



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO

Lucélia Antunes Coutinho Braga

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA NA LATERALIDADE DO
CÂNCER COLORRETAL HUMANO PARA UM PAINEL DE MARCADORES E
PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE E ANTICORPOS PARA
TETRASPANINA CO029

Belo Horizonte

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO

Lucélia Antunes Coutinho Braga

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA NA LATERALIDADE DO
CÂNCER COLORRETAL HUMANO PARA UM PAINEL DE MARCADORES E
PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE E ANTICORPOS PARA
TETRASPANINA CO029**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da UFMG, como requisito para obtenção de título de mestre.

Orientadora: Angélica Nogueira Rodrigues (PhD/UFMG).

Coorientadora: Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz (PhD/FIOCRUZ).

Belo Horizonte

2020

B813a Braga, Lucélia Antunes Coutinho.
Avaliação do perfil de Expressão Gênica na Lateralidade do Câncer Colorretal humano para um painel de marcadores e produção da proteína recombinante e anticorpos para Tetraspanina CO029 [manuscrito]. / Lucélia Antunes Coutinho Braga. - - Belo Horizonte: 2019.
117f.: il.
Orientador (a): Angélica Nogueira Rodrigues.
Coorientador (a): Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz.
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Tetraspanina 29. 2. Antígeno Ki-67. 3. Neoplasias Colorretais. 4. Biomarcadores. 5. Dissertação Acadêmica. I. Rodrigues, Angélica Nogueira. II Queiroz, Rafaella Fortini Grenfell e. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WI 529

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



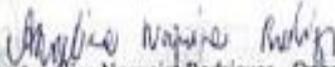
FOLHA DE APROVAÇÃO

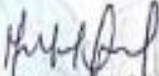
AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES EPITELIAIS DE MOTILIDADE, DIFERENCIAÇÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR EM TUMORES DO CÂNCER COLORRETAL HUMANO E PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE E ANTICORPOS MONOCLONAIS DE TETRASPANINA CO029

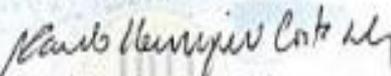
LUCELIA ANTUNES COUTINHO BRAGA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, área de concentração CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Angélica Nogueira Rodrigues - Orientadora
UFMG


Prof. Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz - Coorientadora
FIOCRUZ


Prof. Paulo Henrique Costa Diniz
UFMG


Prof. Rodrigo Gomes da Silva
UFMG

Belo Horizonte, 21 de fevereiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por sempre me capacitar e me dar serenidade em minhas decisões. “Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém”. Romanos 11:36.

Às minhas professoras Dra. Angélica Nogueira e Profa. Dra. Rafaella Fortini. Agradeço pela orientação que não foi apenas científica, mas em muitos momentos amiga, por me ensinar a ter um pensamento crítico e o incentivo pela busca de cada vez mais conhecimento. Pelas oportunidades de crescimento profissional e pessoal e pela confiança no meu trabalho.

Ao professor Dr. Paulo Zech pelos brilhantes ensinamentos e por ser um exemplo de profissional e líder. Ao professor Wander Jeremias pelo tempo dedicado com tanto esmero e gentileza e por compartilhar sua experiência. Agradeço toda colaboração, orientação e parceria das doutoras Viviane Fernandes e Mônica Demas.

Ao meu marido Wesley Braga por sempre me incentivar e apoiar nesta jornada, me proporcionando momentos de carinho, atenção e pela amizade em ouvir, sempre acolhendo com amor. Aos meus pais Célio e M^a Olivia por desde a minha infância me incentivarem e não medirem esforços para apoiar minhas escolhas profissionais, dando todo subsídio para realização dos meus objetivos. Ao meu irmão Lucas pela amizade e apoio em todas as minhas decisões e é uma inspiração de dedicação. Agradeço a família Braga (Neli, Vicente, Wivily, Welkner e Talita), Coutinho (são muitos, mas em especial minha vizinha Maria José) e meu vizinho Gerson Campos, que nos nossos encontros, recarregamos as baterias com muito amor e energias boas.

Agradeço aos meus amigos e amigas da Fiocruz – MG/IRR, que direta ou indiretamente foram muito importantes nesta etapa. A Jessica, que iniciamos e finalizamos esta caminhada juntas, cheias de desafios, aventuras e crescimento. Agradeço a Jussara, Caroline, Maria Luysa, Renata, Diana, Vanessa, Flávia, Élio Babá, Sueleny, Patrícia, Áureo, Neusa, Fábio, Cynthia, Alana, Natália, Camila, Priscila, Raquel, Josilene, Elmo, Wagner, Everton e Thymoti pela acolhida, pela paciência, pelos momentos de descontração, trabalho em equipe e amizade, levo para a vida no meu coração. Agradeço a CAPES, pela bolsa de mestrado, a qual viabilizou crescimento pessoal e profissional. A FAPEMIG, Fiotec, Fiocruz MG/IRR e CNPq pelo auxílio financeiro, o qual viabilizou a execução deste projeto. À Faculdade de Medicina da UFMG e ao programa de pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto pelo suporte acadêmico científico teórico.

RESUMO

A Organização Mundial da Saúde considera que o câncer é um inquestionável problema de saúde pública. Para o Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde estima-se a ocorrência de 625 mil novos casos de câncer em 2020, sendo o câncer colorretal (CCR) a segunda neoplasia de maior incidência para homens e mulheres. O último relatório da GLBOCAN identificou o CCR como a segunda causa mais frequente de óbitos entre os tipos de câncer. Na era da medicina molecular, a avaliação da expressão gênica de marcadores específicos do CCR, devido à heterogeneidade das mutações, tornou-se parte importante de ensaios clínicos e pesquisas. Dentre os diferentes marcadores em estudo na atualidade, um em potencial é a proteína tetraspanina CO029 (TspanCO029), responsável pela motilidade da célula neoplásica. Merecem destaque os marcadores de transição epitélio-mesenquimal (EMT) E-caderina e Vimentina, e o marcador de proliferação celular (Ki67). O EMT está relacionado à perda da diferenciação celular, resistência aos tratamentos convencionais e surgimento de metástases. Já o Ki67, está relacionado à proliferação celular. Recentes estudos têm demonstrado que a lateralidade do CCR tem valores prognóstico e preditivo de resposta a tratamentos específicos. Sendo assim, o objetivo do estudo foi avaliar o perfil de expressão gênica dos marcadores TspanCO029, E-caderina, Vimentina e Ki67 em amostras de pacientes com CCR de variável lateralidade e produzir a TspanCO029 recombinante e seus anticorpos. Dados de expressão gênica foram correlacionados com características do paciente e do tumor. Os resultados mostraram que houve correlação entre a expressão gênica de TspanCO029 com os marcadores de EMT, e Ki67 nas amostras positivas do cólon direito, enquanto que o grupo de pacientes de 38 a 60 anos apresentou maior expressão para Ki67 e Vimentina. Além disso, pacientes do sexo feminino apresentaram maior expressão de E-caderina nas amostras negativas. O presente estudo não conseguiu definir TspanCO029 como marcador de predição de risco baseado na lateralidade, malignidade ou de metástase em linfonodos, quando isolado. Porém, quando correlacionado aos demais marcadores Ki67, E-caderina e Vimentina, demonstrou ter relação com a lateralidade. A proteína recombinante assim como os anticorpos foram produzidos corretamente e poderão ser utilizados futuramente em outros trabalhos.

Palavras chaves: Tetraspanina CO029, Ki67, EMT, câncer colorretal, biomarcadores.

ABSTRACT

The World Health Organization considers cancer to be an unquestionable public health problem. For Brazil, according to data from the Ministry of Health, it is estimated that 625 thousand new cases of cancer will occur in 2020, with colorectal cancer (CRC) being the second most common cancer for men and women. The latest GLBOCAN report identified CCR as the second most frequent cause of death among cancers. In the age of molecular medicine, the evaluation of gene expression of specific CCR markers, due to the heterogeneity of mutations, has become an important part of clinical trials and research. Among the different markers under study today, one potential is the tetraspanin protein CO029 (TspanCO029), responsible for the motility of the neoplastic cell. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers E-cadherin and Vimentin, and the cell proliferation marker (Ki67) are worth mentioning. EMT is related to loss of cell differentiation, resistance to conventional treatments and the appearance of metastases. Ki67, on the other hand, is related to cell proliferation. Recent studies have shown that CRC laterality has prognostic and predictive values for response to specific treatments. Thus, the aim of the study was to evaluate the gene expression profile of the markers TspanCO029, E-cadherin, Vimentina and Ki67 in samples from patients with CRC of variable laterality and to produce the recombinant TspanCO029 and its antibodies. Gene expression data were correlated with patient and tumor characteristics. The results showed that there was a correlation between the gene expression of TspanCO029 with the EMT markers, and Ki67 in the positive samples of the right colon, while the group of patients aged 38 to 60 years showed greater expression for Ki67 and Vimentina. In addition, female patients showed greater expression of E-cadherin in the negative samples. The present study failed to define TspanCO029 as a risk prediction marker based on laterality, malignancy or lymph node metastasis, when isolated. However, when correlated to the other Ki67, E-cadherin and Vimentina markers, it was shown to be related to laterality. The recombinant protein as well as the antibodies were produced correctly and may be used in other works in the future.

Key words: Tetraspanin CO029, Ki67, EMT, colorectal cancer, biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência de novos casos de todos os tipos de câncer em 2018, em ambos os sexos no mundo (FERLAY, J. et.al., 2018). 28

Figura 2. Incidência de mortes em 2018, em ambos os sexos no mundo (FERLAY, J. et.al., 2018). 28

Figura 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020-2022 por sexo, exceto pele não melanoma (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). 29

Figura 4. Colectomia. O CCR é frequentemente removido com uma cirurgia chamada colectomia. A cirurgia remove total ou parcialmente o segmento do cólon onde o câncer está localizado. As duas extremidades do cólon restante são anexadas uma à outra (NCC Guidelines for Patients Colon Cancer, 2018). 31

Figura 5. Diferentes estádios de evolução de um câncer de intestino. Os diferentes estadiamento para T (tumor) a partir do Tis a T4, mostrando as camadas que são invadidas com a evolução da doença. Acesso: <https://www.cancer.gov/search/results> 13/08/2018. 37

Figura 6. Estrutura 2D da TspanCO029. Estruturas Alça EC1, Alça EC2, Alça IL, grande loop, caudas citoplasmáticas e 4 domínios transmembrana. Programa PSI The Protein Model Portal. Acesso: https://www.proteinmodelportal.org/?pid=modelDetail&provider=SWISSMODEL&template=5tcxA&pmpuid=1001215393494&range_from=1&range_to=237&ref_ac=P19075&mapped_ac=P19075&zid=async.&https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P19075. 41

Figura 7. Representação do lócus gênico de TSPAN8, gene que codifica a proteína TspanCO029 (NCBI, 2017). 42

Figura 8. Desenho ilustrativo do Intestino grosso. Acesso: <https://site.medicina.ufmg.br/inicial/constipacao-intestinal-e-a-relacao-com-fatores-comportamentais/25/07>. Adaptado pelo autor. 46

Figura 9. Desenho esquemático do vetor doador pDONR221 e vetor de destino pEXP1-DEST. Esses vetores foram utilizados para construção do clone de entrada e clone de expressão, respectivamente, para a produção de TspanCO029 recombinante. 58

Figura 10. Amplificação dos pares (senso e anti-senso) dos iniciadores (TSP-tetraspanina Co029, Vimt-Vimentina, E-cad-E-caderina, Ki67, GAPDH, β -actina). Eletroforese em gel de agarose a 1%, coloração com corante intercalante Blue Green, observação em transiluminador Uv. PA - padrão de peso molecular “1Kda DNA Ladder” (Promega). 70

Figura 11. Análise de integridade do RNA em *Bioanalyzer High Sensitivity RNA Analysis* de seis amostras parafinadas. (A) Representação gráfica do perfil eletroforético; Eixo x- tamanho do fragmento de RNA em [nt] - nucleotídeos; Eixo y – intensidade de fluorescência; RIN: Número de Integridade de RNA. (B) Perfil eletroforético das amostras de RNA total; cada coluna representa uma amostra, sendo, Ladder – padrão de peso molecular; RNA 659 – amostra 4; RNA 725 – amostra 7 RNA 1342 – amostra 28; RNA 4601 – amostra 16; RNA 9014 – amostra 46; RNA 9111 – amostra 47; [nt] – tamanho de fragmentos de RNA em nucleotídeos. 72

Figura 12. Análise de integridade do RNA em *Bioanalyzer High Sensitivity RNA Analysis* de seis amostras congeladas (A). Representação gráfica do perfil eletroforético; Eixo x- tamanho do fragmento de RNA em [nt] - nucleotídeos; Eixo y – intensidade de fluorescência; RIN: Número de Integridade de RNA. (B) Perfil eletroforético das amostras de RNA total; cada coluna representa uma amostra, sendo, Ladder – padrão de peso molecular; RNA 38 – amostra 38; RNA 39 – amostra 39; RNA 40 – amostra 40; RNA 41 – amostra 41; RNA 42 – amostra 42; RNA 43 – amostra 43; [nt] – tamanho de fragmentos de RNA em nucleotídeos. 76

Figura 13. Padronização da curva de eficiência através do ensaio de qPCR. Iniciadores TspanCO029, Ki67, E-caderina, Vimentina, e os controles endógenos GAPDH, β -actina e cDNA relativas a 1 amostra parafinada (ID3), diluída 1:2 em 7 pontos. Foi possível verificar a não amplificação dos marcadores e apresentou apenas ruídos de reação. 77

Figura 14. Curva de eficiência obtida na qPCR com uso do iniciador TspanCO029. cDNA de 1 amostra congelada (ID10) diluída 1:2 em 7 pontos em triplicata. Apresentou o resultado de: slope -3,638, R2 0,99 e Eficiência de 91%. A figura a esquerda apresenta as amplificações da reação de qPCR e a figura a direita apresenta a curva obtida na reação. 77

Figura 15. Curva de eficiência obtida na qPCR com uso do iniciador E-Caderina. cDNA de 1 amostra congelada (ID10) diluída 1:2 em 7 pontos em triplicata. Apresentou o resultado de: slope -3,467, R2 0,99 e Eficiência de 94%. A figura a esquerda apresenta as amplificações da reação de qPCR e a figura a direita apresenta a curva obtida na reação. 78

Figura 16. Curva de eficiência obtida na qPCR com uso do iniciador Vimentina. cDNA de 1 amostra congelada (ID10) diluída 1:2 em 7 pontos em triplicata. Apresentou o resultado de: slope -3,493, R2 0,98 e Eficiência de 98%. A figura a esquerda apresenta as amplificações da reação de qPCR e a figura a direita apresenta a curva obtida na reação. 78

Figura 17. Curva de eficiência obtida na qPCR com uso do iniciador Ki67. cDNA de 1 amostra congelada (ID10) diluída 1:2 em 7 pontos em triplicata. Apresentou o resultado de: slope -3,335, R2 0,99 e Eficiência de 99%. A figura a esquerda apresenta as amplificações da reação de qPCR e a figura a direita apresenta a curva obtida na reação. 78

Figura 18. Curva de eficiência obtida na qPCR com uso do iniciador β -actina. cDNA de 1 amostra congelada (ID10) diluída 1:2 em 7 pontos em triplicata. Apresentou o resultado de: slope -3,132, R2 0,97 e Eficiência de 103%. A figura a esquerda apresenta as amplificações da reação de qPCR e a figura a direita apresenta a curva obtida na reação. 79

Figura 19. Curva de eficiência obtida na qPCR com uso do iniciador GAPDH. cDNA de 1 amostra congelada (ID10) diluída 1:2 em 7 pontos em triplicata. Apresentou o resultado de: slope -3,37, R2 0,98 e Eficiência de 94%. A figura a esquerda apresenta as amplificações da reação de qPCR e a figura a direita apresenta a curva obtida na reação. 79

Figura 20. Valor médio de RQ e desvio padrão para os marcadores E-CAD (E-caderina); Ki67; TSP (tretspanina CO029); VIM (Vimentina) e o controle endógeno Bact (β -actina), nos grupos Controle negativo e Positivo. 80

Figura 21. Valor da mediana de RQ e diferenças interquartis para os marcadores TspanCO029, Ki67, E-caderina e Vimentina para os grupos Positivo e Negativo. A análise estatística Mann Whitney não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados nos quatro marcadores do experimento de qPCR. 81

Figura 22. Coeficiente de correlação de Spearman. RQ das amostras positivas para cada marcador, correlacionando RQ TspanCo029 e RQ Ki67 (A); RQ TspanCO029 e RQ E-caderina (B); RQ Ki67 e RQ E-caderina (C) e RQ Ki67 e RQ Vimentina (D). Apresenta no canto superior direito valor de p e o valor do coeficiente de Spearman. 82

Figura 23. Coeficiente de correlação de Spearman. RQ das amostras positivas para cada marcador, correlacionando RQ TspanCO029 e RQ E-caderina; RQ Ki67 e RQ E-caderina e RQ E-caderina e RQ Vimentina. Apresenta no canto superior direito valor de p e o valor do coeficiente de Spearman. 83

Figura 24. Valor da mediana de RQ e diferenças interquartis para os marcadores TspanCO029, Ki67, E-caderina e Vimentina para os grupos Cólón Direito –Positivo; Cólón Direito – Negativo; Cólón Esquerdo – Positivo; Cólón Esquerdo – Negativo. A análise estatística Mann Whitney não mostrou

diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados nos quatro marcadores do experimento de qPCR. 84

Figura 25. Coeficiente de correlação de Spearman. RQ das amostras positivas cólon esquerdo para cada marcador, correlacionando RQ TspanCo029 e RQ Ki67; RQ TspanCO029 e RQ E-caderina e RQ Ki67 e RQ Vimentina. Apresenta no canto superior direito valor de p e o valor do coeficiente de Spearman.85

Figura 26. Coeficiente de correlação de Spearman. RQ das amostras positivas cólon direito para cada marcador, correlacionando RQ TspanCo029 com RQ Ki67; RQ E-caderina e RQ Vimentina. Além de RQ Ki67 e RQ E-caderina. Apresenta no canto superior direito valor de p e o valor do coeficiente de Spearman. 86

Figura 27. Coeficiente de correlação de Spearman. RQ das amostras negativas cólon esquerdo para cada marcador, correlacionando RQ Ki67, RQ E-caderina e RQ Vimentina. Apresenta no canto superior direito valor de p e o valor do coeficiente de Spearman. 87

Figura 28. Coeficiente de correlação de Spearman. RQ das amostras negativas cólon direito para cada marcador, correlacionando RQ E-caderina, RQ TspanCO029, e RQ Ki67. Apresenta no canto superior direito valor de p e o valor do coeficiente de Spearman. 88

Figura 29. Valor da mediana de RQ e diferenças interquartis para os marcadores TspanCO029, Ki67, E-caderina e Vimentina para os grupos Sim e Não para histórico familiar. A análise estatística Mann Whitney não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados nos quatro marcadores do experimento de qPCR. 88

Figura 30. Valor da mediana de RQ e diferenças interquartis para os marcadores TspanCO029, Ki67, E-caderina e Vimentina para os grupos Sim e Não para Linfonodos acometidos. A análise estatística Mann Whitney não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados nos quatro marcadores do experimento de qPCR. 89

Figura 31. Valor da mediana de RQ e diferenças interquartis para os marcadores TspanCO029, Ki67, E-caderina e Vimentina para os grupos Feminino e Masculino. A análise estatística Mann Whitney mostrou diferenças estatisticamente significativas para o marcador E-caderina, com maior expressão no grupo Feminino. Valor de p 0,026. 90

Figura 32. Valor da mediana de RQ e diferenças interquartis para os marcadores TspanCO029, Ki67, E-caderina e Vimentina para os grupos de idade 38 a 60; 61 a 70 e Acima de 70. A análise estatística Mann Whitney mostrou diferenças estatisticamente significativas para o grupo de 38 a 60 anos, para os marcadores Ki67 e Vimentina, com valor de $p=0,032$ e $0,004$ respectivamente. 90

Figura 33. Perfil eletroforético da amplificação do gene TSPAN8 por PCR convencional. Como molde, foram usados 0,5 μg de cDNA da célula HT29 e pares de iniciador para o gene. Através do gel de agarose 1% e coloração por fluorescência usando o marcador *blue green* e leitura em aparelho transiluminador com luz UV, foi possível identificar a banda correspondente ao gene de interesse com altura de aproximadamente 714bp. 92

Figura 34. Perfil eletroforético da amplificação por PCR do gene TSPAN8 contendo sítios att. Como molde, foram usados 0,5 μg do *amplicon* de TSPAN8 previamente obtido por PCR convencional. Através do gel de agarose 1% e coloração por fluorescência usando o marcador *blue green* e leitura em aparelho transiluminador com luz UV, foi possível identificar a banda correspondente ao gene de interesse com altura de aproximadamente 714bp.92

Figura 35. Perfil eletroforético dos clones de entrada. Duas colônias (TSP Colônia 1 e TSP Colônia 2) foram submetidas a PCR de colônia com confirmação da presença do gene de interesse, concentração colônia 1 = $112,8\text{ng}/\mu\text{l}$ e colônia 2 = $74,9\text{ng}/\mu\text{l}$. Foi possível visualizar bandas correspondentes ao gene de interesse também no teste controle com primer senso FM13 e anti-senso da TSP, mostrando a inserção correta no plasmídeo. 93

Figura 36. Resultados do sequenciamento avaliado no software *Blast* com 99% de identidade com o gene de interesse TSPAN8. 93

Figura 37. Perfil eletroforético dos clones de destino. 15 colônias foram submetidas a PCR para confirmação da presença do inserto. Controle positivo (C+) amplificação do gene de interesse de 714bp, controle negativo (C-) usando água *RNAse free*. PA = padrão de peso molecular. 94

Figura 38. Resultados do sequenciamento avaliado no software *Blast* com 99% de identidade com o gene de interesse TSPAN8. 95

Figura 39. Perfil eletroforético do produto da expressão de TspanCO029r em diferentes concentrações de IPTG. 0,25mM, 0,5mM, 0,75mM e 1mM, em diferentes tempos de coleta. NI1h e NI4h: Não induzido 1 e 4 horas. 1h a 4h coletados de uma em uma hora após indução. 96

Figura 40. Perfil eletroforético do produto da expressão de TspanCO029r. Diferentes tempos de indução com de 0,5mM de IPTG. T0: Não induzido. T1 a T4 coletados de uma em uma hora após indução. 96

Figura 41. Perfil eletroforético do produto da expressão de TspanCO029r. Sobrenadante, fração solúvel, coletado após as respectivas lises bacterianas. *Pellet*: fração Insolúvel. 97

Figura 42. *Westem Blot* anti-his das eluições do produto da purificação de TSPCO029r. FT: *Flow Throu* (amostra que saiu da coluna), W1: *Whash Buffer* 1 pH 7,8, W2: *Whash Buffer* 2 pH 6,3 e E: *Elution Buffer* pH 4,3. 97

Figura 43. Resultado da espectrometria de massas. Identificação de peso 28474.0775 [Da]. 98

Figura 44. Cultura celular de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais anti-TspanCo029 ID P1.11C. 99

Figura 45. Western blot dos anticorpos policlonal e monoclonal produzidos *in vitro*. A banda visualizada na altura do peso molecular (PA) de 52 kDa corresponde a cadeia pesado dos anticorpos. 100

LISTA DE TABELA

- Tabela 1. Medicamentos citotóxicos e combinações comumente usados no tratamento do CCR. 32
- Tabela 2. Medicamentos mais usados na terapia alvo direcionada do câncer colorretal. 33
- Tabela 3. Medicamentos usados na Imunoterapia. 33
- Tabela 4. Classificação do risco de desenvolvimento de câncer colorretal. 35
- Tabela 5. Sistema de Classificação TNM. 36
- Tabela 6. Estadiamento de acordo com a AJCC 8ª edição. 37
- Tabela 7. Iniciadores usados na PCR convencional e qPCR. 52
- Tabela 8. Iniciadores usados na Plataforma Gateway® para produção da proteína TspanCO029 recombinante. 57
- Tabela 9. Amostras Parafinadas do Departamento de Anatomia Patológica - Faculdade de Medicina da UFMG. São apresentadas as amostras positivas (ID POSITIVA), amostras negativas (ID NEGATIVA), nome, sexo, idade, lateralidade e estadiamento (T, N, M). 67
- Tabela 10. Amostras Congeladas do Instituto Alfa de Gastroenterologia - Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da UFMG. São apresentadas as amostras positivas (ID POSITIVA), amostras negativas (ID NEGATIVA), nome, sexo, idade, lateralidade e estadiamento (T, N, M). 68
- Tabela 11. Perfil descritivo das características clínicas dos 34 pacientes com CCR. Amostras Congeladas do Instituto Alfa de Gastroenterologia - Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da UFMG. 69
- Tabela 12. Concentração do RNA extraído das amostras parafinadas de adenocarcinoma. 70
- Tabela 13. Concentração do RNA das amostras congeladas de adenocarcinoma. 74
- Tabela 14. Valores obtidos na qPCR da curva de eficiência para todos os iniciadores. 79
- Tabela 15. Coeficiente de correlação de Spearman. Amostras positivas Cólon Esquerdo e Cólon Direito. 86
- Tabela 16. Concentração de DNA plasmidial das colônias após a recombinação LR 95

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Absorbância do soro dos camundongos (1 e 2) imunizados. O eixo x apresenta o número de coletas realizadas de 15 em 15 dias, eixo y apresenta a absorbância do valor reativo na técnica de Elisa de cada soro coletado. Camundongo 1 obteve uma melhor imunização e seguiu para a etapa de fusão celular. 98

LISTA DE SIGLAS

AJCC *American Joint Committee on Cancer*

APC *Polipose adenomatosa coli*

BCA Ácido bicinechônico

C Citosina

CCR Câncer colorretal

cDNA DNA complementar

CEA Antígeno carcino-embriônico

CIN Instabilidade cromossômica

CMS *Consensus molecular subtype*

Ct *Threshold cycle*

DAB Diaminobenzidina

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO Dimetilsulfóxido

DNA Ácido desoxirribonucleico

DO Densidade óptica

EC1 Pequena alça externa

EC2 Alça externa maior

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

ELISA Ensaio imunoenzimático de absorção. *Enzyme linked immunosorbent assay*

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

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

G Guanina

G0 Células em repouso

G1 Síntese proteica

G2 Duplicação dos centríolos

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

GTPase Enzimas hidrolases que se ligam e hidrolisam o GTP

HNPCC Câncer colorretal hereditário não associado à polipose

HRP Peroxidase de raiz forte *Horseradish peroxidase*

HT29 Células de adenocarcinoma humano

IARC Agência Internacional para Pesquisa em Câncer

IDH Índice de desenvolvimento humano

Ig Imunoglobulina
IL Pequena alça interna
INCA Instituto Nacional de Câncer
kD KiloDantons
Ki67 Proteína nuclear
LB *Luria Bertani*
M Metástase
MAPK Proteína quinase ativada por mitógeno
MMR Sistema de reparo de incompatibilidade do DNA
MS Ministério da Saúde
MSI Instabilidade de microssatélites
MSS Estabilidade de microssatélites
MYC Genes reguladores e proto-oncogenes que codificam fatores de transcrição
N Gânglios linfáticos acometidos
NCBI *National Center for Biotechnology Information*
NGS Sequenciamento de nova geração
OMS Organização Mundial de Saúde. *World Health Organization*
PAF Polipose adenomatosa familiar
PCR Reação em cadeia da polimerase
qPCR Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RAF/*BRAF* Gene humano que produz uma proteína chamada B-Raf
RAS/*KRAS* Homólogo do oncogene viral do sarcoma do rato de Kirsten
RNA Ácido ribonucleico
RQ Quantificação relativa. *Relative quantification*
RT-PCR Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
S Duplicação do DNA
SAS Solução de sulfato de amônia
SDS-PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida - Dodecil sulfato de sódioT
T Tumor primário
TAE Tampão Tris-Acetato-EDTA
TB *Terrific Broth*
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

TGF-beta Fator de transformação do crescimento beta. *Transforming growth factor beta*

TM Temperatura de *melt*

TP53 Proteína de tumor

TSPAN8 Gene tetraspanina 8

TspanCO029 Proteína tetraspanina CO029

UFMG Universidade Federal de Minas Gerais

VGFR Fator de crescimento endotelial vascular. *Vascular endothelial growth factor*

WB Ensaio imunoenzimático de *Western blotting*

WNT Via de sinalização de transdução

WT Gene selvagem. *Wild type*

SUMÁRIO

1.	JUSTIFICATIVA	19
2.	OBJETIVOS	20
2.1.	GERAL	20
2.2.	ESPECÍFICOS	20
3.	ANTESCEDENTES CIENTÍFICOS	21
3.1.	CÂNCER COLORRETAL – ASPECTOS GERAIS	21
3.2.	EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER COLORRETAL	22
3.3.	DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	25
3.4.	FATORES DE RISCO	28
3.5.	FATORES PROGNÓSTICOS	30
3.5.1.	CLASSIFICAÇÃO PELO SISTEMA DE ESTADIAMENTO TNM	30
3.5.2.	CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA	33
3.5.3.	CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR	33
3.6.	MARCADORES PREDITIVOS E PROGNÓSTICOS	33
3.6.1.	TETRASPANINA CO029	36
3.6.2.	TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL	38
3.6.3.	Ki67	40
3.7.	LATERALIDADE EM CÂNCER COLORRETAL	41
4.	METODOLOGIA	45
4.1.	ASPECTOS ÉTICOS	45
4.2.	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS PARAFINADAS E CONGELADAS	45
4.3.	EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR	46
4.3.1.	DESENHO DOS INICIADORES	46
4.3.2.	VALIDAÇÃO DOS INICIADORES	46
4.3.3.	EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL	47
4.3.3.1.	AMOSTRAS PARAFINADAS	47
4.3.3.2.	AMOSTRAS CONGELADAS	48
4.3.3.3.	SÍNTESE DO cDNA DAS AMOSTRAS PARAFINADAS E CONGELADAS	49
4.3.4.	PADRONIZAÇÃO DA CURVA DE EFICIÊNCIA DOS INICIADORES PARA qPCR	49
4.3.4.1.	AMOSTRAS PARAFINADAS	49
4.3.5.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS AMOSTRAS PARAFINADAS E CONGELADAS POR qPCR	49
4.3.6.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	50

4.4.	PRODUÇÃO DA PROTEÍNA TETRASPANINA CO029 RECOMBINANTE	50
4.4.1	AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO GENE DE INTERESSE POR TECNOLOGIA GATEWAY®	51
4.4.2.	CLONAGEM	52
4.4.3.	REAÇÃO DE RECOMBINAÇÃO BP E OBTENÇÃO DO CLONE DE ENTRADA	52
4.4.4.	REAÇÃO DE RECOMBINAÇÃO LR E OBTENÇÃO DO CLONE DE EXPRESSÃO	53
4.4.5.	EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	54
4.4.6.	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE TspanCO029r	55
4.5.	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ANTICORPOS ANTI-TETRASPANINA CO029 (mAb-TspanCO029r)	56
4.5.1.	IMUNIZAÇÃO	56
4.5.2.	FUSÃO CELULAR	56
4.5.3.	CLONAGEM	57
4.5.4.	PURIFICAÇÃO	57
5.	RESULTADOS	59
5.1.	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS PARAFINADAS E CONGELADAS	59
5.2.	EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR	63
5.2.1.	VALIDAÇÃO DOS INICIADORES	63
5.2.2.	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	63
5.2.2.1.	AMOSTRAS PARAFINADAS	63
5.2.2.2.	AMOSTRAS CONGELADAS	66
5.2.3.	PADRONIZAÇÃO DA CURVA DE EFICIÊNCIA DOS INICIADORES PARA qPCR	69
5.2.3.1.	AMOSTRAS PARAFINADAS	70
5.2.3.2.	AMOSTRAS CONGELADAS	70
5.2.4.	EXPRESSÃO GÊNICA DAS AMOSTRAS POR qPCR	73
5.2.5.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR DAS AMOSTRAS CONGELADAS E CORRELAÇÃO COM VARIÁVEIS DO TUMOR E DO PACIENTE	74
5.3.	PRODUÇÃO RECOMBINANTE DA PROTEÍNA TETRASPANINA CO029	84
5.3.1	AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO GENE DE INTERESSE	84
5.3.2.	REAÇÃO DE RECOMBINAÇÃO BP E OBTENÇÃO DO CLONE DE ENTRADA	86
5.3.3.	REAÇÃO DE RECOMBINAÇÃO LR E OBTENÇÃO DO CLONE DE EXPRESSÃO	87
5.3.4.	EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE TspanCO029r	89
5.4.	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-TETRASPANINA CO029 (mAb-TspanCO029r)	92
5.4.1.	IMUNIZAÇÃO	92
5.4.2	FUSÃO CELULAR	92
5.4.3	CLONAGEM	92

5.4.4 PURIFICAÇÃO	93
6. DISCUSSÃO	95
7. CONCLUSÃO	100
8. PERSPECTIVAS	101
REFERÊNCIAS	102

1. JUSTIFICATIVA

Considerando a crescente incidência e mortalidade de câncer colorretal (CCR) no Brasil e no mundo, é fundamental a realização de estudos que permitam novos conhecimentos e avanços sobre as quais possam ser desenvolvidas melhores estratégias para o controle da doença (FERLAY et al., 2018). Existem muitos desafios enfrentados no desenvolvimento de novas alternativas de diagnósticos, prognóstico e tratamento no CCR. É urgente a aquisição de métodos sensíveis e específicos para uso na prática clínica. São necessários investimentos a longo prazo, envolvendo as pesquisas básica, translacional e clínica direcionados para o CCR.

A busca de proteínas específicas vem ganhando espaços a fim de se ter mais biomarcadores disponíveis para detecção da doença em diferentes contextos clínicos e para eventualmente o desenvolvimento de drogas alvo dirigidas.

A proteína Tetraspanina CO029 (TspanCO029) é um potencial biomarcador tumoral para o CCR, que em células neoplásicas podem apresentar superexpressão e que contribui para a motilidade desta célula tumoral, podendo intensificar eventos metastáticos (MANALE, E.L.K. et al., 2017). Neste contexto, conhecer as características biológicas e moleculares das neoplasias e sua associação com a lateralidade, pode ajudar na prevenção e tratamento da doença, podendo impactar consequentemente a morbidade e mortalidade. Este estudo propõe-se determinar o perfil de expressão gênica de TspanCO029, EMT (E-caderina, Vimentina) e Ki67 em pacientes com CCR manifestando variada lateralidade, o que ainda não foi estudado até o momento, visando caracterizar a existência de correlação entre os perfis de expressão dos marcadores, que possam ser explorados como marcador de valor prognóstico e/ou preditivo em pacientes com CCR e produzir a proteína TspanCO029 recombinante e anticorpos anti-TspanCO029.

2. OBJETIVOS

2.1.GERAL

Avaliar o perfil de expressão gênica do marcador TspanCO029 e dos marcadores de diferenciação E-caderina, Vimentina (EMT) e de proliferação celular Ki67 em amostras com CCR humano, correlacionando com a lateralidade, metástase em linfonodos e características dos pacientes.

