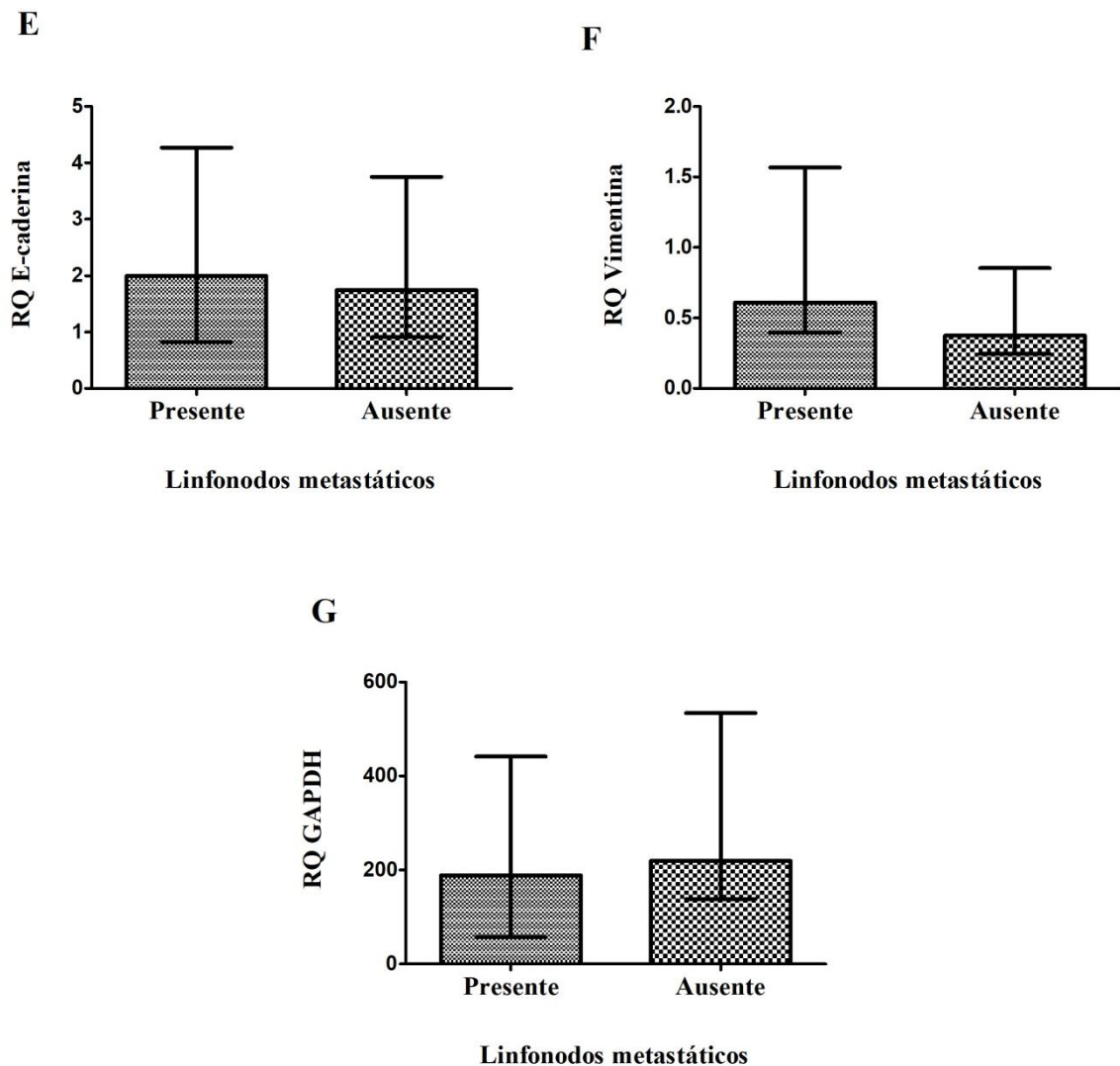
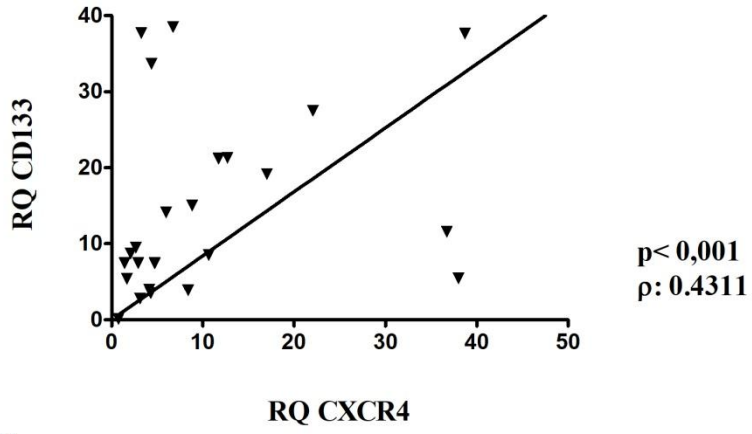


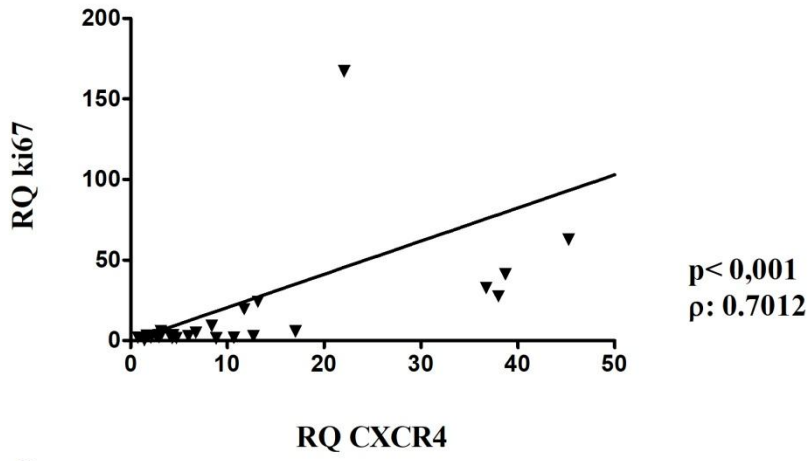
FIGURA 18 Valores da mediana de RQ e intervalos interquartis para CXCR4 (A), CD26 (B), CD133 (C), Ki67 (D), E-caderina (E), Vimentina (F) e GAPDH (G). Os gráficos representam as análises comparativas entre os marcadores e a presença e ausência de linfonodos metastáticos.

Para avaliar a correlação intergrupos das amostras positivas e negativas utilizou-se o coeficiente de Spearman, considerando 5% como nível de significância. Conforme os dados que se seguem, dentre as amostras positivas é notável a correlação direta entre a expressão dos genes CD133, Ki67, e-caderina e vimentina com a de CXCR4 (Figura 19A, B, C e D, respectivamente). Da mesma forma, pode-se observar forte correlação entre a expressão de CD26 e GAPDH (Figura 19E), entre Ki67 e CD133 (Figura 19F), e-caderina e CD133 (Figura 19G), e-caderina e Ki67 (Figura 19H), e vimentina e Ki67 (Figura 19I).

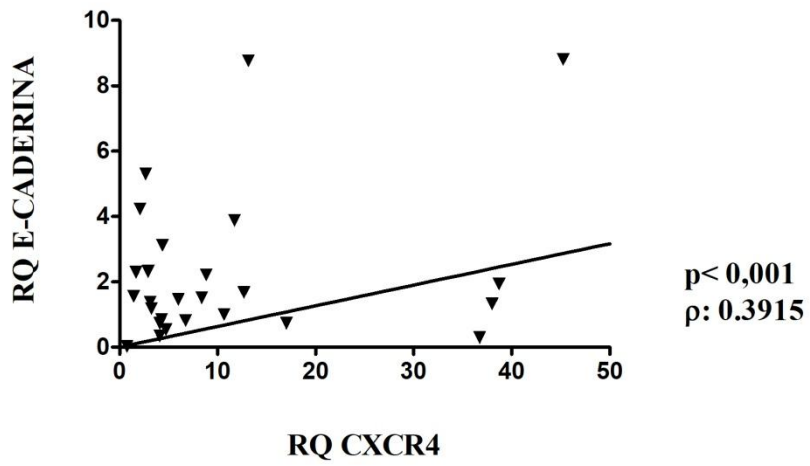
A



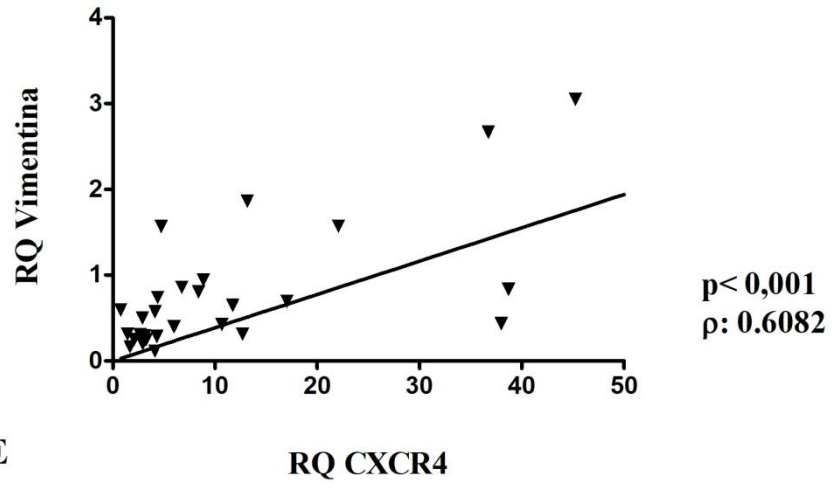
B



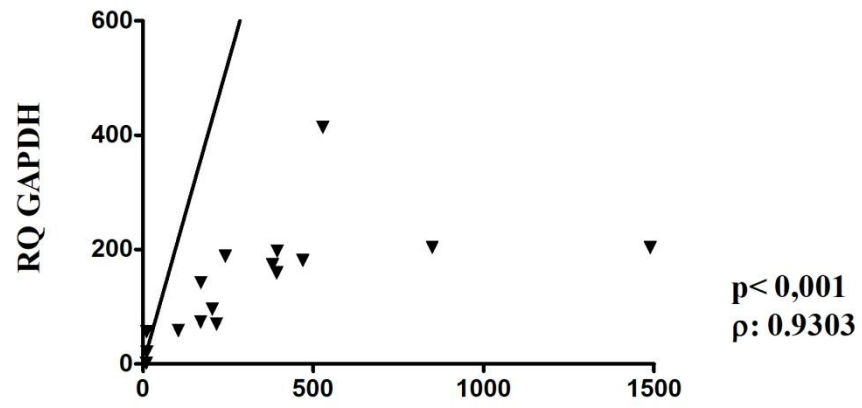
C



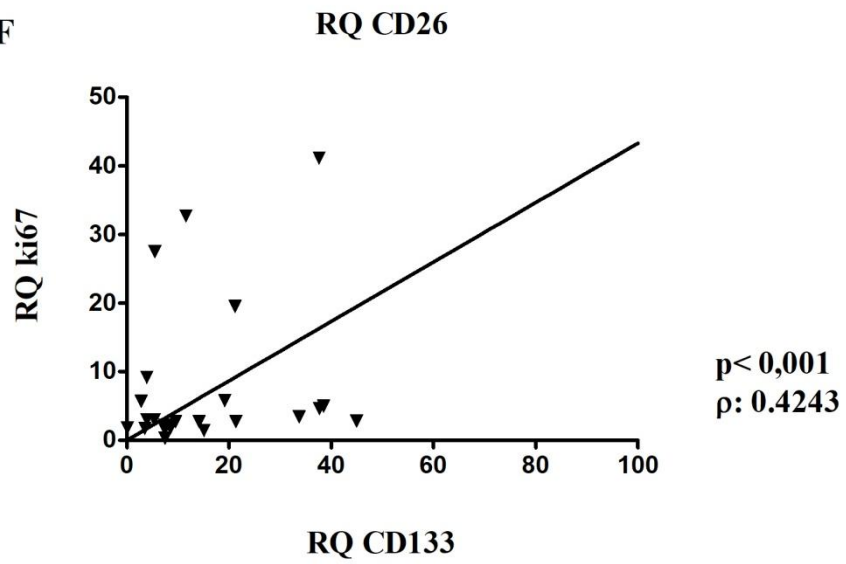
D



E



F



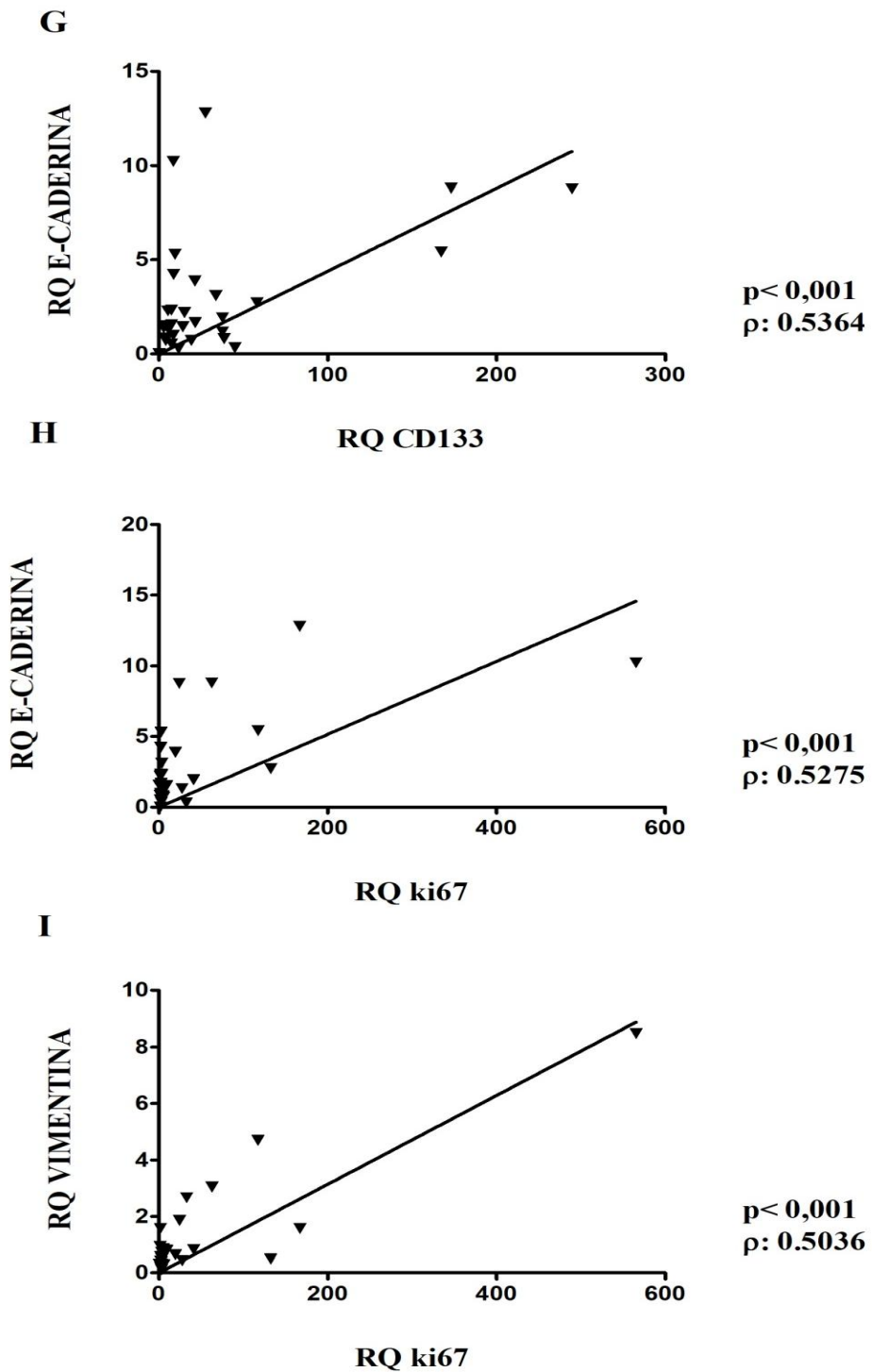


FIGURA 19 Coeficiente de correlação de Spearman dos marcadores propostos para as amostras positivas com significância estatística. (A) CXCR4/CD133, (B) CXCR4/Ki67, (C) CXCR4/E-caderina, (D) CXCR4/vimentina, (E) CD26/GAPDH, (F) CD133/Ki67, (G) CD133/E-caderina, (H)

Para as amostras negativas, as correlações também estão presentes onde a expressão de CXCR4 teve correlação direta com a expressão de Ki67 (Figura 20A). Da mesma forma, foi encontrada correlação entre a expressão de e-caderina e CD133, e de GAPDH e vimentina (Figura 20B e C, respectivamente).

