



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

RENATA IVO VASCONCELOS

Estudo das alterações morfogénicas em resposta à irradiação em células de
câncer colorretal: a indução do fenótipo de células de câncer poliploides
gigantes

Orientador: Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz

Coorientador: Dr. Murilo Ramos Rocha

RIO DE JANEIRO

2022



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

RENATA IVO VASCONCELOS

Estudo das alterações morfogênicas em resposta à irradiação em células de
câncer colorretal: a indução do fenótipo de células de câncer poliploides
gigantes

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação *stricto sensu* em Oncologia do
Instituto Nacional de Câncer como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Oncologia.

Orientador: Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz
Coorientador: Dr. Murilo Ramos Rocha

RIO DE JANEIRO

2022

V331e Vasconcelos, Renata Ivo

Estudo das alterações morfológicas em resposta à irradiação em células de câncer colorretal : a indução do fenótipo de células de câncer poliploides gigantes . / Renata Ivo Vasconcelos . – Rio de Janeiro, 2022.
70 f. il. Color.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2022.

Orientador : Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz

Coorientador : Prof. Dr. Murilo Ramos Rocha

1. Neoplasias Colorretais . 2. Radioterapia . 3. Radioresistência . 4. Poliploidia . I. Díaz, José Andrés Morgado (Orient.). II. Rocha, Murilo Ramos (Coorient). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.994347

Catálogo na fonte
Kátia Simões CRB7/5952



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

RENATA IVO VASCONCELOS

Estudo das alterações morfogênicas em resposta à irradiação em células de
câncer colorretal: a indução do fenótipo de células de câncer poliploides
gigantes

Orientador: Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz

Coorientador: Dr. Murilo Ramos Rocha

Dissertação aprovada em: 04 de Março de 2022

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Renata Binato Gomes

Prof. Dra. Luciana Bueno Ferreira

Prof. Dra. Flávia Castello Branco Vidal

Prof. Dra. Nathalia de Oliveira Meireles da Costa – Suplente I

Prof. Dra. Fernanda Leve – Suplente II

RIO DE JANEIRO

2022



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação

RESUMO

Renata Ivo Vasconcelos

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES MORFOGENÉTICAS EM RESPOSTA À
IRRADIAÇÃO EM CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL: A INDUÇÃO DO
FENÓTIPO DE CÉLULAS DE CÂNCER POLIPLOIDES GIGANTES**

A radioterapia (RT) é um dos tratamentos amplamente utilizados para pacientes com câncer colorretal (CCR), mas a aplicação dessa terapia pode levar a uma menor sobrevida e maior probabilidade de recidivas em sítios secundários em uma parcela dos pacientes. Portanto, se faz crucial compreender os mecanismos tumorais de resposta a irradiação na tentativa de contribuir para um melhor tratamento de pacientes com este tipo de tumor. O presente estudo buscou avaliar o desenvolvimento de mecanismos celulares em resposta a doses de irradiação clinicamente relevantes, usando linhagens celulares de CCR. Inicialmente, para definir o modelo celular a ser trabalhado, utilizamos uma única dose de irradiação (5 Gy) em cinco linhagens celulares de câncer de cólon: LoVo, Caco-2, HT-29, HCT-116 e SW-480. Nossos resultados mostram que, 72 h após a irradiação, células de todas as linhagens testadas adquirem características morfológicas aberrantes como o ganho de volume celular, indícios de multinucleação, presença de vacúolos citoplasmáticos e aumento de projeções de membrana. Logo, utilizamos um protocolo de radiação hipofracionada, modelo já estabelecido em nosso laboratório, para mimetizar o que é praticado na clínica. Observamos que as linhagens SW-480 e HCT-116 quando irradiadas desenvolveram resistência a novas doses de irradiação, apresentaram multinucleação e aumento do volume celular. Para avaliar se essas alterações seriam resultado de uma seleção progressiva pelas doses diárias de irradiação com 5 Gy ou pelo dano celular cumulativo causado pela irradiação, utilizamos doses únicas de irradiação de 5 Gy e 10 Gy nestas duas linhagens. Os resultados mostram que as células tratadas com dose única de irradiação já desenvolvem o fenótipo de células tumorais poliploides gigantes com aparente participação dos mecanismos de autofagia e entose, os quais poderiam ser responsáveis pela sobrevivência das células radioresistentes neste modelo de estudo. Finalmente, o uso de um inibidor da formação de autofagossomos, 3MA, induziu um fenótipo aberrante mais pronunciado em ambas as linhagens, reduziu a viabilidade celular tanto em células irradiadas como controle, e o aumento da poliploidia em células SW-480 irradiadas. Surpreendentemente, observamos que esse inibidor causou uma redistribuição, mas não diminuição do marcador de autofagia, LC3B, sugerindo que não houve inibição da autofagia. Nossos resultados contribuem para um melhor conhecimento dos mecanismos de resposta celular a irradiação e nos direcionam para que em estudos futuros interfiramos na resistência das células tumorais responsáveis pela recidiva neste tipo de tumor.