2.2.ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão gênica por PCR em tempo real para quantificação relativa dos marcadores TspanCO029, E-caderina, Vimentina (EMT) e Ki67;
- Avaliar a existência de correlação entre a expressão gênica dos marcadores, , baseando nos resultados gerados da quantificação relativa, nas amostras humanas com CCR;
- Produzir a proteína recombinante TspanCO029 em sistema procarioto, para posterior produção dos anticorpos e futuros estudos;
- Produzir anticorpos monoclonais anti-TspanCO029 *in vitro* e avaliar sua antigenicidade, para futura avaliação proteica.

3. ANTESCEDENTES CIENTÍFICOS

3.1. CÂNCER COLORRETAL – ASPECTOS GERAIS

O câncer é uma doença genética. O acúmulo de alterações no DNA pode levar ao surgimento de mutações, transformando células normais em malignas. Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças relacionadas, em que algumas células começam a se replicar descontroladamente e se espalham pelos tecidos adjacentes. O processo de carcinogênese envolve os principais grupos de genes, sendo eles os proto-oncogenes e genes supressores de tumor (DANTAS, E.L.R. et al., 2009). Os proto-oncogenes são genes que produzem proteínas que promovem crescimento e proliferação celular. Quando ocorrem mutações nos mesmos há um aumento de função proliferativa. Os genes supressores de tumor regulam a atividade mitótica através das proteínas produzidas por eles que tem como função controlar o ciclo celular. Quando esses genes estão mutados ocorre proliferação tumoral (PARREIRAS F.C. et al., 2013).

Com os avanços das técnicas de diagnóstico, a partir da década de 1990 houve um aumento na incidência dos principais tipos de câncer. Além disso, segundo a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), o aumento da incidência de câncer também ocorre em parte devido ao contínuo crescimento populacional (aumento do número absoluto) e a maior longevidade da população. Ademais, outros fatores contribuem para o aumento do número de casos, como características socioculturais, ambientais, políticas, econômicas e biológicas do indivíduo (CHEN E. et al., 2018). Em 2008, a incidência de câncer foi de 12,7 milhões, já em 2012 aumentou para 14,1 milhões de casos. No ano de 2018, dados do relatório da GLOBOCAN estimaram aproximadamente 18,1 milhões de casos e 9,6 milhões de óbitos (FERLAY et al., 2018), sendo esta uma das maiores causas de morte no mundo, configurando assim um dos mais importantes problemas de saúde pública (HAUPTMAN, N. et al., 2019).

O câncer colorretal (CCR) constitui atualmente um importante e crescente problema de saúde mundialmente, visto que é a terceira neoplasia maligna mais comumente diagnosticada (HONGJUAN, H. et al. 2019) e a segunda causa mais comum de morte relacionada ao câncer em todo o mundo (FERLAY et al., 2018).

O CCR apresenta etiopatogenia multifatorial influenciada por fatores genéticos, ambientais e relacionados ao estilo de vida, dado que a sua incidência é maior em países onde a população possui baixa prática de atividades físicas, onde o hábito alimentar é de alto consumo de carnes vermelhas, alimentos processados, álcool e tabagismo, baixa ingestão de

frutas, legumes e verduras, alta prevalência de obesidade e sobrepeso (NETO, J.D.C. et.al., 2006).

Fatores de risco ambientais, hereditários e as doenças inflamatórias do intestino também estão envolvidos no desenvolvimento desta neoplasia. Mutações genéticas, somáticas ou epigenéticas, quando acumuladas podem levar ao surgimento de CCR, correspondendo a cerca de 80% dos casos o que é denominado câncer esporádico (CHEN E. et al., 2018).

Grande parte dos tumores humanos tem origem epitelial, e são designados carcinomas. Os carcinomas podem ser divididos em dois grandes grupos. O primeiro, o carcinoma pavimento-celular, com origem nas células epiteliais e que possui como função formar uma camada celular de proteção. O segundo é o adenocarcinoma, “adeno” que significa “glandular”, possui a função de secretar substâncias (SAITO, R.F. et.al., 2015). O adenocarcinoma colorretal representa cerca de 95% das neoplasias no intestino grosso, constituído por glândulas atípicas proliferadas, apresentando altas taxas de incidência e mortalidade em todo mundo assim como no Brasil (BRASILEIRO, F.G. 2016).

3.2.EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER COLORRETAL

Os tipos de cânceres de maior incidência em todo mundo, exceto o câncer de pele não melanoma, são os de pulmão, mama e colorretal, totalizando um terço do número de casos de câncer. Para os demais tipos de cânceres as diferenças regionais de cultura, economia e estilo de vida podem influenciar no perfil de incidência desta doença (FERLAY, J. et.al., 2018).

A IARC divulgou o seu último relatório em 2018, com estimativas de incidência e mortalidade relacionadas ao câncer no mundo. Dados da GLOBOCAN 2018, estimaram que para ambos os sexos, o câncer de pulmão apresenta-se como o de maior incidência com 11,6% dos casos e também o de maior mortalidade com 18,4% do total de mortes por câncer. Em sequência, aparece o câncer de mama com também 11,6%, colorretal 10,2%, próstata 7,1% e estômago 5,7%. Em relação à mortalidade, após o câncer de pulmão, seguem o câncer colorretal com 9,2%, gástrico 8,2%, hepático 8,2% e mama 6,6% (FERLAY, J. et.al., 2018), conforme figuras 1 e 2.

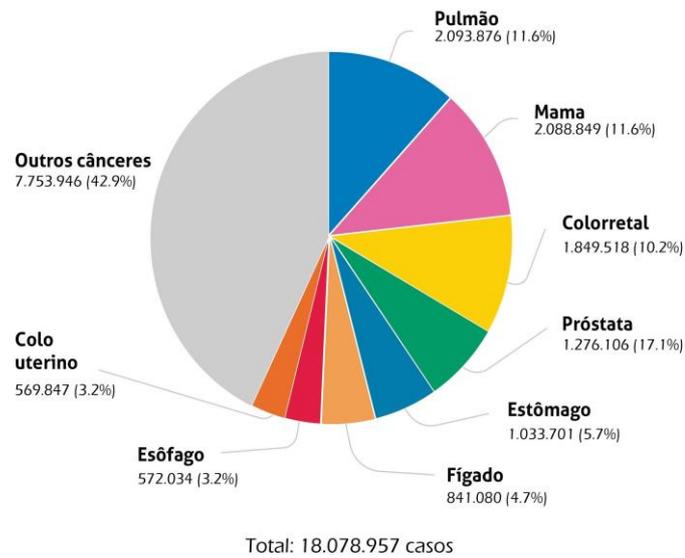


Figura 1. Incidência de novos casos de todos os tipos de câncer em 2018, em ambos os sexos no mundo (FERLAY, J. et.al., 2018).

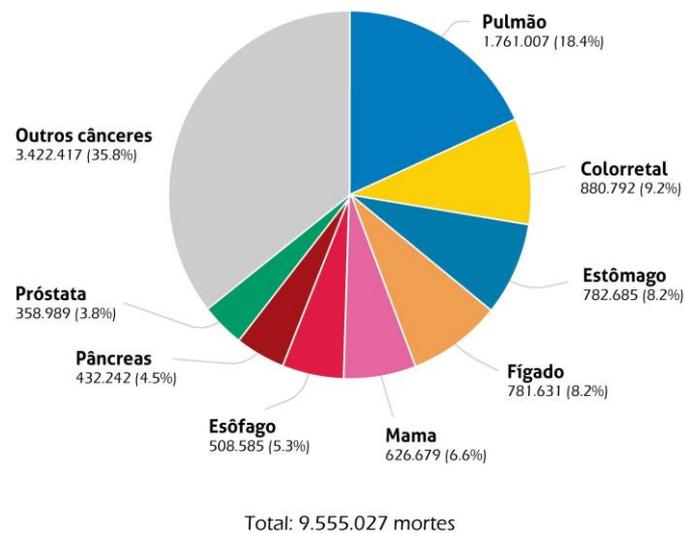


Figura 2. Incidência de mortes em 2018, em ambos os sexos no mundo (FERLAY, J. et.al., 2018).

O último relatório da GLOBOCAN em 2018 estimou aproximadamente 1,8 milhões de casos de CCR com 881 mil óbitos anuais. As taxas de incidência do CCR variam em diferentes regiões do mundo, sendo mais elevadas em países desenvolvidos com índices altos de IDH como países da Europa central e oriental, enquanto os menores estão na África ocidental. Esta neoplasia atua como um marcador de desenvolvimento socioeconômico em que as taxas

tendem a aumentar com a elevação do IDH. Em geral, o câncer colorretal ocupa o terceiro lugar em termos de incidência e o segundo em termos de mortalidade (FERLAY et al., 2018).

As maiores taxas de incidência de CCR são observadas em partes da Europa (Hungria, Eslovênia, Eslováquia, Holanda e Noruega), assim como na Austrália / Nova Zelândia, América do Norte e Leste da Ásia (Japão, República da Coreia e Singapura). São encontrados índices elevados de CCR também no Uruguai. As taxas de incidência tendem a ser mais baixas na maioria das regiões da África e no sul da Ásia. A Rússia, China e Brasil vêm apresentando o aumento da incidência assim como da mortalidade nas últimas décadas. Este aumento pode ser atribuído a padrões alimentares, obesidade e fatores de estilo de vida. Entretanto, foi observado um aumento na incidência, mas, diminuição de mortalidade no Canadá, Reino Unido, Dinamarca e Cingapura, e diminuição de incidência e mortalidade nos Estados Unidos, Japão e França. Este declínio de mortalidade nos países mais desenvolvidos é reflexo de melhorias na sobrevivência através da adoção de melhores tratamentos do câncer nestes países. Assim como maior permanência em programas de triagem e detecção precoce, como os implementados na década de 1990 nos Estados Unidos e no Japão (FERLAY et al., 2018).

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima para o Brasil em 2020-2022 aproximadamente 625 mil casos, para todos os tipos de câncer. A estimativa dos tipos de câncer de maior incidência para os homens, excetuando o câncer de pele não melanoma, serão próstata (29,2%), cólon e reto (9,1%), pulmão (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5,0%). Para as mulheres, excetuando o câncer de pele não melanoma, as maiores incidências serão, os cânceres de mama (29,7%), cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,4%), pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%) figurarão entre os principais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

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

Homens			Mulheres		
Localização Primária	Casos	%	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	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%
Esôfago	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 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020-2022 por sexo, exceto pele não melanoma (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

No Brasil, para 2020, o CCR é a segunda neoplasia de maior incidência em homens e mulheres com estimativa de 20.520 e 20.470 casos respectivamente. Até 2019 o CCR era a

terceira neoplasia de maior incidência para os homens e segunda para as mulheres com aproximadamente 17 e 18 mil casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Assim como na incidência, a mortalidade por CCR é maior em capitais das regiões Sul e Sudeste, sendo a segunda causa de morte por câncer (LOPEZ, G. et.al. 2018).

3.3.DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

Através de rastreamento de rotina com pesquisa de sangue oculto nas fezes, colonoscopia ou sigmoidoscopia, ou partir das informações de histórico clínico e queixa do paciente, é suspeitado o diagnóstico de CCR (NAKAGAWA, W.T. et.al., 2002). Exame físico e laboratorial (incluindo marcador tumoral) são realizados à suspeição (ACS, 2019). O diagnóstico definitivo de CCR requer uma biópsia que habitualmente é realizada a partir de métodos endoscópicos que, apesar de invasivos, são mais precisos. A colonoscopia e a retossigmoidoscopia são utilizadas no rastreamento e diagnósticos do CCR. Estes métodos permitem a ressecção dos pólipos que predispõe ao câncer, por isto estas são técnicas que também viabilizam a prevenção primária, e a coleta de material para biópsia, que permitem confirmar o diagnóstico de neoplasia, determinar o tipo histológico e características moleculares preditoras de resposta (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Outros métodos de diagnóstico que podem ser usados são os exames de imagens como ultrassonografia, tomografia computadorizada, ultrassom endorretal, ressonância magnética, que podem influenciar na estratégia terapêutica, pois são capazes de mostrar possíveis metástases em órgãos adjacentes e distantes, possibilitando estadiar a doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). No Brasil, apesar de não haver um consenso quanto à implantação de programa de rastreamento, a Sociedade Brasileira de Coloproctologia e o INCA recomendam rastreamento em indivíduos com baixo risco a partir dos 50 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). A Sociedade Americana de Coloproctologia recomenda desde 2018 rastreamentos a partir dos 45 anos (ACS, 2019).

A escolha da melhor forma de tratamento depende do estadio da doença. No entanto, o tratamento cirúrgico radical é a principal abordagem para pacientes com CCR localizado, que pode ser de intenção curativa ou de caráter paliativo, visando melhorar a qualidade de vida do paciente, sendo o principal pilar terapêutico capaz de impactar a sobrevida. Quando não há invasão de órgãos ou estruturas adjacentes, o tipo de cirurgia curativa dependerá da localização do tumor, que objetiva remover o segmento acometido, em conjunto com linfadenectomia adjacente. Associado à cirurgia podem ser necessários tratamentos

adjuvantes, que dependem do estágio da doença e também de características clínicas e moleculares (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

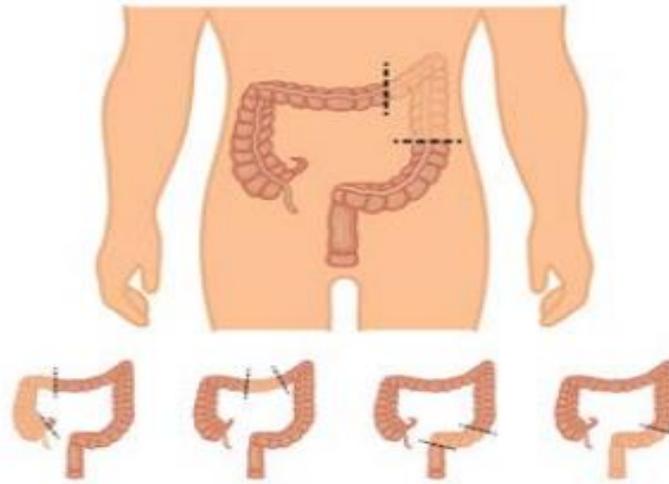


Figura 4. Colectomia. O CCR é frequentemente removido com uma cirurgia chamada colectomia. A cirurgia remove total ou parcialmente o segmento do cólon onde o câncer está localizado. As duas extremidades do cólon restante são anexadas uma à outra (NCC Guidelines for Patients Colon Cancer, 2018).

A remoção cirúrgica padrão visa margem distal livre de infiltração neoplásica, quando houver na peça operatória um limite de ressecção superior a 1,5 a 2,0 cm, sendo retirado e avaliado no mínimo 12 linfonodos. Para câncer de reto excetuando-se lesões T1, passíveis de excisão local em casos selecionados, a cirurgia requer a excisão total do mesorreto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A quimioterapia é um tipo de tratamento medicamentoso, logo sistêmico, usado no CCR que utiliza drogas que objetivam eliminar as células cancerígenas. A quimioterapia pode ser empregada em diferentes momentos durante o tratamento do CCR. A quimioterapia adjuvante é administrada após uma cirurgia com intenção curativa e tem o objetivo de eliminar eventuais células cancerosas que ainda se encontrem no organismo, reduzindo o risco de recidiva. A quimioterapia neoadjuvante é empregada antes da cirurgia, com objetivo de diminuir o câncer facilitando sua remoção cirúrgica e atuação precoce em eventuais micrometástases. No CCR avançado, a quimioterapia pode ser utilizada com o objetivo de ajudar a diminuir o tumor e aumentar a sobrevida e qualidade de vida. Além disso, no cenário metastático, a quimioterapia também possibilita em alguns casos a conversão de uma doença irrisecável em ressecável, aumentando a chance de cura dos pacientes (SBOC, 2017).

Este tipo de tratamento na maioria das vezes pode provocar efeitos colaterais, como alopecia, mucosite, anorexia, diarreia, maior chance de infecções, hematomas, sangramento,

fadiga, náusea e vômito (ACS, 2019). Os quimioterápicos disponíveis para tratamento de acordo com a NCC (2018) estão listados na tabela 1.

Tabela 1. Medicamentos citotóxicos e combinações comumente usados no tratamento do CCR.

ASSOCIAÇÕES	MEDICAMENTOS
5-FU/LV	Fluorouracil, leucovorin
Capecitabina	Capecitabina
CAPEOX	Capecitabina , oxaliplatin
FOLFIRI	Leucovorin, fluorouracil, Irinotecano
FOLFOX	Leucovorin, fluorouracil, oxaliplatina
Irinotecan	Irinotecan
Trifluridina+tipiracil	Trifluridine, tipiracil

(NCC Guidelines for Patients Colon Cancer, 2018).

Outro tratamento que pode ser utilizado é a radioterapia, que utiliza raios de alta energia profundamente direcionados para tratar o câncer de reto. Os raios têm como objetivo atingir e danificar o DNA, desta forma destroem as células cancerígenas ou evita que novas células cancerígenas sejam produzidas (NCC, 2018). Neste tratamento é possível controlar a dose de radiação no local do câncer para poupar tecidos saudáveis, porém, é inevitável que tecidos saudáveis sejam irradiados. O tratamento de radioterapia é utilizado na neoadjuvancia, adjuvância e para tratamento paliativo do tumor de reto (NCC, 2018).

A terapia alvo-direcionada é um tipo de tratamento contra o câncer dirigido a alvos específicos, ou mais comumente expressos, na célula maligna. São exemplos os anticorpos monoclonais direcionados aos fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e do receptor de fator de crescimento epitelial (EGFR). A terapia direcionada tem menos probabilidade de danificar as células não tumorais em relação a quimioterapia, por exemplo, pelo fato de ter um marcador como receptor. Não são todos os pacientes com câncer de cólon que se beneficiará do tratamento com uma terapia direcionada. Os medicamentos comumente utilizados na terapia direcionada estão listados na tabela 2 (NCCN, 2018).

Tabela 2. Medicamentos mais usados na terapia alvo direcionada do câncer colorretal.

NOME GENÉRICO
Bevacizumabe
Ramucirumabe

Ziv-aflibercept
 Cetuximabe
 Panitumumabe
 Regorafenibe
 Vemurafenibe

(NCC Guidelines for Patients Colon Cancer, 2018).

Mais recentemente um tipo de tratamento que vem sendo utilizado é a imunoterapia (tabela 3) que objetiva auxiliar o próprio sistema imunológico para reconhecer e destruir as células cancerígenas. Algumas proteínas (*checkpoint*) são ativadas para iniciar uma resposta imune. A célula cancerígena desativa o *checkpoint* para impedir que o sistema imunológico controle o tumor. A imunoterapia pode ser usada para tratar paciente cujo câncer não pode ser removido cirurgicamente, CCR avançado e pacientes com metástase sendo a presença de instabilidade de microssatélite um biomarcador preditor de resposta à imunoterapia em câncer colorretal. No Brasil, esta modalidade terapêutica não está aprovada pela ANVISA no cenário clínico atual (ACS, 2019).

Tabela 3. Medicamentos usados na Imunoterapia.

NOME GENÉRICO

Ipilimumabe
 Nivolumabe
 Pembrolizumabe

(NCC Guidelines for Patients Colon Cancer, 2018).

Entretanto, mesmo com a evolução do tratamento do CCR, a taxa de morbimortalidade pela doença segue consideravelmente elevada e os tratamentos ainda causam efeitos colaterais nos pacientes. Neste sentido, a busca de tratamentos que sejam mais eficazes e menos tóxicos é uma grande necessidade (SANTOS, R.V. et. al., 2006).

3.4.FATORES DE RISCO

Diferentes fatores de risco estão associados ao desenvolvimento do CCR. Alguns estudos observaram diferenças quanto ao sexo, com maior risco descrito para os homens. Tem-se como hipótese que hormônios femininos exerçam papel de proteção para o desenvolvimento deste câncer (MALTA, D.C. et.al., 2015). Foi identificado em uma revisão sistemática, com 11 estudos sobre uso de contraceptivo oral e câncer colorretal, que o uso da pílula confere proteção à mulher. Em contrapartida, com relação à idade, é descrito o aumento

da incidência a partir dos 40 anos para as mulheres e dos 50 anos em homens (KONO, S. 2004).

Indivíduos com história familiar de primeiro grau, com diagnóstico de CCR têm de duas a três vezes mais risco de desenvolver a doença quando comparados aos que não tem histórico, sendo que o risco aumenta de três a seis vezes, quando se trata de uma pessoa jovem (NASCIMENTO, C. et.al., 2017). Quando a pessoa possui histórico anterior de CCR, o risco de desenvolver um segundo tumor primário é maior, assim como os indivíduos com histórico de pólipos adenomatosos e doenças inflamatórias intestinais crônicas, sendo as mais comuns à colite ulcerativa e a doença de Crohn (ACS, 2019). Os cânceres que não possuem relação hereditária ou com doenças intestinais preexistentes, são classificados como esporádicos (SP, 2017).

A alimentação inadequada é considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do CCR (ACS, 2019). A literatura aponta um aumento do risco associado ao alto consumo de carnes vermelhas (principalmente carne bovina e de cordeiro), carnes processadas e dieta rica em gordura animal (CARR, P.R. et.al., 2016). A forma de preparo dos alimentos também pode contribuir para o aumento do risco deste câncer. Em algumas formas de preparo há liberação de substâncias como nitrato e nitrito que estão associados ao aumento do câncer (CANTWELL, M. et.al., 2017).

Os pólipos adenomatosos e consequente evolução para a neoplasia pode estar associado com excesso de gordura corporal. Um estudo inglês identificou um aumento no risco de 1,10% a cada 5 kg/m² de índice de massa corporal, para o câncer de cólon (BHASKARAN, K. et.al, 2014). Estudos também apontam maior risco para o desenvolvimento de CCR em indivíduos que consomem bebidas alcoólicas em excesso e para fumantes (JAYASEKARA, H. et.al., 2015).

Os principais comportamentos que podem influenciar na minimização do risco para o desenvolvimento do CCR envolvem o hábito de alimentação saudável, com destaque para frutas, verduras e fibras, pois seu papel nutricional inibidor da carcinogênese é de extrema importância, assim como por manter em funcionamento adequado o trânsito intestinal. A prática de atividade física pode contribuir na diminuição do risco de desenvolvimento deste câncer em até 50%, principalmente devido à manutenção do peso adequado (GARÓFOLO, A. et.al., 2004).

Mediante o conhecimento sobre os fatores de risco para o desenvolvimento de CCR, é possível estimar a probabilidade de risco para o desenvolvimento do câncer e determinar os

critérios para rastreamento. O risco é classificado como moderado, alto e muito alto, como elucidado na tabela 4 (FAIVRE, J. et.al., 2002).

Tabela 4. Classificação do risco de desenvolvimento de câncer colorretal.

CLASSIFICAÇÃO	CARACTERÍSTICAS	RISCO DE DESENVOLVER CÂNCER AO LONGO DA VIDA
Moderado	Assintomáticos; ambos os sexos; a partir de 50 anos.	4-6% em homens; 2,5-4% em mulheres.
Alto	Histórico familiar de primeiro grau com diagnóstico de câncer colorretal ou adenoma maior que 1 cm; histórico pessoal de ressecção de adenoma maior que 1 cm; múltiplos adenomas ou câncer colorretal; histórico de doença inflamatória crônica.	20-30%
Muito alto	Histórico familiar de câncer com características autossômicas dominantes ou outros tipos de transmissão hereditária.	40-100%

Fonte: Adaptado de: Faivre, Bouvier, Bonithon-Kopp e Calvert, Frucht.

3.5.FATORES PROGNÓSTICOS

3.5.1. CLASSIFICAÇÃO PELO SISTEMA DE ESTADIAMENTO TNM

Atualmente a classificação do estadiamento da doença no momento do diagnóstico segue sendo fator prognóstico mais importante. O estadiamento permite melhor definição da conduta terapêutica, estimativa mais apurada do prognóstico, avaliação da necessidade de tratamentos adjuvantes (MARANO, L. et.al. 2019). O sistema de classificação de estadiamento de tumores, linfonodos, metástases (TNM) da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) tem sido amplamente utilizado na pesquisa e na prática clínica (MARANO, L. et.al. 2019).

A avaliação prognóstica dos casos de câncer colorretal está baseada no estadiamento ou extensão da doença, além de características histológicas e moleculares. Seguindo a classificação de estadiamento da União Internacional de combate ao Câncer e do Comitê da Junta Americana do Câncer AJCC (PINHO, M.S.L., 2008). O sistema de classificação TNM utiliza três critérios para avaliar o estágio da doença: a extensão do tumor primário (T), a ausência ou presença e a extensão de metástases em linfonodos regionais (N), a ausência ou presença de metástases em tecidos distantes (M) e houve a adição de números a estes três critérios, o que indica a extensão da doença maligna. Assim tem-se T0, T1, T2, T3, T4, N0, N1, N2, N3, M0 e M1 (AJCC, 2002) como mostra a tabela 5. Esta classificação se torna

importante na tomada de decisões do tratamento e para predizer o prognóstico da doença, visto que a taxa de sobrevivência dos pacientes é dependente do estágio TNM (HOLCH, J. W. et al. 2016).

Tabela 5. Sistema de Classificação TNM.

T - Tumor primário onde se desenvolve	
Tx	Tumor primário não pode ser acessado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ: intraepitelial ou invasão da lamina própria*
T1	O tumor se desenvolveu através da mucosa até a submucosa.
T2	O tumor se desenvolveu através da submucosa até a muscular própria.
T3	O tumor se desenvolveu através da muscular própria até a camada mais externa do cólon (serosa).
T4a	O tumor se desenvolveu através da serosa, o revestimento externo dos intestinos.
T4b	O tumor cresceu através da parede do cólon ou reto ou invade os tecidos e órgãos.
N - Gânglios linfáticos acometidos	
N1	Acometimento de 1 a 3 gânglios linfáticos.
N1a	Acometimento de 1 gânglio linfático.
N1b	Acometimento de 2 ou 3 gânglios linfáticos.
N1c	Pequenos depósitos de células cancerosas em áreas de gordura dos gânglios.
N2	Acometimento de 4 ou mais gânglios.
N2a	Acometimento de 4 a 6 gânglios.
N2b	Acometimento de mais de 7 gânglios.
M - Órgãos acometidos por metástase	
M0	Ausência de metástase a distância.
M1a	A doença disseminada para 1 órgão ou conjunto linfonodos distintos.
M1b	A doença já disseminou para mais de 7 gânglios.

Fonte: 8ª Edição AJCC – 2017.

De acordo com a AJCC (2017), em uma proposta simplificada, o tratamento baseado no estágio (tabela 6) para doença inicial de adenocarcinoma colorretal segue o seguinte:

- Estadio I e Estadio II com MSI não são recomendados tratamento adjuvante.
- Estadio II de alto risco é, a depender de presença de fatores de risco adicionais, recomendado quimioterapia adjuvante a base de fluoropirimidina (leucovorin, capecitabina e pode ser considerada a adição de oxaliplatina ao esquema de fluoropirimidina).
- Estadio III é indicado quimioterapia adjuvante a base de fluoropirimidina adicionado à oxaliplatina (FOLFOX, CAPOX).
- Para os pacientes com doença não potencialmente ressecável recomenda-se quimioterapia com FOLFOX e FOLFIRI, podendo ser acrescentado anticorpo monoclonal (AJCC, 2017).

Tabela 6. Estadiamento de acordo com a AJCC 8ª edição.

Estádio	T	N	M
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
Estadio II A	T3	N0	M0
Estadio II B	T4a	N0	M0
Estadio II C	T4b	N0	M0
Estadio III A	T1-2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
Estadio III B	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
Estadio III C	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
Estadio IV A	Qualquer T	Qualquer N	M1a
Estadio IV B	Qualquer T	Qualquer N	M1b

Fonte: 8ª Edição AJCC – 2017

A figura 5 ilustra o desenvolvimento de um tumor de intestino nos diferentes estádios do T e camadas do epitélio que são invadidos com a evolução da doença.

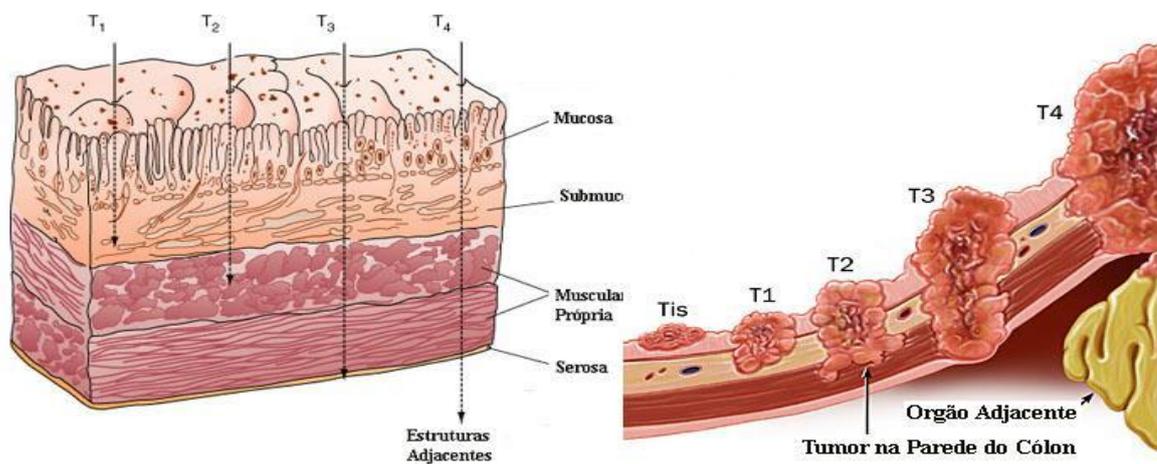


Figura 5. Diferentes estádios de evolução de um câncer de intestino. Os diferentes estadiamento para T (tumor) a partir do Tis a T4, mostrando as camadas que são invadidas com a evolução da doença. Acesso: <https://www.cancer.gov/search/results/13/08/2018>.

3.5.2. CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA

Estudos mostram que a maioria dos tumores colorretais origina-se de pólipos adenomatosos. Pólipos são neoplasias benignas do trato gastrointestinal que podem evoluir para malignização. O adenocarcinoma é o subtipo histopatológico mais comum, os outros tipos são neoplasias malignas raras, compreendendo de 2% a 5% dos tumores colorretais. Algumas características do tumor como arquitetura glandular, pleomorfismo celular e padrão da secreção de muco, categoriza a classificação em três graus de diferenciação: bem diferenciado (grau I), moderadamente diferenciado (grau II) e pouco diferenciado (grau III) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

3.5.3. CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR

Além das classificações de estadiamento e histológica, recentemente foi estabelecido um consenso molecular que define os subtipos de CCR classificando em quatro grupos (*consensus molecular subtype* CMS 1-4). Os CMS (1-4) apresentam características clínicas, moleculares e de vias de sinalização distintas, apresentando diferentes prognósticos. CMS 1 é observado em 14% dos casos de CCR, com maior frequência no cólon direito, mulheres e idosos. Os tumores apresentam instabilidade de microssatélites (MSI) e o gene *BRAF* mutado. Para CMS 2, 42% dos casos apresentam estabilidade de microssatélite (MSS), alta instabilidade cromossômica (CIN), mutação no gene *TP53* e ativação da via WNT/MYC. Encontrado com maior frequência no cólon esquerdo. CMS 3 observado em 8% dos casos nas doenças epiteliais, com heterogeneidade de MSI e CIN, apresenta mutação no gene *KRAS*. CMS 4 é encontrado em 20% dos casos, sendo observado nas doenças mesenquimais, possui MSI e CIN, com mutação em TGF-beta e no gene *VEGF* (LOREE, J. M. et.al., 2018).

3.6. MARCADORES PREDITIVOS E PROGNÓSTICOS

Os biomarcadores se tornaram fundamentais no diagnóstico molecular, bem como para a definição do tratamento do CCR, viabilizando a medicina personalizada no CCR (ALBERTS, B. et.al., 2004). As informações genéticas das células tumorais, os biomarcadores, podem torná-los marcador em potencial para o sistema imunológico fazer o reconhecimento de células anormais e destruir o tumor (HONGJUAN, H. et. al. 2019).

Evidências recentes demonstram significativa heterogeneidade molecular do CCR (HONGJUAN, H. et. al. 2019). Com a evolução da medicina molecular, a avaliação da expressão gênica de marcadores específicos em tumores do CCR tornou-se parte importante para ensaios clínicos e pesquisas (Kielar M., et al., 2019). No entanto, a utilização de alguns

desses marcadores na prática clínica ainda necessita de evidências científicas mais robustas. Isto porque esta é uma área que ainda carece de estudos e interação, buscando compreender melhor a relação entre estes marcadores e a progressão das lesões, padronizando a utilização dos mesmos. Esta padronização é ainda mais importante quando se refere a possíveis marcadores preditivos e marcadores terapêuticos, podendo tornar o tratamento personalizado e possivelmente mais eficiente e com menos efeitos colaterais (COTTI, G.C.C. et.al., 2000).

Os marcadores genéticos mais comuns relatados para CCR são a via de instabilidade cromossômica (CIN), caracterizado pelo acúmulo de mutações em genes específicos como *APC*, *KRAS*, *BRAF*, *TP53* sendo responsável por 65-70% dos casos de CCR. Além disso, outro marcador para CCR é a MSI responsável por cerca de 15% dos casos (HAUPTMAN, N. et al. 2019).

O *polipose adenomatosa coli (APC)* é um gene supressor tumoral identificado também na polipose adenomatosa familiar (PAF). O *APC* mutado é uma alteração epigenética responsável também por maior parte dos casos de CCR esporádicos, no qual 70% a 80% apresentam esta mutação. O *APC* regula várias atividades celulares, sendo estas: migração, adesão, ativação transcricional e apoptose. Foi observado que não há associação entre a metilação do promotor *APC* e a sobrevida global de pacientes com CCR. Diferentes autores entendem que o *APC* hipermetilado apresenta-se como um importante biomarcador no diagnóstico precoce de CCR, assim como um possível marcador de tratamento, sendo personalizada e direcionada a mutação envolvida (VACANTE, M. et al. 2019).

O oncogene *KRAS (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog)* codifica pequenas proteínas (21 kDa) que se ligam à guanina trifosfato (GTP). As proteínas RAS, também chamadas de p21, estão localizadas na membrana celular (PARREIRAS FC., et al., 2013). Essas proteínas regulam o crescimento e diferenciação celular, sendo transdutores de enzimas hidrolases que se ligam e hidrolisam o GTP (GTPase). A proteína *KRAS* selvagem (WT) é ativada temporariamente no momento da transdução de sinal. Mutações no gene *KRAS* leva à ativação contínua da via de transdução de sinal e como resultado, ocorre a transformação e ineficácia da terapia com anticorpos anti-EGFR. Estudos mostraram que a mutação do *KRAS* direciona para terapia com anti-EGFR, desta forma atuando como marcador preditivo negativo, já que para paciente com CCR com *KRAS*-WT, a terapia com anti-EGFR melhorou significativamente a sobrevivência global e sobrevida livre de progressão (HONGJUAN, H. et. al. 2019). Outro estudo mostrou que pacientes com *KRAS*-WT apresentam melhor resposta ao tratamento quando foi adicionado o cetuximabe, comparando aos pacientes que não receberam este medicamento. Já os pacientes com *KRAS* mutado

obtiveram resultados semelhantes com tratamento utilizando FOLFOX isolado ou combinado com cetuximabe. Nesse sentido, o status *KRAS* mutado pode ser considerado como preditor no direcionamento para a estratégias de tratamento mais apropriado (PARREIRAS FC., et al., 2013).