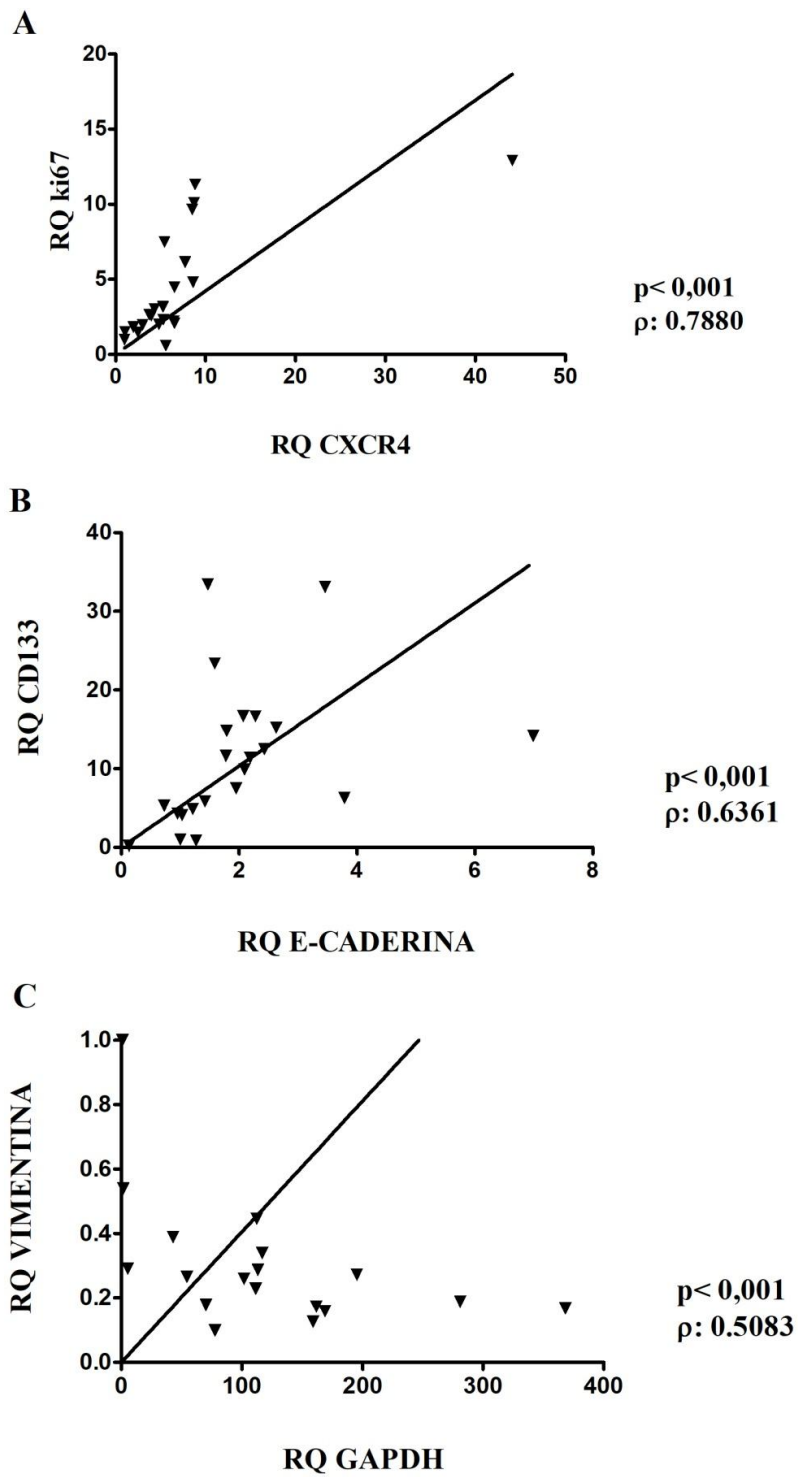


FIGURA 20 Coeficiente de correlação de Spearman dos marcadores propostos para as amostras negativas com significância estatística. (A) CXCR4/Ki67, (B) Ecaderina/CD133 e (C) GAPDH/vimentina.

O teste de Wilcoxon pareado é utilizado para comparar se as medidas de posição de duas amostras são iguais no caso em que as amostras são dependentes. A partir da figura 21 pode-se inferir que a expressão de GAPDH foi alterada pela condição patológica.

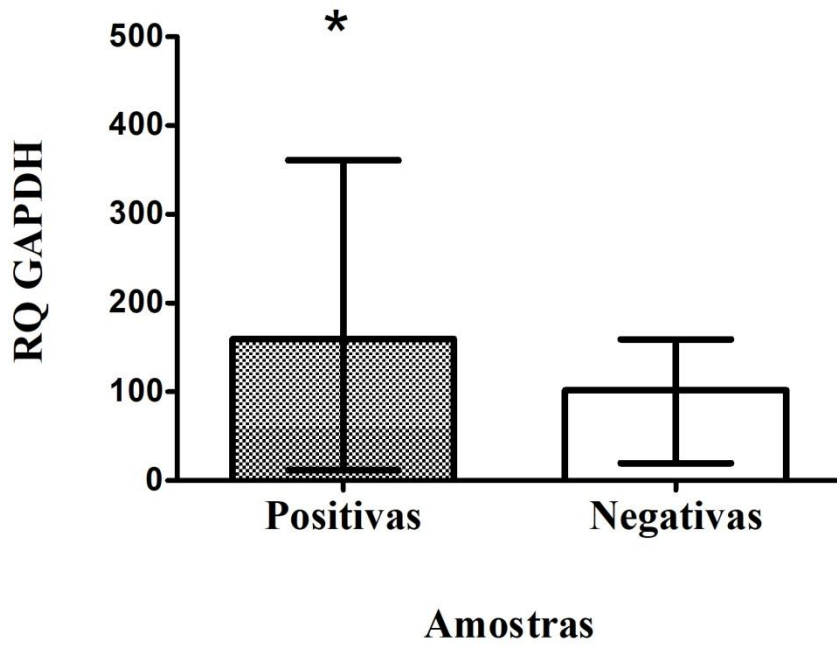


FIGURA 21 Teste de Wilcoxon comparativo para as amostras positivas ao CCR. Teste comparativo e os valores de mediana e intervalos interquartis dos marcadores propostos para as amostras positivas e negativas no caso de serem dependentes com significância estatística.

Foi realizada a distribuição amostral baseado na frequência do estadiamento TNM (Figura 22). Tumor estágio pT4pN1pMx apresentou menor expressão para os sete genes estudados, enquanto pT2pN2pMx foi o que promoveu maior expressão dos marcadores propostos.

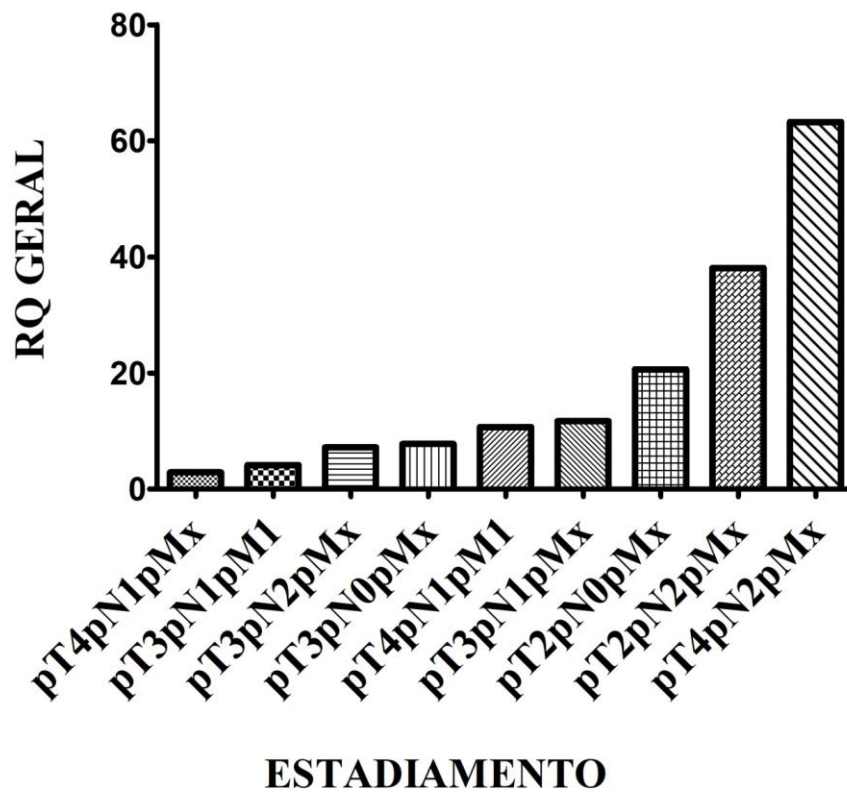


FIGURA 22 Gráfico de estadiamento TNM vs. valor da mediana geral dos RQs de todos os marcadores. Gráfico demonstrando perfis patológicos com maior expressão dos marcadores estudados.

Os pacientes que tiveram suas amostras congeladas e arquivadas no BTT foram contatados para obtenção de dados de evolução da doença e desfecho. No entanto, foi possível coletar informações de apenas 9 (27%) dos pacientes, conforme tabela 13. Os pacientes consultados não foram submetidos ao tratamento radioterápico e apenas um sofreu recidiva, metástase e nova intervenção cirúrgica levando ao desfecho de óbito.

TABELA 13 Distribuição de informações de evolução e desfecho da doença

ID	Estadiamento TNM	Classificação Dukes	Ciclos de QM	Quimioterápicos**	Reicidiva	Metástase	Nova intervenção cirúrgica	Desfecho
2	pT3pN1pM1	Estadio IV A	3 ciclos	Ox, Leuc, 5-FU	Sim	Sim	Sim	Óbito
12	pT2pN0pMx	Estadio I	*	*	Não	Não	Não	Curativo
16	pT4pN1pMx	Estadio III B	12 ciclos	Ox, Leuc, 5-FU, Capec	Não	Não	Não	Curativo
17	pT3pN1pMx	Estadio III B	6 ciclos	Ox, Leuc, 5-FU, Capec	Não	Não	Não	Curativo
19	pT4pN2pMx	Estadio III C	6 ciclos	Xeloda	Não	Não	Não	Curativo
22	pT3pN0pM	Estadio II A	3 ciclos	5-FU, Leuc, Capec	Não	Não	Não	Curativo
26	pT3pN1pMx	Estadio III B	6 ciclos	Ox, Leuc, 5-FU, Capec	Não	Não	Não	Curativo
27	pT2pN2pMx	Estadio III B	6 ciclos	Ox, Leuc, 5-FU, Capec	Não	Não	Não	Curativo
28	pT4pN2pMx	Estadio III C	6 ciclos	Ox, Leuc, 5-FU, Capec	Não	Não	Não	Curativo

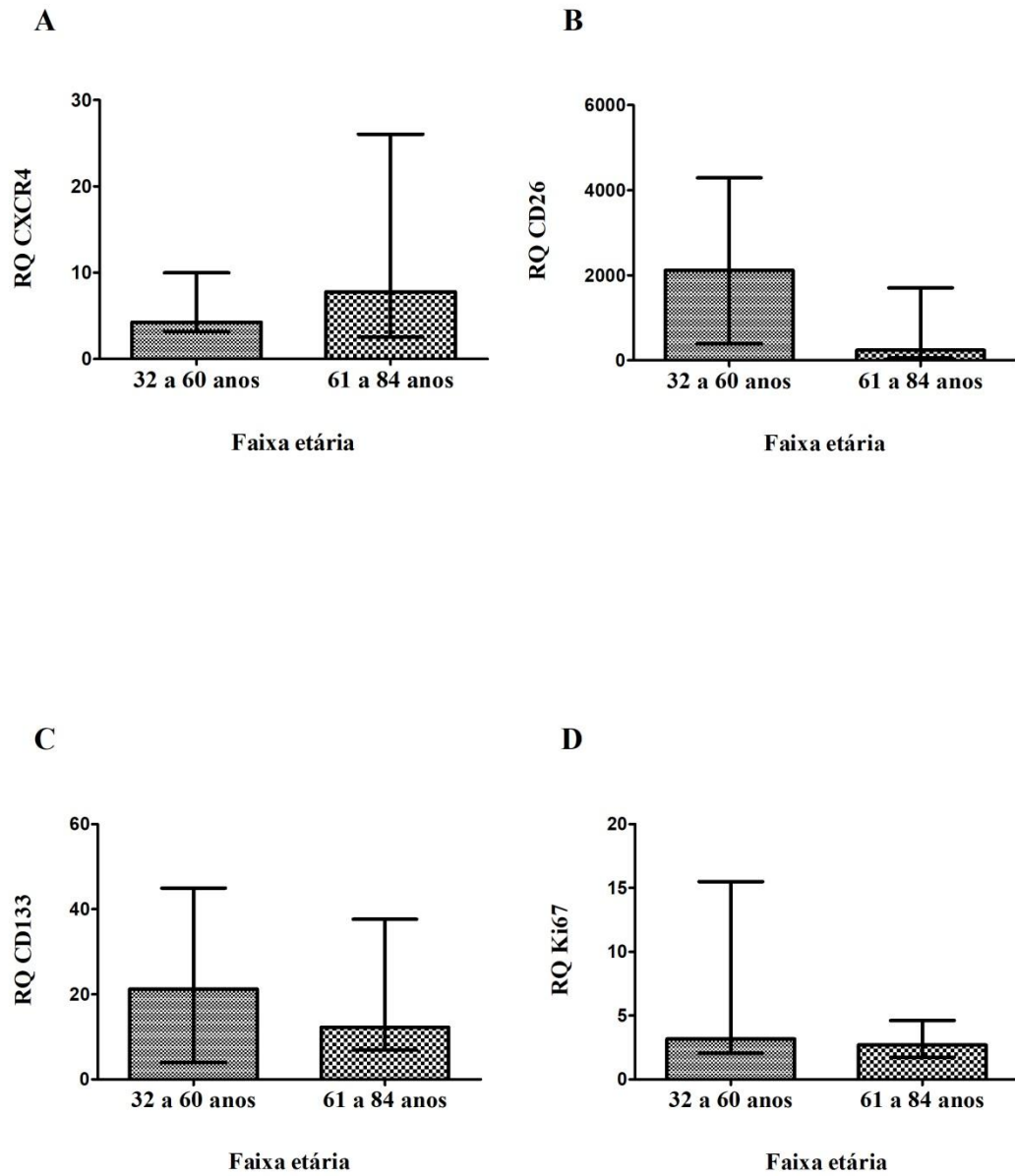
* Pacientes Estadio I não recebem tratamento adjuvante, considerando protocolo regular.