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação

ABSTRACT

Renata Ivo Vasconcelos

**MORPHOGENETIC ALTERATIONS STUDY IN RESPONSE TO
IRRADIATION IN COLORECTAL CANCER CELLS: INDUCTION OF THE
POLYPOID GIANT CANCER CELL PHENOTYPE**

Radiation therapy (RT) is a commonly used treatment in patients with colorectal cancer (CRC), but this therapy can lead to shorter survival and greater odds of developing new tumors in secondary sites for a percentage of the patients. Therefore, it is crucial to understand the tumoral mechanisms of response to irradiation in an attempt to contribute to a better treatment of patients with CRC. The present study sought to evaluate the development of cellular mechanisms in response to clinically relevant irradiation doses using CRC cell lines. Initially, to define the cell model to be worked on, we used a single irradiation dose (5 Gy) in five colon cancer cell lines: LoVo, Caco-2, HT-29, HCT-116 and SW-480. Our results show that, 72 h after irradiation, cells of all tested lineages acquire aberrant morphological characteristics such as greater cell volume, evidence of multinucleation, presence of cytoplasmic vacuoles and increased membrane protrusions. Then, we used a hypofractionated irradiation protocol, a model already established in our laboratory, to mimic what is practiced on the clinic. We observed that SW-480 and HCT-116 cells developed resistance to new irradiation events, multinucleation and increased cell volume. To assess if these morphological changes could be the result of a progressive selection from the daily doses of 5 Gy irradiation or a cumulative irradiation induced cellular damage, we employed single dose treatment of 5 Gy or 10 Gy irradiation in these two cell lines. The results show that cells treated with a single dose of irradiation develop a polyploid giant cancer cell phenotype with apparent involvement of autophagy and entosis, mechanisms that could be responsible for the survival of radioresistant cells in this study model. Finally, the use of an autophagosome formation inhibitor, 3MA, induced a more pronounced aberrant phenotype in both lineages, reduced cell viability in both irradiated and control cells, and induced greater polyploidy in the irradiated SW-480 cells. Surprisingly, we observed that the inhibitor caused a redistribution but not a decrease of the autophagy marker, LC3B, suggesting that it did not inhibit the autophagic process in these cells. Our results contribute to a better understanding of the mechanisms of cellular response to irradiation and guide us, in future studies, to try to interfere in the resistance of these tumor cells responsible for the recurrence in this tumor type.

ÓRGÃOS FINANCIADORES:

Instituto Nacional De Câncer – Ministério da Saúde (INCa – MS)

Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1- Panorama de casos dos tipos de tumores mais incidentes entre homens e mulheres no Brasil estimados para o ano de 2020, exceto tumores tipo pele não melanoma.....	13
Figura 1.2- Sequência adenoma-carcinoma para formação do câncer colorretal.....	14
Figura 1.3- Fatores de risco para o câncer colorretal.....	16
Figura 1.4- Mecanismos de radiorresistência e suas implicações.....	18
Figura 1.5- Ciclo celular das células de câncer poliploides gigantes	21
Figura 5.1- Alterações morfológicas em diferentes linhagens de câncer de cólon após irradiação com 5 Gy.....	31
Figura 5.2- Modelo de irradiação hipofracionada favorece a formação de células poliploides gigantes.....	34
Figura 5.3- Análise da viabilidade celular após irradiação.....	36
Figura 5.4- Irradiação em dose única recapitula alterações morfológicas do modelo de irradiação hipofracionada de forma dose-dependente.....	37
Figura 5.5- Aumento do número de células poliploides após irradiação ocorre de forma dose-dependente.....	39
Figura 5.6- Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão de células da linhagem HCT-116.....	41
Figura 5.7- Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão de células da linhagem SW-480.....	42
Figura 5.8- Ambas as linhagens analisadas ativam o processo de entose em resposta à irradiação.....	44
Figura 5.9- A irradiação induz a redistribuição da proteína LC3B.....	46
Figura 5.10- O tratamento com 3MA nas células irradiadas resulta em um fenótipo aberrante pronunciado.....	48
Figura 5.11- O tratamento com 3MA aumenta a redução de viabilidade celular pela irradiação.....	50
Figura 5.12- O tratamento com 3MA leva ao aumento da ploidia na linhagem SW-480.....	52
Figura 5.13- O tratamento com 3MA induz a redistribuição da proteína LC3B nas células irradiadas.....	54
Figura 5.14- O tratamento com 3MA induz a redistribuição da proteína LC3B também nas células controle.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABCG2 – do inglês, *ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2*
- AKT – do inglês, *Ak Strain Transforming*
- anti-EGFR – Inibidor do receptor do fator de crescimento epidérmico
- anti-VEGF – Inibidor do fator de crescimento endotelial vascular
- APC – do inglês, *Adenomatous Polyposis Coli*
- ATCC – do inglês, *American Type Culture Collection*
- BRAF – do inglês, *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*
- BSA – Albumina sérica bovina
- CCR – Câncer Colorretal
- CDC25C – do inglês, *cell division cycle 25C*
- CDK1 – Quinase 1 dependente de ciclina
- CDK2 – Quinase 2 dependente de ciclina
- CD44 – do inglês, *cluster of differentiation 44*
- CD133 – do inglês, *cluster of differentiation 133*
- CIN – Instabilidade cromossômica
- CTNNB1 – do inglês, *Catenin Beta 1*
- CTT – Células-tronco tumorais
- DCC – do inglês, *Deleted in Colorectal Carcinoma*
- DMEM do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ESMO – do inglês, *European Society for Medical Oncology*
- GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- hMLH1 – do inglês, *mismatch repair genes human mutL homolog 1*
- hMSH2 – do inglês, *mismatch repair genes human mutS homolog 2*
- HNPCC – Câncer Colorretal Hereditário Não-poliposo
- IDH – Índice de Desenvolvimento Humano
- IGF – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
- IP – Iodeto de propídeo
- KRAS – do inglês, *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
- LC3B – do inglês, *autophagy marker Light Chain 3*