O oncogene *BRAF* é um gene que codifica a proteína *BRAF* (conhecida também como serina-treonina-quinase), que é um regulador da via MAPK e está relacionada ao crescimento celular, representando um biomarcador prognóstico e um possível marcador para terapias em pacientes com CCR. As mutações mais frequentes do gene *BRAF* para o CCR ocorrem no códon 600 (LOREE, J. M. et.al., 2018). Quando ocorre conversão de valina 600 em ácido glutâmico (V600E) gera mutações no gene *BRAF* no CCR e cerca de 5 a 9 em cada 100 pessoas com CCR têm essa mutação (NCCN, 2018). Existem evidências de que a progressão e desenvolvimento do câncer são eventos que ocorrem quando há mutações *KRAS* e *BRAF*. Mutação no gene *BRAF* pode levar ao crescimento de células cancerígenas e facilitar que se espalhem mais rapidamente podendo ser encontrada nas metástases (NCCN, 2018). Além disso, o *BRAF* com mutação possui uma maior prevalência em mulheres e em pacientes idosos acima de 70 anos, localizados principalmente no colón direito, podendo afetar qualquer outra parte do cólon e reto (LOREE, J. M. et.al., 2018). Recomenda-se testar esta mutação em pacientes com estágio IV para melhor direcionar o tratamento (NCCN, 2018).

O gene supressor tumoral *P53* ou *TP53* (*tumor protein p53*), localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13), codifica uma proteína citoplasmática que regula o ciclo celular, apoptose, senescência e reparo do DNA, atuando como um supressor tumoral. A *TP53* possui um papel fundamental na conservação da estabilidade, impedindo a mutação do genoma (HAUPTMAN, N. et al. 2019). As mutações no *TP53* são observadas em aproximadamente 60% dos tumores colorretais e levam a inativação do gene podendo levar a transição de adenoma para carcinoma CCR. Desta forma, a identificação desta mutação representa um marcador preditivo em pacientes com CCR e mostra pior prognóstico com curta sobrevida (PARREIRAS FC., et al., 2013).

Os microssatélites são curtas repetições em série de sequências de DNA presentes em todo o genoma humano. A MSI é causada por uma deficiência do sistema de reparo de incompatibilidade do DNA (MMR), especialmente pela inativação de um dos quatro genes MMR (*MSH2*, *MLH1*, *MSH6* e *PMS2*) que leva a uma falha na correção da inserção ou exclusão da repetição durante a replicação do DNA. A MSI é observada em aproximadamente 15% de todos os CCR. O CCR que apresenta instabilidade de microssatélite é mucinoso, com pobre diferenciação celular e forte infiltração linfocitária, ocorrendo com maior frequência no

cólon direito. De forma surpreendente os pacientes com CCR que apresentam MSI tem um melhor prognóstico comparado a pacientes sem MSI. O MSI pode ser considerado um potencial marcador prognóstico para pacientes com CCR. O MSI mostra-se como um potencial marcador para testes de MSI, assim como no direcionamento de escolhas terapêuticas adjuvantes (LOPEZ, G. et.al. 2018).

3.6.1 TETRASPANINA CO029

As tetraspaninas fazem parte de uma superfamília de proteínas, sendo a maioria de seus membros proteínas da superfície celular, que contém quatro domínios transmembranas, sendo uma pequena alça externa nomeada EC1, uma alça externa maior EC2, com resíduos de 4 a 6 cisteínas conservados no grande *loop* extracelular, uma pequena alça interna IL e caudas citoplasmáticas de menor tamanho que são expressas em muitas espécies (figura 6). Possui ainda resíduos polares dentro dos domínios transmembranares. Estas proteínas são expressas na membrana plasmática como também na membrana intracelular (JUN, L. et.al., 2017).



Figura 6. Estrutura 2D da TspanCO029. Estruturas Alça EC1, Alça EC2, Alça IL, grande loop, caudas citoplasmáticas e 4 domínios transmembrana. Programa PSI The Protein Model Portal. Acesso: https://www.proteinmodelportal.org/?pid=modelDetail&provider=SWISSMODEL&template=5tcxA&pmpuid=1001215393494&range_from=1&range_to=237&ref_ac=P19075&mapped_ac=P19075&zid=async.&https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P19075.

São encontradas aproximadamente 33 proteínas diferentes na família das tetraspaninas em células de mamíferos, com diversas funções. As tetraspaninas possuem papel fundamental na movimentação celular, fertilização de mamíferos, na regulação da motilidade e morfologia celular, fusão, sinalização e organização de outras proteínas em uma rede de microdomínios multimoleculares e, provavelmente, contribuem para a montagem de complexos de tetraspaninas ainda maiores, se organizando lateralmente, umas com as outras ou com outras proteínas de membrana, como as integrinas, para se tornarem resistentes à solubilização por detergentes não iônicos (MALOU, Z. et.al., 2017).

Dentro desta família de proteínas, a TspanCO029 vem sendo considerada como um potencial biomarcador tumoral, por exercer uma função pró-invasiva, controlando as interações célula-célula e célula-matriz por meio de sua associação com outras proteínas como a E-caderina (AGAËSSE, G. et. al. 2017). Esta proteína é codificada pelo gene TSPAN8 localizado no cromossomo 12 (localização cromossômica: 12q21.1) (figura 7). Possui 714 nucleotídeos totalizando 237 aminoácidos, com tamanho em Daltons de aproximadamente 26.043,85 – kD26 (NCBI, 2017).

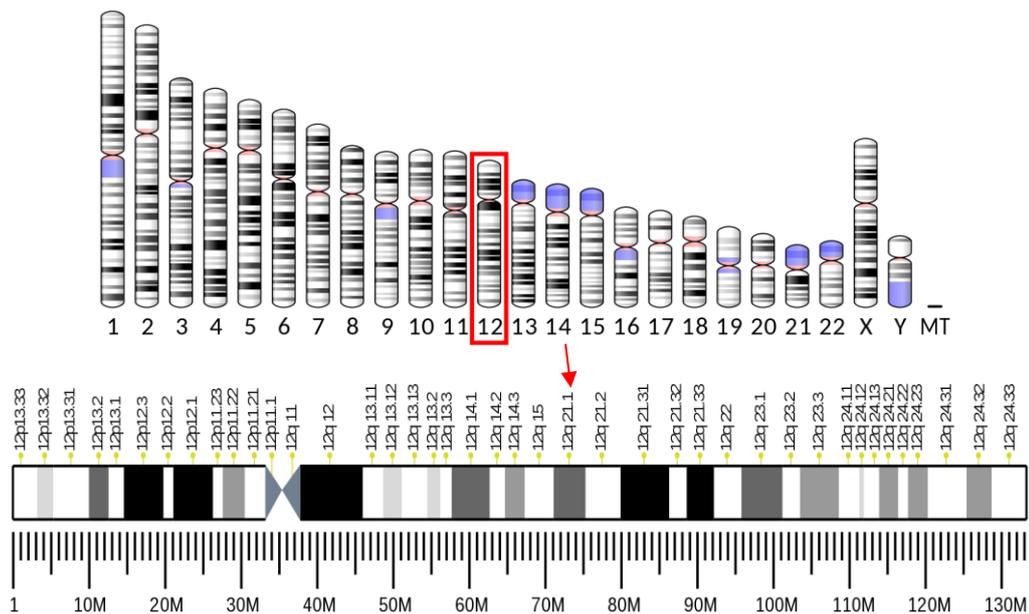


Figura 7. Representação do locus gênico de TSPAN8, gene que codifica a proteína TspanCO029 (NCBI, 2017).

Entre as proteínas da família de tetraspaninas, a TspanCO029 é expressa em poucos tecidos, tais como epitélios do cólon e do estômago. Entretanto, um estudo identificou a expressão de TspanCO029 em diferentes tumores incluindo os do cólon, fígado, próstata, ovário e em câncer cervical (SI-JIAN, P. et.al., 2015). A proteína TspanCO029 em tecidos

normais e em homeostase é expressa de forma equilibrada. Porém, pode apresentar superexpressão em carcinomas humanos, incluindo no CCR, onde desempenha um papel na progressão tumoral (SI-JIAN, P. et.al., 2015).

A TspanCO029 regula uma variedade de processos fisiológicos e patológicos. Esta proteína possui uma função pro-migratória no câncer epitelial de interação e cooperação com o complexo de membrana E-caderina/p120-catenina, estimulando a mobilidade celular. E-Caderina é uma proteína expressa em tecidos epiteliais e a catenina é expressa na porção intracelular. E-caderina comunica com a catenina que são ligadas ao citoesqueleto de actina, sendo responsáveis pela junção estável entre as células epiteliais. A TspanCO029 medeia a perda de conexões intercelulares entre células epiteliais malignas, importantes no desenvolvimento da metástase e apresenta um pior prognóstico quando superexpressa (MANALE, E.L.K. et al., 2017). Contribui para os processos de tumorigênese, influencia no crescimento do tumor, na invasão celular, intensifica a metástase, demonstrando ser um potencial marcador para CCR (HONG, X.W.et.al., 2011).

Alterações na expressão da TspanCO029 estão associadas à progressão e metástase de cânceres no sistema digestivo (GUO, Q. et.al., 2012). No entanto, ainda é pouco conhecido a relação de promover a metástase do câncer. A TspanCO029 funciona como um regulador da adesão da célula-matriz e célula-célula. Durante a progressão do câncer de cólon, esta proteína promove o movimento de células cancerígenas desregulando as aderências celulares (GUO, Q. et.al., 2012).

3.6.2. TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL

O tecido epitelial é caracterizado pela presença de células justapostas, com pouca matriz extracelular. Este tecido está conectado ao tecido conjuntivo, o que permite exercer diferentes funções como o revestimento de superfícies, absorção de moléculas, secreção, percepção de estímulos e contração (JUNQUEIRA, C., 2009).

Em 1982, foi identificada pela primeira vez a transição epitélio-mesenquimal (*epithelial-mesenchymal transition* - EMT). A transição epitélio-mesenquimal é um processo no qual as células epiteliais perdem as suas características e adquirem propriedades de célula mesenquimal (GREENBURG, H., 1982). Na fisiologia este processo ocorre na embriogênese e cicatrização de feridas, e já foi descrito em processos patológicos como em neoplasias. Nas neoplasias, está mais relacionado aos cânceres epiteliais. As células sofrem um processo de aquisição de características das células do mesenquima, permitindo a migração, invasão e

metástases, assim como, perda da adesão célula-célula e de polaridade, aquisição de motilidade e invasividade (LI and LI, 2015).

EMT provavelmente é sustentada por modificações moleculares transitórias induzidas por fatores do microambiente tumoral, como hipóxia por exemplo (LI and LI, 2015). Cannito e colaboradores (2008) demonstraram que linhagens celulares de carcinoma de colón, submetidas a condições de hipóxia, sofrem modificações clássicas da EMT, tais como fenótipo mesenquimal com translocação nuclear de β -catenina e aumento das características de motilidade e invasividade (CANNITO, S., 2008).

A adesão entre as células epiteliais é fundamental para a manutenção do equilíbrio do tecido (HUANG, P. H. et al., 2016). O epitélio apresenta distribuição organizada de caderinas e algumas integrinas (LI, L. W., 2015). Já as células mesenquimais (células do tecido conjuntivo), possuem um aspecto fusiforme e fibroblastos que é uma célula prototípica, com distribuição de Vimentina (ALBERTS, B. et.al., 2004). O processo de transição permite que ocorram modificações bioquímicas, moleculares e morfológicas (LIU, J.; et al., 2012), como redução ou ausência de marcadores epiteliais como E-caderina, uma glicoproteína de membrana de função crucial na adesão célula-célula, homeostasia do epitélio e na arquitetura celular normal, β -catenina, além da aquisição de marcadores mesenquimais como N-caderina e Vimentina, proteína responsável pela manutenção da forma celular, integridade do citoplasma e estabilização das interações do citoesqueleto (ABELL, A. N., 2014). Um estudo identificou que o aumento da expressão de Vimentina está significativamente associado ao mau prognóstico em CCR (MELLING, N. et. al. 2016). Neste sentido, este é um processo importante para diagnósticos de neoplasias.

A proteína E-caderina localiza-se entre as junções intercelulares, na superfície celular, através de sua interação com a catenina p120. Sua principal função é conferir adesão entre as células epiteliais e com a matriz celular (ASHAIE, M.A. et.al., 2016). A expressão anormal de E-caderina pode levar a perda de adesão célula-célula, ativação de marcadores mesenquimais e indução de motilidade celular (KARRAY, C.S. et.al., 2012). A E-caderina é considerada um marcador de EMT e está associada a invasão tumoral (ASHAIE M.A. et.al., 2016). Neste sentido, a diminuição da expressão da E-caderina auxilia o processo de EMT observado em muitas neoplasias (KARRAY, C.S. et.al., 2012). Um estudo identificou níveis reduzidos de E-caderina em casos de câncer de mama triplo-negativo (CMTN), com metástases em linfonodos. Entre os CMTN, o prognóstico das pacientes com reduzida expressão E-caderina, foi significativamente pior comparado aos das com maior expressão

(KASHIWAGI, S. et.al., 2010). O estadiamento em alguns tipos de câncer tende a ser menor, quando associados à expressão positiva da E-caderina (KARRAY, C.S. et.al., 2012).

A Vimentina é o marcador mesenquimal mais comum associado à EMT. Diferentes tipos celulares apresentam Vimentina, como os fibroblastos, linfócitos, células endoteliais, neutrófilos e macrófagos (EVANS, R.M., 1998). O citoesqueleto é remodelado, após perda da polaridade celular, resultando em mudança do filamento intermediário de citoqueratina para Vimentina, a qual se torna um importante marcador (THOMPSON, E.W., et al. 2005). A menor expressão de marcadores epiteliais como E-caderina e o aumento da expressão de marcadores mesenquimais como a Vimentina está relacionado à maior migração e invasividade das células neoplásicas, como é esperado no processo de EMT (GILLES, C. et al. 2003).

3.6.3. Ki67

Ki67 é uma proteína nuclear, marcador celular para proliferação (CUYLEN S, et al., 2016). Em 1983, Gerdes et al, demonstraram a expressão desta proteína nuclear em células na fase G1, S, G2 e M do ciclo celular e ausente em células quiescentes, na fase G0 (GERDES, J. et.al., 1983).

No início da fase G1, ela é identificada no nucleoplasma, com a progressão da fase G1, sua expressão diminui no nucleoplasma passando a ser identificada no nucléolo. Já na fase S, permanece restrita ao nucléolo, podendo também ser observada no nucleoplasma na fase G2. Na fase inicial da mitose – prófase – o nucléolo desaparece e o Ki67 reorganiza-se, passando a ser identificada associada à cromatina condensada. Durante a metáfase ela recobre os cromossomos e permanece unida à cromatina condensada durante a anáfase. Na telófase volta a ser expressa no nucléolo. A proteína Ki67 pode também ser expressa difusamente no citoplasma, quando ocorre a ruptura da membrana nuclear (GERDES, J. et.al., 1983). O Ki67 é um marcador bem conhecido para a avaliação da proliferação celular (YANG, C. et. al. 2018). Diferentes estudos indicam que o índice de expressão de Ki67 prevê independentemente a progressão do câncer incluindo o CCR, porém não é utilizado como preditor de prognóstico ou terapias quando avaliado sozinho, pois não indica um estágio preciso ou marcador de tratamento (MELLING, N. et. al. 2016). Porém, o Ki67 tem sido utilizado como um índice importante na avaliação do prognóstico do câncer de mama (YI, LI., et.al., 2019). O 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. Ademais, o Ki67 é altamente expresso em células malignas, em

contrapartida pouco detectada em células normais (YANG, C. et. al. 2018) e sendo avaliado dentro de um painel de biomarcadores pode tornar-se um marcador importante para o diagnóstico e terapias.

3.7. LATERALIDADE EM CÂNCER COLORRETAL

Constituindo a porção terminal do canal alimentar, o intestino grosso estende do íleo terminal até o ânus. Sua função é formar as fezes e expulsá-las, além de absorver água e sais minerais. Apresenta cerca de um metro e meio de comprimento com vários segmentos: ceco, cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente, cólon sigmoide, reto e ânus (GUYTON, 2011). Anatomicamente, é considerado colón direito a partir do ceco até a flexura esplênica, envolvendo também o colón transverso. Já o colón esquerdo inicia-se no ângulo esplênico e termina no sigmoide, excluindo o reto, como mostra a figura 8 (MEGUID, R.A., et.al., 2008).

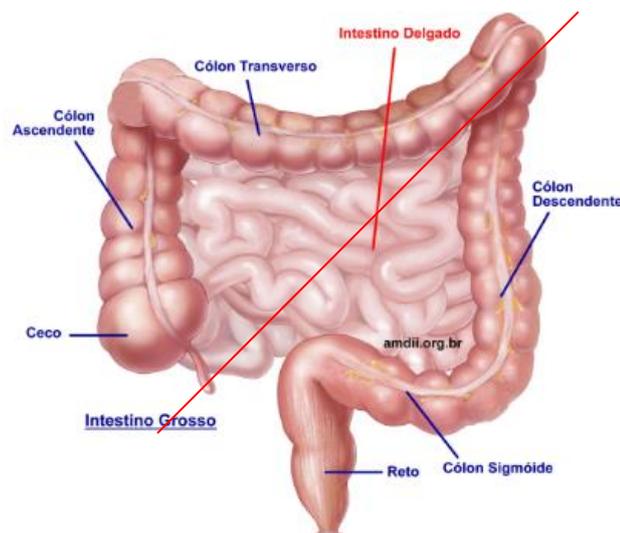


Figura 8. Desenho ilustrativo do Intestino grosso. Acesso: <https://site.medicina.ufmg.br/inicial/constipacao-intestinal-e-a-relacao-com-fatores-comportamentais/25/07>. Adaptado pelo autor.

Este órgão pode se tornar marcador de doenças vasculares, infecciosas, inflamatórias e neoplásicas que levam à perda de homeostase do organismo. O CCR é um dos tipos de câncer mais comuns, sendo este em sua maioria derivados da proliferação epitelial do revestimento e glandular da camada mucosa (BRASILEIRO, F.G, 2017).

Bufill *et al.* descreveu pela primeira vez em 1990 as diferenças clínicas na incidência e no resultado do CCR, dependendo do local anatômico do tumor primário. Estudos têm demonstrado a importância do conceito de lateralidade de cólon como fator prognóstico e

preditivo. Evidências demonstram que tumores do colón direito se diferem significativamente do colón esquerdo, no comportamento histológico e molecular (MEGUID, R.A. et.al., 2008).

Muitos são os elementos ligados a essas diferenças na lateralidade e foi observado que os cólons direito e esquerdo possuem o fornecimento vascular sanguíneo diferente, onde a circulação sanguínea do colón direito acontece através da artéria mesentérica superior e o colón esquerdo pela artéria mesentérica inferior (HONG, S. et.al., 2015). Além disso, a expressão de diferentes antígenos, poliaminas, a produção de ácido butírico, o metabolismo da glicose, as concentrações de ácido biliar, composição e densidade da população bacteriana são diferentes para os cólons direito e esquerdo (OLEG K, G., et al., 2003).

Porém, o principal pilar teórico que tenta explicar as diferenças encontradas na lateralidade dos cólons, está relacionado à ontogênese. Na formação embriológica, o intestino tem diferenciação regional em três segmentos distintos. São eles o intestino anterior, que dará origem ao esôfago, estômago, duodeno, fígado, pâncreas e aparelho biliar; o intestino médio, responsável pela formação do jejuno-íleo, ceco, colón ascendente e a maior parte do colón transversal; e intestino posterior, que compõe o restante do colón transversal, o colón descendente, sigmoide, reto e porção alta do canal anal. Desta forma, com base na embriologia, o intestino médio dá origem ao colón direito, ao passo que o colón esquerdo deriva do intestino posterior (MASASHI, Y. et.al., 2016). Cada uma dessas estruturas possui seu microambiente genético próprio, o que os torna fenotipicamente diferentes (MEGUID, R.A. et al., 2008).

Há algumas décadas, o aparecimento da lesão primária predominava no colón esquerdo com maior frequência no sigmoide. Comparando as incidências de câncer do colón direito (22%), com o colón sigmoide (45%), já se observava uma significativa diferença. Quando se comparava todo colón direito com o esquerdo (62%), o percentual era ainda mais significativo. Considerando todo o intestino grosso, as lesões predominantes estão no colón sigmoide e reto. A lesão situada no ceco representa pouco mais que 4% (SANTOS JR JCM, 2008).

A lateralidade do CCR distingue-se tanto sob o ponto de vista histológico quanto molecular e atualmente tem valor prognóstico no CCR (LOREE, J. M. et.al., 2018).

As principais implicações clínicas da lateralidade do tumor primário são que os tumores do colón direito têm um pior prognóstico, pior sobrevida global e são menos sensíveis à terapia anti-EGFR (MONDACA, S. 2018). À direita, observam-se lesões mais avançadas ao diagnóstico. As neoplasias direitas apresentam em 30% dos casos MSI (figura 8), resultantes de inativações genéticas e epigenéticas de enzimas reparadoras do DNA (LIN, Y. et.al., 2017). Apresenta mais frequentemente fenótipos indiferenciados, mucinosos e cariótipos pseudo-

diploides. Possuem também um maior número de mutações nas vias de sinalização intracelular relacionadas aos genes do *RAS*, *RAF* e *PIK3CA* e exibem uma associação com o subtipo Molecular *Consensus-1* (CMS-1) em tumores do lado direito (LOREE, J. M. et.al., 2018). Estudos mostraram que o perfil dos pacientes com câncer de cólon direito são pessoas mais velhas, sendo mais incidente no sexo feminino, e com lesões mais avançadas no diagnóstico (SUMANA, N. et al., 2018). Outra característica das pessoas que apresentam câncer no cólon direito é a tendência a ter maior anemia por deficiência de ferro, perfuração intestinal, tipo de histologia mucinosa, maior nível de antígeno carcino-embriônico (CEA) (LIN, Y.et.al., 2017).

Em contrapartida, os cânceres do colón esquerdo são mais uniformes aneplóides com perda significativa de heterozigosidade e cromossomos rearranjados. Exibem alterações cromossômicas mais relevantes e maior associação de ativação do EGFR como inicializador proliferativo tumoral e apenas 2% dos tumores malignos no cólon esquerdo apresenta MSI e há uma associação com o subtipo Molecular *Consensus-2* (CMS-2). As lesões no cólon esquerdo tendem a serem infiltrantes, restritivas, circundando o lúmen colorretal e causando obstrução (DAE, R.L. et.al., 2017). Ademais, demonstram melhor resposta ao tratamento, menor risco de eventos metastáticos e maiores chances de sobrevida do paciente. (SUMANA, N. et al., 2018).

Estudos têm demonstrado que inibidores EGFR em tumores do cólon esquerdo apresentam benefício em pacientes *RAS* WT, porém em tumores do cólon direito parece haver mínimo ou nenhum benefício com cetuximabe ou panitumumabe na doença metastática. A melhor evidência foi o estudo fase III CALGB/SWOG 80405 que usou esta terapia anti-EGFR na primeira linha de tratamento associada a quimioterapia (FOLFIRI ou FOLFOX) e demonstrou que a sobrevida global foi significativamente maior em cólon esquerdo com uso de cetuximabe x bevacizumabe (39,3 x 32,6 meses) e em cólon direito com o uso do bevacizumabe x cetuximabe (29,2 x 13,6 meses) (FEDERICA M. et. al. 2019).

Possivelmente há distribuição genômica ordenada por lateralidade de cólon que necessita maior compreensão. Até esta definição, pacientes com CCR à direita *RAS* WT poderiam receber terapia anti EGFR em linhas subsequentes de terapia caso não tenha sido empregada previamente (FEDERICA M. et. al. 2019).

A despeito de tudo isso, até então, a lateralidade do tumor primário jamais havia sido empregada como separador de subgrupos em ensaios clínicos. Além de possuir relevância prognóstica, diversos estudos retrospectivos apontam para a localização tumoral também como preditiva de resposta a terapias direcionadas com fármacos anti-EGFR e anti-*VEGF*

(SEBASTIAN, M. et al., 2018). Além disso, é importante dar atenção para os rastreamentos de lesões, em toda a extensão do intestino grosso, devido à perda de lesões localizadas no cólon direito, onde vem apresentando um notável aumento (SANTOS JR JCM., 2008).

4. METODOLOGIA

4.1. ASPECTOS ÉTICOS

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob o número 34778, emenda 2015 número 1.030.401. O projeto encontra-se registrado na plataforma Brasil, CAAE – 02177612.0.0000.5149. Igualmente aprovado pelo Comitê de Ética de uso Animal (CEUA) Fiocruz, sob a identificação LM1/18. As amostras do Banco de Tumores e Tecidos do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas/UFMG foram cedidas pela autorização TTMB0002/2019.

4.2. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS PARAFINADAS E CONGELADAS

Este estudo é retrospectivo de casos de adenocarcinoma colorretal humano.

As amostras parafinadas foram selecionadas a partir dos prontuários armazenados no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG pela análise dos protocolos anatomopatológicos, no período entre 2016 a 2018, que foram revisados, avaliados e aprovados por uma especialista patologista (Dra. Mônica Demas Álvaro Cabral), colaboradora do projeto.

As amostras congeladas armazenadas a -80°C foram selecionadas a partir dos prontuários armazenados no Banco de Tumores e Tecidos do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas/UFMG, (Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho responsável pelo Banco de Tumores e Tecidos), pela análise dos protocolos anatomopatológicos, no período entre 2011 a 2016.

O tamanho amostral de pelo menos 17 amostras em cada um dos dois grupos (cólon direito e cólon esquerdo), representa 80% de poder estatístico com 1 desvio padrão para inferir sobre diferenças das médias da expressão gênica dos marcadores TspanCO029, E-caderina, Vimentina e Ki67. Esse valor corresponde a um tamanho de efeito igual a 1. O teste utilizado no cálculo amostral foi o teste t-student bilateral a um nível de significância de 0,05. O software utilizado no cálculo foi o G Power 3.0.10.

O trabalho compreende observação da localização do adenocarcinoma, estadiamento pela classificação do Sistema TNM 8ª edição AJCC, sexo, idade, histórico familiar e metástase em linfonodos.

Os critérios de inclusão de amostras de pacientes no estudo foram: informações clínicas disponíveis no protocolo arquivado pelos departamentos, aprovação do especialista em

patologia e amostra suficiente arquivada nos departamentos. Casos com informações ausentes ou incompletas ou com falta absoluta de material e os casos de polipose familiar, foram excluídos.

4.3. EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR

4.3.1. DESENHO DOS INICIADORES

Foram utilizados pares de iniciadores (*primers*) específicos para a amplificação de éxons de tetraspanina CO029, EMT (E-caderina e Vimentina), Ki67 e controles endógenos (normalizador) β -actina e GAPDH, sendo todos analisados no *software* Blast para verificar a similaridade com os genes de interesse. Os iniciadores foram desenhados utilizando o programa *Primer3* v.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) e *software* *IDT Integrated DNA Technologies*, e estão listados na tabela 7, com as respectivas informações de referência do NCBI para cada gene utilizado, tamanho do Amplicon, porcentagem de citosina (C) e guanina (G) e temperaturas de anelamento (TM).

Tabela 7. Iniciadores usados na PCR convencional e qPCR.

MARCADOR	REFERÊNCIA NCBI	INICIADORES	AMPLICON (pb)	%CG	TM
Tetraspanina Co029	NM_004616.2	Sense: GGGTACGAGTAAGCAATGAC AntiSense: GGCACCTACAGCAATCAA	96	50%	53
Ki-67	NM_002417.4	Sense: CACGGATGAATGGAGCTTAC AntiSense: CCTGTGCAGATGTCCAATAG	88	50%	53
E-caderina	NM_004360.4	Sense: CCCTTCACAGCAGAACTAAC AntiSense: CACCTCTAAGGCCATCTTTG	108	50%	53
Vimentina	NM_003380.4	Sense: TCACTCCCTCTGGTTGATAC AntiSense: GTCATCGTGATGCTGAGAAG	105	50%	53
GAPDH	NM_001289745.2	Sense: TGGGTGTGAACCATGAGA AntiSense: GTCCTTCCACGATACCAAAG	123	50%	53
β -actina (ACTB)	NM_001101.4	Sense: CTCCAGCAGATGTGGATCA AntiSense: CACCTTCACCGTTCCAGTTT	239	50%	53

4.3.2. VALIDAÇÃO DOS INICIADORES

Os iniciadores (tabela 7) foram empregados para amplificação dos marcadores por reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional, utilizando o DNA complementar (cDNA) de célula em cultura de adenocarcinoma humano da linhagem HT29 (Banco de células do Rio de Janeiro). Os reagentes para a PCR foram constituídos de 16,4 μ l de água RNase *free*, 2,5 μ l de tampão da enzima, 2,5 μ l de magnésio ($MgCl_2$ 100 μ M), 0,5 μ l de dNTP (10 μ M), 1 μ l de cada iniciador (10 μ M), 0,1 μ l de Taq DNA polimerase 5U/ul (Invitrogen), 2

µl de cDNA (100ng) marcador da célula HT29. As condições de amplificação utilizadas foram 94°C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos de desnaturação, 60°C por 30 segundos para anelamento e 72°C por 1 minuto de extensão, seguidos da extensão final de 72°C por 10 minutos. 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 uma hora e trinta minutos. Como padrão de peso molecular, foi utilizado o marcador “1Kda DNA Ladder” (Promega). O gel foi visualizado através de incidência de luz ultravioleta em um transiluminador (Syngene) e foto documentado através da câmera do próprio equipamento.

4.3.3. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

4.3.3.1. AMOSTRAS PARAFINADAS

Para obtenção do RNA total das amostras parafinadas previamente selecionadas, foi realizada a extração a partir de 8 cortes de 10 milímetros do bloco e foi colocada em microtubo de 1,5ml. Para extração foi utilizado o kit PureLink™ FFPE *Total RNA Isolation Kit* (Invitrogen) seguindo suas instruções. Onde foram adicionados 300 µl de tampão de fusão ao tubo, com incubação de 10 minutos a 72° C com inversão do tubo para derreter a parafina. Foram adicionados 20 µl de proteinase K e uma incubação a 60° C por 60 minutos com agitação ocasional. Após 60 minutos, o material foi centrifugado a 12.000g por 5 minutos e todo o material que ficou abaixo da parafina foi transferido para um tubo limpo. Foi realizada a etapa de purificação adicionando 400 µl de tampão de ligação (L3) e 800 µl de etanol a 100% a amostra. Todo material foi passado na coluna de purificação. Realizou-se a lavagem com 500 µl de tampão de lavagem (W5) com etanol e transferido para coluna para centrifugação. Após a lavagem realizou-se a Eluição adicionando 50 µl de água livre de RNase aquecida a 65°C no centro da coluna, após a centrifugação o RNA total foi armazenado em -80°C para posterior síntese do cDNA. Seis amostras foram selecionadas aleatoriamente e foram submetidas à análise do kit Bioanalyzer *High Sensitivity RNA Analysis* (Agilent Technologies) para avaliar a integridade do RNA extraído, seguindo as especificações do fabricante e em parceria com a Plataforma de Sequenciamento de DNA – BH - RPT01E / IRR/FIOCRUZ-MG.

4.3.3.2. AMOSTRAS CONGELADAS

Para obtenção do RNA total das amostras congeladas, foi realizada a extração e purificação a partir das amostras de adenocarcinoma CCR armazenadas a -80°C , anteriormente selecionadas, pelo emprego do reagente Tryzol (Thermo Fisher), seguindo o manual do fabricante com adaptações a seguir: fragmento de tecido tumoral e não acometido de aproximadamente 0,5cm foi macerado em nitrogênio líquido até todo tecido virar pó, que foi ressuspensionado em 5 ml de Tryzol, homogeneizado utilizando sonicador ajustado para 2 ciclos de 10 segundos (2 x de 10 segundos e 1 minuto de descanso no gelo a cada intervalo) com 40% de intensidade das vibrações, com a finalidade de romper as células da suspensão. O material foi incubado por 20 minutos a temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio para cada ml de Tryzol (20% de clorofórmio). A mistura foi homogeneizada vigorosamente no vortex por 10 segundos e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente (TA). Foi realizada centrifugação à 4°C – 12.000 g por 10 minutos, sendo transferida a fase aquosa para novo tubo. O RNA foi precipitado por adição de igual volume de isopropanol gelado, seguida de homogeneização suave por inversão do tubo três vezes. Incubar à -20°C por 1 hora e centrifugar à 12.000g à 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão do tubo e foi retirado todo líquido da borda do tubo com lenço de papel, o tubo ficou invertido dentro da capela de fluxo laminar por 10 minutos em cima do papel toalha. O precipitado foi lavado 2 vezes o precipitado com 500 μL de etanol 75% gelado, preparado com H_2O RNase free, adicionado cuidadosamente, sem ressuspender o *pellet*, e centrifugado 4°C – 12.000g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão e o tubo ficou por 10 minutos no fluxo a TA para secagem completa do *pellet*. O precipitado foi ressuspensionado com 100 μl de H_2O RNase free. O tubo ficou no terциclador a 50°C por 30 minutos.

O RNA isolado foi purificado seguindo o protocolo do kit Purificação do RNA total (*Cleanup*) com sistema RNeasy (Invitrogen). Ao final, foram separadas duas alíquotas de 5 μl , uma para quantificação e análise prévia de pureza em *NanoDrop 2000*[®] UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific[®]) e outra para análise da qualidade do RNA extraído, por observação da integridade do rRNA em 2100 Bioanalyser[®] Agilent Technologies. Uma alíquota de 1 μl também foi separada para dosagem em sistema Quibit, de maior precisão por empregar fluorescência. O material foi armazenado a -80°C até uso posterior. Seis amostras (parafinadas e congeladas) foram submetidas à análise do kit Bioanalyzer High Sensitivity RNA Analysis (Agilent Technologies) para avaliar a integridade do RNA extraído, seguindo

as especificações do fabricante e em parceria com a Plataforma de Sequenciamento de DNA – BH - RPT01E / IRR/FIOCRUZ-MG.

4.3.3.3. SÍNTESE DO cDNA DAS AMOSTRAS PARAFINADAS E CONGELADAS

A síntese do cDNA foi realizada com o kit *High Capacity cDNA Reverse Trascription* (Applied Biosystems™), seguindo as especificações do fabricante, onde foram adicionados em um microtubo 2 µl de tampão da enzima, 0,8 µl dNTP Mix, 2 µl RT *Randon* iniciadores, 1 µl enzima Transcriptase reversa, 4,2 µl H₂O Nuclease *free* e 10 µl de RNA com volume final de 20 µl. As condições do ciclo utilizadas foram 1 ciclo de 25°C por 10 minutos, seguido de 1 ciclo de 37°C por 120 minutos e 1 ciclo de 85°C por cinco minutos. Os produtos gerados foram armazenados a 4°C até a aplicação no ensaio de qPCR.