** Quimioterápicos considerando protocolo regular.

Ox: oxaliplatina, Leuc: leucovorin, 5-FU: fluoropirimidinas, Capec: capecitabina

6.3.2 Correlação da expressão gênica dos marcadores com características do paciente

A comparação da faixa etária com a expressão dos marcadores está representada na figura 23, onde não foram observadas diferenças estatísticas significativas conforme o teste de Mann-Whitney.



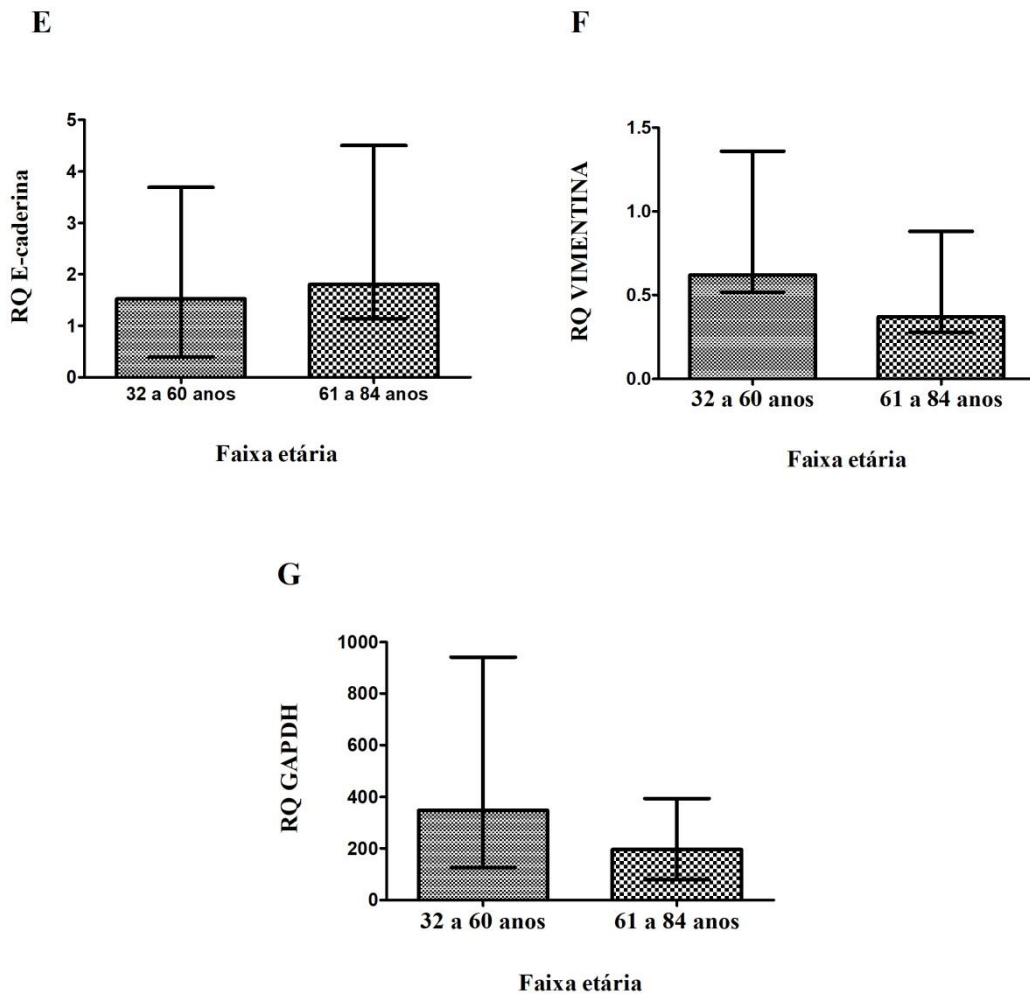
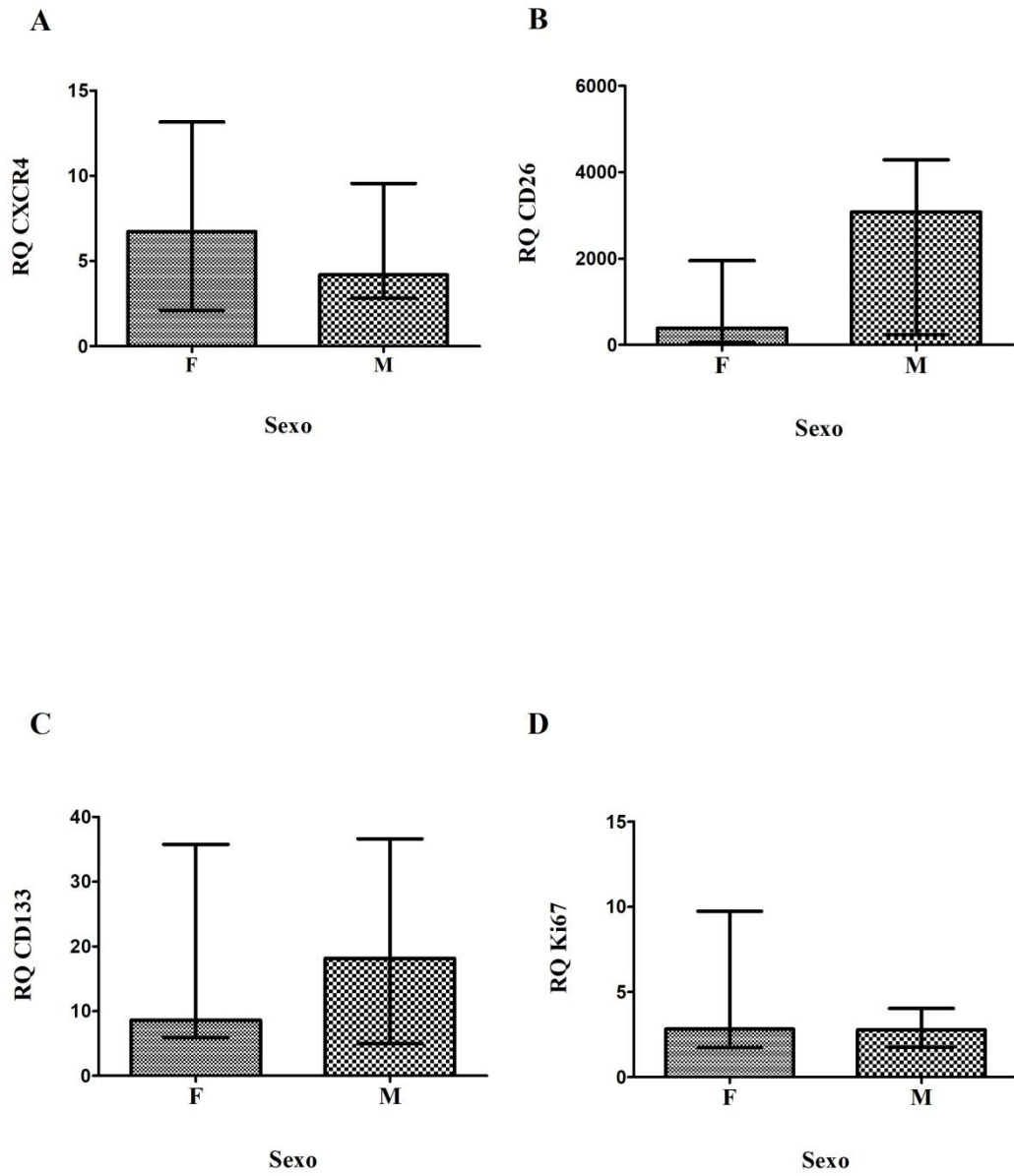


FIGURA 23 Valores da mediana de RQ e intervalos interquartis para CXCR4 (A), CD26 (B), CD133 (C), Ki67 (D) e E-caderina (E) em amostras positivas ao CCR quanto à faixa etária. Os gráficos representam as análises comparativas para os alvos que não demonstraram diferenças estatisticamente significativas.

Foi também realizada, por meio do teste de Mann-Whitney, a comparação das expressões dos marcadores em relação ao sexo dos pacientes. No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas significativas (Figura 24).



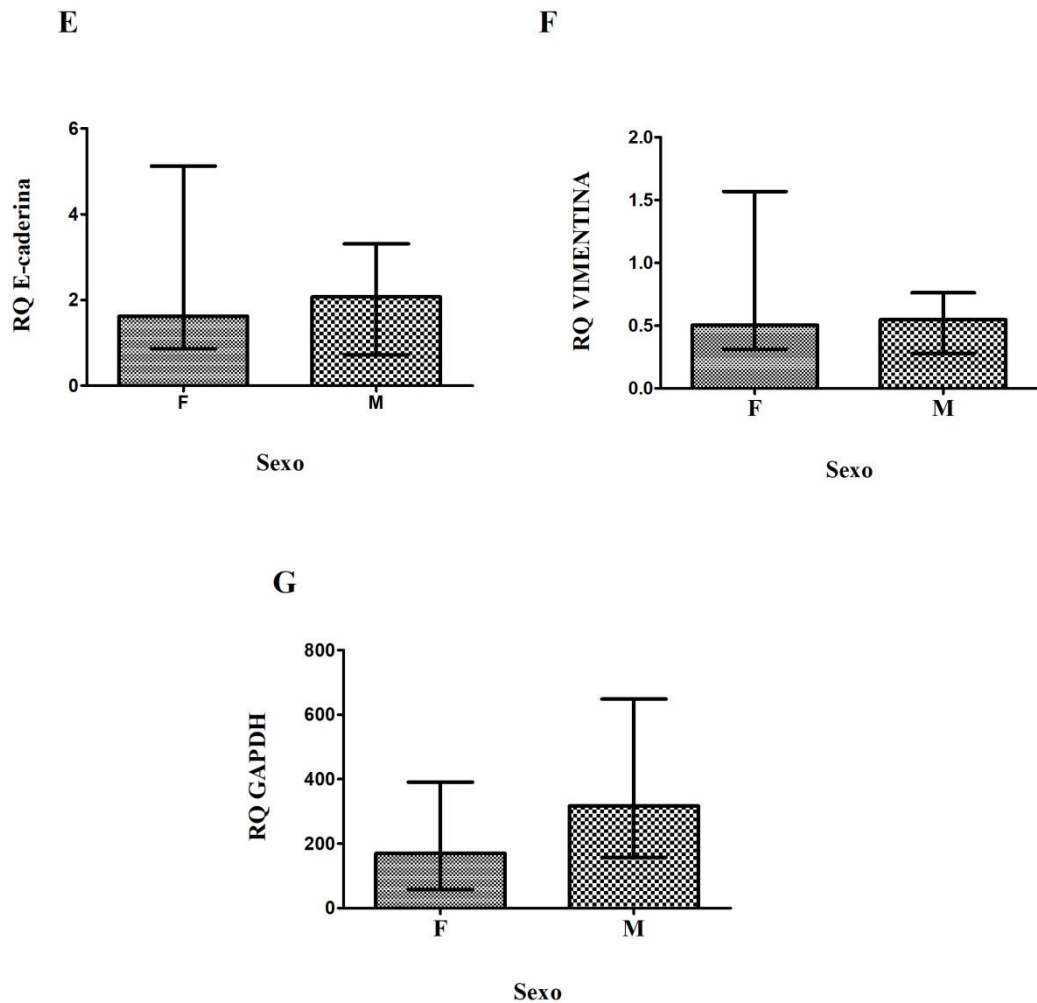
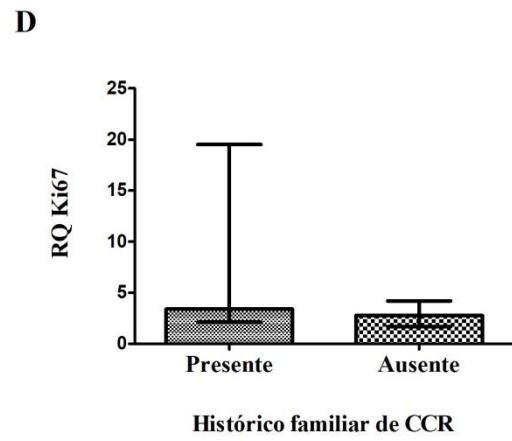
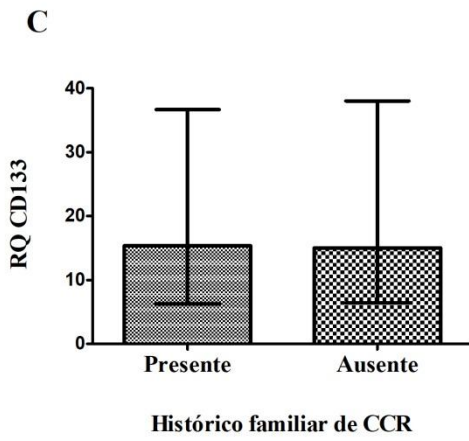
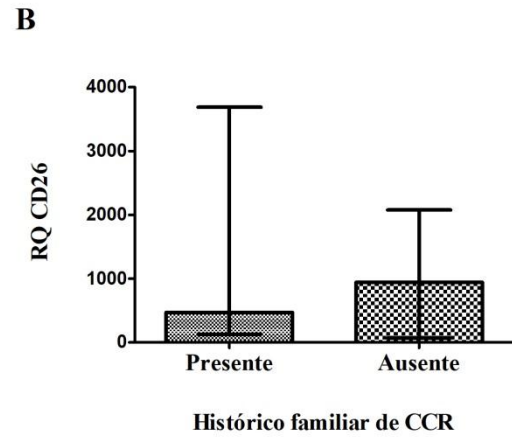
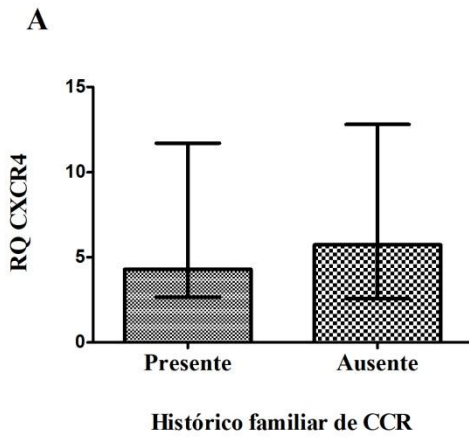


FIGURA 24 Valores da mediana de RQ e intervalos interquartilis para CXCR4 (A), CD26 (B), CD133 (C), Ki67 (D) e E-caderina (E) em amostras positivas ao CCR quanto ao sexo dos pacientes. Os gráficos representam as análises comparativas para os alvos que não demonstraram diferenças estatisticamente significativas.

A comparação da presença e ausência de histórico familiar de CCR com a expressão dos marcadores está representada na figura 25. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.