3MA – 3-metiladenina

MAPK – Proteína-quinases ativadas por mitógeno

MEK – Quinase ativadora da MAP quinase

MSI – Instabilidade de microssatélites

MSS – Estabilidade de microssatélites

MTT – *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid*

OCT3/4 do inglês, *octamer binding transcription facto 3/4*

PBS – do inglês, *Phosphate Buffered Saline*

PGCC – do inglês, *Polyploid Giant Cancer Cell*

PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase

PAF – Polipose adenomatosa familiar

PTEN – Fosfatase e tensina homóloga

QT – Quimioterapia

RT – Radioterapia

SFB – Soro fetal bovino

SOX-2 – do inglês, *sex determining region Y related group box 2*

TEM – Transição epitélio-mesenquimal

TGF- β – do inglês, *Transforming growth factor beta*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Câncer Colorretal	13
1.1.1 Epidemiologia	13
1.1.2 Patogênese do câncer colorretal	13
1.1.3 Fatores de risco do câncer colorretal	15
1.2 Abordagens terapêuticas do câncer colorretal	16
1.3 Mecanismos de radioresistência	17
1.3.1 Autofagia na radioresistência	18
1.4 Formação de células de câncer poliploides gigantes.....	19
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	24
3.1. Objetivo Geral	24
3.2. Objetivos específicos	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Cultura de células	25
4.2 Modelos de irradiação.....	25
4.2.1 Protocolo de Irradiação Hipofracionada (25 Gy)	25
4.2.2 Dose única (5 ou 10 Gy)	26
4.3 Tratamento com 3-metiladenina (3MA): inibição da autofagia	26
4.4 MTT: viabilidade celular	26
4.5 Avaliação da poliploidia por citometria de fluxo	27
4.6 Imunofluorescência.....	28
4.7 Microscopia eletrônica de transmissão.....	29
4.8 Análises estatísticas	29
5. RESULTADOS	30
5.1 Células de câncer colorretal passam por alterações morfológicas em resposta à irradiação.....	30
5.2 Protocolo de irradiação hipofracionada leva a extensas alterações celulares que se assemelham ao fenótipo de Células de Câncer Poliploides Gigantes.....	32
5.3 Irradiação em dose única leva a uma redução moderada na viabilidade celular após 96 horas.....	35
5.4 Células de câncer colorretal passam por extensas alterações morfológicas independente do protocolo de irradiação utilizado.....	36

5.5 Células irradiadas sofrem alterações quanto à ploidia de forma dose dependente.....	38
5.6 Análise das alterações morfológicas por microscopia eletrônica de transmissão	40
5.7 Células de câncer colorretal ativam o processo de entose em resposta à irradiação.....	42
5.8 Células irradiadas redistribuem a proteína LC3B pelo citoplasma celular sugerindo aumento do processo autofágico.....	44
5.8.1 O tratamento com 3MA induz a um fenótipo aberrante mais pronunciado frente a irradiação, em ambas as linhagens celulares.....	46
5.8.2 O tratamento com 3MA reduz a viabilidade celular tanto nas células controle quanto nas irradiadas.....	49
5.8.3 A inibição da autofagia induz à poliploidia em células SW-480 irradiadas.....	50
5.8.4 O tratamento com 3MA leva a uma redistribuição da proteína LC3B.....	53
6. DISCUSSÃO.....	57
7. CONCLUSÃO.....	64
8. REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer Colorretal

1.1.1 Epidemiologia

O câncer colorretal (CCR) é a segunda neoplasia mais incidente tanto entre homens quanto entre mulheres no Brasil, excluindo-se os tumores tipo pele não melanoma (Figura 1.1) e estima-se para o triênio 2020-2022 41 mil novos casos no país (INCA, 2019). No panorama global, o CCR estabeleceu-se no ano de 2020 como o terceiro tipo de câncer mais diagnosticado entre homens e mulheres; a segunda maior causa de morte por câncer e se configurando também como um indicador socioeconômico, tendo em vista a maior incidência entre os países que detêm os melhores IDH (Índices de Desenvolvimento Humano) (SUNG *et al.*, 2021).


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

Figura 1.1- Panorama de casos dos tipos de tumores mais incidentes entre homens e mulheres no Brasil estimados para o ano de 2020, exceto tumores tipo pele não melanoma. Na imagem é destacado o perfil de distribuição dos casos de tumores de cólon e reto entre homens e mulheres no Brasil. Adaptado de INCA, 2019.

1.1.2 Patogênese do câncer colorretal

Os tumores colorretais podem ser classificados em: esporádico, hereditário ou familiar. Seu enquadramento dependerá da origem da mutação que levou ao desenvolvimento deste tumor. Os carcinomas colorretais de origem esporádica representam 70% dos casos, surgindo a partir de mutações pontuais em diferentes genes, o que configura uma patogênese heterogênea. Essas mutações ocorrem classicamente nos genes APC, KRAS, TP53 e DCC promovendo uma lesão adenomatosa (pólipo adenomatoso) que progride lentamente até o estabelecimento do carcinoma (MÁRMOL *et al.*, 2017) caracterizando assim, o que chamamos de sequência adenoma-carcinoma para formação do CCR (Figura 1.2) (LIN *et al.*, 2009).