4.3.4. PADRONIZAÇÃO DA CURVA DE EFICIÊNCIA DOS INICIADORES PARA qPCR

4.3.4.1. AMOSTRAS PARAFINADAS

A padronização da curva de eficiência da qPCR foi realizada utilizando o cDNA de uma das amostras parafinadas selecionada aleatoriamente (amostras ID3), nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,562ng em triplicata. A concentração dos iniciadores foi de 200nM, 400nM, 500nM e 600nM, para avaliação da melhor concentração. Após a padronização foi definido para o ensaio de qPCR com todas as amostras nas concentrações de 100ng de cDNA e 400nM dos iniciadores.

A qPCR foi realizada seguindo os mesmos parâmetros estabelecidos para o ensaio de qPCR do item 4.3.5.

4.3.4.2. AMOSTRAS CONGELADAS

A padronização da curva de eficiência da qPCR foi realizada seguindo os mesmos parâmetros descritos no tópico 4.3.4.1, porém com diferença do cDNA sendo de uma das amostras congeladas (ID 10) que foi selecionada aleatoriamente.

A qPCR foi realizada seguindo os mesmos parâmetros estabelecidos para o ensaio de qPCR do item 4.3.5.

4.3.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS AMOSTRAS PARAFINADAS E CONGELADAS POR qPCR

A quantificação relativa da expressão de TspanCO029, EMT (E-caderina e Vimentina) e Ki67, foi realizada através da qPCR, utilizando o reagente Power SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems™). Os iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 7 na

concentração de 400nM. As reações foram realizadas no QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System com bloco de 384-wells (Applied Biosystems), em parceria com a Plataforma de PCR em Tempo Real - RPT09D – do Instituto René Rachou. Foi utilizada uma concentração de 100ng de cDNA (em triplicata), ao qual se acrescentou 5 µl do Power SYBR Green master mix (Invitrogen), 0,5 µl (400nM) 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 minutos;
- Ativação da enzima DNA polimerase a 95°C por 10 minutos;
- 40 ciclos de amplificação sendo: 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento, extensão e aquisição de fluorescência);
- Dissociação dos produtos amplificados de DNA, entre a temperatura de 60°C e 95°C, para a avaliação da TM.
- Após a qPCR o valor da quantificação relativa das amostras ocorre por meio do cálculo $2^{(-\Delta\Delta CT)}$.

4.3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para os métodos estatísticos as variáveis categóricas estão apresentadas por frequências e proporções. Para as variáveis contínuas estão apresentadas a mediana, desvio padrão, interquartis, mínimo e máximo. A normalidade dos dados foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilk, os quais não apresentaram distribuição normal. Para comparar os valores de RQ das amostras nos grupos positivo e negativo, lateralidade, histórico familiar, sexo, idade e linfonodos acometidos foi utilizado o teste de Mann Whitney. Na avaliação da correlação entre os RQs dos marcadores para os grupos positivo, negativo e lateralidade foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. As análises foram realizadas no software Stata 13.0 considerando um nível de significância de 5%.

4.4. PRODUÇÃO DA PROTEÍNA TETRASPANINA CO029 RECOMBINANTE

A sequência da proteína tetraspanina CO029 foi obtida do banco de dados NCBI (*GenBank*: NP_004607.1, NCBI – *National Library of Medicine, PubMed, Protein*) para a qual foram desenhados iniciadores para amplificação por PCR convencional, seguida de clonagem empregando o sistema Gateway® (Invitrogen), seguindo as especificações do fabricante.

4.4.1 AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO GENE DE INTERESSE POR TECNOLOGIA GATEWAY®

A tecnologia Gateway®, que emprega recombinação de sítios homólogos específicos, promove a clonagem entre o bacteriófago lambda e o cromossomo da *Escherichia coli* (Landy, 1989). A recombinação ocorre entre sítios específicos (*att*) presentes nas moléculas de DNA, sem perda ou ganho de nucleotídeos. A recombinação do gene de interesse ocorre entre as regiões *attB* e *attP* do plasmídeo, resultando na formação de novos sítios de interação, chamados *attL* e *attR*. Essas reações são específicas e direcionais, de modo que *attB* recombina exclusivamente com *attP*, *attL* com *attR*, (Hartley et al., 2000).

Os iniciadores específicos para tecnologia Gateway® foram sintetizados seguindo as orientações do manual do fabricante (Invitrogen). A proteína tetraspanina CO029 foi amplificada com sítios específicos *att* nos flancos da sequência. Foram adicionadas duas sequências distintas aos iniciadores contendo os sítios de recombinação *attB1* (*Sense*) e *attB2* (*Antisense*). Ao iniciador *Sense* (F- TSPCO029-GW) foram adicionadas 4 guaninas, a sequência do sítio de recombinação *attB1* seguidas de mais 2 nucleotídeos, a sequência consenso *Shine-Dalgarno* (responsável pela expressão da proteína nativa em *E. coli*), seguidas 3 nucleotídeos, correspondentes a sequência de Kozak, finalizando com a sequência específica do gene de interesse. O iniciador *Antisense* (R- TSPCO029-GW) foi desenhado a partir de 4 guaninas, a sequência do sítio de recombinação *attB2* seguido de 1 nucleotídeo, e o códon de parada seguido da sequência específica do gene de interesse. Os iniciadores foram desenhados para produção da proteína com uma cauda de histidina na porção N-terminal. Na tabela 8 seguem as sequências de todos os iniciadores utilizados para a amplificação do gene de interesse.

Tabela 8. Iniciadores usados na Plataforma Gateway® para produção da proteína TspanCO029 recombinante.

MARCADOR	REFERÊNCIA NCBI	INICIADORES	AMPLICON (pb)	% GC	TM
Tetraspanina Co029	NM_004616.2	Sense: ATGGCAGGTGTGAGTGCCTGTATAA	714	50%	59
		AntiSense: TCATTTGTTCCCGATCTGGCAATACAGG			
Tetraspanina Co029 / GW	NM_004616.2	Sense: GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	714	50%	59
		CTC ATTTGTTCCCGATCTGGCAATACAGG			
		AntiSense: GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT			
		TCGAAGGAGATAG ACC ATGGCAGGTGTGAGTGCCTGTATAA			

Legenda de cores: vermelho: sítios att, azul sequência Shine-Dalgarno, roxo sequência Kozak, e verde sequência do gene TSPAN8.

A PCR foi realizada a partir de 20 µl de tampão, 2 µl de dNTP 10mM, 5 µl de cada iniciador para Gateway® 10 µM, 0,5 µg de DNA da tetraspanina CO029 purificado, 1 µl de DNA polimerase (*Phusion High-Fidelity DNA Polymerase*, NEB) e volume de água suficiente para 100 µl de reação. A variação de temperatura na amplificação incluiu uma etapa inicial de 98°C por 1 min, seguido por 35 ciclos com etapa de desnaturação a 98°C por 10 s, anelamento a 70°C por 30 s, extensão a 58°C por 30 s e extensão final a 72°C por 10 min. Uma alíquota do produto da reação foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da amplificação e tamanho do fragmento referente à tetraspanina CO029 de 714pb. O volume restante foi submetido à purificação através do kit *QIAquick® Gel Extraction* (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. O produto foi quantificado em espectrofotômetro (*NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer*, Thermo Scientific) para ser utilizado nas posteriores etapas de clonagem.

4.4.2. CLONAGEM

Após a amplificação da sequência de TspanCO029 e purificação do produto de PCR contendo o sítio de recombinação attB, foi realizada a etapa de clonagem baseada na plataforma Gateway®. A figura 9 apresenta o esquema do vetor doador pDONR221 e vetor de destino pEXP1-DEST utilizado para construção do clone de entrada e clone de expressão, respectivamente, para a produção de TspanCO029 recombinante.

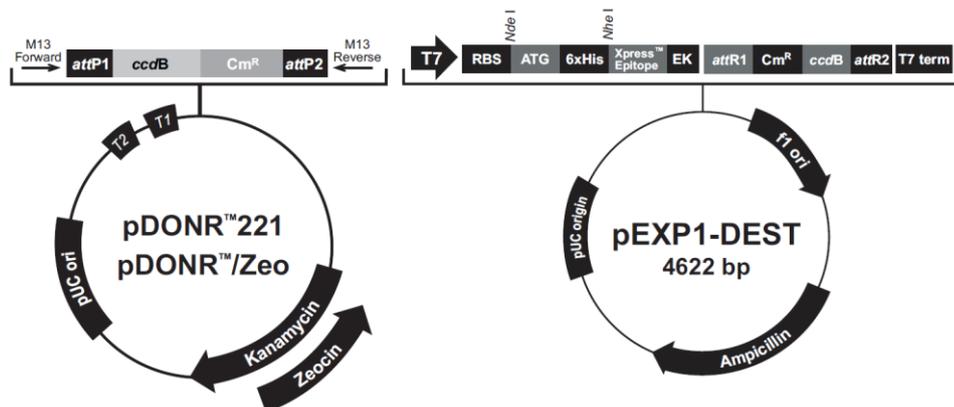


Figura 9. Desenho esquemático do vetor doador pDONR221 e vetor de destino pEXP1-DEST. Esses vetores foram utilizados para construção do clone de entrada e clone de expressão, respectivamente, para a produção de TspanCO029 recombinante.

4.4.3. REAÇÃO DE RECOMBINAÇÃO BP E OBTENÇÃO DO CLONE DE ENTRADA

Seguindo as instruções do sistemas Gateway®, para a obtenção do clone de entrada, houve a inserção do produto de PCR contendo os sítios attB no vetor doador pDONR221 contendo os sítios attP pela ação da BP clonase (*Gateway® BP Clonase II Enzyme mix*,

Invitrogen). A reação se deu a partir 3µl de pDONR221 150ng/µl, 150ng do produto de PCR, 2µl da BP clonase e 4µl de tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0) a 25°C por 16 horas. Após as 16 horas, 1µl da enzima proteínase K (100 µM) foi adicionada a reação por 10 min a 37°C, para parar a ação da enzima BP clonase.

Para a transformação e clonagem, foi utilizada *E. coli* linhagem TOP10 competente conforme as informações do fabricante (Thermo Fisher). O volume total da reação de recombinação BP clonase (10µl) foi adicionado a 50µl da linhagem de bactéria, incubadas 30 minutos em gelo seguido de 30 segundos em banho maria a 42°C, e por fim incubadas 2 minutos em gelo. Após a transformação, as células foram cultivadas em 750µl de meio SOC (Invitrogen) sob agitação de 225 RPM, durante 60 min a 37°C. Um volume de 100 e 200µl de bactérias foi plaqueado em meio *Luria Bertani* (LB) ágar contendo canamicina (50µg/ml) e incubadas a 37°C *overnight*.

Foi realizada PCR de colônia, para verificação da presença do inserto, utilizando o kit *Amplitaq Gold* (Applied Biosystems). Foi realizado um experimento de controle, de modo que para cada colônia foram feitas duas reações de PCR: uma usando o par de iniciadores F-TSPCO029-GW e R-TSPCO029-GW e a outra usando o iniciador universal *sense* FM13 (o sítio FM13 está presente *upstream* ao início do sítio de recombinação, 5'-CGACGTTGTAAAACGGCCAGT-3') e o R-TSPCO029-GW. A amplificação foi realizada em condições idênticas às descrito anteriormente. As colônias positivas foram inoculadas em 10 ml de meio LB líquido contendo canamicina e cultivadas a 37°C *overnight* sob agitação de 225 RPM. Após o crescimento dos clones, 5 ml do extrato contendo as bactérias transformadas, foram congelados, e os outros 5 ml foram usados para purificação de plasmídeos recombinantes com o kit *Miniprep* (Invitrogen) conforme indicações do fabricante. O produto recombinante foi enviado para a Plataforma de Sequenciamento de DNA – BH - RPT01E / IRR/FIOCRUZ-MG, para verificação da inserção correta do gene de interesse ao plasmídeo pDONR221. O resultado do sequenciamento foi visualizado no software *SnapGene* e as seqüências analisadas através do programa BLAST, comparando as seqüências obtidas às seqüências depositadas nos bancos de dados.

4.4.4. REAÇÃO DE RECOMBINAÇÃO LR E OBTENÇÃO DO CLONE DE EXPRESSÃO

Após a análise de sequenciamento, foram realizados os procedimentos para a obtenção do clone de expressão e então da proteína recombinante TspanCO029. Esta aconteceu 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 1µl de clone de entrada 150ng/µl, 1µl de pEXP1-DEST 150ng/µl, 8µl da LR clonase, 4µl de tampão da enzima e 6µl de tampão TE. A reação foi incubada 25°C por 16 h. Após as 16 horas 1µl da enzima proteínase K foi adicionada a reação por 10 min a 37°C, para parar a ação da enzima LR clonase.

Para a transformação e clonagem foi utilizada linhagem competente de *E. coli* TOP10 conforme as informações do fabricante. O volume total da reação de recombinação LR clonase (10µl) foi adicionado a 50µl da linhagem de bactéria, incubadas 30 minutos em gelo seguido de 30 segundos em banho maria a 42°C, e por fim incubadas 2 minutos em gelo. Após a transformação, as células foram cultivadas conforme item anterior. Um volume de 100 e 200µl de bactérias foi plaqueado em meio *Luria Bertani* (LB) ágar contendo ampicilina (30µg/ml) e incubadas a 37°C *overnight*.

Com o crescimento de inúmeras colônias, 15 foram selecionadas aleatoriamente e foi realizado PCR de colônia, para verificação da presença do inserto, utilizando o kit *Amplitaq Gold* (Applied Biosystems) com os iniciadores do gene de interesse. A condição de amplificação foi à mesma usada no item anterior. O produto da reação foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da amplificação e tamanho do fragmento. As colônias positivas foram inoculadas em 10 ml de meio LB líquido contendo ampicilina e cultivadas a 37°C *overnight* sob agitação de 225 RPM. Após o crescimento dos clones, 5 ml contendo as bactérias transformadas, foram congelados, e os 5 ml restantes os plasmídeos recombinantes foram purificados através do kit *Miniprep* (Invitrogen) conforme indicações do fabricante. O produto da reação LR clonase foi enviado para a Plataforma de Sequenciamento de DNA – BH - RPT01E / IRR/FIOCRUZ-MG, utilizando os iniciadores específicos para TSPANCO029 e T7 *terminator* para verificar a inserção correta do gene de interesse ao plasmídeo pEXP1-DEST. O resultado do sequenciamento foi visualizado no software *SnapGene* e as sequências analisadas através do programa BLAST, comparando as sequências obtidas às sequências depositadas nos bancos de dados e manualmente, verificando a correta inserção a partir da cauda de histidina.

4.4.5. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Após a análise do sequenciamento, células competentes *E. coli* BL21 AI (*Singles™ Competent Cells*, Novagen) foram transformadas com o clone de expressão pEXP1-DEST-TspanCO029 conforme as informações do fabricante, descritas anteriormente. O pré-inoculo

foi realizado a partir da adição das colônias em 10 ml de meio Terrific Broth (TB) líquido mais ampicilina e incubado *overnight* a 37°C a 180RPM. No dia seguinte, 1 ml foi adicionado em 100ml de meio TB líquido mais ampicilina e este foi incubado a 37°C a 180RPM, para avaliar a expressão da proteína de interesse. O crescimento bacteriano foi monitorado em espectrofotômetro 600nm até a densidade óptica (OD600) alcançar 0,4 a 0,6 para posterior indução.

Foi então coletado 1 ml do cultivo denominado amostra não induzida (T0) e foi verificado e registrado a OD600, sendo ao restante adicionado IPTG 1 mM 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. As alíquotas foram centrifugadas a 13.000 RPM, por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o *pellet* do T0 foi ressuscitado em 50µl de PBS. Para as coletas T1 a T4 os volumes foram respectivamente 112 µl, 150 µl, 211 µl e 247 µl, com objetivo de deixar a mesma quantidade de bactérias, visando identificar o aumento somente da produção da proteína de interesse. Estas amostras foram submetidas a eletroforese em gel SDS-PAGE a 12%, em sistema *Mini-Protean TGX™ Precast Gel* (BioRad), com voltagem de 100 volts, por aproximadamente 1 hora e 30 minutos, sendo por fim, corado com solução de azul de Commassie. Em gel idêntico foi realizado *western Blot*, utilizando anticorpo anti cauda de histidina, para visualização da expressão da proteína de interesse.

Posteriormente, o restante do inóculo (aproximadamente 90ml) foi centrifugado 13.000 RPM por 10 minutos. O *pellet* foi ressuscitado em 1ml de PBS e realizou-se a lise desta suspensão de células, congelando e descongelando completamente, por 3 vezes e 3 sonicações de 30 segundos intercalando com descanso de 1 minuto, sempre em gelo. O lisado foi centrifugado, o sobrenadante separado do *pellet* que foi ressuscitado separadamente em PBS para análise em SDS-PAGE 12%.

4.4.6. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE TspanCO029r

Confirmada a expressão da proteína e a melhor condição de tempo de indução, foi produzido um volume final de 1000ml de cultura do clone para obter quantidade satisfatória da proteína. Após esta etapa, o meio de cultivo foi centrifugado 12.000xg 45 minutos a 4°C e o *pellet* lisado em tampão apropriado para purificação em coluna de níquel. O *pellet* foi ressuscitado em tampão de lise para desagregação de corpos de inclusão (300ml para 25g de *pellet*, adicionado de Lisozima 200µg/ml, PmSF 1mM, DNase 20µg/ml), incubado em

gelo, sob agitação por 15 minutos. O lisado foi separado em alíquotas de 10ml, seguindo com a etapa de 5 ciclos de sonicação, na intensidade de 40%, por 30 segundos, com 1 minuto de intervalo entre os ciclos, sendo a sonicação sempre em gelo, evitando o aquecimento da suspensão de bactérias. Fez-se uma centrifugação de 12.000 RPM por 45 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em filtro 0.22µm e submetido à purificação em coluna de níquel (Biorad). Esta etapa repetida várias vezes, obtendo-se ao final, o *pellet* lisado e 4 sobrenadantes. As frações de sobrenadante foram coletadas, agrupadas e dialisadas contra tampão PBS, com duas trocas do tampão. O produto foi concentrado por centrifugação em filtro Vivaspin com *cutoff* de 10kDa (Millipore), e a dosagem proteica foi realizada por kit ácido bicinchonínico (BCA) (ThermoFisher), seguindo as instruções do fabricante. Alíquotas de 1ml (total de 30ml) foram armazenadas em freezer -20°C para posterior uso.

4.5. PRODUÇÃO *IN VITRO* DE ANTICORPOS ANTI-TETRASPANINA CO029 (mAb-TspanCO029r)

A produção dos anticorpos policlonais e monoclonais anti-tetraspanina CO029 (mAb-TspanCO029r) foi realizada de acordo com protocolo adotado pelo laboratório de Diagnóstico e Terapia de Doenças Infecciosas e Oncológicas – Fiocruz, seguindo a metodologia descrita por Köhler & Milstein, 1975, com modificações.

4.5.1. IMUNIZAÇÃO

Iniciou-se com a imunização de dois camundongos BALB/c com 20mg da proteína recombinante produzida (TspanCO029r) acrescida de 200µl de adjuvante de Freund (Sigma). Realizaram-se quatro imunizações com intervalos de 15 dias entre elas. Amostras de soro foram coletadas antes de cada imunização e ao final da sexta imunização, realizou-se um imuno-ensaio *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), para avaliação da reatividade imunológica contra a proteína (antígeno). Confirmada a produção de anticorpos pelos animais, os mesmos foram eutanasiados, para esplenectomia.

4.5.2. FUSÃO CELULAR

O baço foi removido em condições assépticas e mantido em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) estéril. Em seguida, o baço foi macerado sob compressão em membrana de nylon com abertura de 70µm. As células foram ressuspensas com meio DMEM, centrifugadas a 250g por 9 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspensado suavemente. Seguindo, foi adicionado 2ml de *Lysis Buffer* (Sigma) e homogeneizado suavemente para ressuspensão das células e mantido em repouso por 2

minutos a temperatura ambiente (TA). Após os 2 minutos de repouso foram acrescentados 8ml de DMEM e centrifugado a 250g por 9 minutos a 4°C. O sobrenadante descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 2ml de DMEM para obtenção dos linfócitos B. Os linfócitos B foram fundidos, sob ação de polietilenoglicol, as células de mieloma da linhagem SP2/0-IL6, previamente cultivadas no laboratório, na proporção 1 mieloma para 5 linfócitos B.

Esses hibridomas foram cultivados em placas de 96 poços em meio seletivo HAT (hipoxantina-aminoptericina-tiamina) e HT (hipoxantina-tiamina) por 4 semanas, selecionados por ELISA utilizando os sobrenadantes da cultura.

4.5.3. CLONAGEM

Os poços positivos selecionados na etapa anterior foram novamente distribuídos em novas placas de 96 poços, de forma a distribuir cada célula individualizada em um único poço para a obtenção dos clones produtores de anticorpo monoclonal. Uma nova ELISA foi executada e o clone positivo expandido para garrafa de 25cm² e posteriormente para garrafa de 75cm², para produção em maior escala, onde foram coletados aproximadamente 600ml de sobrenadante de cultura de cada um dos clones produtores de anticorpos policlonais e monoclonais.

4.5.4. PURIFICAÇÃO

Os anticorpos policlonais e monoclonais foram purificados por uma etapa inicial de precipitação em solução de sulfato de amônio (SAS) a 50%. O sobrenadante é centrifugado para remoção de *debris* celulares. O SAS foi acrescentado em igual volume do sobrenadante (600ml) que foi coletado anteriormente, este material ficou sob agitação a 4°C, por aproximadamente 16 horas. Passado o tempo, todo o volume foi centrifugado a 6000g para formação do *pellet*, por 35 minutos a 4°C. O *pellet* foi ressuspensionado em 100ml de PBS e dialisado com PBS, com 3 trocas de tampão. Os anticorpos policlonais foram concentrados em coluna Vivaspin de 50kDa (GE Healthcare), para um volume final de 10ml e armazenados a 4°C. Os anticorpos monoclonais foram encaminhados a segunda etapa de purificação por cromatografia de afinidade com coluna G (GE Healthcare), seguindo as especificações do fabricante, onde os 100ml previamente obtidos foram passados por 3 vezes na coluna e eluídos com tampão indicado pelo fabricante. Ao final este material foi submetido a tubo Vivaspin de 50kDa (GE Healthcare), para concentração dos anticorpos monoclonais.

Os materiais finais purificados foram submetidos à SDS-PAGE unidimensional 12% em sistema MiniProtean III (BioRad), empregando-se a técnica descrita por Laemmli (1970).

As concentrações dos géis utilizados foram 5% para o gel de concentração e de 12% para o gel de separação. As amostras serão diluídas (1:2) em tampão de amostra 2x (Tris HCl 0,5M pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 0,1%, azul de bromofenol 0,2%), fervidas por 5 minutos a 98°C e conduzidas a uma corrente 80-120 V em tampão de corrida (Tris 250mM, Glicina 2,5M pH 8,3, SDS 1%). Um dos géis foi corado com Azul de Coomassie Colloidal G250 para análise do perfil do material purificado e o outro transferido para membrana de PVDF 0,2 μ m (GE Healthcare) conforme descrito por Towbin et al. (1979). A corrente de 100 volts foi aplicada, durante duas horas, em sistema Mini-Trans-Blot (BioRad) usando tampão de transferência (Tris 25mM, Glicina 192mM, Metanol 20%). A membrana foi bloqueada com 3% de proteínas do leite diluídas em tampão tris-salina (TBS) (Tris-HCl 20mM, NaCl 500mM, pH 7,5) com 1% de Tween 20 (TBS-T) sob agitação por 16 h a 4°C, e lavadas 5 vezes com TBS-T por 5 minutos a temperatura ambiente. Etapa de lavagem seguindo da mesma forma nas demais lavagens seguintes e o anticorpo secundário anti-IgG/camundongo conjugado à HRP adicionado em TBS-T com 3% de proteínas do leite e incubado sob agitação por 2 horas a temperatura ambiente. Após última etapa de lavagem, a membrana foi submetida a uma lavagem de 10 minutos em TBS e reveladas pelo método de quimiluminescência com o kit ECL Plus (GE Healthcare), e a imagem foi capturada por sistema de imagem digital LAS4000 (GE Healthcare).

5. RESULTADOS

5.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS PARAFINADAS E CONGELADAS

As 35 amostras parafinadas de casos positivos de pacientes acometidos com adenocarcinoma colorretal representavam 16 casos de adenocarcinomas localizados no cólon direito e 19 adenocarcinomas localizados no cólon esquerdo. E foram obtidas 10 amostras negativas dos mesmos pacientes que foram retirados de bordas livres de tumor (tabela 9).

Tabela 9. Amostras Parafinadas do Departamento de Anatomia Patológica - Faculdade de Medicina da UFMG. São apresentadas as amostras positivas (ID POSITIVA), amostras negativas (ID NEGATIVA), nome, sexo, idade, lateralidade e estadiamento (T, N, M).

ID POSITIVA	ID NEGATIVA	NOME	SEXO	IDADE	LATERALIDADE	T	N	M
1	NA	MSCM-18	F	69	Cólon Direito	pT3	pN1	pMx
3	2	JA-16	M	57	Cólon Direito	pT3	pN2	pMx
5	4	MLBD-18	F	76	Cólon Direito	pT4	pN1	pMx
7	6	AAA-18	F	57	Cólon Direito	pT3	pN1	pMx
8	NA	VCN-17	F	64	Cólon Direito	pT3	pN0	pMx
9	NA	JN-16	M	54	Cólon Direito	pT4	pN2	pMx
11	10	FGM-18	M	91	Cólon Direito	pT4	pN1	pMx
13	12	VBL-17	F	60	Cólon Direito	pT3	pN1	pMx
14	NA	NSS-17	F	69	Cólon Direito	pT4	pN1	pMx
15	NA	EG-17	F	76	Cólon Direito	pT3	pN0	pMx
16	NA	ALS-17	F	81	Cólon Direito	pT3	pN2	pMx
17	NA	JMS-16	M	62	Cólon Direito	pT3	pN1	pMx
18	NA	CJR-17	M	55	Cólon Direito	pT4	pN0	pMx
19	NA	EC-16	M	37	Cólon Direito	pT3	pN2	pMx
20	NA	LMA-17	F	81	Cólon Direito	pT2	pN0	pMx
21	NA	ALO-16	M	75	Cólon Direito	pT4	pN1	pMx
23	22	MLV-16	F	62	Cólon Esquerdo	pT2	pN0	pMx
25	24	AGS-16	M	90	Cólon Esquerdo	pT2	pN0	pMx
26	NA	NSG-17	M	56	Cólon Esquerdo	pT1	pN0	pMx
27	NA	NGS-16	M	69	Cólon Esquerdo	pT3	pN2	pMx
28	NA	MOPP-18	F	57	Cólon Esquerdo	pT4	pN1	pMx
29	NA	ECS-18	F	49	Cólon Esquerdo	pT4	pN0	pMx
30	NA	SAV-16	F	61	Cólon Esquerdo	pT3	pN1	pMx
31	32	ZMC-16	F	85	Cólon Esquerdo	pT2	pN0	pMx
33	NA	MLAS-17	F	66	Cólon Esquerdo	pT1	pN0	pMx
35	34	WCF-16	F	85	Cólon Esquerdo	pT3	pN1	pMx
36	NA	OGR-16	F	82	Cólon Esquerdo	pT3	pN1	pMx
37	NA	RSM-16	F	90	Cólon Esquerdo	pT3	pN1	pMx
38	NA	AMSC-17	F	54	Cólon Esquerdo	pT3	pN1	pMx
39	40	IPB-17	F	86	Cólon Esquerdo	pT3	pN2	pMx
41	NA	LERC-17	M	68	Cólon Esquerdo	pT4	pN2	pMx
42	NA	JSS-17	M	83	Cólon Esquerdo	pT3	pN0	pMx
43	NA	TRS-17	F	61	Cólon Esquerdo	pT4	pN1	pMx
46	NA	WSP-17	M	67	Cólon Esquerdo	pT3	pN0	pMx
47	NA	FJCR-17	M	53	Cólon Esquerdo	pT3	pN0	pMx

NA – Não se aplica

As 34 amostras congeladas de casos positivos de pacientes acometidos com adenocarcinoma colorretal representavam 13 casos de adenocarcinomas localizados no cólon direito e 21 adenocarcinomas localizados no cólon esquerdo. E foram selecionadas amostras negativas dos mesmos pacientes, no total de 34, coletadas distantes do sítio acometido, com bordas livres de tumor (tabela 10).

Tabela 10. Amostras Congeladas do Instituto Alfa de Gastroenterologia - Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da UFMG. São apresentadas as amostras positivas (ID POSITIVA), amostras negativas (ID NEGATIVA), nome, sexo, idade, lateralidade e estadiamento (T, N, M).

ID POSITIVA	ID NEGATIVA	NOME	SEXO	IDADE	LATERALIDADE	T	N	M
1	38	OFS	M	64	Cólon Direito	pT3	pN2	pMx
2	39	MSQB	F	53	Cólon Direito	pT3	pN1	pM1
3	40	VSS	F	59	Cólon Direito	pT3	pN2	pMx
4	41	DMJ	F	65	Cólon Direito	pT4	pN1	pM1
5	42	FVS	F	63	Cólon Direito	pT3	pN1	pMx
6	43	LHRS	F	57	Cólon Direito	pT3	pN0	pMx
7	44	GRR	M	73	Cólon Direito	pT2	pN0	pMx
8	45	MLJ	F	75	Cólon Direito	pT4	pN2	pMx
9	46	MCCS	F	55	Cólon Direito	pT3	pN1	pMx
10	47	RLBF	M	59	Cólon Direito	pT3	pN0	pMx
11	48	ARS	M	70	Cólon Direito	pT3	pN0	pMx
12	49	LETC	M	72	Cólon Direito	pT2	pN0	pMx
13	50	AMJ	F	67	Cólon Direito	pT3	pN2	pMx
14	51	EPAR	F	72	Cólon Esquerdo	pT3	pN0	pMx
15	52	DTA	M	69	Cólon Esquerdo	pT3	pN0	pMx
16	53	OJCF	M	61	Cólon Esquerdo	pT4	pN1	pMx
17	54	JFS	M	47	Cólon Esquerdo	pT3	pN1	pMx
18	55	EMSM	F	44	Cólon Esquerdo	pT3	pN0	pMx
19	56	RMB	F	61	Cólon Esquerdo	pT4	pN2	pMx
20	57	JSR	M	49	Cólon Esquerdo	pT3	pN0	pMx
21	58	GPB	F	61	Cólon Esquerdo	pT3	pN0	pMx
22	59	EBSA	F	65	Cólon Esquerdo	pT3	pN0	pMx
23	60	WCF	F	81	Cólon Esquerdo	pT3	pN1	pMx
24	61	MEOS	F	56	Cólon Esquerdo	pT2	pN0	pMx
25	62	HDL	F	84	Cólon Esquerdo	pT3	pN0	pMx
27	64	CTS	M	33	Cólon Esquerdo	pT2	pN2	pMx
28	65	MC	M	36	Cólon Esquerdo	pT4	pN2	pMx
29	66	GDB	M	60	Cólon Esquerdo	pT3	pN1	pMx
30	67	MCR	F	54	Cólon Esquerdo	pT3	pN0	pMx
31	68	CMLS	F	62	Cólon Esquerdo	pT2	pN0	pMx
32	69	GVM	M	67	Cólon Esquerdo	pT3	pN0	pMx
33	70	HCT	F	73	Cólon Esquerdo	pT3	pN0	pMx
34	71	NGS	F	65	Cólon Esquerdo	pT3	pN2	pMx

As características clínicas, variáveis categóricas, estão apresentadas por frequências e proporções na tabela 11 para descrição do perfil das amostras congeladas.

Tabela 11. Perfil descritivo das características clínicas dos 34 pacientes com CCR. Amostras Congeladas do Instituto Alfa de Gastroenterologia - Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da UFMG.

VARIÁVEIS	N	%
SEXO		
Feminino	20	58,82
Masculino	14	41,18
FAIXA ETÁRIA (ANOS)		
< 40 anos	2	5,88
> 40 anos	32	94,12
LATERALIDADE		
Cólon Direito	13	38,24
Cólon Esquerdo	21	61,76
LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA		
Ceco	7	20,59
Cólon ascendente	4	11,76
Cólon descendente	2	5,88
Cólon sigmoide	13	38,24
Cólon transverso	2	5,88
Flexura esplênica	1	2,94
Reto	5	14,71
T		
pT2	5	14,71
pT3	24	70,59
pT4	5	14,71
N		
pN0	17	50
pN1	9	26,47
pN2	8	23,53
M		
pM1	2	5,88
pMx	32	94,12
LINFONODOS COM METASTASE		
Não	19	55,88
Sim	15	44,11
HISTÓRICO FAMILIAR		
Não	18	52,94
Sim	16	47,04

5.2. EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR

5.2.1. VALIDAÇÃO DOS INICIADORES

Foram validados os pares de iniciadores por amplificação em PCR convencional, utilizando cDNA da célula de adenocarcinoma humano da linhagem HT29 como molde. Foi possível detectar a amplificação de fragmentos dos genes-marcador de interesse com pesos moleculares preditos *in silico*, como mostra a figura 10.

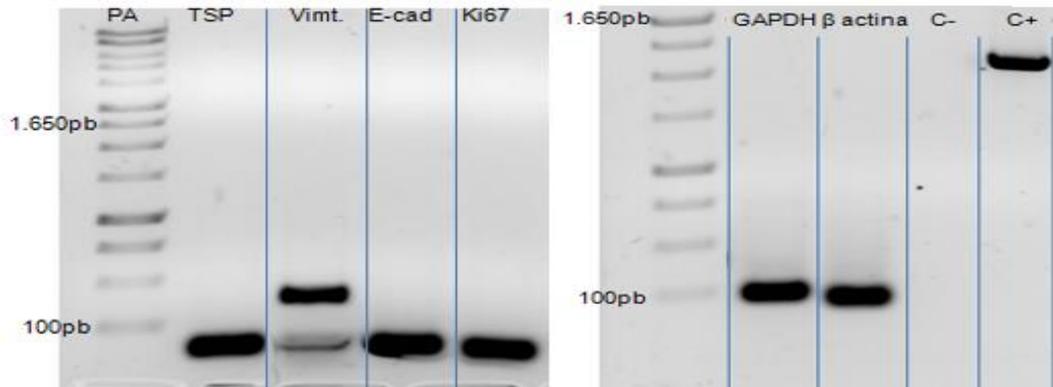


Figura 10. Amplificação dos pares (senso e anti-senso) dos iniciadores (TSP-tetraspanina Co029, Vimt-Vimentina, E-cad-E-caderina, Ki67, GAPDH, β-actina). Eletroforese em gel de agarose a 1%, coloração com corante intercalante Blue Green, observação em transiluminador Uv. PA - padrão de peso molecular “1Kda DNA Ladder” (Promega).

5.2.2. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

5.2.2.1. AMOSTRAS PARAFINADAS

Foram extraídos os RNAs das amostras parafinadas, onde a concentração foi analisada no nanodrop, em nanogramas por microlitros e está descrito na tabela 12. As concentrações abaixo de 50ng/μl foram excluídas e não entraram no experimento de qPCR por não apresentar concentração suficiente para o volume total da reação de 10 μl por poço.