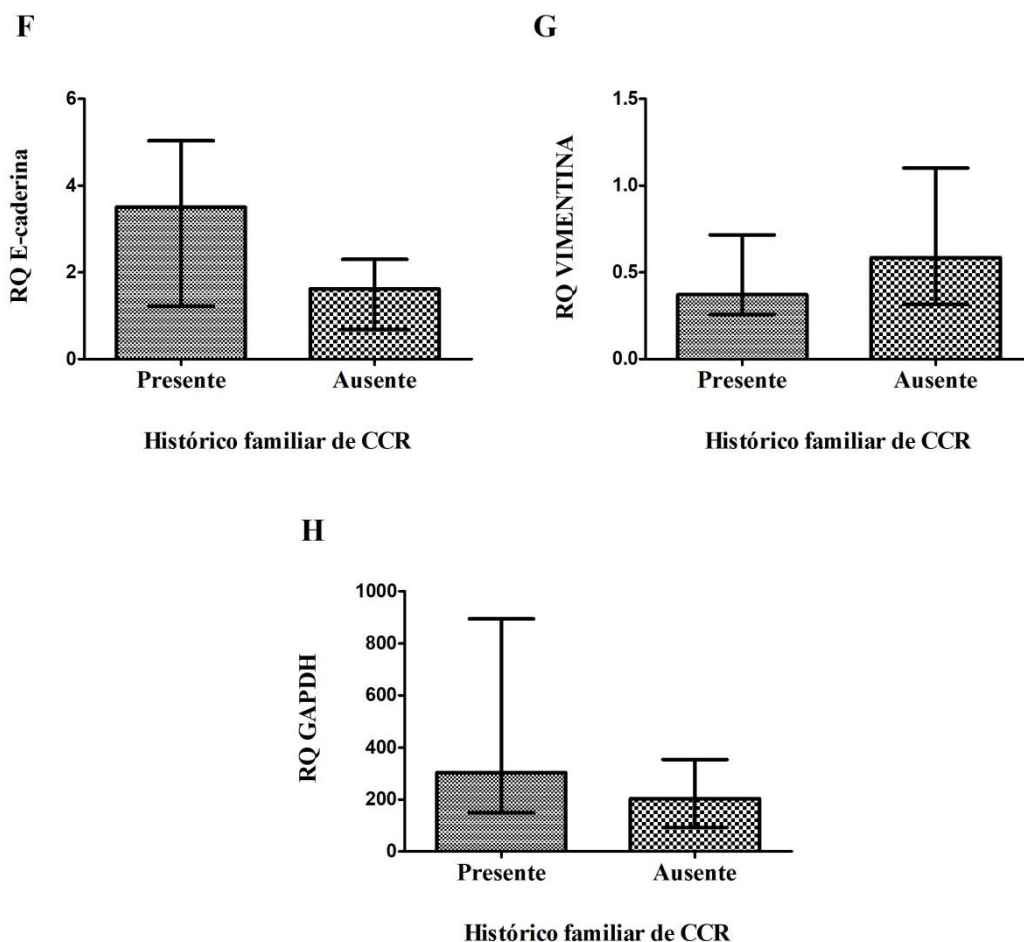


FIGURA 25 Valores da mediana de RQ e intervalos interquartis para CXCR4 (A), CD26 (B), CD133 (C), Ki67 (D) e E-caderina (E) em amostras positivas ao CCR ao histórico familiar de CCR. Os gráficos representam as análises comparativas para os alvos que não demonstraram diferenças estatisticamente significativas.

6.4 Produção das proteínas CXCR4 e CD26 recombinantes

6.4.1 Amplificação e purificação dos genes de interesse

Os fragmentos gênicos correspondentes a CXCR4 e CD26 apresentaram bons níveis de amplificação, apresentando-se, em perfil eletroforético, tamanhos esperados com *amplicons* de cerca de 1.000 bp e 200 bp, respectivamente, não havendo produção de artefatos de amplificação (Figura 26). Observou a amplificação dos genes denominados CXCR4 17,18 CXCR4 13,14, CD26 9,10, CD26 5,6, nos tamanhos esperados. O produto final então foi purificado por precipitação em etanol e os passos de inserção no vetor de entrada (pDONR) foram conduzidos.

Sequência de nucleotídeos de CXCR4(1.691 pb)

AACTTCAGTTTGTGGCTGCGGCAGCAGGTAGCAAAGTGACGCCGAGGGCCTGA
 GTGCTCCAGTAGCCACCGCATCTGGAGAACCAGCGGTTACCATGGAGGGGATCA
 GTATATACTTCAGATAACTACACCGAGGAAATGGGCTCAGGGGACTATGACTC
 CATGAAGGAACCCTGTTTCCGTGAAGAAAATGCTAATTTCAATAAAAATCTTCCTG
 CCCACCATCTACTCCATCATCTTCTTA ACTGGCATTGTGGGCAATGGATTGGTCAT
 CCTGGTCATGGGTTACCAGAAGAACTGAGAAGCATGACGGACAAGTACAGGCT
 GCACCTGTCAGTGGCCGACCTCCTCTTTGTCATCACGCTTCCCTTCTGGGCAGTTG
 ATGCCGTGGCAA ACTGGTACTTTGGGAACTTCCTATGCAAGGCAGTCCATGTCAT
 CTACACAGTCAACCTCTACAGCAGTGTCTCATCCTGGCCTTCATCAGTCTGGACC
 GCTACCTGGCCATCGTCCACGCCACCAACAGTCAGAGGCCAAGGAAGCTGTTGGC
 TGAAAAGGTGGTCTATGTTGGCGTCTGGATCCCTGCCCTCCTGCTGACTATTCCCG
 ACTTCATCTTTGCCAACGTCAGTGAGGCAGATGACAGATATATCTGTGACCGCTT
 CTACCCCAATGACTTGTGGGTGGTTGTGTTCCAGTTTCAGCACATCATGGTTGGCC
 TTATCCTGCCTGGTATTGTCATCCTGTCTGCTATTGCATTATCATCTCCAAGCTGT
 CACACTCCAAGGGCCACCAGAAGCGCAAGGCCCTCAAGACCACAGTCATCCTCA
 TCCTGGCTTTCTTCGCCTGTTGGCTGCCTTACTACATTGGGATCAGCATCGACTCC
 TTCATCCTCCTGGAAATCATCAAGCAAGGGTGTGAGTTTGAGAACACTGTGCACA
 AGTGGATTTCCATCACCGAGGCCCTAGCTTTCTTCCACTGTTGTCTGAACCCCATC
 CTCTATGCTTTCCTTGGAGCCAAATTTAAAACCTCTGCCCAGCACGCACTCACCTC
 TGTGAGCAGAGGGTCCAGCCTCAAGATCCTCTCCAAAGGAAAGCGAGGTGGACA
 TTCATCTGTTTCCACTGAGTCTGAGTCTTCAAGTTTTCACTCCAGCTAACACAGAT
 GTAAAAGACTTTTTTTTATACGATAAATAACTTTTTTTTAAGTTACACATTTTTCA
 GATATAAAAGACTGACCAATATTGTACAGTTTTTATTGCTTGTGGATTTTTGTCT
 TGTGTTTCTTTAGTTTTTTGTGAAGTTAATTGACTTATTTATATAAATTTTTTTGTT
 TCATATTGATGTGTGTCTAGGCAGGACCTGTGGCCAAGTTCTTAGTTGCTGTATGT
 CTCGTGGTAGGACTGTAGAAAAGGGA ACTGAACATTCCAGAGCGTGTAGTGAAT
 CACGTAAAGCTAGAAATGATCCCCAGCTGTTTATGCATAGATAATCTCTCCATTC
 CCGTGGAACGTTTTTCCTGTTCTTAAGACGTGATTTTGCTGTAGAAGATGGCACTT
 ATAACCAAAGCCCAAAGTGGTATAGAAATGCTGGTTTTTCAGTTTTTCAGGAGTGG
 GTTGATTTTCAGCACCTACAGTGTACAGTCTTGTATTAAGTTGTTAATAAAAAGTACA
 TGTTAAACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Sequência de aminoácidos de CXCR4 (356 aa)

MSIPLPLLQIYTS DNYTEEMSGDYDSMKEPCFREENANFNKIFLPTIYSIIFLTGIVGN
 GLVILVMGYQKKLRSM TDKYRLHLSVADLLFVITLPFWAVDAVANWYFGNFLCKA
 VHVIYTVNLYSSVLILAFISLDRYLAI VHATNSQRPRKLLAEKVYVGVWIPALLLTIP
 DFIFANVSEADDRYICDRFYPNDLWV VVFQFQHIMVGLILPGIVILSCYCIISKLSHSK
 GHQKRKALKTTVILILAFFACWLPYYIGISIDSFILLEI IKQGCEFENTVHKWISITEALA
 FFHCCLNPILYAFLGAKFKTSAQH ALTSVSRGSSLKILSKGKRGGHSSVSTESSESSFHS
 S

Sequência de nucleotídeos de CD26 (3.573 pb)

AGTGCCCCGCGCCACGCGCGCTGCTCCCGCGCCGCCTGCCCTGCAGCCTGCCCG
 CGGCGCCTTTATACCCAGCGGGCTCGGCGCTACTAATGTTTAACTCGGGGCCGA
 AACTTGCCAGCGGCGAGTGACTCCACCGCCCGGAGCAGCGGTGCAGGACGCGCG
 TCTCCGCCGCCGCGGTGACTTCTGCCTGCGCTCCTTCTCTGAACGCTCACTTCCG
 AGGAGACGCCGACGATGAAGACACCGTGGAAGGTTCTTCTGGGACTGCTGGGTG
 CTGCTGCGCTTGTACCATCATCACCGTGCCCGTGGTTCTGCTGAACAAAGGCAC

AGATGATGCTACAGCTGACAGTCGCAAACTTACACTCTAACTGATTACTTAAAA
AATACTTATAGACTGAAGTTATACTCCTTAAGATGGATTTTCAGATCATGAATATCT
CTACAAACAAGAAAATAATATCTTGGTATTCAATGCTGAATATGGAAACAGCTCA
GTTTTCTTGGAGAACAGTACATTTGATGAGTTTGGACATTCTATCAATGATTATTC
AATATCTCCTGATGGGCAGTTTATTCTCTTAGAATACAACACTACGTGAAGCAATGG
AGGCATTCCCTACACAGCTTCATATGACATTTATGATTTAAATAAAAAGGCAGCTGA
TTACAGAAGAGAGGATTCCAAACAACACACAGTGGGTCACATGGTCACCAGTGG
GTCATAAATTGGCATATGTTTGGAAACAATGACATTTATGTTAAAATTGAACCAAA
TTTACCAAGTTACAGAATCACATGGACGGGGAAAGAAGATATAATATATAATGG
AATAACTGACTGGGTTTATGAAGAGGAAGTCTTCAGTGCCTACTCTGCTCTGTGG
TGGTCTCCAAACGGCACTTTTTTAGCATATGCCCAATTTAACGACACAGAAGTCC
CACTTATTGAATACTCCTTCTACTCTGATGAGTCACTGCAGTACCCAAAGACTGTA
CGGGTTCCATATCCAAAGGCAGGAGCTGTGAATCCAACTGTAAAGTTCTTTGTTG
TAAATACAGACTCTCTCAGCTCAGTCACCAATGCAACTTCATACAAATCACTGC
TCCTGCTTCTATGTTGATAGGGGATCACTACTTGTGTGATGTGACATGGGCAACA
CAAGAAAGAATTTCTTTGCAGTGGCTCAGGAGGATTCAGAACTATTCGGTCATGG
ATATTTGTGACTATGATGAATCCAGTGGAAAGATGGAAGTCTTAGTGGCACGGCA
ACACATTGAAATGAGTACTACTGGCTGGGTTGGAAGATTTAGGCCTTCAGAACCT
CATTTTACCCTTGATGGTAATAGCTTCTACAAGATCATCAGCAATGAAGAAGGTT
ACAGACACATTTGCTATTTCCAAATAGATAAAAAAGACTGCACATTTATTACAAA
AGGCACCTGGGAAGTCATCGGGATAGAAGCTCTAACCAGTGATTATCTATACTAC
ATTAGTAATGAATATAAAGGAATGCCAGGAGGAAGGAATCTTTATAAAATCCAA
CTTAGTGACTATACAAAAGTGACATGCCTCAGTTGTGAGCTGAATCCGGAAAGGT
GTCAGTACTATTCTGTGTCATTCAGTAAAGAGGGCGAAGTATTATCAGCTGAGATG
TTCCGGTCCCTGGTCTGCCCTCTATACTCTACACAGCAGCGTGAATGATAAAGGG
CTGAGAGTCCTGGAAGACAATTCAGCTTTGGATAAAAATGCTGCAGAATGTCCAGA
TGCCCTCCAAAAAACTGGACTTCATTATTTTGAATGAAACAAAATTTTGGTATCA
GATGATCTTGCCCTCCTCATTTTGATAAATCCAAGAAATATCCTCTACTATTAGATG
TGTATGCAGGCCCATGTAGTCAAAAAGCAGACACTGTCTTCAGACTGAACTGGGC
CACTTACCTTGCAAGCACAGAAAACATTATAGTAGCTAGCTTTGATGGCAGAGGA
AGTGGTTACCAAGGAGATAAGATCATGCATGCAATCAACAGAAGACTGGGAACA
TTTGAAGTTGAAGATCAAATTGAAGCAGCCAGACAATTTTCAAAAATGGGATTTG
TGGACAACAACGAATTGCAATTTGGGGCTGGTCATATGGAGGGTACGTAACCTC
AATGGTCCTGGGATCGGGAAGTGGCGTGTTC AAGTGTGGAATAGCCGTGGCGCCT
GTATCCCGGTGGGAGTACTATGACTCAGTGTACACAGAACGTTACATGGGTCTCC
CAACTCCAGAAGACAACCTTGACCATTACAGAAATTCAACAGTCATGAGCAGAG
CTGAAAATTTTAAACAAGTTGAGTACCTCCTTATTCATGGAACAGCAGATGATAA
CGTTCACCTTCAGCAGTCAGCTCAGATCTCAAAGCCCTGGTCGATGTTGGAGTG
GATTTCCAGGCAATGTGGTATACTGATGAAGACCATGGAATAGCTAGCAGCACA
GCACACCAACATATATATACCCACATGAGCCACTTCATAAAAACAATGTTTCTCTTT
ACCTTAGCACCTCAAATACCATGCCATTTAAAGCTTATTA AAAACTCATTTTTGTT
TTCATTATCTCAAACTGCACTGTCAAGATGATGATGATCTTTAAAATACACACTC
AAATCAAGAACTTAAGGTTACCTTTGTTCCCAAATTTCATACTATCATCTTAAG
TAGGGACTTCTGTCTTCACAACAGATTATTACCTTACAGAAGTTTGAATTATCCGG
TCGGGTTTTATTGTTTAAAATCATTCTGCATCAGCTGCTGAAACAACAATAGG
AATTGTTTTTATGGAGGCTTTGCATAGATTCCCTGAGCAGGATTTAATCTTTTTC
TAACTGGACTGGTTCAAATGTTGTTCTCTTTTAAAGGGATGGCAAGATGTGGG
CAGTGATGTCACTAGGGCAGGGACAGGATAAGAGGGATTAGGGAGAGAAGATA
GCAGGGCATGGCTGGGAACCAAGTCCAAGCATACCAACACGAGCAGGCTACTG
TCAGCTCCCCTCGGAGAAGAGCTGTTACAGCCAGACTGGCACAGTTTTCTGAGA

AAGACTATTCAAACAGTCTCAGGAAATCAAATATGCAAAGCACTGACTTCTAAGT
 AAAACCACAGCAGTTGAAAAGACTCCAAAGAAATGTAAGGGAAACTGCCAGCAA
 CGCAGGCCCCCAGGTGCCAGTTATGGCTATAGGTGCTACAAAAACACAGCAAGG
 GTGATGGGAAAGCATTGTAATGTGCTTTTAAAAAAAATACTGATGTTCTAGT
 GAAAGAGGCAGCTTGAAACTGAGATGTGAACACATCAGCTTGCCCTGTAAAAG
 ATGAAAATATTTGTATCACAAATCTTAACTTGAAGGAGTCCTTGCATCAATTTTC
 TTATTTTCAATTTCTTTGAGTGTCTTAATTAAGAATATTTTAACTTCTTGGACTCA
 TTTTAAAAAATGGAACATAAAATACAATGTTATGTATTATTATCCCATCTACAT
 ACTATGGAATTTCTCCAGTCATTTAATAAATGTGCCTTCATTTTTTCAGAA