O CCR de origem hereditária representa cerca de 5% dos casos, sendo subdividido em duas formas: a Polipose Adenomatosa Familiar (PAF), resultante do acometimento por inúmeras lesões pólio-adenomatosas; e o Câncer Colorretal Hereditário Não-poliposo (HNPCC), resultante de mutações em genes de reparo. Dentre este último temos ainda um subgrupo de casos resultantes da Síndrome de Lynch, que representa cerca de 2 a 3% dos casos de HNPCC (MÁRMOL *et al.*, 2017), e que é causada por uma falha no sistema de reparo de bases do DNA durante a replicação (*mismatch repair*) ocasionando instabilidade nas regiões de microssatélite.

Nestes tumores é possível notar, através de análises moleculares, que ocorre uma deficiência nas proteínas que atuam nesse sistema de reparo resultando, portanto, na instabilidade de microssatélites (MSI) (RASKOV *et al.*, 2014; DEKKER *et al.*, 2019). No entanto, é importante pontuar que a MSI não é um processo exclusivo da Síndrome de Lynch, apresentando-se ainda em cerca de 15% dos casos de CCR esporádicos (DEKKER *et al.*, 2019). E, por fim, os 25% de casos restantes são representados pelo CCR do tipo familiar, que não apresentam associação com mutações em genes da linhagem germinativa e cujas bases genéticas ainda precisam ser melhor elucidadas (STOFFEL; KASTRINOS, 2014; MÁRMOL *et al.*, 2017).

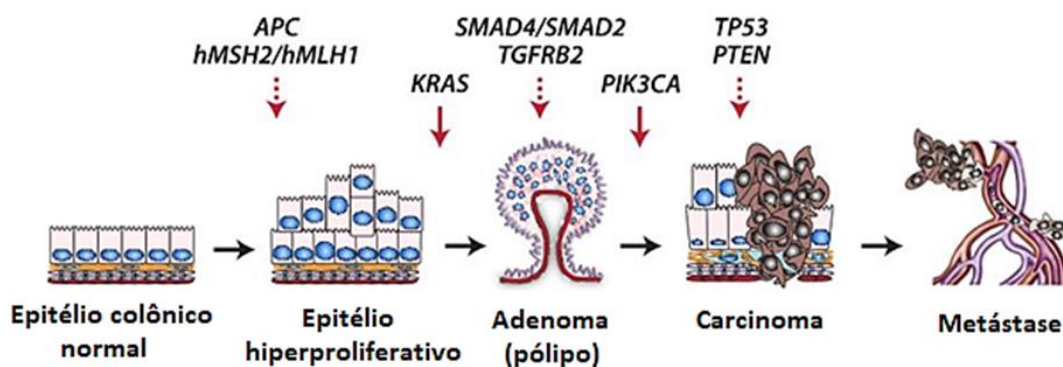


Figura 1.2- Sequência adenoma-carcinoma para formação do câncer colorretal. Representação do estabelecimento da progressão do CCR através do acúmulo de mutações em sequência, o que se inicia com o ganho de mutações no gene APC podendo levar a um desequilíbrio entre os eventos de diferenciação e proliferação celular e, por conseguinte, alterações nos genes responsáveis pelo reparo nos erros de replicação do DNA (*mismatch repair*) *hMSH2/hMLH1* resultando na transformação de um epitélio colônico em equilíbrio para um epitélio hiperproliferativo. Seguindo-se para o ganho de mutações em *KRAS* que leva a ativação das vias de MAPK e PI3K-AKT e ao estabelecimento de pólipos hiperplásicos. Na sequência, a inativação da via de TGF-β auxilia no estabelecimento do carcinoma. Mutações em TP53 também são bem documentadas em uma parcela dos tumores colorretais contribuindo para o potencial invasivo desta neoplasia. Adaptado de LIN *et al.*, 2009.