Tabela 12. Concentração do RNA extraído das amostras parafinadas de adenocarcinoma.

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

*Amostra excluída

Seis amostras aleatoriamente selecionadas foram submetidas à análise de integridade do RNA, o que mostrou que o RNA das mesmas não estava íntegro (figura 11). Entretanto, apesar destas seis amostras não apresentarem RNA íntegros, todas as amostras parafinadas foram submetidas a síntese do cDNA para posteriormente serem avaliadas no ensaio de qPCR.

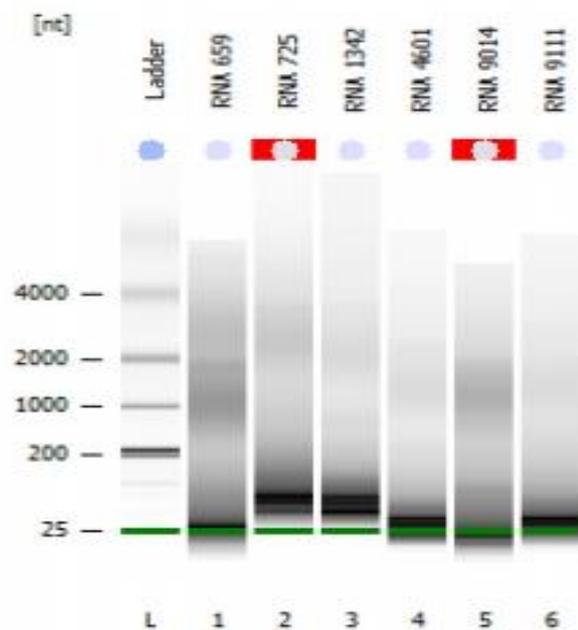
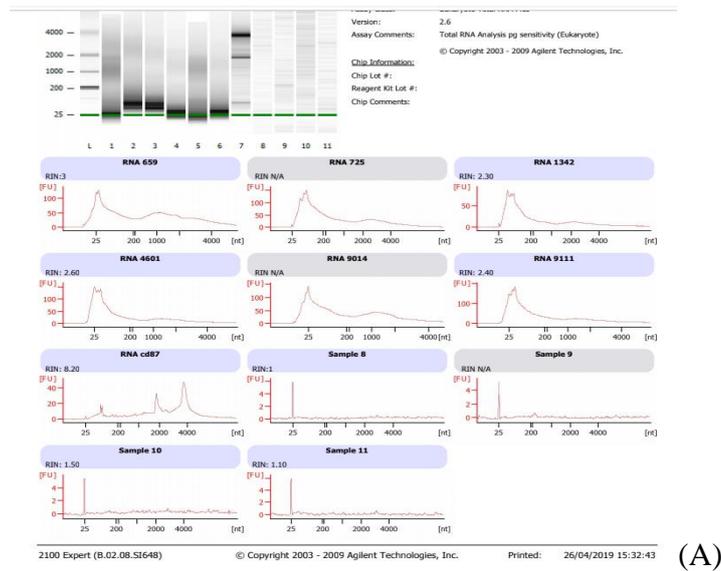


Figura 11. Análise de integridade do RNA em *Bioanalyzer High Sensitivity RNA Analysis* de seis amostras parafinadas. (A) Representação gráfica do perfil eletroforético; Eixo x- tamanho do fragmento de RNA em [nt] - nucleotídeos; Eixo y – intensidade de fluorescência; RIN: Número de Integridade de RNA. (B) Perfil eletroforético das amostras de RNA total; cada coluna representa uma amostra, sendo, Ladder – padrão de peso molecular; RNA 659 – amostra 4; RNA 725 – amostra 7; RNA 1342 – amostra 28; RNA 4601 – amostra 16; RNA 9014 – amostra 46; RNA 9111 – amostra 47; [nt] – tamanho de fragmentos de RNA em nucleotídeos.

5.2.2.2. AMOSTRAS CONGELADAS

Foram extraídos os RNAs das amostras congeladas, das quais a concentração foi determinada em nanodrop, em nanogramas por microlitros, e está descrita na tabela 13. As concentrações abaixo de 50ng/μl foram excluídas e não entraram no experimento de qPCR por não apresentar concentração suficiente para o volume total da reação de 10 μl por poço.

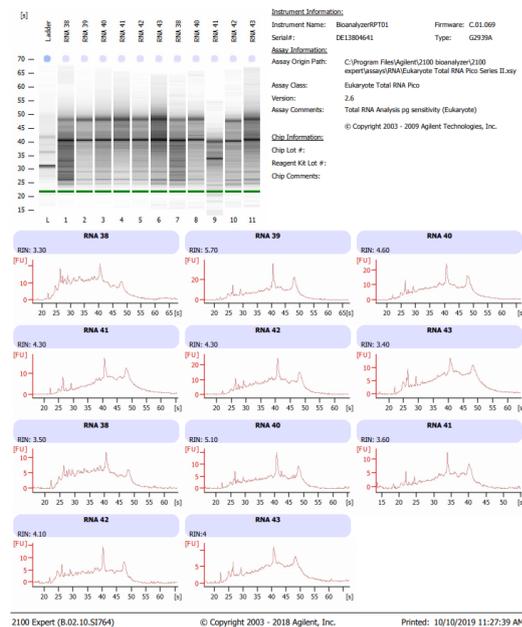
Tabela 13. Concentração do RNA das amostras congeladas de adenocarcinoma.

ID POSITIVA	CONCENTRAÇÃO ng/ul	ID NEGATIVA	CONCENTRAÇÃO ng/ul
1	1328	38	149,2
2	1627	39	311
3	1108	40	159,8
4	576	41	199,5
5	121,2	42	227,9
6	1141,1	43	334,7
7	1578,6	44	402,3
8	1271,8	45	398,3
9	642	46	447,9
10	433	47	148,9
11	326	48	245,1
12	1169,8	49	389,6
13	781,1	50*	Excluída
14	577,6	51	325,3
15	759,1	52	684,9
16	1071,9	53	886,1
17	369,6	54	632
18*	Excluída	55	808,2
19	1038,7	56	1814,1
20	123,3	57	156,4
21	906,7	58*	4,8
22	1468,7	59	1388,2
23	1139,7	60	407
24	1891,3	61*	3,6
25	1300	62	945,9
27	197,9	64	146,4
28	111,8	65	265,9
29	965	66	435,2
30	168,3	67*	Excluída
31	1097,1	68	341,2
32	331,4	69*	21
33	107,2	70*	43,8
34	773,1	71*	23,7

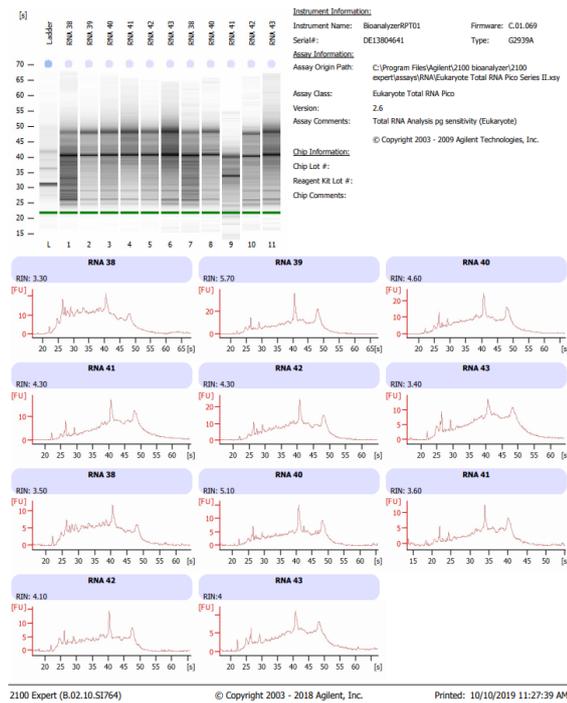
*Amostra excluída

As amostras sinalizadas com asterisco foram retiradas do experimento de qPCR. No momento da extração do RNA o tubo da amostra ID18 quebrou e perdeu-se o material, ID50 e 67 estavam na relação de amostras cedidas pelo Instituto Alfa, porém a mesmas não foram enviadas. As amostras ID 58, 61, 69, 70 e 71 tiveram uma concentração baixa de RNA extraído, por isso ficaram inviáveis de serem avaliadas no qPCR. Sendo assim, as amostras ID18, 50, 58, 61, 67, 69, 70 e 71 não foram submetidas ao ensaio de qPCR.

Seis amostras aleatórias foram submetidas a análise de integridade do RNA (figura 12), foi possível diferenciar os picos de rRNA 18s (próximo do 40nts eixo x) e 28s (próximo do 50nts eixo x), além de não haver pico de grande magnitude na região de pequenos RNAs, próximo dos 25nts. Além disto, foi possível evidenciar os valores de RIN (integridade de RNA), que não foram muito elevados, sendo o menor deles de 3,3; e o ideal seria trabalhar com valores próximos de 10, mas se tratando de amostras humanas congeladas, os valores de RIN são considerados de acordo para o experimento. Portanto, foi realizado a síntese de cDNA de todas as amostras congeladas e posteriormente foram analisadas no ensaio de qPCR.



(A)



(B)

Figura 12. Análise de integridade do RNA em *Bioanalyzer High Sensitivity RNA Analysis* de seis amostras congeladas (A). Representação gráfica do perfil eletroforético; Eixo x- tamanho do fragmento de RNA em [nt] - nucleotídeos; Eixo y – intensidade de fluorescência; RIN: Número de Integridade de RNA. (B) Perfil eletroforético das amostras de RNA total; cada coluna representa uma amostra, sendo, Ladder – padrão de peso molecular; RNA 38 – amostra 38; RNA 39 – amostra 39; RNA 40 – amostra 40; RNA 41 – amostra 41; RNA 42 – amostra 42; RNA 43 – amostra 43; [nt] – tamanho de fragmentos de RNA em nucleotídeos.

5.2.3. PADRONIZAÇÃO DA CURVA DE EFICIÊNCIA DOS INICIADORES PARA qPCR

Foi realizada a padronização da curva de eficiência para definição da concentração dos iniciadores e de cDNA na qual os *amplicons* de PCR são gerados. Se um *amplicon* de PCR dobrar em quantidade durante a fase geométrica da amplificação da PCR, então a PCR apresentou 100% de eficiência, sendo considerada adequada eficiência entre 90 a 110%.

O *slope* (inclinação) de uma curva padrão é comumente usados para estimar a eficiência de amplificação de uma reação de PCR em tempo real. A curva padrão de PCR em tempo real é representada por um gráfico de regressão linear semi-log do valor CT em comparação ao log da quantidade inicial do ácido nucleico. O *slope* da curva padrão de $-3,32$ indica uma reação de PCR com 100% de eficiência. Os *slopes* mais negativos que $-3,32$ (p. ex. $-3,9$) indicam reações com menos de 100% de eficiência, ao passo que o mais positivo que $-3,32$ (p. ex. $-2,5$) podem indicar má qualidade da amostra ou problemas de pipetagem.

5.2.3.1. AMOSTRAS PARAFINADAS

A concentração dos iniciadores foi de 400nM para todos os marcadores (TspanCO029, E-caderina, Vimentina, Ki67, β -actina e GAPDH) e o cDNA da amostra parafinada (ID3) foi diluído 1:2 em sete pontos de diluição, 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562ng, que foram realizados em triplicata. A curva de eficiência utilizando a amostra parafinada ID 3 não apresentou amplificação satisfatória apenas ruídos de reação como mostra a figura 13.

Portanto, não foi possível estabelecer a melhor condição para o ensaio utilizando todas as amostras parafinadas. Porém, as mesmas foram submetidas ao ensaio de qPCR seguindo as condições encontradas para as amostras congeladas.

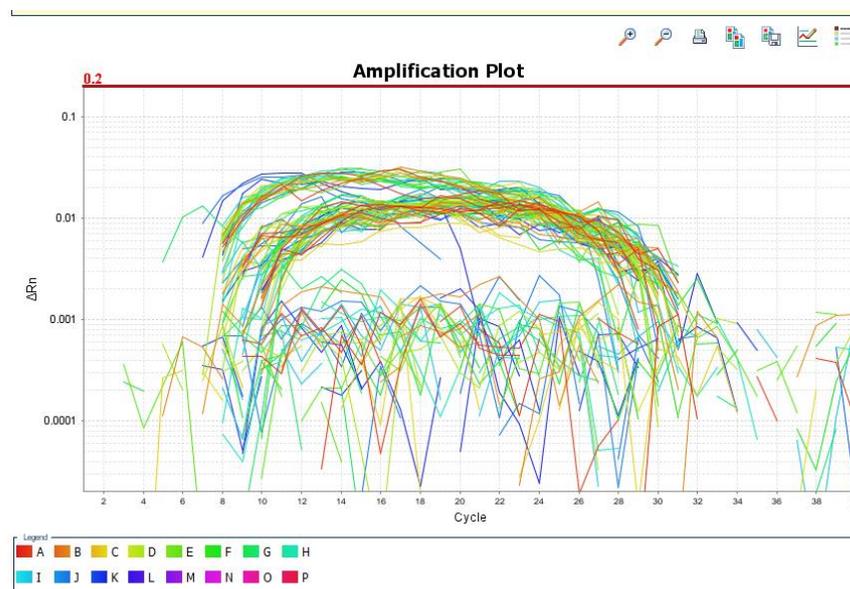


Figura 13. Padronização da curva de eficiência através do ensaio de qPCR. Iniciadores TspanCO029, Ki67, E-caderina, Vimentina, e os controles endógenos GAPDH, β -actina e cDNA relativas a 1 amostra parafinada (ID3), diluída 1:2 em 7 pontos. Foi possível verificar a não amplificação dos marcadores e apresentou apenas ruídos de reação.

5.2.3.2. AMOSTRAS CONGELADAS

Através da padronização da curva de eficiência utilizando a amostra congelada ID10, foi possível definir as melhores condições de concentração dos iniciadores (400nM) e do cDNA (100ng) para o ensaio de qPCR com todas as amostras congeladas. A curva, portanto, apresentou 7 pontos de diluição 1:2 (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562ng), para todos os marcadores (TspanCO029, E-caderina, Vimentina, Ki67, β -actina e GAPDH) e foram realizados em triplicata (figura 14, 15, 16, 17, 18, 19, respectivamente e tabela 14).

TspanCO029

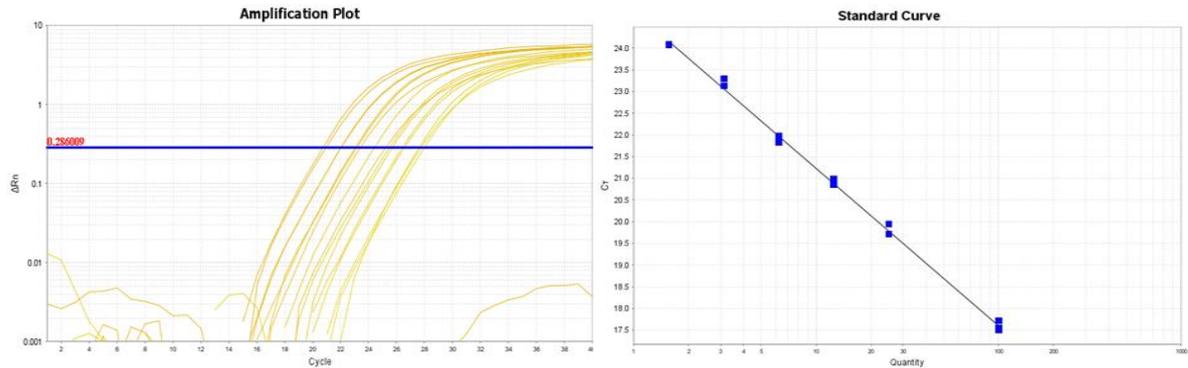


Figura 14. Curva de eficiência obtida na qPCR com uso do iniciador **TspanCO029**. cDNA de 1 amostra congelada (ID10) diluída 1:2 em 7 pontos em triplicata. Apresentou o resultado de: slope -3,638, R2 0,99 e Eficiência de 91%. A figura a esquerda apresenta as amplificações da reação de qPCR e a figura a direita apresenta a curva obtida na reação.

E-caderina

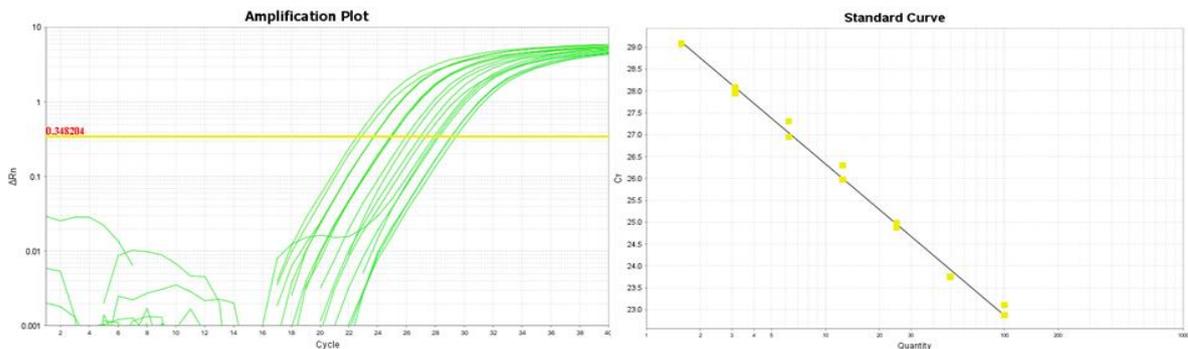


Figura 15. Curva de eficiência obtida na qPCR com uso do iniciador **E-Caderina**. cDNA de 1 amostra congelada (ID10) diluída 1:2 em 7 pontos em triplicata. Apresentou o resultado de: slope -3,467, R2 0,99 e Eficiência de 94%. A figura a esquerda apresenta as amplificações da reação de qPCR e a figura a direita apresenta a curva obtida na reação.

Vimentina

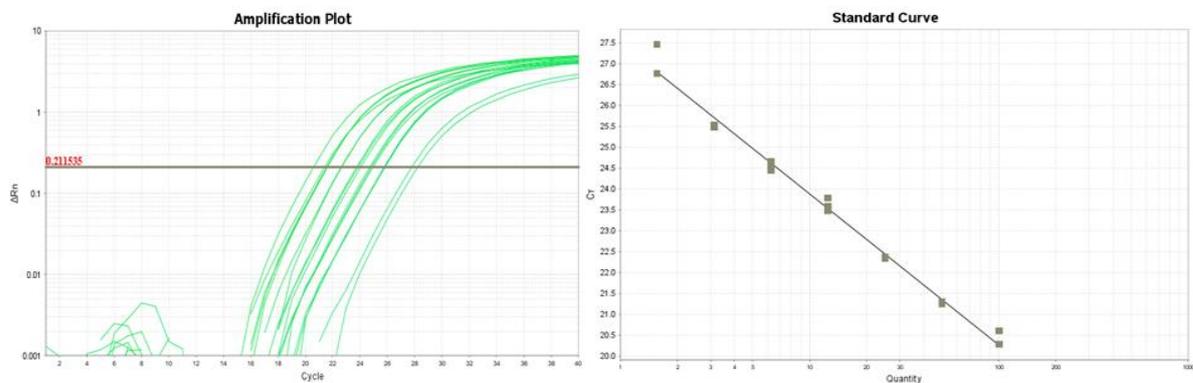


Figura 16. Curva de eficiência obtida na qPCR com uso do iniciador **Vimentina**. cDNA de 1 amostra congelada (ID10) diluída 1:2 em 7 pontos em triplicata. Apresentou o resultado de: slope -3,493, R2 0,98 e Eficiência de 98%. A figura a esquerda apresenta as amplificações da reação de qPCR e a figura a direita apresenta a curva obtida na reação.

Ki67

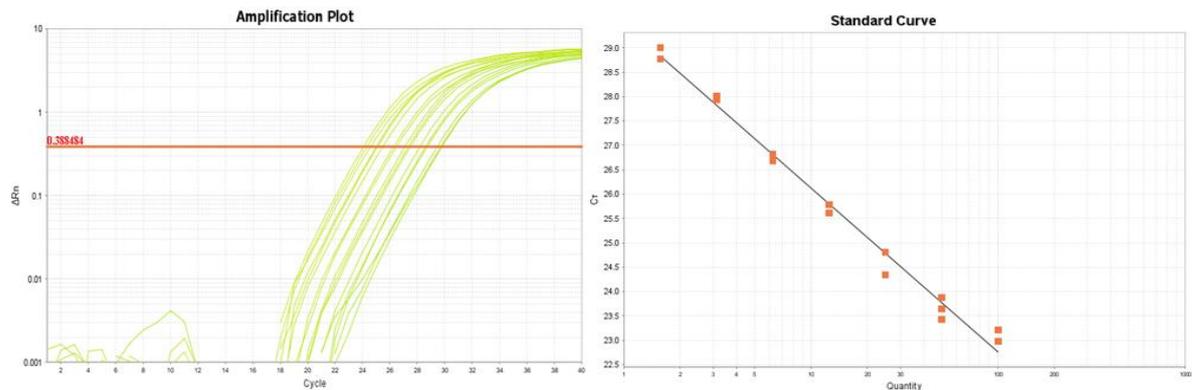


Figura 17. Curva de eficiência obtida na qPCR com uso do iniciador **Ki67**. cDNA de 1 amostra congelada (ID10) diluída 1:2 em 7 pontos em triplicata. Apresentou o resultado de: slope -3,335, R2 0,99 e Eficiência de 99%. A figura a esquerda apresenta as amplificações da reação de qPCR e a figura a direita apresenta a curva obtida na reação.

β-actina

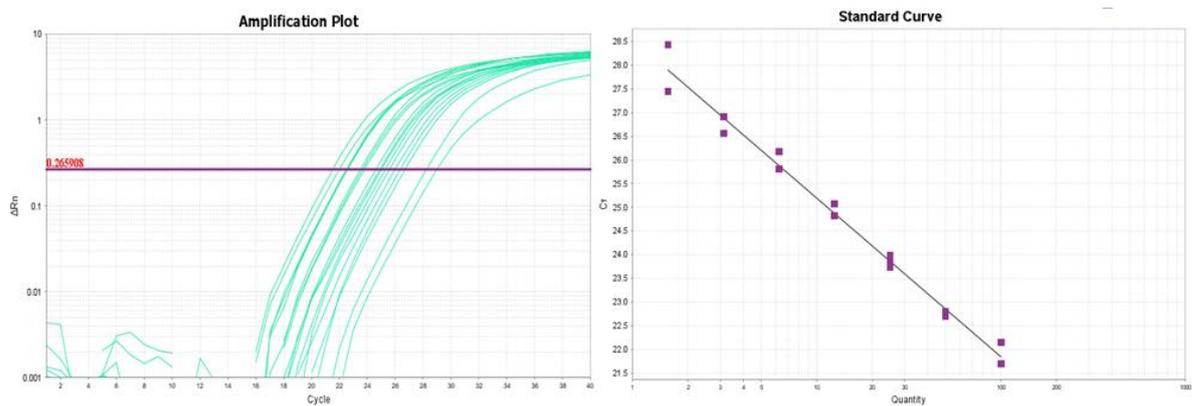


Figura 18. Curva de eficiência obtida na qPCR com uso do iniciador **β-actina**. cDNA de 1 amostra congelada (ID10) diluída 1:2 em 7 pontos em triplicata. Apresentou o resultado de: slope -3,132, R2 0,97 e Eficiência de 103%. A figura a esquerda apresenta as amplificações da reação de qPCR e a figura a direita apresenta a curva obtida na reação.

GAPDH

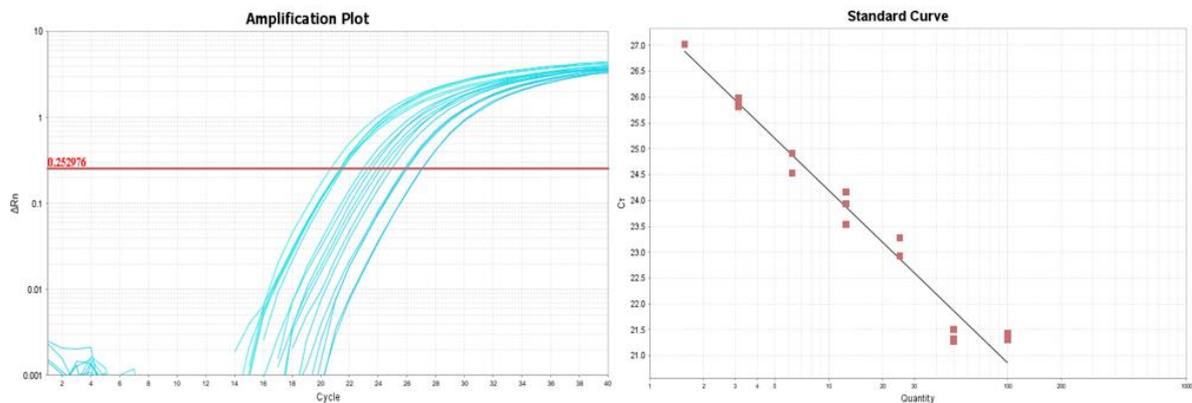


Figura 19. Curva de eficiência obtida na qPCR com uso do iniciador **GAPDH**. cDNA de 1 amostra congelada (ID10) diluída 1:2 em 7 pontos em triplicata. Apresentou o resultado de: slope -3,37, R2 0,98 e Eficiência de 94%. A figura a esquerda apresenta as amplificações da reação de qPCR e a figura a direita apresenta a curva obtida na reação.

Tabela 14. Valores obtidos na qPCR da curva de eficiência para todos os iniciadores.

MARCADOR	SLOPE	R ²	EFICIÊNCIA
TspanCO029	-3,638	0,99	91%
E-Cadererina	-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%

5.2.4. EXPRESSÃO GÊNICA DAS AMOSTRAS POR qPCR

A técnica de qPCR permite quantificar diferenças no nível de expressão de um marcador específico (gene) entre as diferentes amostras.

Neste ensaio, as amostras parafinadas não apresentaram amplificação satisfatória, provavelmente devido à falta de integridade do RNA que foi extraído destas amostras, como foi apresentado no item 6.2.2.1 na análise de integridade do RNA com o kit Bioanalyzer *High Sensitivity* RNA Analysis, portanto não foram analisadas estatisticamente.

Já as amostras congeladas obtiveram amplificação para todos os marcadores analisados, exceto para o controle endógeno GAPDH, que foi retirado da análise por não apresentar Cts homogêneos. Além disso, não foi possível quantificar a expressão deste gene em todas as amostras analisadas.

Os resultados obtidos no qPCR apresentados na figura 20, representam a quantificação relativa da expressão gênica de cada marcador para grupo de amostras positivas (33 amostras), normalizada em relação ao gene constitutivo, o controle endógeno β-actina e calibrada com o controle de amostras negativas (26 amostras). Assim, foi possível analisar estatisticamente a partir dos valores obtidos de quantificação relativa (RQ) de cada amostra para cada marcador.

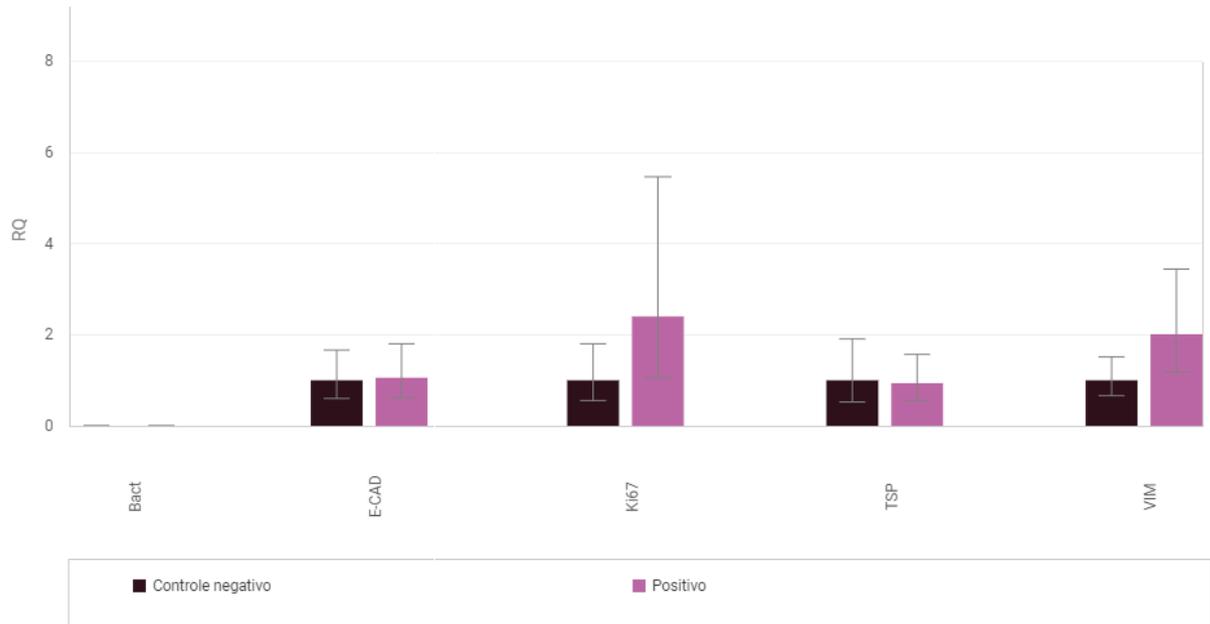


Figura 20. Valor médio de RQ e desvio padrão para os marcadores E-CAD (E-caderina); Ki67; TSP (tretaspanina CO029); VIM (Vimentina) e o controle endógeno Bact (β -actina), nos grupos Controle negativo e Positivo.

5.2.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR DAS AMOSTRAS CONGELADAS E CORRELAÇÃO COM VARIÁVEIS DO TUMOR E DO PACIENTE

Diante dos valores de RQ obtidos na qPCR, a normalidade dos dados foi avaliada e não foi obtida distribuição normal e, sim, distribuição não paramétrica, por isso o teste estatístico de comparação utilizado foi o de Mann Whitney e o teste para correlação foi através do cálculo de coeficiente de Spearman.

Neste sentido, os valores de RQ de cada amostra foram separados em dois grupos: grupo Positivo (33 amostras, total de amostras são 34, porém com 1 exclusão) e grupo Negativo (26 amostras, total de amostras são 34, porém com 8 exclusões) apresentados no gráfico 1 para cada marcador. Para o teste de Mann Whitney, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos devido ao grande desvio padrão das amostras do grupo positivo.

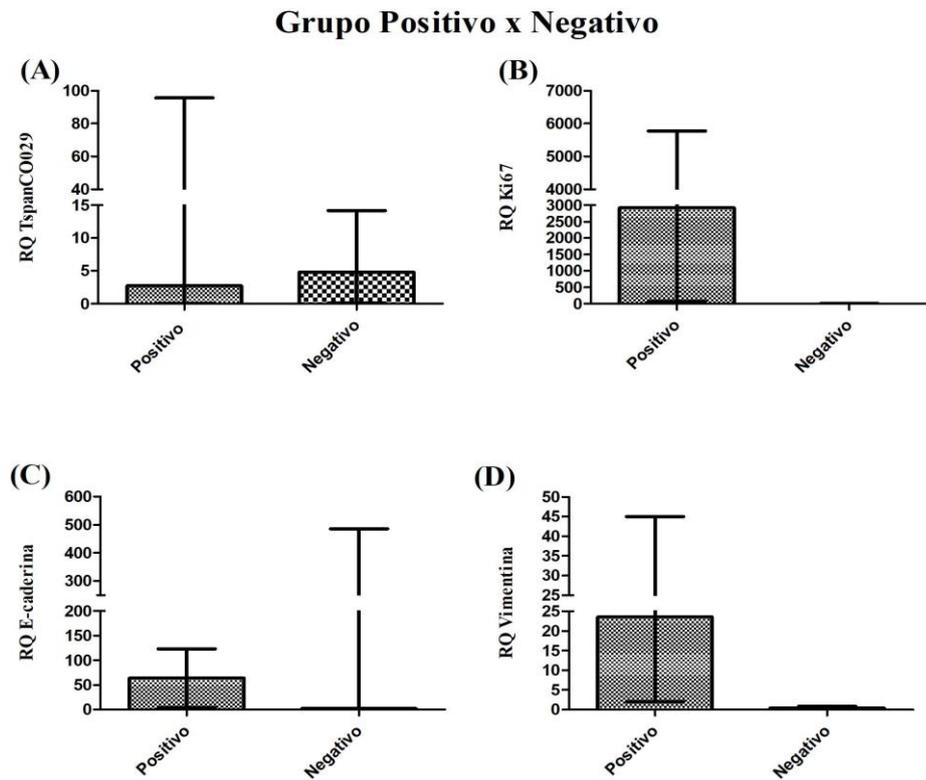


Figura 21. Valor da mediana de RQ e diferenças interquartis para os marcadores TspanCO029, Ki67, E-caderina e Vimentina para os grupos Positivo e Negativo. A análise estatística Mann Whitney não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados nos quatro marcadores do experimento de qPCR.

Para a análise do coeficiente de correlação de Spearman, correlacionando os marcadores dentro do grupo de amostras positivas, foram encontradas algumas relações fortes que estão apresentadas no gráfico 2. Houve correlação entre as expressões de TspanCo029 e Ki67 (coeficiente 0,6588) (gráfico 7 A), TspanCO029 e E-caderina (coeficiente 0,6674) (gráfico 7 B), Ki67 e RQ E-caderina (coeficiente 0,5979) (gráfico 7 C) e Ki67 e Vimentina (coeficiente 0,5612) (gráfico 7 D) nas amostras positivas para CCR de ambas as lateralidades de tumor primário.

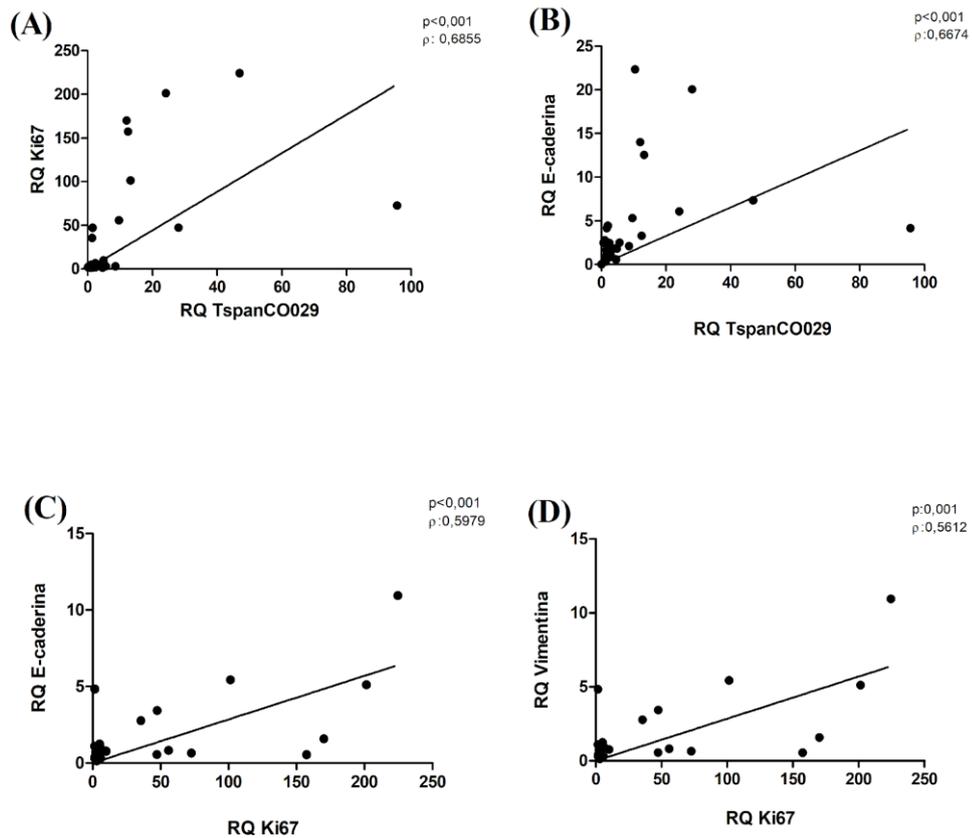


Figura 22. Coeficiente de correlação de Spearman. RQ das amostras positivas para cada marcador, correlacionando RQ TspanCo029 e RQ Ki67 (A); RQ TspanCO029 e RQ E-caderina (B); RQ Ki67 e RQ E-caderina (C) e RQ Ki67 e RQ Vimentina (D). Apresenta no canto superior direito valor de p e o valor do coeficiente de Spearman.