Sequência de aminoácidos de CD26 (766 aa)

MKTPWKVLLGLLGAAALVTIITVPVLLNKGTTDDATADSRKTYTLTDYLNKNTYRLK
 LYSLRWISDHEYLYKQENNILVFNAEYGNSSVFLENNTFDEFGHSINDYSISPDGQFIL
 LEYNYVKQWRHSYTASYDIYDLNKRQLITEERIPNNTQWVTWSPVGHKLAYVWNN
 DIYVKIEPNLPSYRITWTGKEDIINGITDWVYEEEVFSAYSALWWSPNGTFLAYAQF
 NDTEVPLIEYSFYSDSLQYPKTVRVPYPKAGAVNPTVKFFVNTDSLSSVTNATSIQI
 TAPASMLIGDHYLCDVTWATQERISLQWLRRIQNYSVMDICDYDESSGRWNCLVAR
 QHIEMSTTGWVGRFRPSEPHFTLDGNSFYKIISNEEGYRHICYFQIDKKDCTFITKGTW
 EVIGIEALTSYLYISNEYKGMPPGRNLYKIQLSDYTKVTCLSCELNPERCQYYSVS
 FSKEAKYYQLRCSGPGPLPLYTLHSSVNDKGLRVLEDNSALDKMLQNVQMPSKKLDFI
 ILNETKFWYQMILPPHFDKSKKYPLLLDVYAGPCSQKADTVFRLNWTYLASTENIIV
 ASFDGRGSGYQGDKIMHAINRRLGTFEVEDQIEAARQFSKMGFVDNKRIAIWGSY
 GGYVTSMVLGSGSVFKCGIAVAPVSRWEYYSVYTERYMGLPTPEDNLDHYRNST
 VMSRAENFKQVEYLLIHGTADDNVHFQQAQISKALVDVGVDFQAMWYTDDEHGI
 ASSTAHQHIYTHMSHFIKQCFSLP

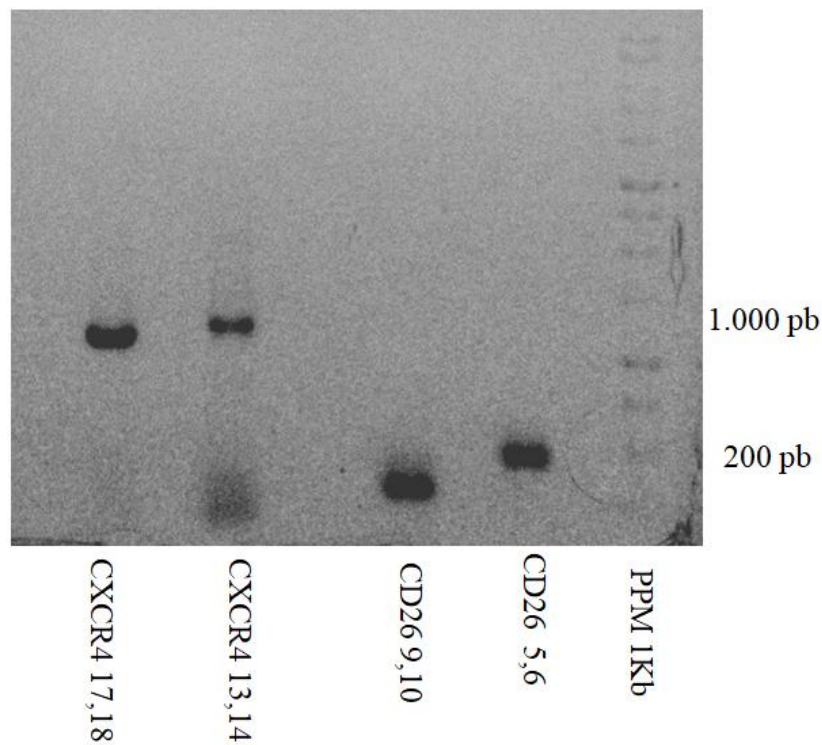


FIGURA 26 Perfil eletroforético da amplificação de CXCR4 e CD26 por PCR convencional. Como molde, foram usados 0,5 µg de cDNA da célula HT29. Gel de agarose 0,8% e coloração por fluorescência usando o marcador *blue green*. Os números ao lado de cada gene representam o código interno dado a cada par de iniciador.

Esse produto foi purificado do gel de agarose e serviu como molde para amplificação da sequência de CXCR4 e CD26 com os sítios para clonagem na plataforma Gateway® (Figura 27). Nota-se a amplificação do controle positivo padronizado no laboratório, denominado TSP8 (c+). Trata-se do segmento gênico da proteína Tetraspanina CO029, produzida adotando o mesmo sistema de produção utilizado para CXCR4r e CD26r.

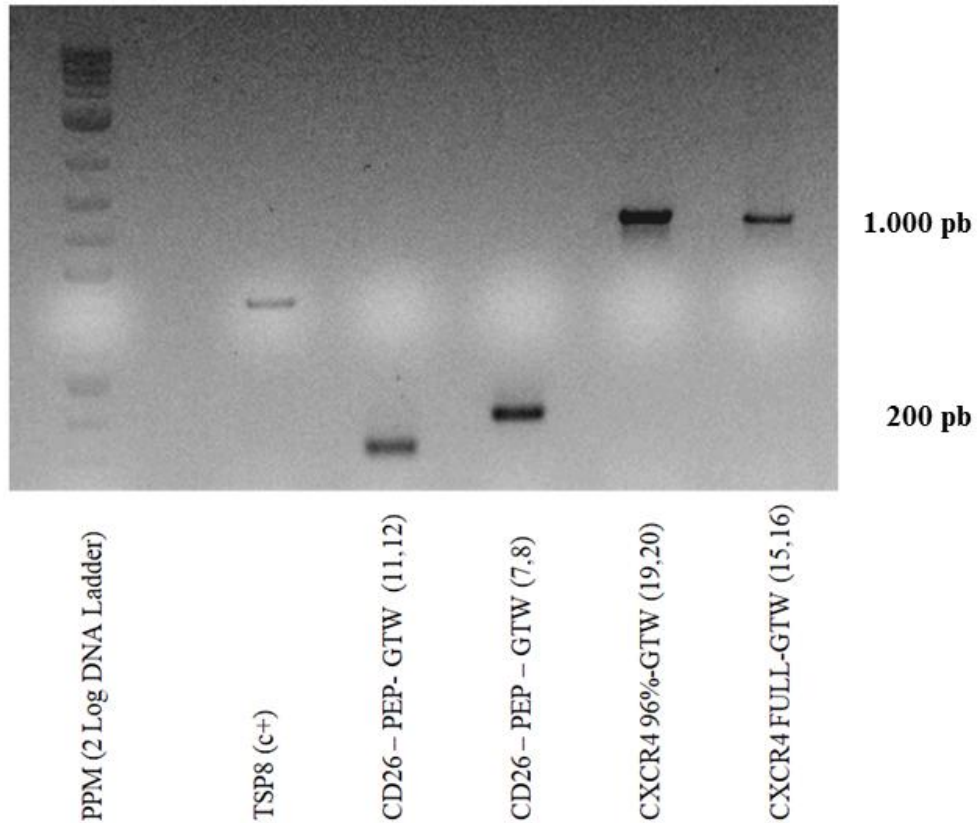


FIGURA 27 Perfil eletroforético da amplificação por PCR de CXC4 e CD26 contendo sítios *att*. Como molde, foram usados 0,5 µg de DNA de CXC4 e CD26 previamente obtido por PCR. Gel de agarose 0,8% e coloração por fluorescência usando o marcador *blue green*. Os números ao lado de cada gene representa o código interno dado a cada par de iniciador. PPM= padrão de peso molecular; TSP8 (C+)= controle positivo.

6.4.2 Reação de recombinação BP e obtenção do clone de entrada

A reação de recombinação BP foi realizada a partir do DNA de HT29 contendo os sítios *att* e o vetor de entrada pDONR. O DNA extraído de 22 colônias para os dois genes foram usados como molde em PCR, juntamente ao iniciador direto M13 que flanqueia o sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo, e reverso CXC4 e CD26, para confirmação da presença dos genes-alvo nos clones (Figura 28). Pela análise do perfil eletroforético dos produtos de PCR percebe-se a presença dos insertos corretos nos plasmídeos recombinantes então usados na transformação bacteriana. A confirmação posterior foi realizada por sequenciamento dos mesmos plasmídeos purificados, sendo realizados pela Plataforma de sequenciamento de DNA - Solid - RPT01F.

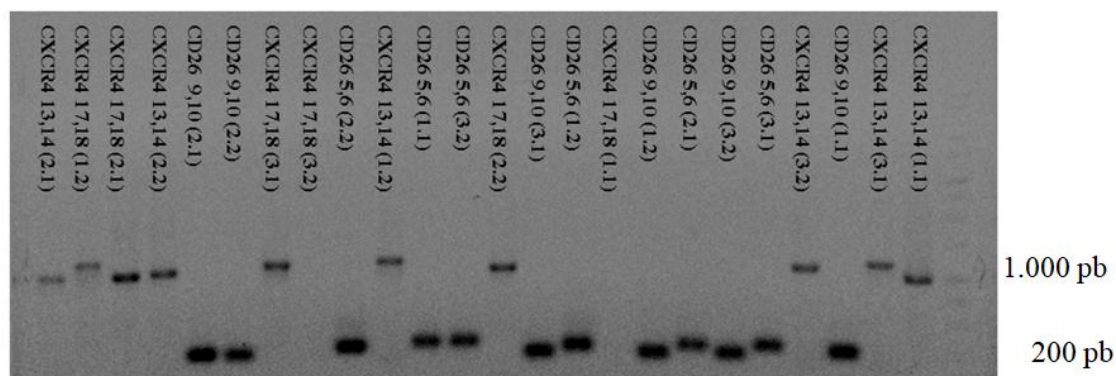


FIGURA 28 Perfil eletroforético dos clones de entrada. Vinte e quatro colônias foram submetidas a PCR de colônia para confirmação da presença do inserto, no entanto, 22 foram positivas para os genes em questão. Os números ao lado de cada gene representa o código interno dado a cada par de iniciador.

Os genes candidatos ao sequenciamento de Sanger foram selecionados baseados na evidência da associação do plasmídeo pDNOR e o gene de interesse, através da seleção pelo antibiótico canamicina. A partir dos dados gerados, CD26 5,6 (1.2) e CXCR4 13,14 (1.1) demonstraram ser mais promissores, ambos com valores idênticos de Max e Total Score (446 e 1.775) respectivamente. A probabilidade dos fragmentos analisados terem se anelado de forma aleatória aos genes é nula conforme valor de e ($E\text{-value}=0$). Os genes depositados no banco de dados de busca obtiveram, por meio do BLASTn, 97% de identidade com o fragmento CXCR4 e 99% com o de CD26. Além disso, 79% do gene semelhante ao fragmento alinhado é coberto por CXCR4 e 82% por CD26.

6.4.3 Reação de recombinação LR e obtenção do clone de expressão

A reação de recombinação LR Clonase se deu através do clone de entrada selecionado no sequenciamento de Sanger prévio e o vetor de destino pEXP1-DEST.

O DNA extraído de 21 colônias para os dois genes foram usados como molde em PCR, juntamente ao iniciador direto T7 que flanqueiam o sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo, e reverso CXCR4 e CD26, para confirmação da presença dos genes-alvo nos clones (Figuras 29 e 30). Essas colônias foram cultivadas e os plasmídeos purificados para sequenciamento, confirmando a presença do inserto.

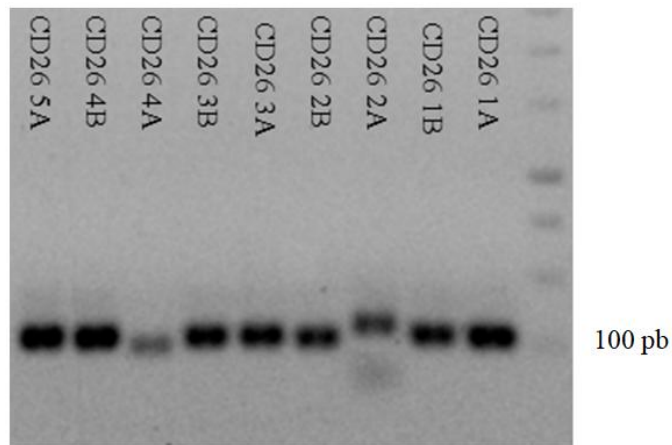


FIGURA 29 Perfil eletroforético dos clones de destino. Nove colônias foram submetidas a PCR para confirmação da presença do inserto. Os números ao lado de cada gene representa o código interno dado a cada par de iniciador.

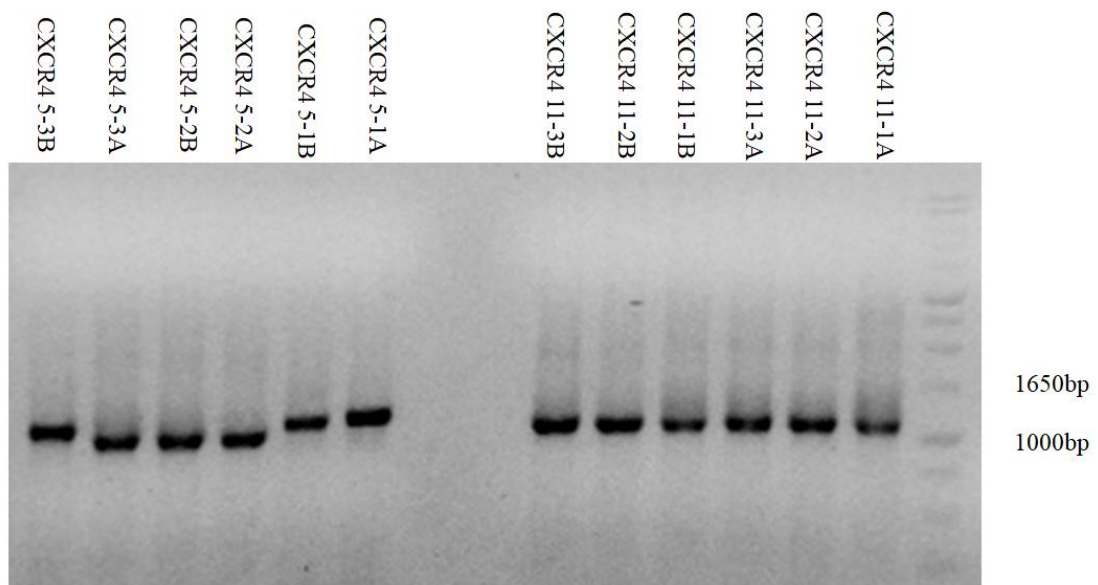


FIGURA 30 Perfil eletroforético dos clones de destino. Doze colônias foram submetidas a PCR para confirmação da presença do inserto. Os números ao lado de cada gene representa o código interno dado a cada par de iniciador.