Além disso, há alterações genômicas que são responsáveis por afetar vias de sinalização importantes para a progressão do CCR. Mutações como as que ocorrem no gene APC são as principais responsáveis por alterações na via de WNT, que está associada à diferenciação e ao crescimento celular (MÁRMOL *et al.*, 2017), e também se sabe que a sua ativação está correlacionada ao aumento da atividade de MYC, um importante biomarcador no CCR (CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012). Outras mutações frequentes neste tipo de tumor ocorrem nos genes KRAS, BRAF e PI3CA, afetando vias relacionadas à proliferação e sobrevivência celular como a via de MAPK/PI3K; ou ainda mutações nos supressores tumorais SMAD2 e SMAD4 afetando a via de TGF- β , importante nos processos de proliferação, diferenciação e apoptose (MÁRMOL *et al.*, 2017).

1.1.3 Fatores de risco para o câncer colorretal

A etiologia do CCR está relacionada a diversos fatores. Indivíduos com 50 anos ou mais apresentam maior predisposição a desenvolver este tipo de tumor, pois a lesão precursora desta neoplasia (pólipo adenomatoso) é mais incidente conforme o avanço da idade; e homens tendem a ser mais acometidos do que mulheres (CORLEY *et al.*, 2013). Outros fatores que também podem contribuir para esta condição estão associados ao estilo de vida como alcoolismo, tabagismo, sedentarismo, obesidade, alta ingestão de alimentos processados e carne vermelha, além de baixa ingestão de fibras e de alimentos ricos em cálcio. Histórico familiar de CCR ou de lesões pólipó-adenomatosas; Polipose Adenomatosa Familiar (PAF); Câncer Colorretal hereditário Não-poliposo (HNPCC); histórico de doença inflamatória intestinal crônica (colite ulcerativa ou doença de Crohn); Síndrome de Lynch; diabetes tipo II; e exposição ocupacional à radiação ionizante também são fatores de risco (INCA, 2019; (RASKOV *et al.*, 2014) (Figura 1.3).

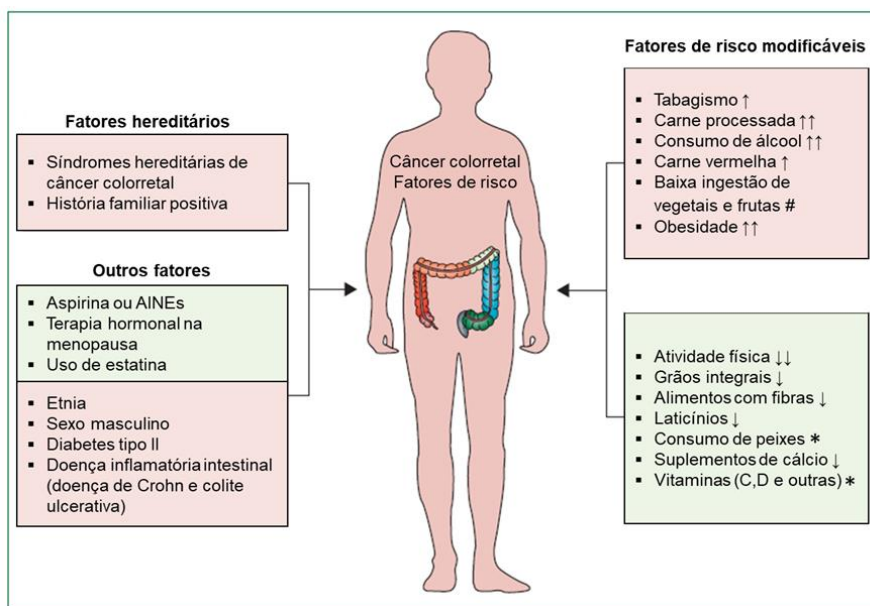


Figura 1.3- Fatores de risco para o câncer colorretal. Esquema dos fatores de risco para o CCR. Nas caixas de texto em cor rosa são citados os fatores considerados de risco, subclassificados em modificáveis e hereditários, e nas caixas em cor verde os fatores protetivos. Estes fatores são ainda classificados quanto aos seus graus de correlação para a probabilidade de ocorrência do CCR em: (↑↑) fator de risco convincente, (↑) fator de risco provável, (↓↓) fator protetor convincente, (↓) fator protetor provável, (#) fator de risco sugestivo, (*) fator protetor sugestivo. AINES: antiinflamatórios não esteroidais. Adaptado de DEKKER *et al.*, 2019.