Para o grupo das amostras negativas a relação apresentou-se forte entre (gráfico 3) a expressão de TspanCO029 e E-caderina (coeficiente 0,5774) (gráfico 3A), Ki67 e E-caderina (coeficiente 0,5426) (gráfico 3B) e E-caderina e Vimentina (coeficiente 0,6691) (gráfico 3C).

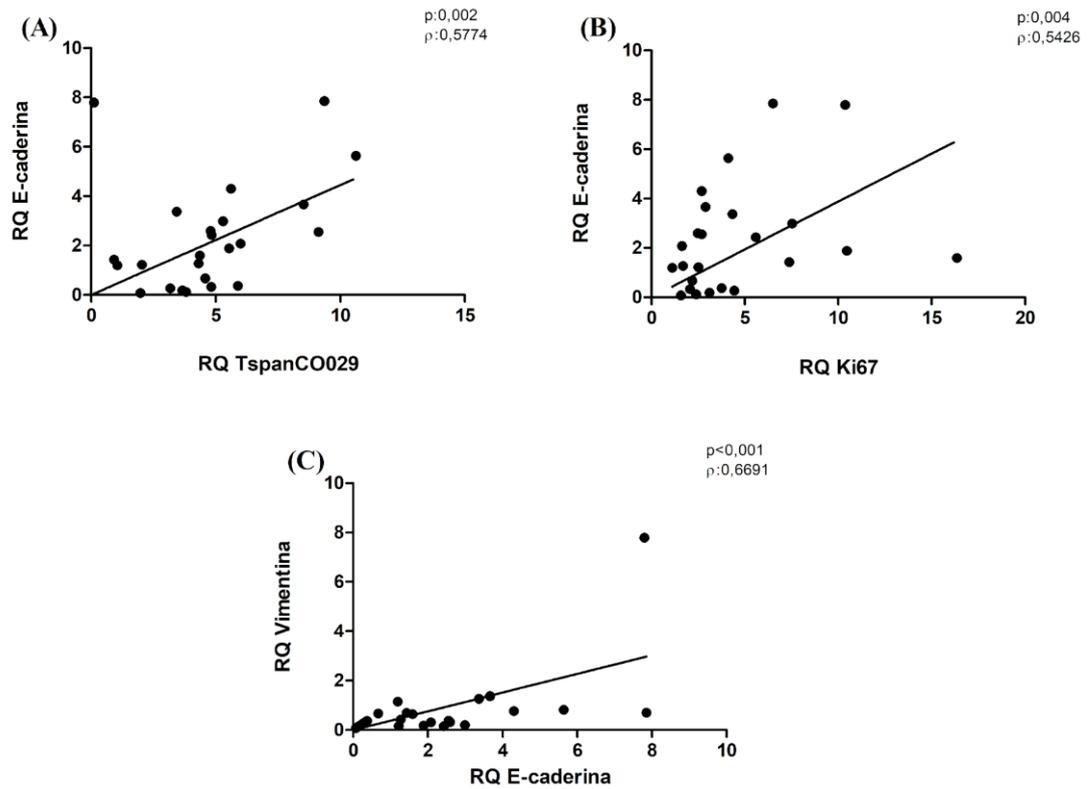


Figura 23. Coeficiente de correlação de Spearman. RQ das amostras positivas para cada marcador, correlacionando RQ TspanCO029 e RQ E-caderina; RQ Ki67 e RQ E-caderina e RQ E-caderina e RQ Vimentina. Apresenta no canto superior direito valor de p e o valor do coeficiente de Spearman.

Posteriormente, foram avaliados por teste de Mann Whitney os grupos de lateralidade: Cólón Direito – Positivo (13 amostras), Cólón Direito – Negativo (11 amostras), Cólón Esquerdo – Positivo (20 amostras) e Cólón Esquerdo – Negativo (15 amostras) apresentados no gráfico 4. Não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados.

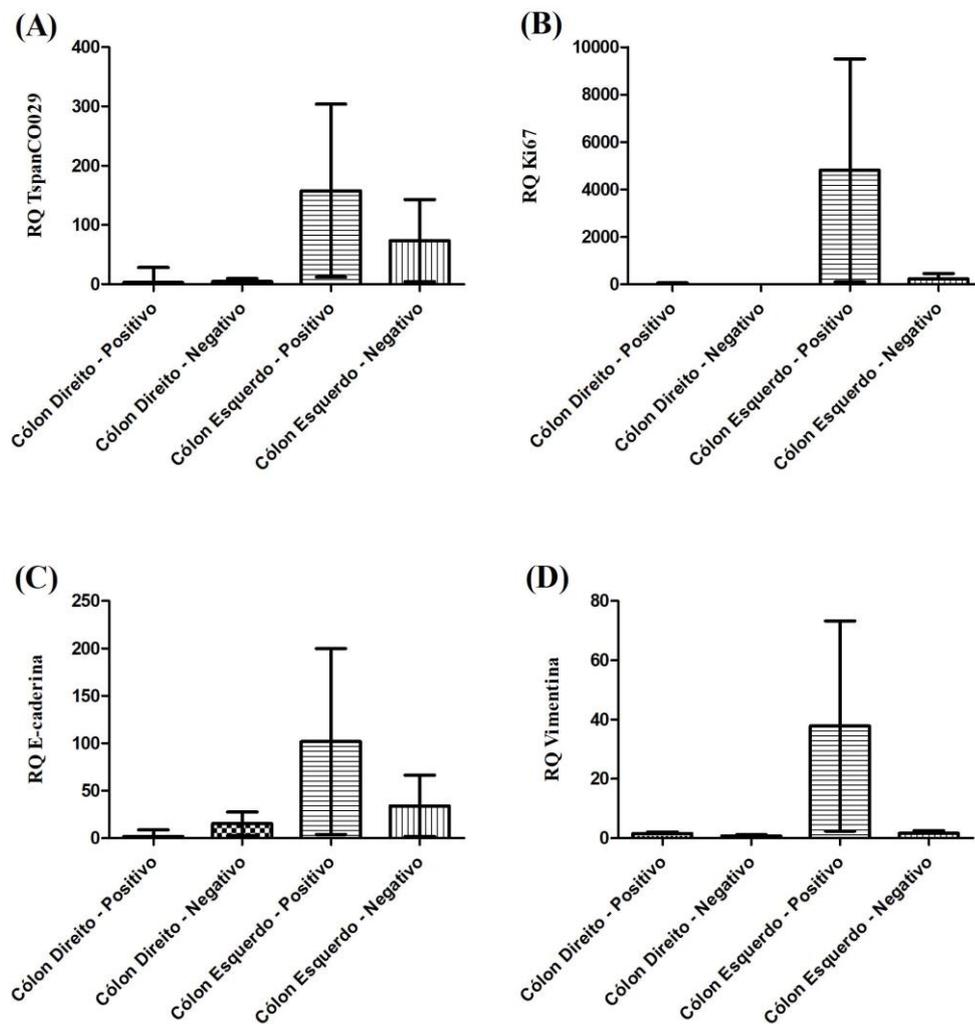


Figura 24. Valor da mediana de RQ e diferenças interquartis para os marcadores TspanCO029, Ki67, E-caderina e Vimentina para os grupos Cólón Direito –Positivo; Cólón Direito – Negativo; Cólón Esquerdo – Positivo; Cólón Esquerdo – Negativo. A análise estatística Mann Whitney não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados nos quatro marcadores do experimento de qPCR.

Na análise de Spearman para os grupos de lateralidade do tumor primário para as amostras positivas, observou-se uma forte correlação para alguns marcadores, como mostrada no gráfico 5, para o grupo de amostras Cólón Esquerdo e, no gráfico 6, para o grupo de amostras Cólón Direito.

Para o grupo de amostras do Cólón Esquerdo, houve correlação entre a expressão de TspanCo029 e Ki67 (coeficiente 0,618), TspanCO029 e E-caderina (coeficiente 0,6075) e Ki67 e Vimentina (coeficiente 0,6361), como mostrado no gráfico 5, respectivamente em A, B e C.

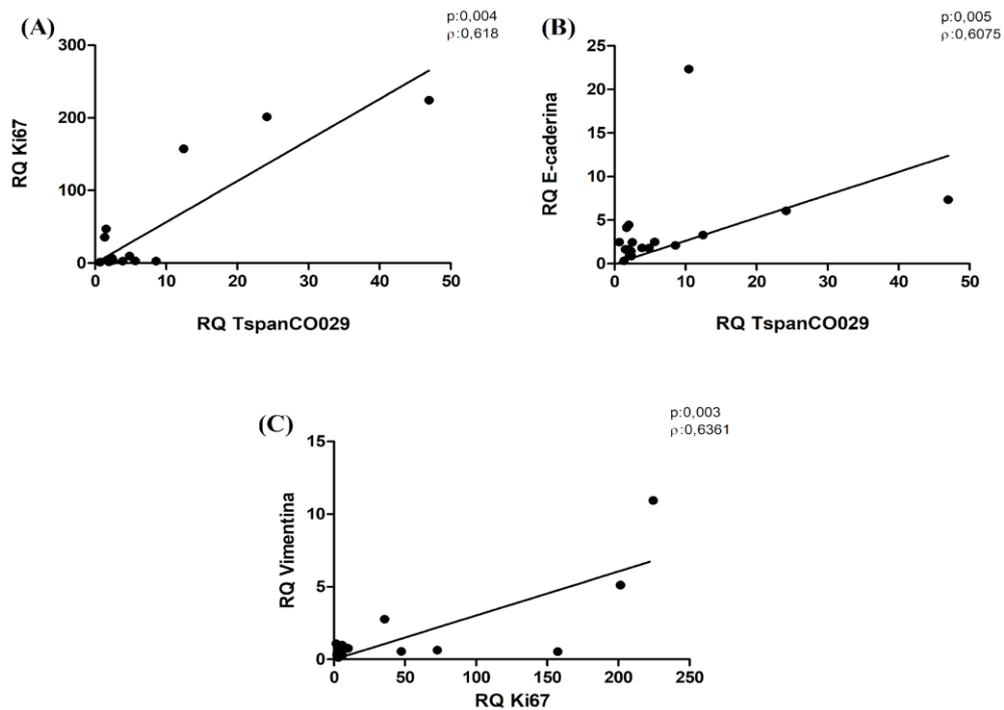


Figura 25. Coeficiente de correlação de Spearman. RQ das amostras positivas cólon esquerdo para cada marcador, correlacionando RQ TspanCo029 e RQ Ki67; RQ TspanCO029 e RQ E-caderina e RQ Ki67 e RQ Vimentina. Apresenta no canto superior direito valor de p e o valor do coeficiente de Spearman.

Importante pontuar que especialmente para as amostras positivas com tumor primário no cólon direito houve forte correlação na expressão conjunta de TspanCO029 com os três marcadores: Ki67 (coeficiente 0,6374), E-caderina (coeficiente 0,6758) e Vimentina (coeficiente 0,7527), sendo que para as amostras positivas do cólon esquerdo não houve correlação entre TspanCO029 e Vimentina. E também apresentou correlação entre a expressão de Ki67 e E-caderina (coeficiente 0,8516) (tabela 15 e gráfico 6).

Tabela 15. Coeficiente de correlação de Spearman. Amostras positivas Cólon Esquerdo e Cólon Direito.

Amostras positivas				
Cólon Esquerdo	RQ TspanCO029	RQ Ki67	RQ E-caderina	RQ Vimentina
RQ TspanCO029	1	0,004	0,005	0,420
RQ Ki67	0,618*	1	0,082	0,003
RQ E-caderina	0,6075*	0,3985	1	0,141
RQ Vimentina	0,191	0,6361*	0,3414	1

Cólon Direito	RQ TspanCO029	RQ Ki67	RQ E-caderina	RQ Vimentina
RQ TspanCO029	1	0,0191	0,011	0,003
RQ Ki67	0,6374*	1	0,000	0,174
RQ E-caderina	0,6758*	0,8516*	1	0,297
RQ Vimentina	0,7527*	0,4011	0,3132	1

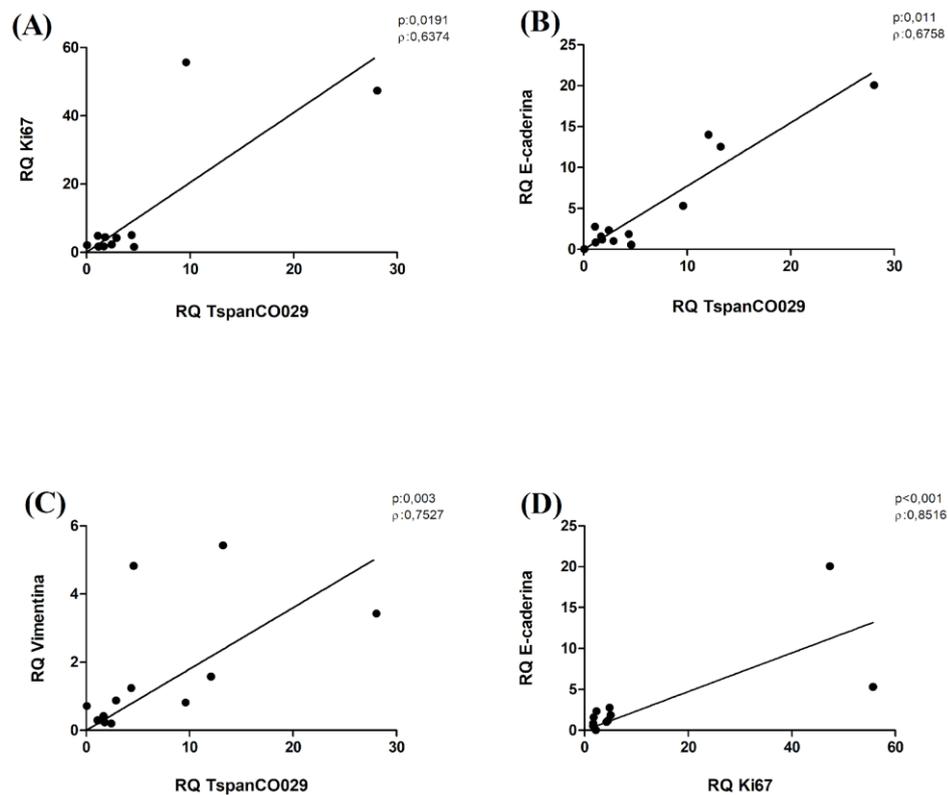


Figura 26. Coeficiente de correlação de Spearman. RQ das amostras positivas cólon direito para cada marcador, correlacionando RQ TspanCo029 com RQ Ki67; RQ E-caderina e RQ Vimentina. Além de RQ Ki67 e RQ E-caderina. Apresenta no canto superior direito valor de p e o valor do coeficiente de Spearman.

A análise feita para o grupo de amostras negativas de pacientes com tumor primário no cólon esquerdo mostrou correlação nas comparações entre a expressão de Ki67 e E-caderina (coeficiente 0,5143), Ki67 e Vimentina (coeficiente 0,5214), e E-caderina e Vimentina

(coeficiente 0,6429) (gráfico 7). Já nas amostras negativas de pacientes com tumor primário no cólon direito, houve correlação apenas entre a expressão de TspanCO029 e E-caderina (coeficiente 0,7091), e Ki67 e E-caderina (coeficiente 0,7273) como apresentado no gráfico 8.

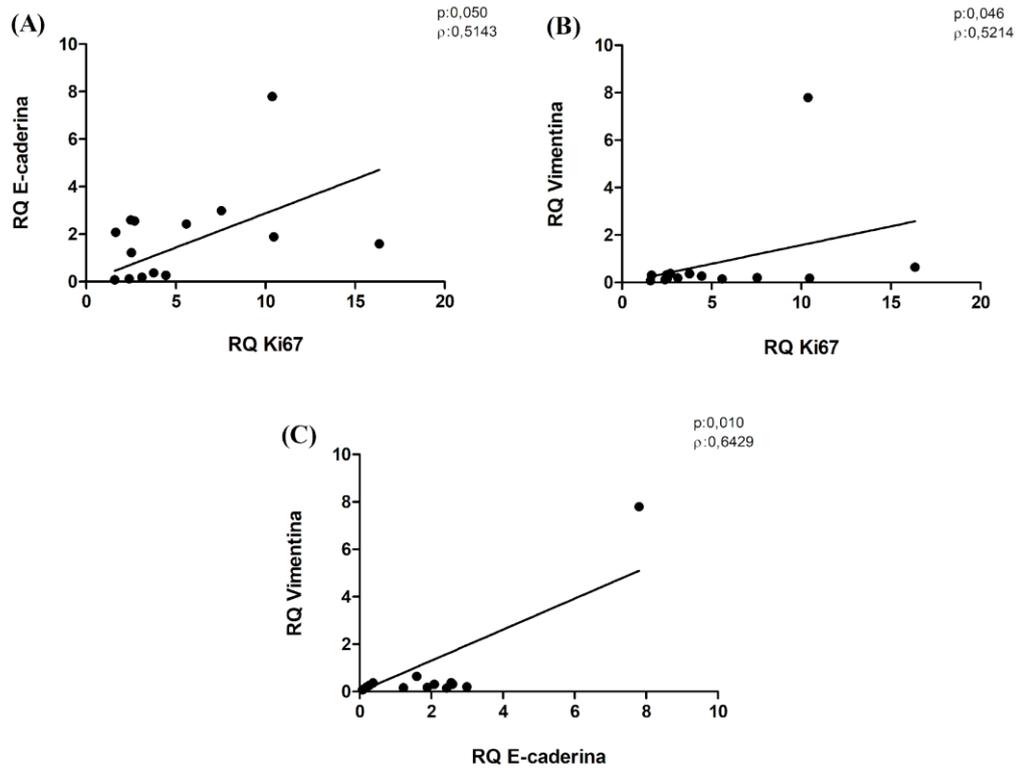


Figura 27. Coeficiente de correlação de Spearman. RQ das amostras negativas cólon esquerdo para cada marcador, correlacionando RQ Ki67, RQ E-caderina e RQ Vimentina. Apresenta no canto superior direito valor de p e o valor do coeficiente de Spearman.

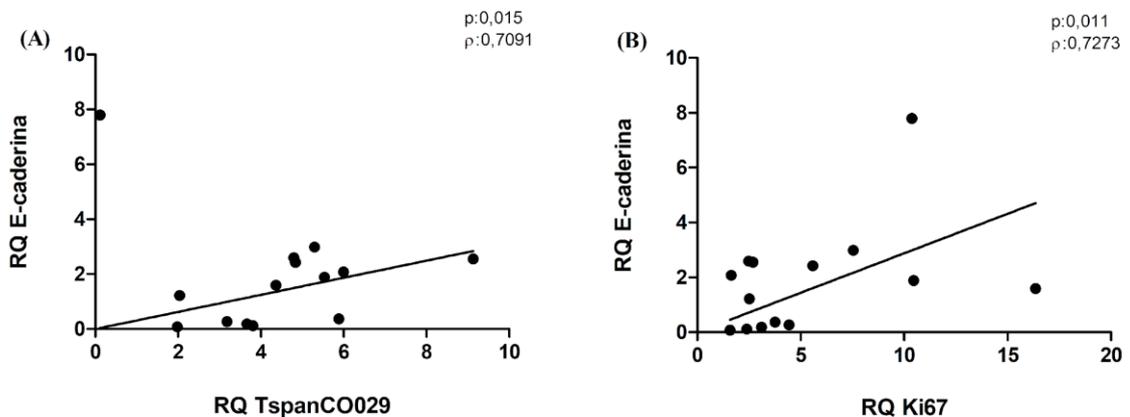


Figura 28. Coeficiente de correlação de Spearman. RQ das amostras negativas cólon direito para cada marcador, correlacionando RQ E-caderina, RQ TspanCO029, e RQ Ki67. Apresenta no canto superior direito valor de p e o valor do coeficiente de Spearman.

A comparação da variável de histórico familiar, com a expressão dos marcadores está representada no gráfico 9 e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos com histórico familiar de câncer (grupo COM HF) com 16 amostra e sem histórico familiar de câncer (grupo SEM HF) com 17 amostras.

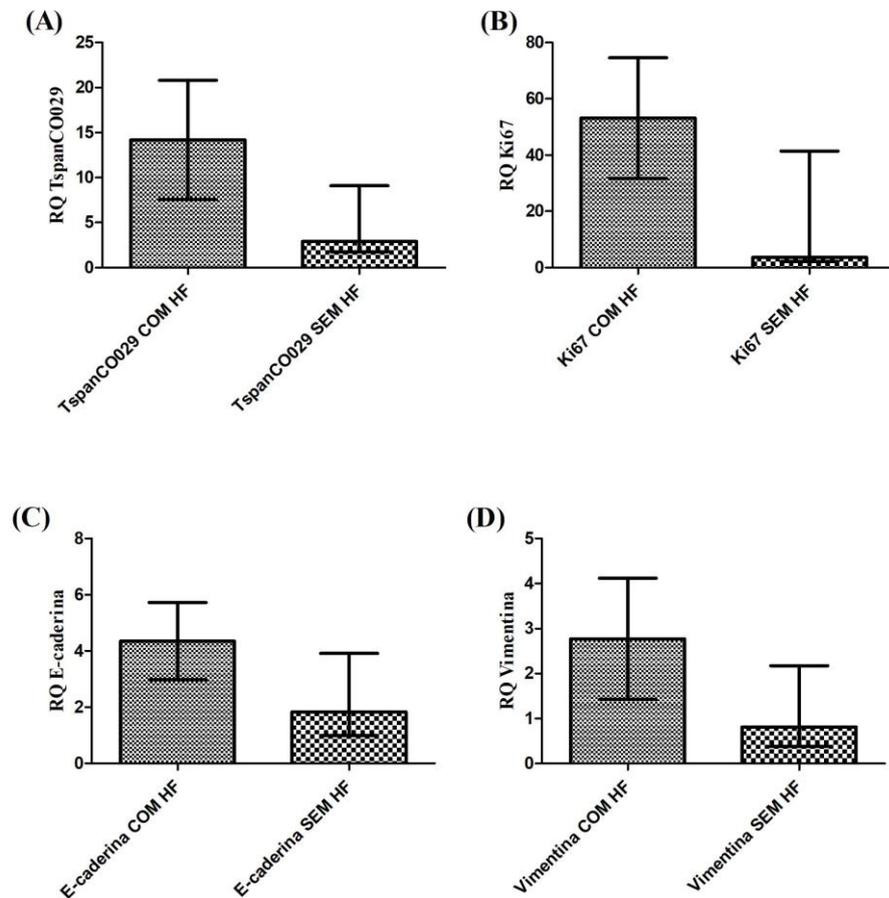


Figura 29. Valor da mediana de RQ e diferenças interquartis para os marcadores TspanCO029, Ki67, E-caderina e Vimentina para os grupos Sim e Não para histórico familiar. A análise estatística Mann Whitney não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados nos quatro marcadores do experimento de qPCR.

A comparação da variável de linfonodos acometidos com metástase, com a expressão dos marcadores está representada no gráfico 10 e também não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de linfonodos acometidos (LA) com 15 amostras e o grupo de linfonodos Não acometidos (LNA) com 18 amostras (gráfico 10).

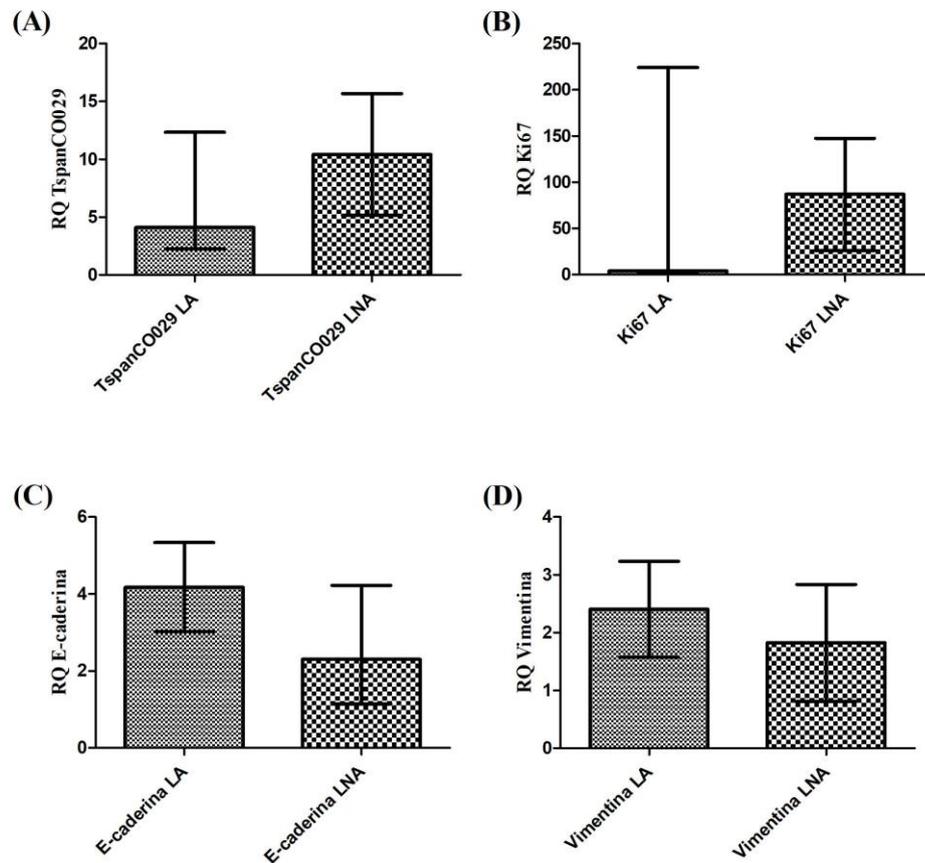


Figura 30. Valor da mediana de RQ e diferenças interquartis para os marcadores TspanCO029, Ki67, E-caderina e Vimentina para os grupos Sim e Não para Linfonodos acometidos. A análise estatística Mann Whitney não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados nos quatro marcadores do experimento de qPCR.

Quando os dados foram analisados em relação ao sexo, foi visto que as amostras negativas do grupo feminino apresentaram expressão significativa para E-caderina em comparação com o grupo masculino ($p = 0,026$) (gráfico 11).

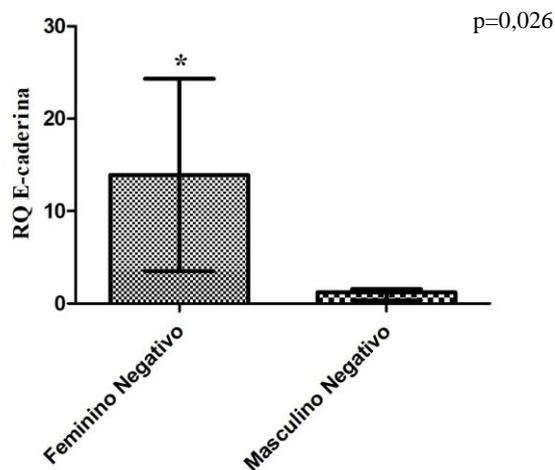


Figura 31. Valor da mediana de RQ e diferenças interquartis para os marcadores TspanCO029, Ki67, E-caderina e Vimentina para os grupos Feminino e Masculino. A análise estatística Mann Whitney mostrou diferenças estatisticamente significativas para o marcador E-caderina, com maior expressão no grupo Feminino. Valor de $p = 0,026$.

Da mesma forma, para variável idade, quando comparada os RQs dos marcadores para os grupos de 38 a 60 anos, de 61 a 70 e acima de 70, foi visto que as amostras do primeiro grupo apresentaram maior expressão que os outros grupos para os marcadores Ki67 ($p=0,032$) e Vimentina ($p=0,004$) (gráfico 12).

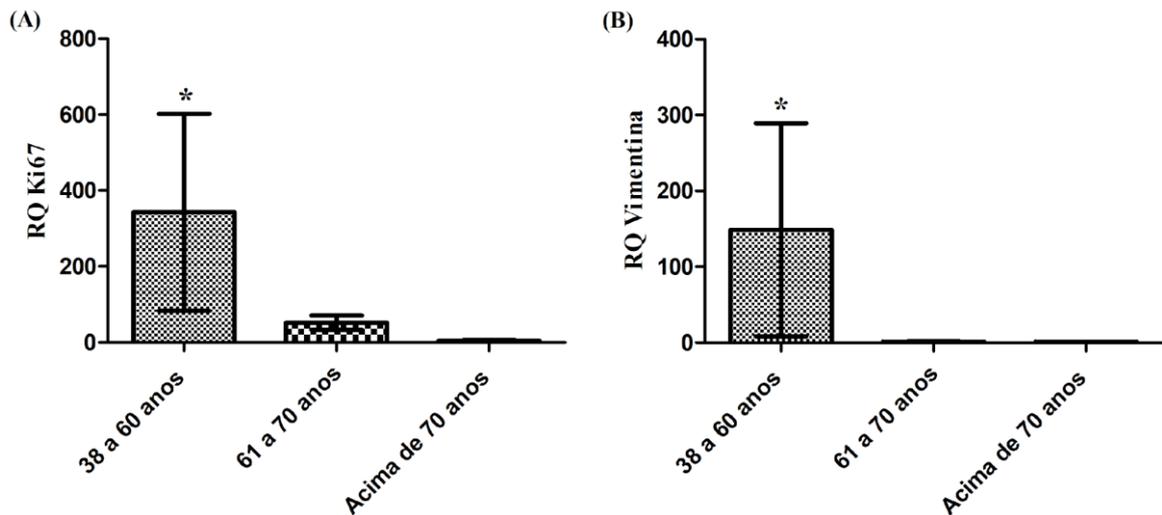


Figura 32. Valor da mediana de RQ e diferenças interquartis para os marcadores TspanCO029, Ki67, E-caderina e Vimentina para os grupos de idade 38 a 60; 61 a 70 e Acima de 70. A análise estatística Mann Whitney mostrou diferenças estatisticamente significativas para o grupo de 38 a 60 anos, para os marcadores Ki67 e Vimentina, com valor de $p=0,032$ e $0,004$ respectivamente.

5.3. PRODUÇÃO RECOMBINANTE DA PROTEÍNA TETRASPANINA CO029

5.3.1 AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO GENE DE INTERESSE

O fragmento gênico correspondente a TspanCO029 apresentou bom nível de amplificação a partir do cDNA da célula de adenocarcinoma, linhagem HT29, sendo observado em perfil eletroforético com tamanho esperado para o *amplicon* (714pb) e sem produção de artefatos de amplificação (Figura 21). Esse produto foi purificado do gel de agarose e serviu como molde para amplificação da sequência de TspanCO029 com os sítios para clonagem na plataforma Gateway® (Figura 22). O produto final então foi purificado por precipitação com etanol e os passos de inserção no vetor de entrada (pDONR) foram conduzidos.

Sequência de nucleotídeos de TSPAN8 (714nt):

```
ATGGCAGGTGTGAGTGCCTGTATAAAATATTCTATGTTTACCTTCAACTTCTTGTTCTGGCTATGT
GGTATCTTGATCCTAGCATTAGCAATATGGGTACGAGTAAGCAATGACTCTCAAGCAATTTTTGG
TTCTGAAGATGTAGGCTCTAGCTCCTACGTTGCTGTGGACATATTGATTGCTGTAGGTGCCATCAT
CATGATTCTGGGCTTCCTGGGATGCTGCGGTGCTATAAAAGAAAGTCGCTGCATGCTTCTGTTGTT
```

TTTCATAGGCTTGCTTCTGATCCTGCTCCTGCAGGTGGCGACAGGTATCCTAGGAGCTGTTTTCAA
 ATCTAAGTCTGATCGCATTGTGAATGAAACTCTCTATGAAAACACAAAGCTTTTGAGCGCCACAG
 GGGAAAGTGAAAAACAATTCCAGGAAGCCATAATTGTGTTTCAAGAAGAGTTTAAATGCTGCGG
 TTTGGTCAATGGAGCTGCTGATTGGGGAAATAATTTCAACACTATCCTGAATTATGTGCCTGTCT
 AGATAAGCAGAGACCATGCCAAAGCTATAATGGAAAACAAGTTTACAAAGAGACCTGTATTTCT
 TTCATAAAAGACTTCTTGGCAAAAAATTTGATTATAGTTATTGGAATATCATTGGACTGGCAGTT
 ATTGAGATACTGGGTTTGGTGTCTTCTATGGTCCTGTATTGCCAGATCGGGAACAAATGA.

Sequência de aminoácidos de TspanCO029 (237aa):

MAGVSACIKYSMFTFNFLFWLFCGILILALAIWVRVSNDSQAIFGSEDVGSSSYVAVDILIAVGAIIMILG
 FLGCCGAIKESRCMLLLFFIGLLILLQVATGILGAVFKSKSDRIVNETLYENTKLLSATGESEKQFQE
 AIIVFQEEFKCCGLVNGAADWGNNFQHYPELCACLDKQRPCQSYNGKQVYKETCISFIKDFLAKNLII
 VIGISFGLAVIEILGLVFSMVLYCQIGNK.

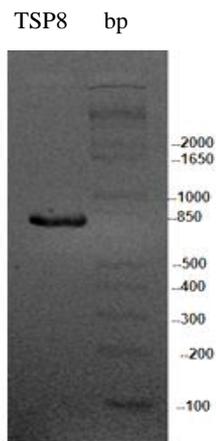


Figura 33. Perfil eletroforético da amplificação do gene TSPAN8 por PCR convencional. Como molde, foram usados 0,5 µg de cDNA da célula HT29 e pares de iniciador para o gene. Através do gel de agarose 1% e coloração por fluorescência usando o marcador *blue green* e leitura em aparelho transluminador com luz UV, foi possível identificar a banda correspondente ao gene de interesse com altura de aproximadamente 714bp.