Os genes candidatos ao sequenciamento de Sanger foram selecionados baseados na evidência da associação do plasmídeo pEXP1-DEST e o gene de interesse, através da seleção pelo antibiótico ampicilina. A partir dos dados gerados, CD26 -3A e CXCR411-1BR obtiveram os resultados mais promissores, ambos com valores idênticos de Max e Total Score

(446 e 1.775) respectivamente. A probabilidade dos fragmentos analisados terem se anelado de forma aleatória aos genes é nula conforme valor de e ($E\text{-value}=0$). Os genes depositados no banco de dados de busca obtiveram 99% de identidade com o fragmento CXCR4 e 99% com o de CD26. Além disso, 99% do gene semelhante ao fragmento alinhado é coberto por CXCR4 e 12% por CD26.

6.4.4 Expressão e purificação de CXCR4 e CD26 recombinantes

Para expressão foram testadas diferentes condições de indução com IPTG. A melhor condição foi 1mM IPTG (Figuras 31 e 32) a 37°C por 3 h, baseado na literatura, para CXCR4 e CD26. As proteínas foram expressas em ambas as frações solúvel e insolúvel, sendo mais significativa na fração insolúvel. Com a condição adequada, deu-se então início a etapa de produção em maior escala induzindo-se 1 L de meio TB.

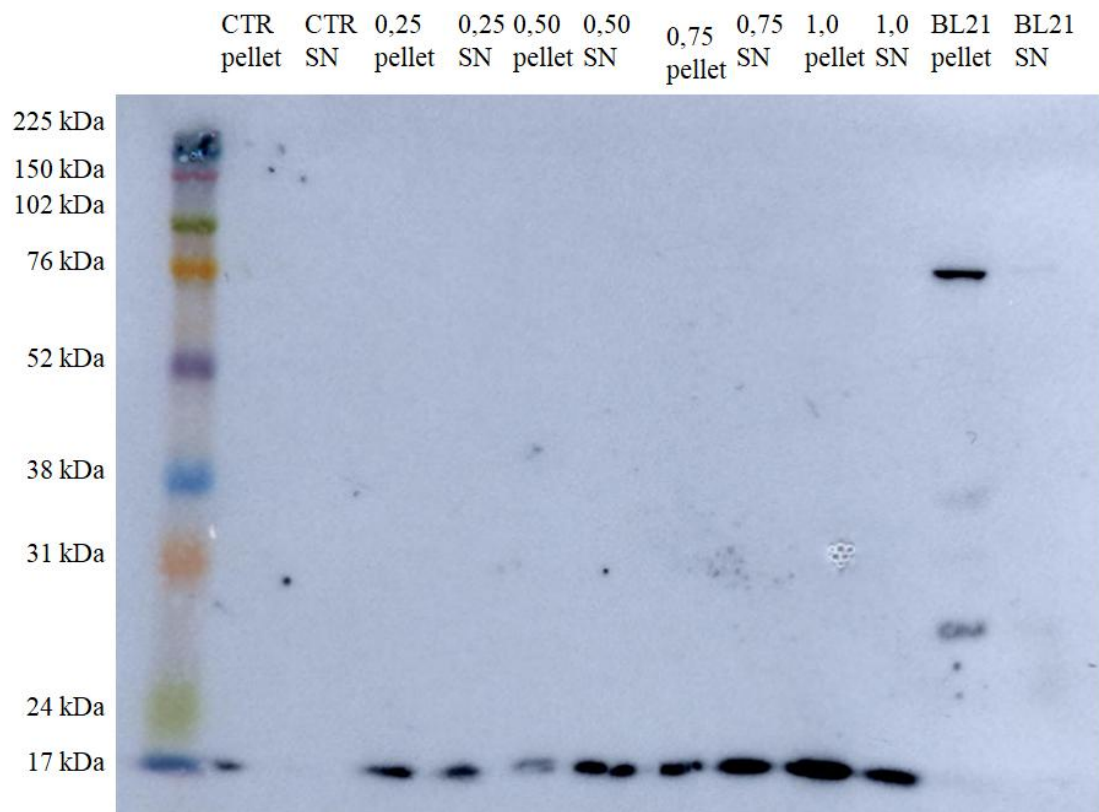


FIGURA 31 Curva dose-resposta da expressão de CXCR4 em membrana de Western Blot. Imagem contendo CXCR4r em peso molecular esperado, confirmando a presença da proteína recombinante. CTR= controle; SN= sobrenadante.

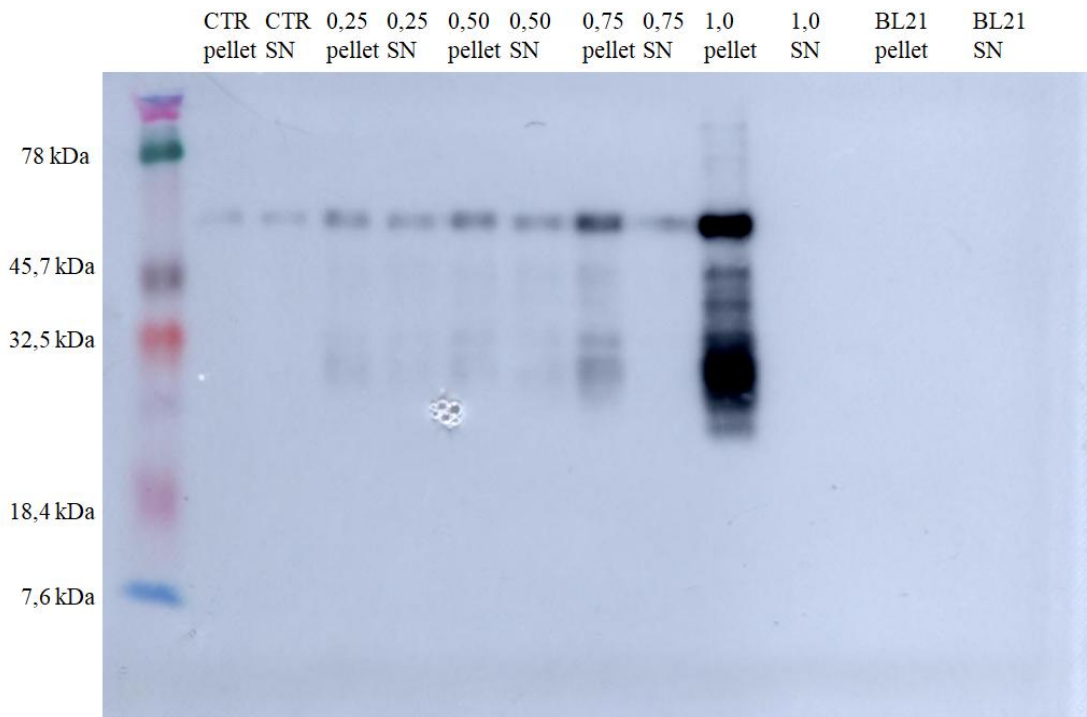


FIGURA 32 Curva dose-resposta da expressão de CD26 em membrana de Western Blot. Imagem contendo CD26r em peso molecular esperado, confirmando a presença da proteína recombinante. SN= sobrenadante.

Após indução e lise bacteriana, os lisados contendo as proteínas recombinantes foram purificados por cromatografia de afinidade em coluna de níquel seguido de eluição com aumento da concentração de imidazol, bem como por variação de pH. A presença de CXCR4r e CD26r foram confirmadas por WB usando o anticorpo contra a cauda de poli-histidina anti-his (Figuras 33 e 34).

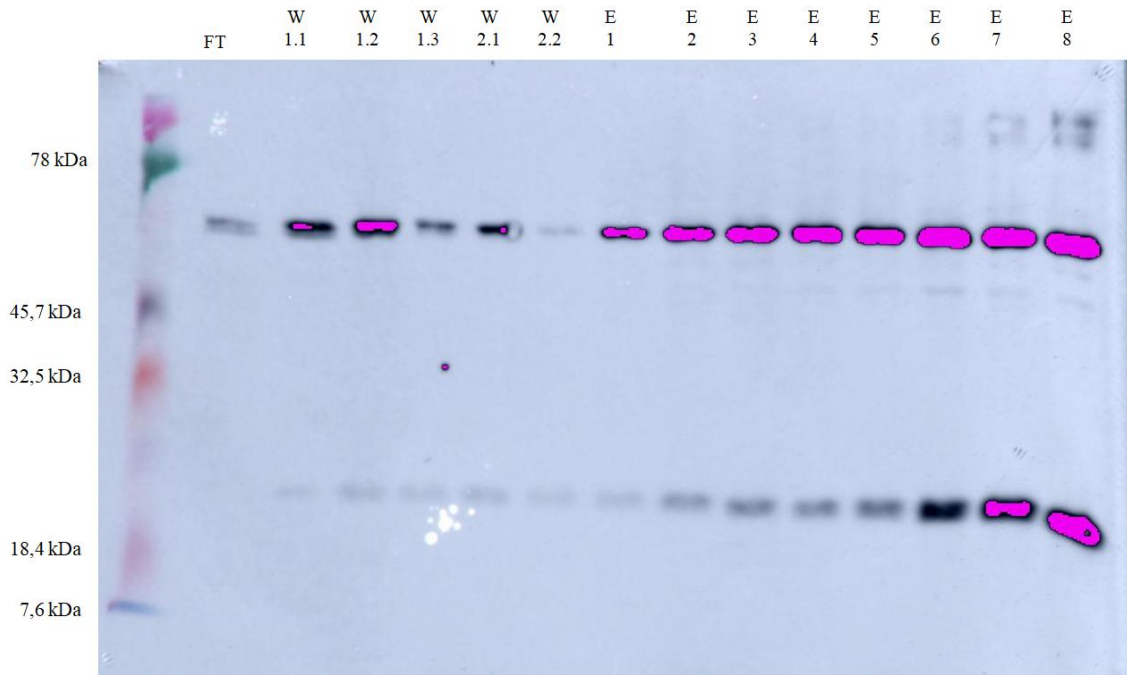


FIGURA 33 Western Blot anti-his das eluições do produto da purificação de CXCR4. FT: *Flow Throw* (amostra que saiu da coluna), W1.1;1.2;1.3: *Washing Buffer 1* pH 7,8, W2.1;2.2: *Washing Buffer 2* pH 6,3 e E: *Elution Buffer* pH 4,3.

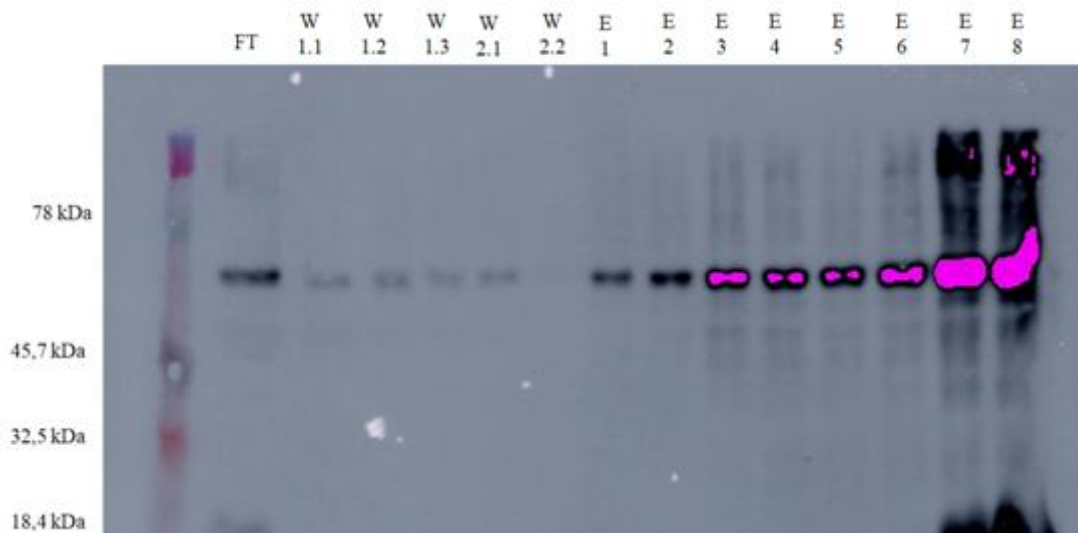


FIGURA 34 Western Blot anti-his das eluições do produto da purificação de CD26. FT: *Flow Throw* (amostra que saiu da coluna), W1.1;1.2;1.3: *Washing Buffer 1* pH 7,8, W2.1;2.2: *Washing Buffer 2* pH 6,3 e E: *Elution Buffer* pH 4,3.

Após o processo de purificação, as proteínas recombinantes produzidas foram submetidas à diálise para redução de sais presentes nas soluções de purificação e dosados pelo método de Pierce BCA Protein Kit, sendo a concentração final de CXCR4r=0,956 mg/mL (8,5 mg/L) e CD26r=1,059 mg/mL (5,3 mg/L).

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

A mais recente estimativa mundial, ano 2018, aponta que ocorreram no mundo 18 milhões de casos novos de câncer (17 milhões sem contar os casos de câncer de pele não melanoma) e 9,6 milhões de óbitos (9,5 milhões excluindo os cânceres de pele não melanoma). O câncer de cólon e reto é o segundo tumor mais incidente no mundo (1,8 milhão). A incidência em homens (20.520 casos) representa 9,1% dos casos, sendo um pouco maior nas mulheres, com 20.470 casos (9,2%) de casos novos (Delay, 2018).

A distribuição dos dados das amostras adquiridas retrataram o que é citado acima onde 60% dos pacientes que tiveram seu material arquivado no Laboratório de Anatomia Patológica e Medicina Legal da UFMG se tratavam de mulheres diagnosticadas com o CCR. O perfil se repetiu nas amostras advindas do BTT, onde 58,82% da amostragem eram do sexo feminino. A análise da faixa etária demonstrou que pacientes acima de 61 anos de idade tiveram maior incidência do CCR e 55,88 % dos pacientes não apresentaram linfonodos metastáticos ao diagnóstico.

Para o Brasil, estimam-se, para cada ano do triênio de 2020-2022, 20.520 casos de câncer de cólon e reto em homens e 20.470 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 19,63 casos novos a cada 100 mil homens e 19,03 para cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde, 2020).

Um estudo realizado pela Sociedade Americana de Câncer (2018) indicou a crescente incidência de tumores intestinais em jovens e indivíduos de meia idade, o que vai à contramão dos números deste tipo de neoplasia na população em geral. Os dados obtidos por meio das diferentes amostras indicou maior incidência em pacientes acima de 61 anos tendo apenas 2 pacientes com idades entre 30 e 40 anos.

O acometimento metastático dos linfonodos regionais é, isoladamente, o fator prognóstico mais importante do CCR (Lindmarck, 1994), sendo incorporado a todos os sistemas de estágio (Cserni, 2002). O acometimento linfonodal metastático relaciona-se a fatores de pior prognóstico, como doença mais avançada e presença de metástase em órgãos à distância (Baxter et al., 2005).

Nas amostras congeladas avaliadas pelo presente estudo, 15 (44,12%) apresentavam pelo menos um linfonodo metastático e para as amostras incluídas em parafina, 22 (62,86%).

Peruzzo e colaboradores (2017) demonstraram que o câncer no cólon esquerdo apresenta melhor prognóstico e maior incidência. Fato este confirmado no presente estudo onde mais de 54% das amostras tratavam de segmentos colônico do lado esquerdo.

Em 2016, segundo a Sociedade Europeia de Oncologia Médica, os tumores devem ser tratados de modo individualizado, uma vez que estudos indicam sua heterogeneidade. Para isso, a proposta do trabalho foi a criação de um painel gênico entre CXCR4, CD26, CD133, vimentina, e-caderina, Ki67 e GAPDH e a análise de sua correlação com variáveis do paciente e do tumor. As análises foram realizadas por meio da técnica de qPCR relativas tendo a β -actina como gene endógeno. Para a aquisição do DNA molde da reação foi extraído o RNA total de amostras parafinadas e congeladas.