1.2 Abordagens terapêuticas do câncer colorretal

A principal abordagem terapêutica para combate ao CCR se baseia na ressecção das lesões poliposas por colonoscopia associada, ou não, à indicação de cirurgia para remoção total da lesão quando necessário (DEKKER *et al.*, 2019). Nos casos dos tumores de reto, devido a restrições anatômicas para a ressecção conservadora do tumor e uma margem de segurança, indica-se a radioterapia (RT) neoadjuvante, a depender da extensão tumoral, e o tratamento pós-operatório associado à quimioterapia (QT). Sendo esta última comumente a abordagem de primeira escolha seguida de cirurgia para grupos de pacientes considerados de alto risco (LI *et al.*, 2016; DEKKER *et al.*, 2019).

A quimioradioterapia neoadjuvante apresenta prós e contras. Isto porque ela pode promover a sensibilização da massa tumoral antes da cirurgia, ou ainda diminuindo o tamanho da lesão e consequentemente permitindo uma maior possibilidade de preservação do tecido após a cirurgia. No entanto, a seleção dos pacientes para adoção desta abordagem terapêutica deve ser bem avaliada, tendo em vista que esta estratégia não é recomendada para casos de tumores

em estadiamento inicial, pois é preciso considerar que o pré-tratamento pode resultar na inflamação do tecido e com isso aumentar as chances de hemorragia durante a cirurgia.

No que se refere a terapia adjuvante com quimioterápicos no CCR, essa se dá pela adoção de um esquema de administração com fluoropirimidinas (capecitabina ou 5-FU), oxaliplatina e/ou irinotecano, podendo ainda se associar anticorpos anti-VEGF ou anti-EGFR, o que dependerá do quadro clínico do paciente e de características do tumor. Sendo ainda possível adotar várias combinações de tratamentos para os casos metastáticos, como o uso de quimioterápicos, imunobiológicos, imunoterápicos e inibidores de BRAF e/ou BRAF e MEK (DEKKER *et al.*, 2019).

Para os pacientes em que se avalia uma baixa tolerância à quimioterapia de longo prazo adota-se na clínica o protocolo de radioterapia curta, hipofracionada, estabelecido pelo guia de diretrizes da ESMO (do inglês *European Society for Medical Oncology*), que consiste em 5 doses de 5 Gy, totalizando 25 Gy, realizadas no período de uma semana. (LI *et al.*, 2016).

A RT neoadjuvante reduz o risco de recorrência local do tumor em comparação com o tratamento apenas cirúrgico. No entanto, essa abordagem não possui impacto na sobrevida dos pacientes (SAUER *et al.*, 2004; VAN GIJN *et al.*, 2011) e tampouco na formação de metástases à distância (ENGELEN *et al.*, 2013; BANWELL *et al.*, 2019). Além disso, as recorrências locais com o uso da RT pré-operatória ainda ocorrem em 5 a 11% dos pacientes (SEBAG-MONTEFIORE *et al.*, 2009; VAN GIJN *et al.*, 2011). Isso sugere que as células podem adquirir mecanismos de resistência que possibilitam a sua sobrevivência após a RT.

1.3 Mecanismos de radioresistência

A radioterapia é indicada para o tratamento com intenção curativa ou paliativa, no entanto a radioresistência é a principal causa da falha terapêutica levando a recorrência tumoral e formação de metástase (RYCAJ; TANG, 2014). A RT pode causar danos diretos ou indiretos nas células. Os efeitos diretos estão relacionados com o dano a biomoléculas como proteínas, lipídeos e,

principalmente, o DNA. Enquanto a ação indireta ocorre através do aumento de espécies reativas de oxigênio (Wang *et al.*, 2018b). A Figura 1.4 mostra a ação biológica da irradiação e os mecanismos de radioresistência. Alguns desses mecanismos relacionados com o presente estudo, como a regulação da autofagia, serão abordados ao longo do texto.