TSP8 bp

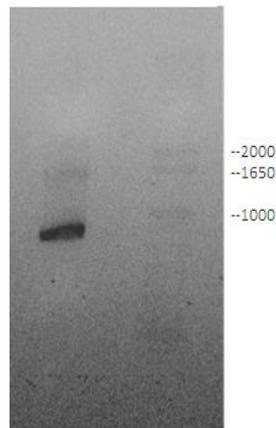


Figura 34. Perfil eletroforético da amplificação por PCR do gene TSPAN8 contendo sítios att. Como molde, foram usados 0,5 µg do *amplicon* de TSPAN8 previamente obtido por PCR convencional. Através do gel de agarose 1% e coloração por fluorescência usando o marcador *blue green* e leitura em aparelho transluminador com luz UV, foi possível identificar a banda correspondente ao gene de interesse com altura de aproximadamente 714bp.

5.3.2. REAÇÃO DE RECOMBINAÇÃO BP E OBTENÇÃO DO CLONE DE ENTRADA

A reação de recombinação BP foi realizada entre o cDNA de HT29 contendo os sítios att e o vetor de entrada pDONR sendo o recombinante inserido na linhagem bacteriana *E. coli* cepa TOP10 no volume de 50µl. O DNA plasmideal extraído de duas colônias foi usado como molde em PCR, junto com iniciadores para o gene TSPAN8, além dos iniciadores M13, que flanqueiam o sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo, para confirmação da presença dos genes-marcador nos clones (Figura 23). Pela análise do perfil eletroforético dos produtos de PCR percebe-se a presença dos insertos corretos nos plasmídeos recombinantes então usados na transformação bacteriana na próxima etapa e dosagem em nanodrop colônia 1 = 112,8ng/µl e colônia 2 =74,9ng/µl.

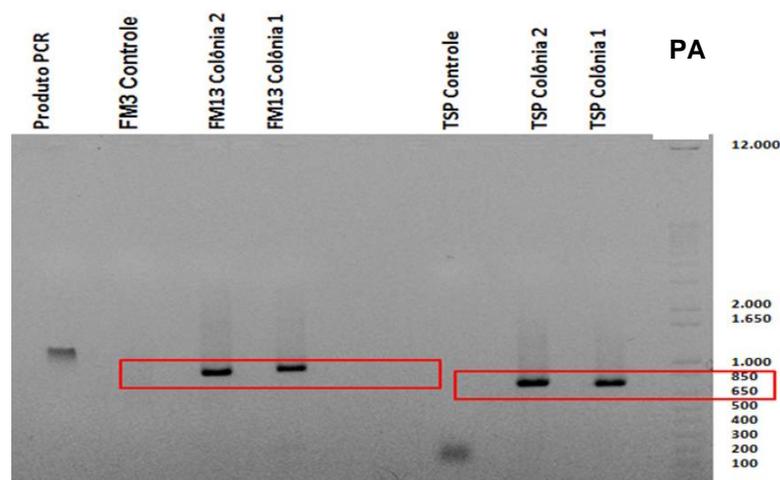


Figura 35. Perfil eletroforético dos clones de entrada. Duas colônias (TSP Colônia 1 e TSP Colônia 2) foram submetidas a PCR de colônia com confirmação da presença do gene de interesse, concentração colônia 1 = 112,8ng/μl e colônia 2 =74,9ng/μl. Foi possível visualizar bandas correspondentes ao gene de interesse também no teste controle com primer senso FM13 e anti-senso da TSP, mostrando a inserção correta no plasmídeo.

A confirmação posterior foi realizada por sequenciamento dos mesmos plasmídeos purificados, sendo realizados pela Plataforma de sequenciamento de DNA - SANGER - RPT01E e apresentou 99% de identidade com o gene de interesse (figura 24).

Download v GenBank Graphics

PREDICTED: Homo sapiens tetraspanin 8 (TSPAN8), transcript variant X1, mRNA
Sequence ID: [XM_017019913.2](#) Length: 1122 Number of Matches: 1

Range 1: 168 to 881 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1308 bits(708)	0.0	712/714(99%)	0/714(0%)	Plus/Plus
Query 464	ATGGCAGGTGTGAGTGCCTGTATAAAAATTTCTATGTTTACCTTCAACTTCTTGTCTCG	523		
Sbjct 168	ATGGCAGGTGTGAGTGCCTGTATAAAAATTTCTATGTTTACCTTCAACTTCTTGTCTCG	227		
Query 524	CTATGTGGTATCTTGATCCTAGCATTAGCAATATGGGTACGAGTAAGCAATGACTCTCAA	583		
Sbjct 228	CTATGTGGTATCTTGATCCTAGCATTAGCAATATGGGTACGAGTAAGCAATGACTCTCAA	287		
Query 584	GCAATTTTTGGTTCTGAAGATGTAGGCTCTAGCTCTACGTTGCTGTGGACATATTGATT	643		
Sbjct 288	GCAATTTTTGGTTCTGAAGATGTAGGCTCTAGCTCTACGTTGCTGTGGACATATTGATT	347		
Query 644	GCTGTAGGTGCCATCATCATGATTCTGGGCTTCTGGGATGCTGCGGTGCTATAAAAGAA	703		
Sbjct 348	GCTGTAGGTGCCATCATCATGATTCTGGGCTTCTGGGATGCTGCGGTGCTATAAAAGAA	407		
Query 704	AGTCGCTGCATGCTTCTGTTGTTTTTCATAGGCTTGCTTCTGATCCTGCTCCTGCAGGTG	763		
Sbjct 408	AGTCGCTGCATGCTTCTGTTGTTTTTCATAGGCTTGCTTCTGATCCTGCTCCTGCAGGTG	467		
Query 764	GCGACAGGTATCCTAGGAGCTGTTTTCAAACTAAGTCTGATCGCATTGTGAATGAAACT	823		
Sbjct 468	GCGACAGGTATCCTAGGAGCTGTTTTCAAACTAAGTCTGATCGCATTGTGAATGAAACT	527		
Query 824	CTCTATGAAAAACAACAACTTTTGAGCGCCACAGGGGAAAGTGAAAAACAATTCAGGAA	883		
Sbjct 528	CTCTATGAAAAACAACAACTTTTGAGCGCCACAGGGGAAAGTGAAAAACAATTCAGGAA	587		
Query 884	GCCATAATTGTGTTTCAAGAAGAGTTTAAATGCTGCGGTTTGGTCAATGGAGCTGCTGAT	943		
Sbjct 588	GCCATAATTGTGTTTCAAGAAGAGTTTAAATGCTGCGGTTTGGTCAATGGAGCTGCTGAT	647		
Query 944	TGGGAAATAATTTTCAACACTATCCTGAATTATGTGCTGTCTAGATAAGCAGAGACCA	1003		
Sbjct 648	TGGGAAATAATTTTCAACACTATCCTGAATTATGTGCTGTCTAGATAAGCAGAGACCA	707		
Query 1004	TGCCAAGCTATAATGGAAAAACAAGTTTACAAGAGACCTGTATTTCTTTCATAAAAAGAC	1063		
Sbjct 708	TGCCAAGCTATAATGGAAAAACAAGTTTACAAGAGACCTGTATTTCTTTCATAAAAAGAC	767		
Query 1064	TTCTTGGCAAAAAATTTGATTATAGTTATTGGAATATCATTGGACTGGCAGTTATTGAG	1123		
Sbjct 768	TTCTTGGCAAAAAATTTGATTATAGTTATTGGAATATCATTGGACTGGCAGTTATTGAG	827		
Query 1124	ATACTGGGTTTGGTCTTTCTATGGTCTGTATTGCCAGATCGGGAAACAAATGA	1177		
Sbjct 828	ATACTGGGTTTGGTCTTTCTATGGTCTGTATTGCCAGATCGGGAAACAAATGA	881		

Figura 36. Resultados do sequenciamento avaliado no software *Blast* com 99% de identidade com o gene de interesse TSPAN8.

5.3.3. REAÇÃO DE RECOMBINAÇÃO LR E OBTENÇÃO DO CLONE DE EXPRESSÃO

A reação de recombinação LR foi realizada entre o clone de entrada 1 e o vetor de destino pEXP1-DEST e o recombinante foi usado em transformação da linhagem bacteriana *E. coli* DH5alfa. Esta etapa da produção foi realizada quatro vezes, e na quarta tentativa se obteve crescimento de várias colônias, sendo 15 selecionadas para realização do PCR de colônia e confirmação da inserção correta do gene de interesse. Essas colônias foram cultivadas tendo os DNAs plasmídios extraídos, purificados e sequenciados, confirmando a

presença do inserto, com 99% de identidade com o gene de interesse. Quinze plasmídeos (originados da recombinação da colônia 1) foram usados para transformar em bactérias de expressão *E. coli* DH5alfa, sendo a colônia LR14 selecionada para expressão (figura 25). As concentrações estão descritas na tabela 15.

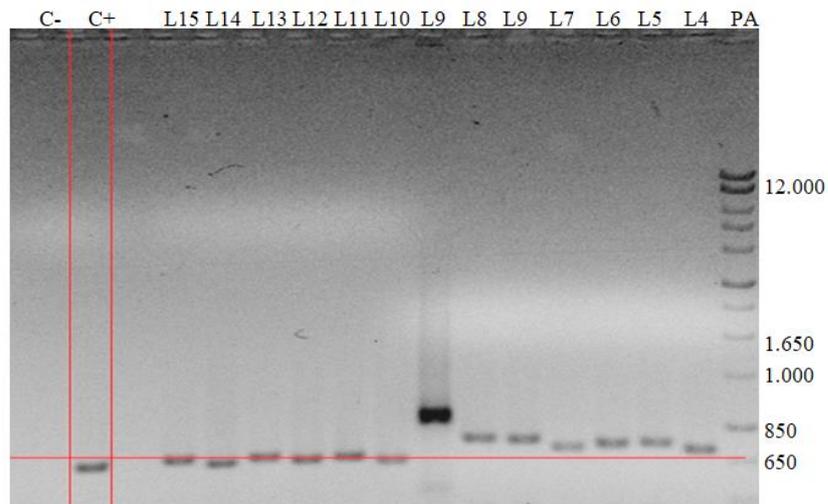


Figura 37. Perfil eletroforético dos clones de destino. 15 colônias foram submetidas a PCR para confirmação da presença do inserto. Controle positivo (C+) amplificação do gene de interesse de 714bp, controle negativo (C-) usando água RNase free. PA = padrão de peso molecular.

Tabela 16. Concentração de DNA plasmidial das colônias após a recombinação LR

Dosagem ng/ μ l

LR1=315
LR2=393,4
LR3=322,2
LR4=377,6
LR5=335,4
LR6=422
LR7=312,9
LR8= 374,1
LR9=323,8
LR10=262,5
LR11=503,1
LR12=388,1
LR13=293
LR14=475,9
LR15=329,9

A confirmação posterior foi realizada por sequenciamento dos mesmos plasmídeos purificados, sendo também realizados na Plataforma de sequenciamento de DNA - SANGER - RPT01E e apresentou 99% de identidade com a proteína de interesse a qual foi produzida (figura 26).

Download ▾ GenBank Graphics

PREDICTED: Homo sapiens tetraspanin 8 (TSPAN8), transcript variant X1, mRNA
Sequence ID: [XM_017019913.2](#) Length: 1122 Number of Matches: 1

Range 1: 168 to 881 GenBank Graphics ▾ Next Match ▴ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1293 bits(700)	0.0	711/716(99%)	2/716(0%)	Plus/Plus
Query 461	ATGGCAGGTGTGAGTGCCTGTATAAAAATATTCTATGTTTACCTTCAACTCTCTGTTCTG	520		
Sbjct 168	ATGGCAGGTGTGAGTGCCTGTAT-AAAATATTCTATGTTTACCTTCAACTCTCTGTTCTG	226		
Query 521	GCTATGTGGTATCTTGATCCTAGCATTAGCAATATGGGTACGAATAAGCAATGACTCTCA	580		
Sbjct 227	GCTATGTGGTATCTTGATCCTAGCATTAGCAATATGGGTACGAATAAGCAATGACTCTCA	286		
Query 581	AGCAATTTTGGTCTGAAGATGTAGGCTCTAGCTCCTACGTTGCTGTGGACATAITGAT	640		
Sbjct 287	AGCAATTTTGGTCTGAAGATGTAGGCTCTAGCTCCTACGTTGCTGTGGACATAITGAT	346		
Query 641	TGCTGTAGTGCATCATCATGATTCCTGGGCTTCTGGCATGCTGCGGTGCTATAAAAAGA	700		
Sbjct 347	TGCTGTAGTGCATCATCATGATTCCTGGGCTTCTGGGATGCTGCGGTGCTATAAAAAGA	406		
Query 701	AAGTCGCTGCATGCTCTGTGTTTTTTCATAGGCTTGCCTCTGATCCTGCTCCTGCAAGT	760		
Sbjct 407	AAGTCGCTGCATGCTCTGTGTTTTTTCATAGGCTTGCCTCTGATCCTGCTCCTGCAAGT	466		
Query 761	GGCGACAGGTATCCTAGGAGCTGTTTTCAAATCTAAGTCTGATCGCATTGTGAATGAAAC	820		
Sbjct 467	GGCGACAGGTATCCTAGGAGCTGTTTTCAAATCTAAGTCTGATCGCATTGTGAATGAAAC	526		
Query 821	TCTCTATGAAAAACAAAAGCTTTTGAGCCACACAGGGGAAAGTAAAAACAATTCAGGA	880		
Sbjct 527	TCTCTATGAAAAACAAAAGCTTTTGAGCCACACAGGGGAAAGTAAAAACAATTCAGGA	586		
Query 881	AGCCATAATTGTGTTTTCAAGAAGAGTTTAAATGCTGCGGTTTGGTCAATGGAGCTGCTGA	940		
Sbjct 587	AGCCATAATTGTGTTTTCAAGAAGAGTTTAAATGCTGCGGTTTGGTCAATGGAGCTGCTGA	646		
Query 941	TTGGGAAATAATTTTCAACACTATCCTGAATTATGTGCTGCTAGATAAGCAGAGACC	1000		
Sbjct 647	TTGGGAAATAATTTTCAACACTATCCTGAATTATGTGCTGCTAGATAAGCAGAGACC	706		
Query 1001	ATGCCAAAGCTATAATGGAAAAACAAGTTTACAAGAGACCTGTATTTCTTTCATAAAAAGA	1060		
Sbjct 707	ATGCCAAAGCTATAATGGAAAAACAAGTTTACAAGAGACCTGTATTTCTTTCATAAAAAGA	766		
Query 1061	CTTCTGGCAAAAAGAAATTTGATTAGTTTATGGAAATAGCATTGGACTGGCAGTATTGG	1120		
Sbjct 767	CTTCTGGCAAAA- AATTTGATTAGTTTATGGAAATAGCATTGGACTGGCAGTATTGG	825		
Query 1121	AGATACTGGGTTTGGTGTTTTCTATGGTCTGTATTGCCAGATCGGGAACAATGA	1176		
Sbjct 826	AGATACTGGGTTTGGTGTTTTCTATGGTCTGTATTGCCAGATCGGGAACAATGA	881		

Figura 38. Resultados do sequenciamento avaliado no software *Blast* com 99% de identidade com o gene de interesse TSPAN8.

5.3.4. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE TspanCO029r

Para expressão da proteína TspanCo029 recombinante foi testada em diferentes condições para a indução com IPTG. A condição escolhida foi 0,5mM IPTG (Figura 25) (para concentrações maiores que 0,5mM IPTG não houve acréscimo importante na expressão. Portanto não justificaria gastar adicionalmente IPTG sem melhora proporcional do rendimento) a 37°C por 4 h (figura 27 e 28). A proteína foi expressa em ambas as frações solúvel e insolúvel (figura 29), sendo mais significativa na fração insolúvel. Com a condição adequada, deu-se então início a etapa de produção em maior escala induzindo-se 1 litro de cultura da bactéria recombinante em meio LB.

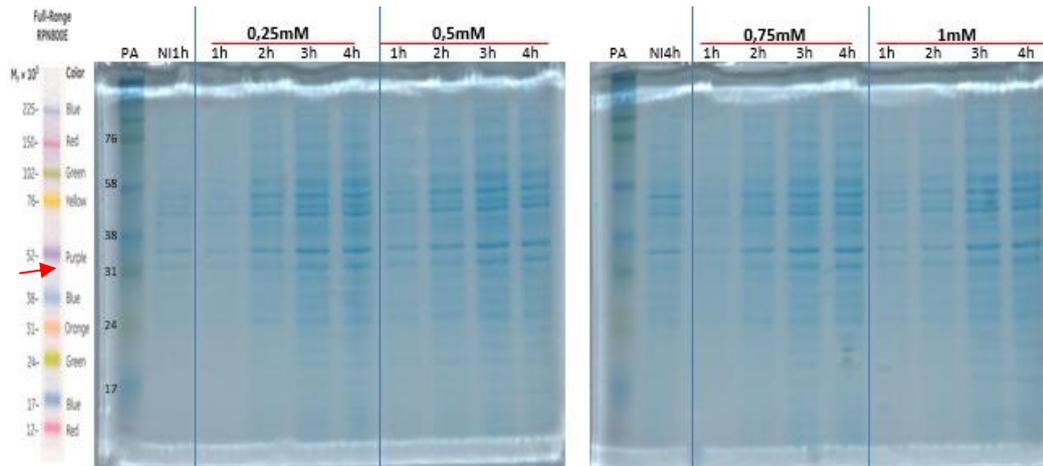


Figura 39. Perfil eletroforético do produto da expressão de TspanCO029r em diferentes concentrações de IPTG, 0,25mM, 0,5mM, 0,75mM e 1mM, em diferentes tempos de coleta. NI1h e NI4h: Não induzido 1 e 4 horas. 1h a 4h coletados de uma em uma hora após indução.

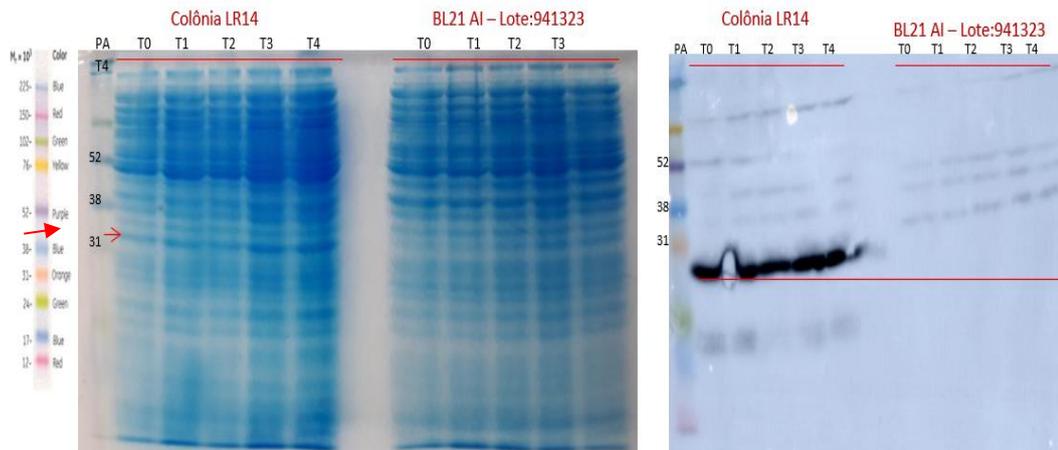


Figura 40. Perfil eletroforético do produto da expressão de TspanCO029r. Diferentes tempos de indução com de 0,5mM de IPTG. T0: Não induzido. T1 a T4 coletados de uma em uma hora após indução.

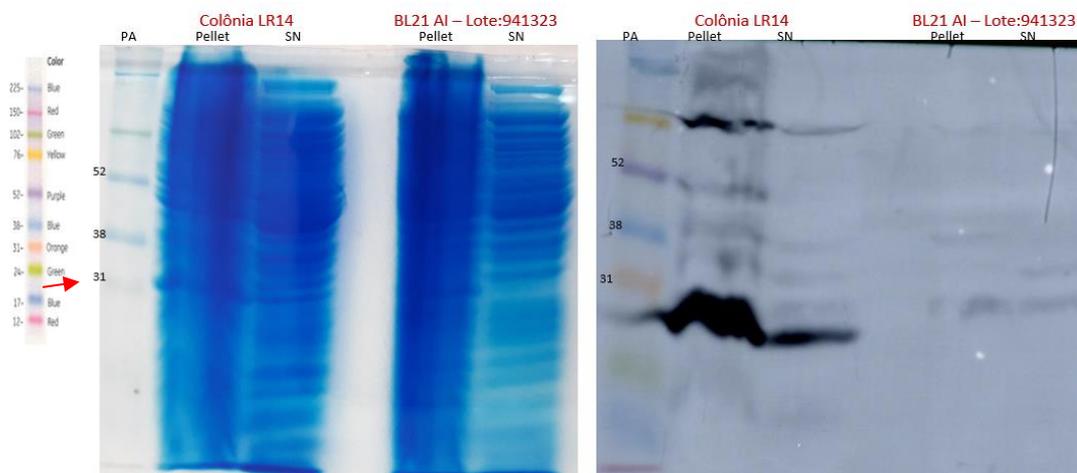


Figura 41. Perfil eletroforético do produto da expressão de TspanCO029r. Sobrenadante, fração solúvel, coletado após as respectivas lises bacterianas. *Peller*: fração Insolúvel.

Após indução e lise bacteriana, o lisado contendo a proteína recombinante foi purificado por cromatografia por afinidade em coluna de Níquel (Biorad) seguido de eluição com aumento da concentração de imidazol, bem como por variação de pH. A presença da proteína foi confirmada por *Westem Blot* usando o anticorpo contra a cauda de poli-histidina (anti-his) (figuras 30). A concentração final da proteína TspanCo029 recombinante foi de 1,63mg/ml.

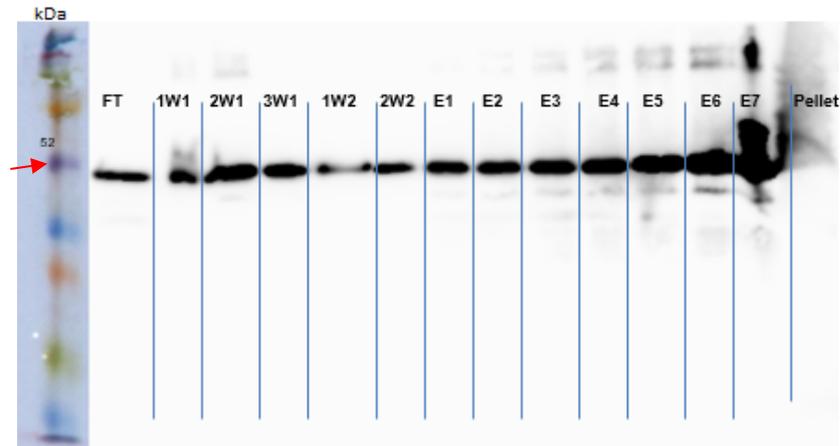


Figura 42. *Westem Blot* anti-his das eluições do produto da purificação de TSPCO029r. FT: *Flow Throu* (amostra que saiu da coluna), W1: *Whash Buffer* 1 pH 7,8, W2: *Whash Buffer* 2 pH 6,3 e E: *Elution Buffer* pH 4,3.

A proteína TspanCO029 recombinante foi avaliada por espectrometria de massas e demonstrou peso de aproximadamente 28 Kda, em comparação com o peso de 26kD (26.043,85) segundo informações do banco de dados de proteínas NCBI, 2017 (figura 31).

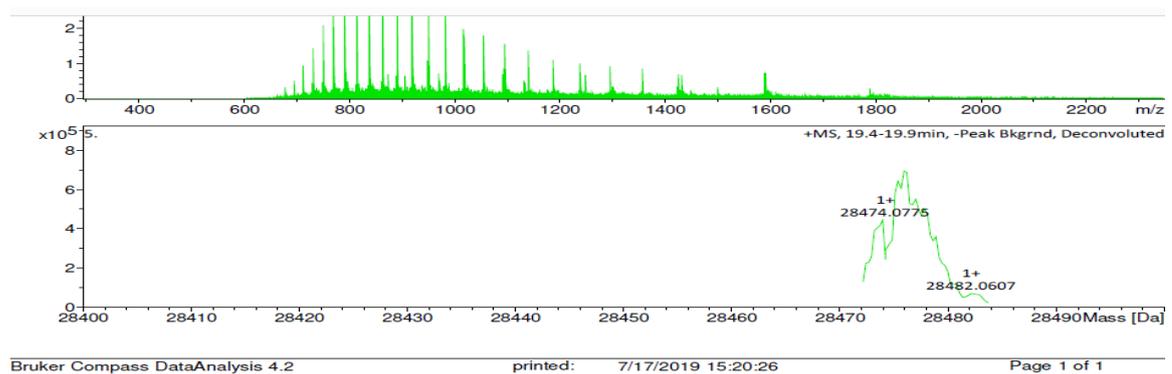


Figura 43. Resultado da espectrometria de massas. Identificação de peso 28474.0775 [Da].

5.4. PRODUÇÃO *IN VITRO* DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-TETRASPANINA CO029 (mAb-TspanCO029r)

5.4.1. IMUNIZAÇÃO

Foram realizadas seis imunizações, sendo a reatividade imunológica contra TspanCO029r confirmada por teste de ELISA com os soros dos camundongos (gráfico 13). Uma vez confirmada a produção de anticorpos por determinado camundongo, o mesmo foi eutanasiado, para esplenectomia.

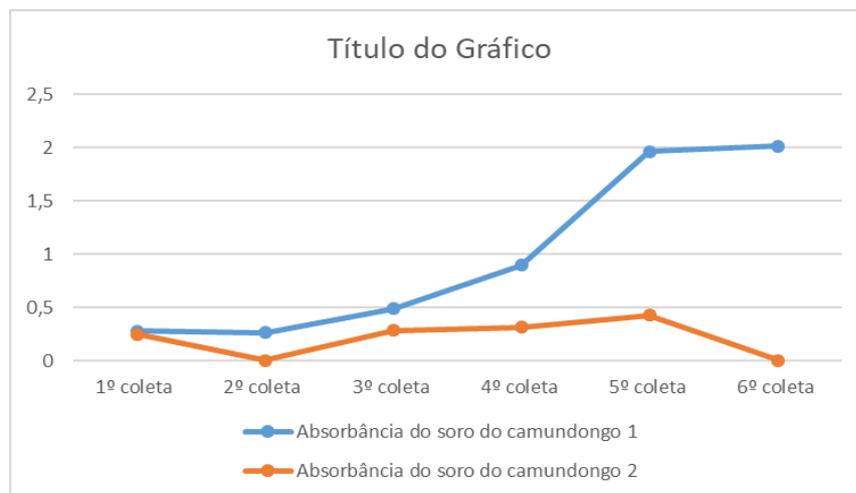


Gráfico 1. Absorbância do soro dos camundongos (1 e 2) imunizados. O eixo x apresenta o número de coletas realizadas de 15 em 15 dias, eixo y apresenta a absorbância do valor reativo na técnica de Elisa de cada soro coletado. Camundongo 1 obteve uma melhor imunização e seguiu para a etapa de fusão celular.

5.4.2 FUSÃO CELULAR

A fusão foi realizada com $2,8 \times 10^7$ de linfócitos B sendo $1.250 \mu\text{l}$ desta suspensão, assim como $2,8 \times 10^7$ sendo $250 \mu\text{l}$ de mielócitos, totalizando 15 placas de 96 poços com cultura de hibridomas.

O ELISA realizado com o sobrenadante da cultura confirmou nove poços positivos com hibridomas produtores de anticorpos policlonal conforme tabela 16. O clone P10F2 foi selecionado para obtenção de 700ml de sobrenadante para posterior purificação e pAbs e para clonagem. Hibridomas positivos para produção de anticorpos policlonais para TspanCO029r P.3B2, P.3C2, P.3C3, P.3E2, P.3E3, P.3E4, P.3D2, P.3D3 e P.10F2(++).

5.4.3 CLONAGEM

Após a clonagem do hibridoma policlonal P.10F2, cinco poços foram confirmados como produtores de anticorpos monoclonais pela técnica de ELISA (tabela 17). O clone P.1 11B foi expandido e de sua cultura (figura 32) foram coletados aproximadamente 600ml de

sobrenadante para posterior purificação. Foi realizado também o ELISA para identificação do subtipo da imunoglobulina (Ig) que foi positivo para IgG1. Hibridomas positivos para produção de anticorpos monoclonais para TspanCO029r P.1 4G, P.1 11B, P.1 11C (++), P.2 3G, P.2 8B.

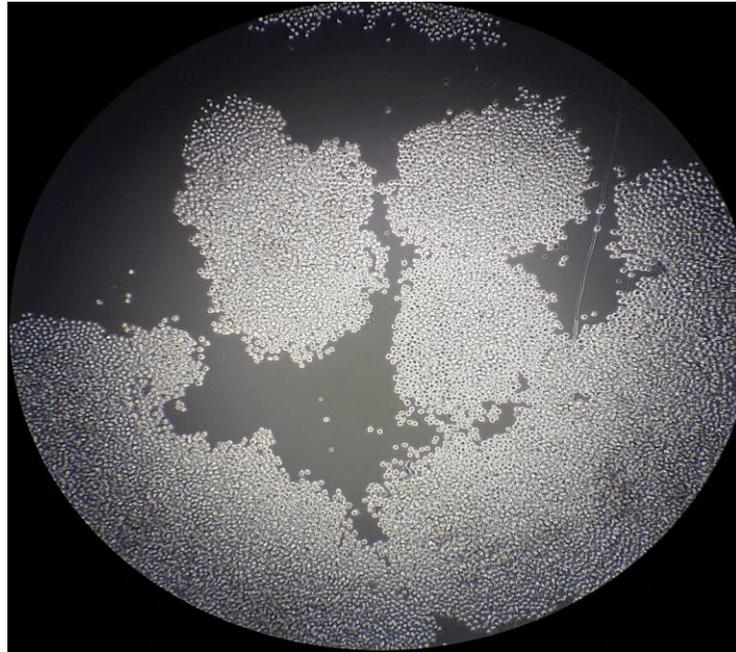


Figura 44. Cultura celular de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais anti-TspanCo029 ID P1.11C.

5.4.4 PURIFICAÇÃO

O anticorpo policlonal foi purificado e apresentou uma dosagem de 4,6mg/ml e de 1,09mg/ml para os monoclonais anti-TspanCO029r e apresentou antigenicidade com a proteína que foi utilizada na imunização. Conforme mostra a figura 33, a banda de 52 kDa é referente a cadeia pesado do anticorpo produzido *in vitro*.

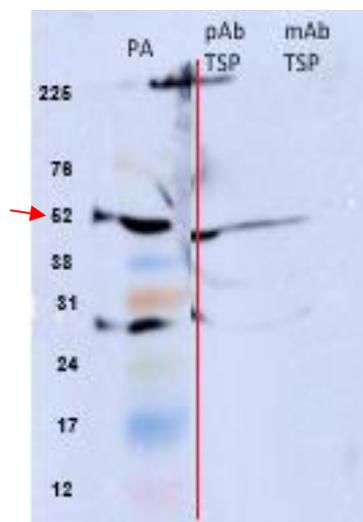


Figura 45. Western blot dos anticorpos policlonal e monoclonal produzidos *in vitro*. A banda visualizada na altura do peso molecular (PA) de 52 kDa corresponde a cadeia pesada dos anticorpos.

Ademais, os produtos produzidos *in vitro* (proteína recombinante e os anticorpos policlonais e monoclonais) serão utilizados em próximas etapas e em perspectivas deste projeto.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, utilizamos o PCR em tempo real para analisar o perfil de expressão gênica para um painel contendo quatro potenciais biomarcadores para o CCR, que são expressos em células epiteliais. Foi avaliado, pela primeira vez, o perfil de expressão dos biomarcadores TspanCO029, Ki67, E-caderina e Vimentina em conjunto, buscando em especial a correlação entre esses marcadores e a lateralidade do tumor primário, histórico familiar, linfonodos acometidos, sexo e idade de pacientes com CCR. Foi também produzida a proteína recombinante para TspanCO029, assim como anticorpos policlonais e monoclonais, onde serão empregados no ensaio de imunohistoquímica para a avaliação da expressão proteica da mesma.

Com a prática cada vez maior da medicina personalizada, há uma demanda para pesquisas que busquem mais biomarcadores tanto para o diagnóstico, quanto para prognóstico e predição de tratamento (ALBERTS, B. et.al., 2004). Neste sentido, as proteínas estudadas neste trabalho mostram ser potenciais marcadores tumorais devido às suas funções nas células tumorais. A TspanCO029 em associação com a E-caderina (ASHAIE, M.A. et.al., 2016) exercem a adesão celular e quando expressas de forma alteradas na célula tumoral, contribuem para a motilidade desta célula (SI-JIAN, P. et.al., 2015). Da mesma forma a expressão de vimentina em células epiteliais pode indicar um processo neoplásico (GILLES, C. et al. 2003), assim como de Ki67 que também sinaliza exacerbada proliferação celular (YANG, C. et. al. 2018). Portanto, estes quatro marcadores mostram um possível painel para o CCR.

Neste contexto, empregou-se a metodologia de qPCR que nos permitiu quantificar a expressão relativa de cada biomarcador para cada amostra analisada. A quantificação por qPCR é precisa pois analisa as amostras durante a fase exponencial da reação de PCR, onde espera-se que a quantidade de cópias de determinado marcador venha a dobrar caso a eficiência da reação seja de cem por cento, em cada ciclo. A análise do ciclo limiar (C_t), ou seja, o número do ciclo no qual os sinais são detectados acima da fluorescência de fundo (ruído), pode ser usada para estimar os níveis de expressão gênica, relacionando os valores de C_t para um gene de controle (quantificação relativa). A quantificação relativa é a abordagem mais amplamente adotada e é baseada na análise de um gene marcador, cuja expressão é normalizada em relação a expressão de um gene endógeno, onde a expressão não se altera nos diferentes grupos testados (KHEIRELSEID, AH. et al. 2010). Neste trabalho, usamos como endógeno o gene da β -actina. A utilização do gene de controle endógeno é a abordagem mais

comumente utilizada, pois exclui a variação associada às diferenças nas quantidades de RNA/cDNA molde (KHEIRELSEID, AH. et al. 2010).

Neste estudo, analisamos a viabilidade de extração de RNA de duas fontes amostrais distintas: amostras de tecido fixadas em parafina e amostras congeladas após ressecção cirúrgica de pacientes com CCR. A análise do material extraído mostrou que amostras fixadas em parafina não apresentaram integridade, diferentemente das amostras congeladas. Os ácidos nucleicos são mais difíceis de extrair do tecido fixado na parafina devido à necessidade de remoção da parafina e da neutralização de ligações covalentes de proteína-DNA resultantes do processo de fixação. Além disso, o processo de fixação, a preparação do tecido, a incorporação de parafina e o armazenamento, contribuem para a fragmentação e modificações químicas. Essas alterações interferem em muitas análises moleculares clássicas que requerem ácidos nucleicos de alta qualidade (HEDEGAARD J., et al., 2014).

Os dados das amostras congeladas foram analisados e o perfil das variáveis categóricas encontrado foi de 58,82% do sexo feminino e 41,18% masculino, indo de acordo com o perfil encontrado pelo INCA para o ano de 2019, onde o CCR é o segundo tipo de neoplasia de maior incidência para as mulheres e o terceiro para os homens, porém o perfil esperado para 2020 é de incidências proporcionais em ambos os sexos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). MALTA (2015) observou que, para os homens, existem maiores riscos para o CCR e a hipótese é de que os hormônios femininos exerçam uma proteção para as mulheres.