A degradação do rRNA, durante a extração, manipulação ou armazenamento afeta diretamente os dados gerados após amplificação, tornando-os pouco precisos. A fixação em formalina e o consequente processamento histológico provocam, em grau variável, degradação e modificação química do RNA, o que pode prejudicar o uso dessas amostras para estudos de expressão gênica. A formalina cria ligações cruzadas do RNA com proteínas, além de acrescentar um grupo monometilol aos grupos amino de quatro bases do RNA (Korbler et al., 2003; Liu et al., 2002)

Nas amostras fixadas em formol e incluídas em parafina, foi possível observar o elevado grau de degradação do RNA total extraído das amostras parafinadas. O eletroferograma, que é uma representação gráfica composta por picos de fluorescência por segundo (FU), demonstra a razão 18S/28S, onde o valor exigido é de aproximadamente 1,5. As unidades ribossomais 18 e 28s tem cerca de 1.900 e 4.700 nucleotídeos (nt), respectivamente. Os picos, quando visíveis nessas regiões, indicam a integridade destes RNAs. Quando fragmentados, elevam os picos de menor tamanho, e na reação há dificuldades para o anelamento dos *primers* em sua região homóloga. Ao lado de cada eletroferograma gerado, observa-se o perfil eletroforético, que é um método de separação que pode ser definido como sendo a migração de espécies carregadas eletricamente, que ocorre quando as mesmas são dissolvidas ou suspensas em um eletrólito, através do qual um alto potencial de corrente elétrica é aplicado. Esse recurso nos permite visualizar a integridade e qualidade eletroforética do RNA. O painel de corrida apresentou RNA degradado em todas as amostras parafinadas analisadas. As duas bandas correspondentes às unidades ribossomais do RNA não foram visualizadas, indicando degradação e/ou contaminação por DNA genômico impedindo a utilização destas amostras nas etapas seguintes.

Os valores de *slope* e eficiência para o gene endógeno foram -3,55 e 91,38 respectivamente. Os valores de Ct foram corrigidos pela eficiência ajustando o threshold. Foram detalhadas outras características da curva de eficiência, mostrando que no presente trabalho, tanto o LepR quanto a β -actina obtiveram resultados de eficiência dentro dos limites

estabelecidos, podendo, portanto, serem analisados pelo método do Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$). Como desejado, as reações que não continham cDNA, ou seja, as reações controle, não apresentaram nenhum tipo de amplificação. A β -actina foi escolhida como controle endógeno pelo fato de ser expressa em mais amostras quando comparadas ao GAPDH.

Para as análises comparativas entre os grupos positivo e negativo de cada marcador, através do teste de Mann Whitney, foram observadas diferenças significativas para CXCR4, vimentina e GAPDH. Espera-se a elevada expressão de CXCR4 e vimentina por trata-se de uma região em intenso processo inflamatório e renovação celular. GAPDH está diretamente envolvido com a progressão tumoral (Persons et al., 1989), o que justifica seu elevado nível de expressão.

Foram realizadas análises comparativas das amostras levando em consideração o sítio primário de acometimento nas amostras positivas e negativas ao tumor. No primeiro grupo estudado, não foram encontradas diferenças significativas, no entanto, no segundo grupo é observado um elevado perfil de expressão de vimentina e GAPDH. Acredita-se que, ainda que se trate de material peritumoral, o intenso infiltrado inflamatório esteja presente também nas margens livres de tumor. A expressão de GAPDH é expressa em amostras positivas e negativas ao CCR, demonstrando seu potencial como marcador tumoral de cólon e reto, uma vez que ele tem relação direta com o desenvolvimento do tumor. Associa-se sua expressão ao risco de recidiva e sua presença em material peritumoral pode indicar menores chances de cura e sobrevida (Guo et al., 2013).

O teste pareado de Wilcoxon também apresentou elevada expressão gênica para GAPDH entre amostras positivas e negativas ao adenocarcinoma de cólon. Zhenji (2012) demonstrou que a expressão de GAPDH é aumentada em tumores de cólon e elevou o risco de metástase hepática demonstrando sua importância no desenvolvimento e evento metastático.

Com base no coeficiente de Spearman foi possível estabelecer correlações positivas entre CXCR4 e CD133, Ki67, e-caderina e vimentina. Muller (2001) demonstrou que CXCR4 está intimamente relacionada à disseminação metastática, o que pode ser evidenciado pela alta expressão de marcadores TEM que promovem a diferenciação celular, favorecendo a motilidade celular. Além disso, o índice proliferativo é aumentado uma vez que a lesão recruta o infiltrado inflamatório elevando o índice mitótico para recuperação da mucosa. A elevada expressão de marcador CTT indica a renovação celular que pode conduzir o paciente a um quadro não responsivo ao tratamento (Zhao, 2016).

A análise de correlação indicou ainda a correlação direta entre a expressão de CD26 e GAPDH. Pang (2010) demonstrou que a expressão de CD26 está associada à malignidade, assim como a de GAPDH. A elevada expressão destes marcadores combinados pode levar o paciente a um quadro de mal prognóstico, uma vez que a progressão tumoral é assegurada pelos genes citados.

A expressão de CD133 também está relacionada às expressões gênicas de Ki67 e e-caderina, por tratar-se de um ambiente em intenso processo inflamatório e provavelmente como medida de contenção à renovação celular (Pavon et al., 2012). Esses marcadores em conjunto pode indicar lesões maiores que necessitam de maior recuperação tecidual.

A expressão de Ki67 demonstrou correlação direta com a expressão de vimentina e e-caderina, o que pode ser atribuído ao dano tecidual gerado pela lesão com a finalidade de recuperação.

A mesma análise foi realizada para as amostras negativas onde CXCR4 teve correlação direta com a expressão de Ki67, e CD133 com e-caderina. A presença desses marcadores é justificada pela resposta inflamatória gerada em tecido peritumoral. A expressão de vimentina também está associada à expressão de GAPDH, o que pode conduzir o paciente a uma provável recidiva em local de intensa inflamação.

Os pacientes cujas amostras se encontravam arquivadas no BTT foram contatados para inclusão de dados de evolução da doença e desfecho. No entanto, o contato foi possível com apenas nove (27,27%) deles, onde apenas um desfecho foi de óbito. A falta dos dados dos demais pacientes impactou na análise destes resultados, demonstrando a necessidade de um sistema informatizado para inclusão e busca de informações relevantes aos estudos.

De acordo com Smith (2014), Liang (2005) e Labege (2008) CXCR4 expressa pior prognóstico sem metástase linfonodal. No estudo apresentado, não houveram diferenças significativamente relevantes quanto à metástase em linfonodos.

Conforme as estimativas do Ministério da Saúde (2020) e estudos realizados por Neto e colaboradores (2006), indivíduos do sexo feminino, com idade superior a 60 anos tem maior probabilidade de desenvolvimento do CCR, assim como aqueles que apresentam histórico familiar positivo do tumor. As variáveis mencionadas acima, para cada paciente, foram correlacionadas às expressões gênicas dos marcadores estudados e não houveram diferenças estatisticamente significativas.

O gene CXCR4 tem notável relação com outros marcadores conhecidos e tal associação leva à compreensão do intenso infiltrado inflamatório presente nas neoplasias de cólon e reto. Em contrapartida, considerando que a expressão de CD26 correlacionada à de

GAPDH leva a um possível quadro prognóstico ruim, apesar de CXCR4 e CD26 não apresentarem relação direta, contrariamente ao estudo realizado por Murray e colaboradores em 2015, acredita-se que estas podem vir, futuramente associadas a outros marcadores como os apresentados neste trabalho, a se tornarem importantes ferramentas no diagnóstico e prognóstico do CCR.

As produções das proteínas recombinantes foram realizadas conforme protocolo estabelecido pelos fabricantes e serão o produto para a próxima fase que consiste na produção dos anticorpos monoclonais anti-CXCR4 e anti-CD26. Esses anticorpos serão empregados como primários no ensaio de expressão proteica por meio da técnica de imunohistoquímica. Por questões orçamentárias e temporais, essa etapa será realizada posteriormente.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que pacientes acometidos com CCR apresentaram maior expressão gênica de CXCR4, vimentina e GAPDH em tecidos positivos quando comparados aos seus respectivos tecidos ausentes de tumor. Ainda, estes pacientes demonstraram forte correlação entre a expressão de CXCR4, CD133, Ki67, e-caderina, vimentina e GAPDH. Desta forma, podemos concluir que o presente painel de marcadores tem potencial para ser alvo de estudos mais aprofundados quanto a sua aplicação na determinação de diagnóstico e prognóstico de CCR. Este estudo revelou ainda o aumento significativo de GAPDH quando CD26 esteve superexpresso podendo estar associado ao desenvolvimento e progressão da doença. Quanto às variáveis dos pacientes como, idade, sexo e histórico familiar de CCR, estas não apresentaram diferenças significativas quando correlacionadas às expressões dos biomarcadores estudados. Por fim, o estudo conclui que não houve diferenças estatísticas entre as expressões de CXCR4 e CD26 em tumores de cólon e reto incluídos no trabalho.

9. PERSPECTIVAS

No decorrer do estudo, as proteínas CXCR4 e CD26 recombinantes foram também produzidas, purificadas e dosadas por meio da metodologia Gateway®. Será realizada a produção dos anticorpos monoclonais anti-CXCR4 e anti-CD26 para futuras aplicações, incluindo:

- ✓ Avaliar a expressão proteica de CXCR4 e CD26 em amostras histológicas dos pacientes estudados neste trabalho;
- ✓ Analisar a resposta imunoestimuladora de CXCR4 e CD26 frente a células do sangue periférico humano de pacientes com diferentes tumores bem como indivíduos saudáveis;
- ✓ Avaliar a utilização dos anticorpos para imunoterapias;
- ✓ Correlacionar a expressão proteica de CXCR4 e CD26 a outros marcadores;
- ✓ Avaliar o potencial imunoterápico de CXCR4 e CD26 *in vitro* e *in vivo*.

Estão sendo submetidos 2 artigos científicos provenientes dos resultados deste estudo:

- Artigo 1 contendo os resultados de expressão gênica dos marcadores aqui trabalhados;
- Artigo 2 contendo informações descritivas de biomarcadores com potencial no CRC, como artigo de revisão.

PRODUÇÃO OBTIDA**10. PRODUÇÃO OBTIDA**

Os resultados do estudo foram apresentados em eventos nacionais e internacionais no período entre 2017 a 2019:

- ✓ “Evaluation of the gene and protein expression of CXCR4 and CD26 and their relation with the response to the treatment of colorectal neoplasms”

Identificação: Pôster

Nomes dos autores: Jéssica Vieira de Assis, Lucélia Antunes Coutinho, Natália Gregório Custódio, Wander Jeremias de Jesus, Geovanni Dantas Cassali, Monica Maria Demas Álvares Cabral, Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz

Nome do evento: Gene Time Conference

Data do evento: 23 e 24 de agosto de 2018

Data do evento: 25/04/2017

Local: Belo Horizonte/MG

- ✓ “CXCR4 and CD26 genomic and proteomic analysis and their relation with the response to the treatment of colon and rectum neoplasms”

Identificação: Pôster

Nomes dos autores: Jéssica Vieira de Assis, Lucélia Antunes Coutinho, Natália Gregório Custódio, Wander Jeremias de Jesus, Ana Sofia Mesquita, Matheus Santos Mazine Viviani, Viviane Cristina Fernandes dos Santos, Taís Nobrega de Souza, Geovanni Dantas Cassali, Monica Maria Demas Álvares Cabral, Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz

Nome do evento: Next Frontiers to Cure Cancer

Data do evento: 16 a 18 de maio de 2019

Data do evento: 25/04/2017

Local: São Paulo/São Paulo

- ✓ “Development and Standartization of Methodology for Diagnosis and Detection of Response to Chemotherapeutic in Patients with Colorectal Cancer”

Identificação: Apresentação de pôster

Nomes dos autores: Jéssica Vieira de Assis, Lucélia Antunes Coutinho, Renata Ramalho Cruz, Matheus de Oliveira silva Pinto, Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz

Nome do evento: Experimental Biology

Data do evento: 25/04/2017

Local: Chicago/USA

- ✓ “Genomic and Proteomic Analysis of CXCR4 and CD26 and their relation with the response to the treatment of colon and rectum neoplasms”

Identificação: Apresentação de pôster

Nomes dos autores: Jéssica Vieira de Assis, Lucélia Antunes Coutinho, Natália Custódio Gregório, Wander de Jesus Jeremias, Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz

Nome do evento: Science of Veterinary Medicine Symposium

Data do evento: 13/11/2018

Local: University of Georgia – Georgia/USA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amara S. et al. Stromal cell derived factor-1 and CXCR4 expression in colorectal cancer promote liver metastasis. *Cancer Biomark.* 2015;15(6):869-79. doi: 10.3233/CBM-150531.
- Angell-Andersen E, Tretli S, Coleman MP, Langmark F, Grotmol T. Colorectal cancer survival trends in Norway 1958–1997. *Eur J Cancer.* 1o de março de 2004;40(5):734–42.
- Bajetto A. et al. CXCR4 and SDF1 expression in human meningiomas: A proliferative role in tumoral meningeothelial cells in vitro: CXCR4 and SDF1 expression in human meningiomas: A proliferative role in tumoral meningeothelial cells in vitro *Neuro-oncol.* 2007 Jan; 9(1): 3–11.
- Balkwill, F. Cancer and the chemokine network. *Nature reviews. Cancer,* v. 4, n. 7, p. 540-50, Jul 2004.
- Becerra AZ, Probst CP, Tejani MA, Aquina CT, González MG, Hensley BJ, et al. Evaluating the prognostic role of elevated preoperative carcinoembryonic antigen levels in colon cancer patients: results from the National Cancer Database. *Ann Surg Oncol.* maio de 2016;23(5):1554–61.
- Becerra AZ. et al. Variation in Hospital-Specific Rates of Suboptimal Lymphadenectomy and Survival in Colon Cancer: Evidence from the National Cancer Data Base. *Ann Surg Oncol.* 2016 Dec;23(Suppl 5):674-683. Epub 2016 Sep 9.
- Beckenkamp A. et al. DPPIV/CD26: a tumor suppressor or a marker of malignancy? *Tumour Biol.* 2016 Jun;37(6):7059-73. doi: 10.1007/s13277-016-5005-2. Epub 2016 Mar 4.
- Blay J. (2008) CD26/DPPIV in Cancer Progression and Spread. In: Schwab M. (eds) *Encyclopedia of Cancer.* Springer, Berlin, Heidelberg
- Brasil. Ministério da Saúde. Caderno de diretrizes: objetivos, metas e indicadores 2013-2015. 1ª edição. 2013
- Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Atenção Básica. Rastreamento. Brasília: Ministério da saúde, 2010.
- Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas/2018 – Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2018. Disponível em <http://www.inca.gov.br>. Acesso em 05/12/2019.
- Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas/2020-2022 – Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em <http://www.inca.gov.br>. Acesso em 05/02/2020.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Falando sobre câncer do intestino: orientações úteis aos usuários fatores de riscos e proteção. 1ª ed. Rio de Janeiro (RJ): INCA; 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Homepage. Rio de Janeiro (RJ): INCA; 1996. Disponível em: < http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=325> . Acesso em: 04 nov. 2008.