Com relação a idade, KONO (2004) descreveu que a incidência de CCR aumenta a partir de 40 anos para as mulheres e para os homens a partir de 50 anos. O perfil encontrado para as amostras neste trabalho foi similar, sendo 31 dos pacientes acima de 40 anos para ambos os sexos, e apenas dois pacientes com 33 e 36 anos do sexo masculino.

Quando avaliamos a lateralidade, o perfil encontrado está de acordo com o perfil descrito na literatura. Segundo SANTOS (2008), a lesão primária predomina no cólon esquerdo (62% dos casos). As amostras trabalhadas neste estudo mostraram 61,74% de tumores do cólon esquerdo e 38,24% do cólon direito. Ainda, de acordo com SANTOS (2008) o cólon mais acometido é o sigmoide. O perfil encontrado nas amostras do trabalho é semelhante, com 38,24% dos tumores localizados no cólon sigmoide, seguido do ceco (20,59%), reto (14,71%), cólon ascendente (11,76%), cólon descendente e transversal com a mesma porcentagem de 5,88% e, por último, a flexura esplênica (2,94%).

Os valores obtidos da quantificação relativa dos marcadores TSPANCo029, E-caderina, Ki67 e Vimentina por qPCR foram analisados pelo teste estatístico de Mann Whitney e apresentaram diferença estatística entre os grupos feminino e masculino, sendo que o primeiro

grupo apresentou maior expressão do marcador E-caderina. KIM, et.al (2019) mostrou que os níveis de expressão de genes de marcadores EMT nas linhagens celulares de câncer não eram influenciados pelo gênero, indo de encontro com outros autores (YUAN, Y., et.al., 2016). Apesar disso, as diferenças nas taxas de incidência, progressão e mortalidade do câncer entre cada sexo é hoje bem documentada (ZAHM, S.H, et.al., 1995 & DORAK M.T., et.al., 2012), com diferenças entre o gênero, caracterizadas em nível molecular (YUAN, et.al., 2016). Quando consideramos a idade dos pacientes, foi encontrado maior expressão dos marcadores Ki67 e Vimentina no grupo de 38 a 60 anos de idade. Estudos prévios não demonstraram diferenças na expressão de Ki67, Vimentina e E-caderina com relação a idade (FORONES, N.M, et.al., 1999 & SEN, A., et.al., 2015).

Não foram encontradas diferenças estatísticas na expressão dos marcadores TspanCO029, Ki67, E-caderina e Vimentina quando estes foram relacionados com a presença de histórico familiar, metástase em linfonodos e lateralidade do tumor primário. O número de amostras incluídos no trabalho pode ter limitado a identificação das diferenças na análise do teste de Mann Whitney.

Segundo HONG, X.W.et.al., (2011), TspanCO029 está envolvida nos processos de tumorigênese, na invasão celular e metástase. YI, LI., et.al., (2019) identificou que a alta expressão de Ki67 está correlacionada com maior grau de malignidade, maior taxa de crescimento de células tumorais, maior grau de invasão, metástase e pior prognóstico clínico. Um estudo avaliou que a alta expressão de E-caderina, apresenta melhor prognóstico e menor ocorrência de metástase o que foi significativamente melhor comparado as amostras com maior expressão (KASHIWAGI, S. et.al., 2010). Em contrapartida, a maior expressão de Vimentina favorece a maior migração e invasividade das células neoplásicas (GILLES, C. et al. 2003).

De acordo com SI-JIAN (2015), a TspanCO029 foi identificada expressa em altos níveis, em vários tipos de carcinoma e sarcomas humanos. Sua superexpressão se correlacionou com a progressão do tumor, representando ser um marcador de mau prognóstico, porém, não foi possível corroborar estes achados com o presente trabalho, visto que não foi encontrada diferença de expressão gênica entre o grupo de amostras positivas e negativas para o marcador TspanCO029.

Os mesmos valores de RQ foram analisados por outro teste estatístico, agora avaliando o coeficiente de correlação de Spearman das expressões dos marcadores. Os valores do coeficiente $\geq 0,5$ e $p < 0,05$ indicam existência de forte correlação, ou seja, quanto maior a expressão de um marcador, maior será a do marcador correlacionado, sendo diretamente

proporcional a expressão dos marcadores analisados. Através do teste de Spearman foi possível identificar algumas correlações fortes entre os marcadores em diferentes análises.

Analisando os grupos de amostras positivas, negativas e nos grupos de lateralidade de tumor primário, em ambos os lados foi identificada uma forte correlação entre as expressões de TspanCO029 e E-caderina, corroborando com o trabalho de MANALE (2017). De acordo com este autor, a TspanCO029 tem função pró-migratória no câncer epitelial, pois ela medeia a perda de conexões intercelulares e possui interação e cooperação com o complexo de membrana E-caderina/p120catenina, estimulando a mobilidade celular, processo importante no desenvolvimento da metástase. A expressão de TspanCO029 revela um pior prognóstico quando está superexpressa em células tumorais. HONG (2011), por sua vez, identificou que o aumento da expressão de TspanCO029 implica no crescimento celular, assim como na invasão celular. Da mesma forma, a correlação entre TspanCO029 e Ki67 foi encontrada nos grupos de amostras positivas, negativas e em ambos os grupos de lateralidade. Ki67 é um marcador bem conhecido que indica progressão tumoral e está superexpresso em células malignas. No entanto, apesar disso, quando avaliado sozinho não apresenta valor preditivo ou de prognóstico (YANG 2018). No presente trabalho, Ki67 foi correlacionado com os demais marcadores, o que pode sugerir um potencial de aplicação em análises futuras de prognóstico quando avaliado em conjunto com TspanCO029, E-Caderina e Vimentina.

Uma forte correlação foi encontrada para os marcadores TspanCO029 e Vimentina no grupo de amostras positivas com tumor primário localizado no cólon direito. De acordo com MONDACA (2018), tumores do colón direito apresentam um pior prognóstico e segundo MELLING (2016), quando ocorre o aumento da expressão de Vimentina em tecido epitelial tem-se maior chance de desenvolvimento de metástase, o que pode estar associado à expressão concomitante de TspanCO029 que, conforme já demonstrado, apresenta relação direta com desenvolvimento de metástase (LI and LI, 2015). Quando ocorre a expressão de Vimentina (marcador de célula mesenquimal) em células epiteliais tumorais, tem-se um indicativo de processo de transição epitélio mesenquima, já identificado como um possível processo neoplásico (LI and LI, 2015).

Por fim, este estudo demonstrou uma correlação importante na expressão gênica de TspanCO029, E-caderina, Ki67 e Vimentina nas amostras positivas com tumor primário localizado no cólon direito em comparação com o cólon esquerdo, visto que não houve correlação entre TspanCO029 e Vimentina nos tumores iniciados do lado esquerdo.

O presente estudo não conseguiu definir TspanCO029 isoladamente como biomarcador de predição de risco baseado na expressão conforme lateralidade, malignidade ou de

metástase. Porém, quando associada aos demais marcadores Ki67, E-caderina e Vimentina, a proteína demonstrou potencial relação com a lateralidade. Uma coorte com um maior número de amostras pode, no entanto, levar a resultados distintos. A TspanCO029 possui importante função nas células epiteliais conferindo adesão entre as células e matriz. Portanto, alterações na expressão da TspanCO029 estão envolvidos na progressão tumoral e podem estar associadas com a promoção de metástase por promover o movimento de células cancerígenas desregulando as aderências celulares (GUO, Q. et.al., 2012). Futuros estudos poderão demonstrar sua aplicabilidade em painel de predição de prognóstico e de malignidade.

7. CONCLUSÃO

✓ Para a variável categórica lateralidade o perfil encontrado no trabalho também foi de acordo com a literatura onde apresenta maior frequência de incidência no cólon esquerdo com maior prevalência no cólon sigmoide;

✓ Não foram encontradas diferenças significativas na expressão gênica dos marcadores aqui estudados quanto as variáveis sexo, idade, histórico familiar, metástase em linfonodos e lateralidade do tumor primário, quando os marcadores foram avaliados separadamente;

✓ Foi encontrada correlação entre os marcadores TspanCO029, E-caderina e Ki67 em amostras positivas para CCR de ambas as lateralidades;

✓ Foi encontrada correlação entre TspanCO029, E-caderina, Ki67 e também Vimentina nas amostras positivas com tumor primário localizado no cólon direito;

✓ A proteína recombinante assim como os anticorpos policlonais e monoclonais foram produzidos corretamente de acordo com os protocolos estabelecidos e poderão ser utilizados futuramente em outros trabalhos.

8. PERSPECTIVAS

Na busca pela identificação de novos potenciais biomarcadores, a proteômica é uma abordagem amplamente utilizada para identificação de marcadores de drogas, diagnóstico, prognóstico e candidatos para vacina (SELIGER & KELLNER, 2002). Existem diferentes estudos mostrando que TspanCO029 é um potencial biomarcador para CCR, porém a utilização do mesmo na aplicação clínica ainda é escassa na literatura.

Neste trabalho foi realizada também a produção da proteína recombinante para tetraspanina CO029, por meio da metodologia em sistema procarioto Gateway®, assim como anticorpos policlonais e monoclonais que terão futuramente aplicações em diferentes projetos.

Como visto nos resultados do item 6, a proteína recombinante e os anticorpos foram produzidos com confirmação positiva para *western blotting* e espectrometria de massas (para produção da proteína). Diante disto, estes produtos serão utilizados para:

- Avaliar a correlação de TspanCO029 com outros marcadores do CCR;
- Avaliar a expressão proteica nas amostras parafinadas utilizadas neste trabalho;
- Avaliar a resposta imunomoduladora *in vitro* mediante estímulo de TspanCO029r;

- Avaliar a expressão de TspanCO029 para outros tipos de tumores;
- Avaliar a utilização dos anticorpos para imunoterapias;

Estão sendo submetidos 3 artigos científicos provenientes dos resultados deste estudo:

- Artigo 1 contendo os resultados de expressão gênica dos marcadores TspanCO029, E-caderina, Ki67 e Vimentina;

- Artigo 2 contendo os dados da produção da TspanCO029r e dos anticorpos policlonais e monoclonais e suas aplicações na localização de Tspan CO029 nativa em células tumorais;

- Artigo 3 contendo informações descritivas de biomarcadores com potencial no CRC, como artigo de revisão.

REFERÊNCIAS

ABELL, A. N. AND G. L. JOHNSON. "Implications of Mesenchymal Cells in Cancer Stem Cell Populations: Relevance to EMT." *Curr Pathobiol Rep*. 2014; v.2(1) p.21-26.

AGAËSSE, G.; BARBOLLAT-BOUTRAND, L.; KHARBILI, M.EL.; BERTHIER-VERGNES, O.; MASSE, I. p53 targets TSPAN8 to prevent invasion in melanoma cells. *Oncogenesis*. 2017; v. 6, p.309.

AJCC. *Cancer staging manual*. 6th ed. New York: Springer; 2002.

AILANE, N.; et al. Effect of an anti-human Co-029/TspanCO029 mouse monoclonal antibody on tumor growth in a nude mouse model. *Frontiers in Physiology*. 2014; v.5, p.364.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; *Biologia molecular da célula*. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed. Estrutura da membrana: organização interna da célula. 2004; p.583-614.

AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/colorectal-cancer/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html>. Acessado em 04/06/2019.

ANDREW, S.M; TITUS, J.A. Purification of Immunoglobulin G. *Current Protocols in Molecular Biology*, suppl. 2000; 5, p.16.3.1-16.3.12.

ASHAIE MA, CHOWDHURY EH. Cadherins: The Superfamily Critically Involved in Breast Cancer. *Curr Pharm Des*. 2013; 22(5):616-38.

BACKUS H.H; VAN GROENINGEN C.J; VOS W, DUKERS D.F; BLOEMENA E; WOUTERS D; et al. Differential expression of cell cycle and apoptosis related proteins in colorectal mucosa, primary colon tumours, and liver metastases. *J Clin Pathol*. 2002; v.55(3): p.206-211.

BHASKARAN K, DOUGLAS I, FORBES H, DOS-SANTOS-SILVA I, LEON DA, SMEETH L. Bodymass index and risk of 22 specific cancers: a population-based cohort study of 5,24 million UK adults. *The Lancet*. 2014, v.384(9945), p.755-65.

BRASILEIRO, F.G.: *Bogliolo: Patologia*. 9. Ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2016.

BRESOLIN, I.T.; BORSOI-RIBEIRO, M.; TAMASHIRO, W.M.; et al. Evaluation of immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) as a technique for IgG(1) monoclonal antibodies purification: the effect of chelating ligand and support. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010; v.160, n.7, p.2148-65.

BUFILL JA. Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. *Ann Intern Med*. 1990; v.113(10) p.779-788.

CALVERT PM, FRUCHT H. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med*. 2002; v.137(7) p.603-12.

CANNITO, S.; NOVO E.; et al. Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial–mesenchymal transition in cancer cells. *Carcinogenesis*. 2008; v.29(12) p.2267-78.

CANTWELL M, ELLIOTT C. Nitrates, Nitrites and Nitrosamines from Processed Meat Intake and Colorectal Cancer Risk. *J Clin Nutr Diet*. 2017; v.3(4) p.27.

CARR PR, WALTER V, BRENNER H, HOFFMEISTER M. Meat subtypes and their association with colorectal cancer: Systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2016; v.138(2) p.293-302.

CENTER, M.M., JEMAL, A., SMITH, R.A., et. al. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin*. 2009; v.59, p.366-378.

CHEN, L., D. L. GIBBONS, et al. Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nat Commun*. 2014; v.5, p.5241.

CHEN E; YANG F; YANG J; et.al. Alteration of tumor suppressor BMP5 in sporadic colorectal cancer: a genomic and transcriptomic profiling based study. *Molecular Cancer*. v.17:176.

CIANCHI F, MESSERINI L, PALOMBA A, BODDI V, PERIGLI G, PUCCIANI F, et al. Character of the invasive margin in colorectal cancer: does it improve prognostic information of Dukes staging? *Dis Colon Rectum*. 1997; v.40(10), p.1170-5.

COMPTON C, FENOGLIO-PREISER CM, PETTIGREW N, FIELDING LP. American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group. *Cancer*. 2000; v. 88(7), p.1739-57.

COOK, D.B.; SELF, C.H. Monoclonal antibodies - Production, Engineering and Clinical Application. Monoclonal antibodies in diagnostic immunoassays. In LADYMAN & RITTER. Cambridge: University Press, 1995.

COTTI, G.C.C.; SANTOS, P.S.S.; SEBASTIANES, F.M.; GAMA, A.H.; SEID, V.E.; MARTINO, R.B.; Genética do câncer colorretal/Genetics of colorectal câncer. *Rev Med (São Paulo)*. 2000; v.79, p. 45-64.

CUYLEN S, BLAUKOPF C, POLITI AZ, T DE MÜLLER-REICHERT, NEUMANN B, POSER I, ELLENBERG J, AA DE HYMAN, GERLICH DW. Ki-67 age como um surfactante biológico para dispersar os cromossomos mitóticos . *Natureza*. 2016; v.535(7611), p.308-12.

DAE R. L., JUNG K. K., TAEHYUNG K., EUNG J. S. Comparison of oncological outcomes of right-sided colon cancer versus left-sided colon cancer after curative resection Which side is better outcome? *Clinical Trial/Experimental Study Medicine*. 2017; v.96, p.42.

DANTAS, E.L.R.; LIMA, F.H.S.; CARVALHO, S.M.F.; ARRUDA, A.P.; RIBEIRO, E.M.; RIBEIRO, MARQUES, E.R. Genética do Câncer Hereditário. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2009; v.55(3), p. 263-269.

DORAK MT, KARPUZOGLU E. Gender differences in cancer susceptibility: an inadequately addressed issue. *Front Genet*. 2012; v.3 p. 268.

EVANS R.M. Vimentin: the conundrum of the intermediate filament gene family. *Bioessays*. 1998; v.20 (1): 79-86.

FAIVRE J, BOUVIER A-M, BONITHON-KOPP C. Epidemiology and screening of colorectal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2002; v.16(2), p.187-99.

FANG CB. Rastreamento do câncer colorretal. *Ver Assoc Med Bras*. 2002; v.48(4), p.286-6.

FEDERICA MORANO, SALVATORE CORALLO, FILIPPO DE BRAUD, FILIPPO PIETRANTONIO, et. al. Negative Hyperselection of Patients With RAS and BRAF Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer Who Received Panitumumab-Based Maintenance Therapy. *J Clin Oncol*. by American Society of Clinical Oncology. 2019; v.37:3099-3110.

FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, ESER S, MATHERS C, REBELO M, PARKIN DM, FORMAN D, BRAY F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*. 2015; v.136, p. 1;136(5).

FERLAY J, M ERVIK, LAM F, M COLOMBET, L MERY, PIÑEROS M, ZNAOR A, SOERJOMATARAM I, BRAY F (2018). Observatório Global do Câncer: Câncer Hoje. Lyon, França: Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today>, acessado [29/04/2019].

FORONES NM, OSHIMA C, NANOGAKI S, TANAKA M, BARBOSA V. Determinação da atividade proliferativa pelo Ki67 e p53 em doentes com câncer colorretal [Determination of proliferative activity using Ki67 and expression of p53 in colorectal cancer]. *Arq Gastroenterol*, 1999; v.36(3):122-126.

GALIZIA G, LIETO E, FERRARACCIO F, ORDITURA M, DE VITA F, CASTELLANO P, et al. Determination of molecular marker expression can predict clinical outcome in colon carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2004; v. 15;10(10), p.3490-9.

GARRIDO MC, CORDELL JL, BECKER MH, KEY G, GERDES J, JONES M, GATTER KC, MASON DY. Monoclonal antibody JCI: new reagent for studying cell proliferation. *J Clin Pathol*. 1992; v.45, p.860-865.

GARÓFOLO A, AVESANI CM, Camargo KG, Barros ME, Silva SRJ, Taddei JAdAC, et al. Diet and cancer: an epidemiological view. *Braz J Nutr*. 2004; v.17(4), p.491-505.

GERDES J., SCHWAB U., LEMKE H., STEIN H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International Journal of Cancer. Human Cancer*. 1983; v.31.

GILLES C., POLETTE M., MESTDAGT M. et al. Transactivation of vimentin by β -catenina in human breast cancer cell. *Cancer research*. 2003; v.63 (10) : 2658-2664.

GUO, QIUSHA; XIA, BING; RICHARDSON, MEKEL; LI, MINGHAO; ZHANG, JULIAN; CHEN, FENG; ZHANG, XIN. Tetraspanin CO-029 Inhibits Colorectal Cancer Cell Movement by Deregulating Cell-Matrix and Cell-Cell Adhesions. *PloS one*. 2012; 38464, v.7.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

HARTLEY, J. L.; TEMPLE, G. F.; BRASCH, M. A. DNA cloning using in vitro site specific recombination. *Genome Research*. 2000; v.26:383–97.

HAUPTMAN, N; JEVŠINEK, D. S.; SPASOVSKA, E.; BOŠTJANČIČ, E.; GLAVAČ, D. Genes CEP55, FOXD3, FOXF2, GNAO1, GRIA4, and KCNA5 as potential diagnostic biomarkers in colorectal cancer. *BMC Medical Genomics*. 2019; 12:54.

HEDEGAARD J, THORSEN K, LUND MK, et al. Next-generation sequencing of RNA and DNA isolated from paired fresh-frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples of human cancer and normal tissue. *PLoS One*. 2014;9(5):e98187.

HOLCH, J. W. et al. The relevance of primary tumour location in patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of first-line clinical trials. *European Journal of Cancer*. 2016; v. 70, p. 87-98.

HONG X. W., QINGLIN L., CHANDAN S., KONSTANTIN K., MARTIN E. H. Tetraspanin protein contributions to câncer. 4th European Conference on Tetraspanins. *Biochem. Soc. Trans*. 2011; v.39, p.547–552.

HONG S, JIAO Y, QING H, MENG-JIE J, YI-NUO T, JIAN-FEI F, LI-ZHEN Z, XUE-FENG F, YING Y. Different treatment strategies and molecular features between right-sided and left-sided colon cancers. 2015; v.7; 21(21), p.6470-6478.

HONGJUAN, H.; CHEN, E.; YANG, J.; et. al. Alteration of the tumor suppressor SARDH in sporadic colorectal cancer: A functional and transcriptome profiling-based study. *Molecular Carcinogenesis*. 2019; p. 1-10.

HUANG, P. H. et al. TGFbeta promotes mesenchymal phenotype of pancreatic cancer cells, in part, through epigenetic activation of VAV1. *Oncogene*, 2016.

INVITROGEN. GATEWAY® TECHNOLOGY. A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems. *Invitrogen*; MAN0000282 (250522), 2003.

JAYASEKARA H, MACINNIS RJ, ROOM R, ENGLISH DR. Long-term alcohol consumption and breast, upper aero-digestive tract and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Alcohol Alcohol*. 2015; v.51(3), p.315-30.

JESSUP et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York Springer; 2017.

JUN L., JUN L., SHUO L., TENG W., ALESSANDRO I., EVA B., THOMAS B., RONG X., SHIJING Y. Exosomal tetraspanins mediate cancer metastasis by altering host microenvironment. *Oncotarget*. 2017; v.5; 8(37), p. 62803–62815.

JÚNIOR L, FENNER H, BONARDI MA, SCHIOCHET VJC, BALDIN JÚNIOR A, CARMES ER, et al. Importância da colonoscopia no rastreamento de pólipos e câncer colorretal em pacientes portadores de pólipos retais. *Rev Bras Colo-Proctol*. 2005; v.25(3), p.226–34.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Biologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. *Membrana plasmática: digestão intracelular*. 1997; p.94-100.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 11. Ed. [s.l] Guanabara Koogan, 2009.

KALFA N.; et al. Searching for somatic mutations in McCune-Albright syndrome: a comparative study of the peptidic nucleic acid versus the nested PCR method based on 148 DNA samples. *Eur J Endocrinol*. 2006; v.155(6), p.839-843.

KARRAY-CHOUAYEKH S, TRIFA F, KHABIR A, SELAMI-BOUDAWARA T, FRIKHA M, GARGOURI A, MOKDAD-GARGOURI R. Negative/low HER2 expression alone or combined with E-cadherin positivity is predictive of better prognosis in patients with breast carcinoma. *Histol Histopathol*. 2012; 27(3):377-85.

KASHIWAGI S, YASHIRO M, TAKASHIMA T, NOMURA S, NODA S, KAWAJIRI H, et al. Significance of E-cadherin expression in triple-negative breast cancer. *Br J Cancer*. 2010; 13;103(2):249-55.

KHEIRELSEID, ELRASHEID AH.; et al. Identification of endogenous control genes for normalisation of real-time quantitative PCR data in colorectal cancer. *BMC Molecular Biology*. 2010; v. 11:12.

KIELER, M.; UNSELD, M.; BIANCONI, D.; et al. Interim analysis of a real-world precision medicine platform for molecular profiling of metastatic or advanced cancers: MONDTI. *ESMO Open*. 2019; 4:e000538.

KIM SY, LEE S, LEE E, et al. Sex-biased differences in the correlation between epithelial-to-mesenchymal transition-associated genes in cancer cell lines. *Oncol Lett*. 2019; v.18(6):6852–6868.

KIM, T.K.; PARK, C.S.; JEOUNG, M.H.; LEE, W.R.; GO, N.K.; CHOI, J.R.; LEE, T.S.; SHIM, H.; LEE, S.; Generation of a human antibody that inhibits TSPANCO029-mediated invasion of metastatic colorectal cancer cells. *ELSEVIER*. 2015; v.25, n.468, p.774-80.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975; v.256, n.5517, p.495-497.

KONO S. Secular trend of colon cancer incidence and mortality in relation to fat and meat intake in Japan. *Eur J Cancer Prev*. 2004; v.13, p.127-32.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature*. 1970; 227 (5259):680-5.

LANGLEY RR, FIDLER IJ. Tumor Cell-Organ Microenvironment Interactions in the Pathogenesis of Cancer Metastasis. *Endocrine Reviews*. 2007; v.28, p.297-321.

LANDY, A.; *Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda Site-specific Recombination*. *Annual Review of Biochemistry*. 1989; v.58, p.913-949.

LI, L. W.; Epithelial-mesenchymal transition in human cancer: comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and differentiation. *Pharmacol Ther.* 2015; v.150, p.33-46.

LIN Y., WENZHUO H., PENGFEI K., CHANG J., QIONG Y., QIANKUN X., LIANG P. X. Clinical baseline and prognostic difference of platelet lymphocyte ratio (PLR) in rightsided and let-sided colon cancers. 2017; v. 17, p.873.

LIU, J.; et al. Screening and identification of lung cancer metastasis-related genes by suppression subtractive hybridization. *Thorac Cancer.* 2012; v. 3 (3), p. 207-216.

LOREE, J. M.; PEREIRA, A. A.L.; KOPETZ, S.; et.al. Classifying colorectal cancer by tumor location rather than sidedness highlights a continuum in mutation profiles and Consensus Molecular Subtypes. *Clin Cancer Res.* 2018; v.24(5): p.1062–1072.

LOPEZ, G.; BOGGIO, F.; FERRERO, S.; FUSCO, N.; GOBBO, A. D. Molecular and Immunohistochemical Markers with Prognostic and Predictive Significance in Liver Metastases from Colorectal Carcinoma. *Int. J. Molecular. Sciences.* 2018; v.19, p.3014.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.; Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; v.193(1), p.265-75.

MACCALLI, C. et al. Immunology of cancer stem cells in solid tumours. A review. *Eur J Cancer.* 2014; v.50(3), p.649-655.

MALOU Z., KUNTAL W., ALIE V. D. S., SONJA I. B., ANNEMIEK B. V. S. Differential expression of tetraspanin superfamily members in dendritic cell subsets. *PLoS ONE.* 2017; v.12(9), e0184317.

MALTA DC, OLIVEIRA TP, LUZ M, STOPA SR, SILVA JUNIOR JB, REIS AAC. Tendências de indicadores de tabagismo nas capitais brasileiras, 2006 a 2013. *Ciênc. Saúde Coletiva.* 2015; v. 20(3), p. 631-40.

MANALE E. L. K., CLÉMENT R., TIFFANY W., EMMANUELLE D. B., FRANÇOISE D., ODILE B.V., et. al. Tetraspanin 8 is a novel regulator of ILK-driven $\beta 1$ integrin adhesion and signaling in invasive melanoma cells. *Oncotarget.* 2017; v.7;8(10): p.17140-17155.

MASASHI Y., KOJI O., HIROTOSHI H., MASASHI T., YUKO K. The Worse Prognosis of Right-Sided Compared with Left-Sided Colon Cancers: a Systematic Review and Meta-analysis. *J Gastrointest Surg.* 2016; v.20: p.648–655.

MEDICI, D.; KALLURI, R. Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype. *Seminars in Cancer Biology.* 2012; v.22, n. 5-6, p. 379-384.

MEGUID, R.A., SLIDELL, M.B., WOLFGANG, C.L. et al. Is there a difference in survival between right versus leftsided colon cancers? *Ann Surg Oncol.* 2008; v.15, p.2388.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Brasil Secretaria de Atenção à Saúde. PORTARIA N° 601, DE 26 DE JUNHO DE 2012. *Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Câncer de Cólon e Reto.* 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Brasil. Secretaria de Atenção à Saúde. *Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em Oncologia/Ministério da Saúde*, Secretaria de Atenção à Saúde – Brasília: Ministério da Saúde. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Brasil. Estimativa 2020. Incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019.

MONDACA, S.; YAEGER, R. Genômica do câncer colorretal e projeto de ensaios racionais. *Annals of Translational Medicine*. 2018; v.6(9):p.159.

MOORE, K.L. *Anatomia orientada para a clínica*. 7ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

NAKAGAWA WT, ROSSI BM, FERREIRA FO, AGUIAR JR S, GARCIA SZ, FERRIGNO R, et al. Adenocarcinoma do Reto. In: Kowalski LP, Anelli A, Salvajoli JV, Lopes LF (org). *Manual de Condutas Diagnósticas e Terapêuticas em Oncologia*. 2002; 2. ed. São Paulo:Âmbito Editores. p. 580-3.

NASCIMENTO C, MARIËLLE A, DE AZEVEDO MB, JOSÉ R, GALVÃO CL, JOHAN P. Use, Access, And Equity In Health Care Services In São Paulo, Brazil. *Cad. Saúde Pública*. 2017; v.33(4):e00078015.

NCBI CCDS release 1, NCBI annotation release 35.1, Ensembl annotation release 23. Assembly GRCh38.p12 ([GCF_000001405.38](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GCF_000001405.38)). Nucleotide Sequence (714 nt) and Translation (237 aa), 2017.

NCCN National Comprehensive Cancer Network, Inc. Based on the NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) Colon Cancer. Version 4. 2018, October 19, 2018.

NELSON, A.L.; DHIMOLEA, E.; REICHERT, J.M. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010; v.9, p.767-774.

NETO, J.D.C.; BARRETO, J.B.P.; FREITAS, N.S.; QUEIROZ, M.A.; Câncer colorretal: Características Clínicas e Anatomopatológicas em Pacientes com idade inferior a 40 anos. *Revista brasileira Coloproctologista*. 2006; v.26, n.4, p.430-435.

NIETO, M. A. The Ins and Outs of the Epithelial to Mesenchymal Transsition in Health and Disease, *Annual Rview of Cell and Developmental Biology*. 2011; v.27, n.1, p. 347-376.

OLEG K. G., LUZ M. R., KENNETH N., JEAN J., JANET C., GARY G., ERNEST H., ILAN R. K. et. al. Distinguishing Right from Left Colon by the Pattern of Gene Expression. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2003; v.12, p.755-762.

PALMERO E.I, CALEFFI M, SCHULER-FACCINI L, ROTH F.L, KALAKUN L, NETTO C.B, SKONIESKI G, GIACOMAZZI J, WEBER B, GIUGLIANI R, CAMEY S.A, ASHTON-PROLLA P. Population prevalence of ereditary breast cancer phenotypes and implementation of a genetic cancer risk assessment program in southern Brazil. *Genet Mol Biol*. 2009; v.32(3), p.447-55.

PANG, L.; XIA, Y.; WANG, D.; MENG, X. Antitumor activity of iNGR-GRIM-19 in colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2017; v.1;47(9), p.795-808.

PARREIRAS, F. C.; SANTIAGO, G. M. Z.; COSTA, A. M.; LACERDA, A. F. Aspectos genéticos do câncer colorretal e seu impacto no manejo da doença. Genetic aspects of colorectal cancer and its impact on disease management. *Rev Med Minas Gerais*. 2013; v.23(2), p.221-227.

PINHO, M.S.L.; Molecular Biology of Colorectal cancer: A silent Revolution. *Revista brasileira Coloproctologista*. 2008; v.28, n.3, p.363-367.

SAITO, R.F.; LANA, M.V.G.; RUAN F. V.; MEDRANO, R.C. Fundamentos de Oncologia Molecular. 2015; 1º Edição, Atheneu.

SANTOS JR JCM. Câncer Ano-Reto-Cólico: Aspectos Atuais IV - Câncer de Cólon - Fatores Clínicos, Epidemiológicos e Preventivos. *Rev bras Coloproct*. 2008; v.28(3), p.378-385.

SANTOS, R.V. et al. Anticorpos Monoclonais: Implicações Terapêuticas no câncer. Aplicações terapêuticas dos anticorpos monoclonais. *Rev. bras. alerg. imunopatol*. 2006; v. 29, Nº 2.

SÃO PAULO (SP). Secretaria Municipal da Saúde. Coordenação de Epidemiologia e Informação - CEInfo. Boletim ISA Capital 2015, no 9, 2017: Rastreamento de Câncer colorretal. São Paulo: CEInfo; 20 p.

SCHOCK, F.; PERRIMON, N.; Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis. *Ann Rev Cell Dev Biol*. 2002; v.18, p.463-93.

SEBASTIAN MONDACA, RONA YAEGER. Colorectal cancer genomics and designing rational trials. *Annals of Translational Medicine*. All rights reserved. 2018; v.6(9), p.159.

SELIGER B & KELLNER R. Design of proteome-based studies in combination with serology for the identification of biomarkers and novel targets. *Proteomics*. 2002; v. 2:1641-1651.

SEN A, MITRA S, DAS RN, et al. Expression of CDX-2 and Ki-67 in different grades of colorectal adenocarcinomas. *Indian J Pathol Microbiol*. 2015; v.58(2):158–162.

SHIRE, S.; GOMBOTZ, W; BECHTOLD-PETERS, K. Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing. New York: Springer, 2010.

SI-JIAN P., YUE-BING W., SHANG C., YI-XIN P., WEI L., LIU-GUAN B., BOMIN S., QING-FANG S. Overexpression of tetraspanin 8 in malignant glioma regulates tumor cell progression. Elsevier. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015; v.458, p.476-482.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA SBOC, 2017. Disponível em: <https://sboc.org.br/noticias/item/815-rastreamento-do-cancer-colorretal-e-negligenciado-no-brasil>. Acessado em 04/06/2019.

SUMANA N., EMMANUEL G., KRISTOPHER A., PATRICK B., STEVEN N. et. al. Association of Clinicopathologic and Molecular Markers on Stage-specific Survival of Right Versus Left Colon Cancer. 2018; v.17, p.671-678.

TOWBIN H.; STAEHELIN T.; GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*. 1992; v.24:145-9.

THOMPSON EW, NEWGREEN DF, TARIN D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Research*. 2005; v.65 (14): 5991-5.

VACANTE, M.; BORZÌ, A.M.; BASILE, F.; BIONDI, A. Biomarkers in colorectal cancer: Current clinical utility and future perspectives. *World J Clin Cases*. 2018; v6: 6(15): p.869-881.

VERGNES, O.B.; et al. Gene expression profiles of human melanoma cells with different invasive potential reveal TSPANCO029 as a novel mediator of invasion. *British Journal of Cancer*. 2011; v.104, p. 155-165.

YANG, C.; ZHANG, J.; DING, M. et al. Ki67 targeted strategies for cancer therapy. *Clin Transl Oncol*. 2018; v.20: p.570.

YI LI, XUEXIA ZHANG, JILIANG QIU, TING PANG, LIN HUANG, QINGAN ZENG. Comparisons of p53, KI67 and BRCA1 expressions in patients with different molecular subtypes of breast cancer and their relationships with pathology and prognosis. *JBUON*. 2019; v.24(6): 2361-2368.

YUAN Y, LIU L, CHEN H, WANG Y, XU Y, MAO H, LI J, MILLS GB, SHU Y, LI L, LIANG H. Comprehensive Characterization of Molecular Differences in Cancer between Male and Female Patients. *Cancer Cell*. 2016; v.29(5):711-722.

WEISS L, GRUNDMANN E, TORHORST J, HARTVEIT F, MOBERG I, EDER M, et al. Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies. *J Pathol*. 1986; v.150(3), p.195-203.

ZAHM SH, FRAUMENI JF JR. Racial, ethnic, and gender variations in cancer risk: considerations for future epidemiologic research *Environ Health Perspect*. 1995; 103 Suppl 8():283-6.

ZHOU R.; et al. The lichen secondary metabolite atranorin suppresses lung cancer cell motility and tumorigenesis. *Sci Rep*. 2017; v.15;7(1), p. 8136.