Brenner H, Stock C, Hoffmeister M. Effect of screening sigmoidoscopy and screening colonoscopy on colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and metaanalysis of randomised controlled trials and observational studies. *Bmj*. 2014;348:g2467.

Campos F.G.C.M. Perspectivas e Vantagens da Videocirurgia no Tratamento do Câncer Colorretal. *Rev bras videocir*. 2(1):39-42, 2004.

Carvalho M, Andreozzi V, Codeço C, Campos D, Barbosa M, Simakura S. Análise de Sobrevida: teoria e aplicações em saúde. 2 ed. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2011.

Chao X. et al. CXCR4 overexpression is correlated with poor prognosis in colorectal cancer. *Life Sciences* Volume 208, 1 September 2018, Pages 333-340

Colell A. et al. Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. *Cell Death Differ*. 2009 Dec;16(12):1573-81.

Cordero OJ. et al. On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 58-1723-1747 (2009)

Cutait R, Cotti G, Garicochea B, Muraro C, Carvalho F, Leite K, et al. Instabilidade microssatélites em portadores de câncer colo-retal. *Rev Bras Coloproctologia*. 2002;4:225–323.

Cutler MJ et al. Chemotherapeutic agents attenuate CXCL12-mediated migration of colon cancer cells by selecting for CXCR4-negative cells and increasing peptidase CD26. *BMC Cancer*. 2015 Nov 10;15:882.

Dontu, G. et al. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell proliferation*, v. 36 Suppl 1, p. 59-72, Oct 2003.

Eluf-Neto J, Wunsch-Filho V. Screening faz bem à saúde? *Rev Assoc Médica Bras*. 141 2000;46(4):310–311.

Ferlay J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*. v.136, p. 1;136(5), 2015.

Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinoma by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med*. 1o de março de 1965;121:439–62.

Gunderson JG. Commentary on “Personality Traits and the Classification of Mental Disorders: Toward a More Complete Integration in DSM-5 and na Empirical Model of

Psychopathology” Personality Disorders: Theory, Research, and Treatment 2010, Vol. 1, No. 2, 119 –122

Havre PA. et al. The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. *Front Biosci.* 2008 Jan 1;13:1634-45.

Hemminki K, Santi I, Weires M, Thomsen H, Sundquist J, Bermejo JL. Tumor location and patient characteristics of colon and rectal adenocarcinomas in relation to survival and TNM classes. *BMC Cancer.* 21 de dezembro de 2010;10:688.

Hine KR, Dykes PW. Serum CEA testing in the post-operative surveillance of colorectal carcinoma. *Br J Cancer.* junho de 1984;49(6):689–93.

Holme Ø, Løberg M, Kalager M, Bretthauer M, Hernán MA, Aas E, et al. Effect of flexible sigmoidoscopy screening on colorectal cancer incidence and mortality: a randomized clinical trial. *Jama.* 2014;312(6):606–615.

Huang M. et al. EGFR-dependent pancreatic carcinoma cell metastasis through Rap1 activation. *Oncogene.*, v. 31, n.22, p. 2783-93, 2012.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Ministério da Saúde. Falando sobre o câncer de intestino. Rio de Janeiro: INCA, 2003.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Ministério da Saúde. TNM: classificação de tumores malignos/traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6 ed. Rio de Janeiro: INCA; 2004.

Jorgensen JO, McCall JL, Morris DL. Port site seeding after laparoscopic ultrasonographic staging of pancreatic carcinoma. *Surgery* 2013; 117:118-119.

Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia celular e molecular* 7a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Kim J. et al. Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival. *J Clin Oncol.* 2005 Apr 20;23(12):2744-53.

Kleinbaum D. *Survival Analysis - A Self-Learning Text.* 3th ed. New York: Springer; 1995.

Kobayashi N. et al. Cancer stem cells: a new approach to tumor development. *Rev Assoc Med Bras* 2015; 61(1):86-93

Kordatou Z. et al. Treatment o folder pacientes with colorectal câncer: a perspective review. *The adv Med Oncol*, 6 (3): 128-40, 2014

Kruizinga RC. et al. Difference in CXCR4 expression between sporadic and VHL-related hemangioblastoma. *Fam Cancer.* 2016; 15(4): 607–616.

Kulbe, H. et al. The chemokine network in cancer--much more than directing cell movement. *The International journal of developmental biology*, v. 48, n. 5-6, p. 489-96, 2004.

Lansdorp-Vogelaar I, Knudsen AB, Brenner H. Cost-effectiveness of colorectal cancer screening. *Epidemiol Rev.* 2011;33(1):88–100.

Laohavinij S, Maneechavakajorn J, Techatanol P. Prognostic factors for survival in colorectal cancer patients. *J Med Assoc Thai.* 2010;93(10):1156–66.

Laurence, A. D. Location, movement and survival: the role of chemokines in haematopoiesis and malignancy. *British journal of haematology*, v. 132, n. 3, p. 255-67, Feb 2006.

Lee I, Baek S-H, Kim H, Jo H-J, Oh N-G, Ko S. Survival analysis for colon subsite and rectal cancers: experience from a single surgeon. *Korean J Clin Oncol.* 2015 dec;11(2):114–9.

Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Smith RA, Brooks D, Andrews KS, 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 MultiSociety Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA Cancer J Clin.* 08;58(3):130–160.

Li F, Lai M. Colorectal cancer, one entity or three. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2009 mar;10(3):219–29.

Liang, Z. et al. Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. *Cancer research*, v. 65, n. 3, p. 967-71, Feb 1 2005.

Lieberman, D. A. Clinical Practice. Screening for colorectal cancer. *N Engl J Med*, 361:1179-87, 2009

Liu S. et al. Role of microR

NAs in the regulation of breast cancer stem cells. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 17, 15-21

Lopes, A; Iyeyasu, H; Castro, RMRPS. *Oncologia para a graduação*. 2ª. edição. São Paulo-SP: Tecmed, 2008. 739p.

Lopes, A; Iyeyasu, H; Castro, RMRPS. *Oncologia para a graduação*. 2ª. edição. São Paulo-SP: Tecmed, 2008. 739p.

López PJT, Albero JS, Rodríguez-Montes JA. Primary and secondary prevention of colorectal cancer. *Clin Med Insights Gastroenterol.* 2014;7:33.

Luker, K. E.; Luker, G. D. Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer letters*, v. 238, n. 1, p. 30-41, Jul 8 2006.

Martin R, Weiser, MD, William R, Jarnagin, MD, Leonard B. Saltz, MD. Colorectal cancer patients with oligometastatic liver disease: What is the new approach? *Oncology Journal* 27:11, 2013.

McMICHAEL, A. J., 1994. Molecular epidemiology: new pathway or new travelling companion? *American Journal of Epidemiology*, 140:1-11.

- Mikuriya K et al. Expression of glycolytic enzymes is increased in pancreatic cancerous tissues as evidenced by proteomic profiling by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. *Int J Oncol*. 2007 Apr;30(4):849-55.
- Mitry E, Bouvier A-M, Esteve J, Faivre J. Improvement in colorectal cancer survival: a population-based study. *Eur J Cancer*. 2005;41(15):2297–2303.
- Muller, A. et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, v. 410, n. 6824, p. 50-6, Mar 1 2001.
- Murakami T. et al. The role of CXCR3 and CXCR4 in colorectal cancer metastasis. *Cancer Cell Biology Int. J. Cancer*: 132, 276–287 (2012).
- Mukherjee S. et al. Decreased Frequency and Secretion of CD26 Promotes Disease Progression in Indian Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis. *J Clin Immunol* 2013.
- Murphy, P. M. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *The New England journal of medicine*, v. 345, n. 11, p. 833-5, Sep 13 2001.
- Nahas SC, Nahas CSR, Bustamante-Lopez LA, Pinto RA, Marques CFS, Campos FG, et al. Prognostic factors of surgically-treated patients with cancer of the right colon: a ten years' experience of a single university institution. *ABCD Arq Bras Cir Dig São Paulo*. 2015;28(1):03–7.
- Nicholls C. et al. GAPDH: a common enzyme with uncommon functions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012 Aug;39(8):674-9.
- O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst*. 6 de outubro de 2004;96(19):1420–5.
- Ojino S. et al. Molecular Pathologic Epidemiology of Colorectal Neoplasia: An Emerging Transdisciplinary and Interdisciplinary Field. *Gut*. 2011 March ; 60(3): 397–411. doi:10.1136/gut.2010.217182
- Ostenfeld EB, Nørgaard M, Thomsen RW, Iversen LH, Jacobsen JB, Sjøgaard M. Comorbidity and survival of Danish patients with colon and rectal cancer from 2000- 2011: a population-based cohort study. *Clin Epidemiol*. 2013;5(Suppl 1):65–74.
- Ottiano A. et al. Overexpression of both CXC chemokine receptor 4 and vascular endothelial growth factor proteins predicts early distant relapse in stage II-III colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2006 May 1;12(9):2795-803.
- Pearsons DA. et al. Increased expression of glycolysis-associated genes in oncogene-transformed and growth-accelerated states. *Mol Carcinog*. 1989;2(2):88-94.
- Pelser C, Arem H, Pfeiffer RM, Elena JW, Alfano CM, Hollenbeck AR, et al. Prediagnostic lifestyle factors and survival after colon and rectal cancer diagnosis in the National Institutes of Health (NIH)-AARP Diet and Health Study. *Cancer*. 15 de maio de 2014;120(10):1540–7.

Pemdlebury, S et al. A Trial of Adjuvant Therapy in Colorectal Cancer: The VICTOR Trial. *Clinical Colorectal Cancer*, Vol. 3, nº 1 58-60,2003

Petrarca, CR. Expressão de microRNAs em amostras tumorais e linfonodais de câncer colorretal, 2016, 102 f. Tese de doutorado – curso de Medicina e Ciências da Saúde, PUC, Porto Alegre, 2016.

Pinho MSL; Ferreira LC; Kleinubing Jr. H. Tratamento Cirúrgico do Câncer Colorretal: Resultados a Longo Prazo e Análise da Qualidade. *Rev bras Coloproct.* 26(4): 422-429, 2006.

Pollack A. et al. Ki-67 staining is a strong predictor of distant metastasis and mortality for men with prostate cancer treated with radiotherapy plus androgen deprivation: Radiation Therapy Oncology Group Trial 92-02. *J Clin Oncol.* 2004 Jun 1;22(11):2133-40.

R: The R Project for Statistical Computing [Internet]. [citado 4 de março de 2017]. Disponível em: <https://www.r-project.org/>

Rasmussen HB. et al. Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV/CD26 in complex with a substrate analog. *Nat Struct Biol.* 2003 Jan;10(1):19-25.

Rondinelli RH et al. Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in late pathological stage human prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 1997 Dec;1(2):66-72.

Rutter CM, Johnson EA, Feuer EJ, Knudsen AB, Kuntz KM, Schrag D. Secular Trends in colon and rectal cancer relative survival. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 4 de dezembro de 2013;105(23):1806–13.

Salvucci, O. et al. The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study. *Breast cancer research and treatment*, v. 97, n. 3, p. 275-83, Jun 2006.

Santos Junior., JCM. Câncer Ano-Reto-Cólico: Aspectos Atuais II – Câncer Colorretal – Fatores de Riscos e Prevenção. *Rev bras Coloproct.* 27(4): 459-473, 2007.

Santos M. *Diretrizes Oncológicas 2.* São Paulo : Doctor Press Ed. Científica, 2019.

Santos Silva I. *Cancer Epidemiology: Principles and Methods.* Lyon: IARC; 1999.

Savarin-Vuaillet et al. Chemokines and chemokine receptors in neurological disease: raise, retain, or reduce? *Neurotherapeutics.* 2007 Oct;4(4):590-601.

Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017 Mar.

Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 2017; 67:177-93.

Silva, EJ; Freire, D; Souza, Y; Almeida, E. Câncer de Cólon: Como Diagnosticá-lo?

Trabalho Prospectivo. Rev bras Coloproct.27(1): 020-025, 2007.

Sjo OH, Lunde OC, Nygaard K, Sandvik L, Nesbakken A. Tumour location is a prognostic factor for survival in colonic cancer patients. *Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel.* 2008 jan;10(1):33–40.

Smeltzer SC, Bare BG. Tratado de enfermagem médico- cirúrgico: tratamento do paciente com distúrbios intestinais e retais. 10 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. v. 2, cap. 38, p. 1119- 1126.

Smeltzer, CS; Bare, BC. Brunner & Suddarth. Tratado de enfermagem médico- cirúrgica. 10ed. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan, 2v, 2005.

Smith, M. C. et al. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Research* 64(23):8604-12, 2005.

Sonobe HM, Barichello E, Zago MF. A visão do colostomizado sobre o uso da bolsa de colostomia. *Rev Bras Cancerol.* 48(3):341-48, 2002.

Staller P. et al. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature.* 2003 Sep 18;425(6955):307-11.

Tamas K, Walenkamp AME, de Vries EGE, van Vugt MATM, Beets-Tan RG, van Etten B, et al. Rectal and colon cancer: not just a different anatomic site. *Cancer Treat Rev.* 2015 sep;41(8):671–9.

Tanaka K. et al. DPEP1 expressed in the early stages of colon carcinogenesis, affects cancer cell invasiveness. *Journal of Gastroenterology* 46, 153-163 (2011).

The American Cancer Society. *Colorectal Cancer Facts & Figures 2008-2010.* Atlanta:American Cancer Society, 2018

Therneau TM, Lumley T. (original S->R port and maintainer until 2009). survival: Survival Analysis [Internet]. 2017 [citado 17 de março de 2017]. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/survival/index.html>

Therneau, T. M. & Grambsch, P. M. *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model* (Springer-Verlag, 2017).

Thirunavukarasu P, Sukumar S, Sathaiyah M, Mahan M, Pragasheeshwar KD, Pingpank JF, et al. C-stage in colon cancer: implications of carcinoembryonic antigen biomarker in staging, prognosis, and management. *J Natl Cancer Inst.* 20 de abril de 2011;103(8):689–97.

Tokunaga K. et al. Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancers. *Cancer Res.* 1987 Nov 1;47(21):5616-9.

Ueno, Y.; Tanaka, S.; Chayama, K. Non-polypoid colorectal neoplasm in ulcerative colitis. *Gastrointest Endosc Clin N Am,* 20:525-542, 2010

Van Cutsem et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology* 27: 1386–1422, 2016

Wilschut, J. A., Habbema, J.D., Ramsey, S. D. et al. Increased risk of adenomas in individuals with a family history of colorectal cancer: results of a meta-analysis. *Cancer Causes Control*, 21:2287-93, 2010

Winawer SJ, Zauber AG, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Stewart ET, et al. The national polyp study design, methods, and characteristics of patients with newly diagnosed polyps. *Cancer*. 1992;70(S3):1236–1245.

Winawer SJ. Natural history of colorectal cancer. *Am J Med*. 1999;106(1):3–6.

Wu Qiang et al. Prognostic Value of Ki-67 in Patients With Resected Triple-Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Front. Oncol.*, 17 October 2019

Xinfeng Y. et al. CXCL12/CXCR4 promotes inflammation-driven colorectal cancer progression through activation of RhoA signaling by sponging miR-133a-3p. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019; 38: 32.

Yang DX, Gross CP, Soulos PR, Yu JB. Estimating the magnitude of colorectal cancers prevented during the era of screening: 1976 to 2009. *Cancer*. 2014;120(18):2893–2901.

Zagzag D et al. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest*. 2006 Dec;86(12):1221-32. Epub 2006 Oct 30.

Zlotnik, A. Chemokines in neoplastic progression. *Seminars in cancer biology*, v. 14, n. 3, p. 181-5, Jun 2004.