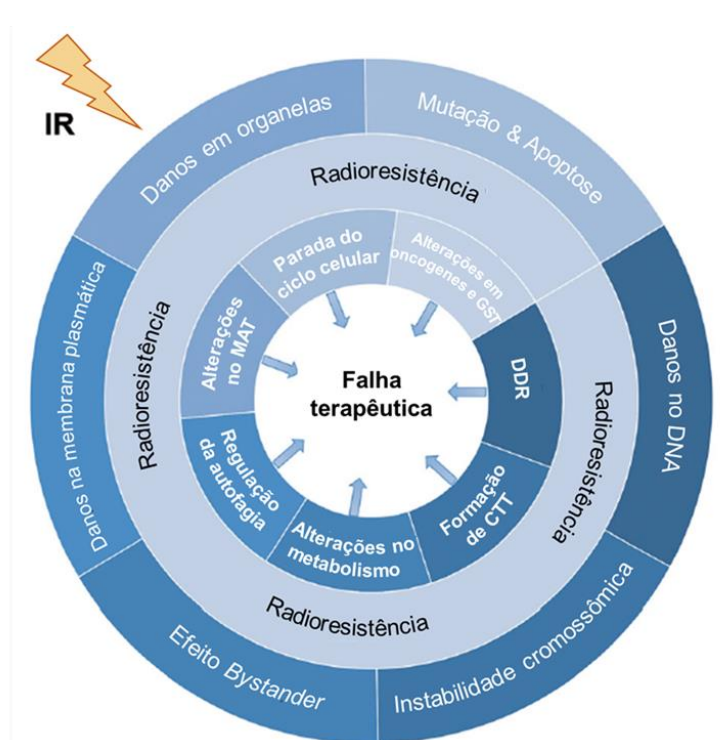


Figura 1.4- Mecanismos de radioresistência e suas implicações. A circunferência mais externa indica os efeitos moleculares causados pela radioterapia no organismo. A circunferência interna indica os mecanismos de radioresistência associados a esses efeitos e que contribuem para os desafios decorrentes da falha terapêutica na prática clínica. IR: irradiação, MAT: microambiente tumoral, DDR: *DNA damage response*, CTT: células-tronco tumorais, GST: genes supressores tumorais. Adaptado de TANG *et al.*, 2018

1.3.1 Autofagia na radioresistência

Autofagia é um processo intracelular catabólico, no qual as células digerem e reciclam seu próprio conteúdo citoplasmático e a sua regulação se dá por genes coletivamente chamados de *ATG (AuTophagy)*. Essa nomenclatura também é utilizada para representar as proteínas codificadas por esses genes. O processo de autofagia tem sido amplamente estudado e compreende várias etapas que são finamente reguladas (LI; HE; MA, 2020).

A autofagia pode ser ativada por fatores como, por exemplo, a falta de nutrientes, estresse oxidativo, hipóxia, QT e RT (HU *et al.*, 2016). Alguns estudos

demonstram que a radioresistência está frequentemente associada à regulação positiva da autofagia, o que já foi observado em diferentes tipos de tumores (CHEN *et al.*, 2010a; MO *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2015). No contexto da radioresistência, a autofagia é responsável pela eliminação de espécies tóxicas, como radicais livres, macromoléculas citoplasmáticas e proteínas ou organelas danificadas (TOWERS; THORBURN, 2016). Esse processo gera energia e precursores metabólicos que sustentam a sobrevivência do tumor (CHEN *et al.*, 2010). Além disso, a autofagia pode induzir senescência (TAM; WU; LAW, 2017), promover disseminação metastática (LI; HE; MA, 2020) e atuar na sobrevivência, diferenciação e auto renovação de células-tronco tumorais (CTT) (YUN; LEE, 2018). No entanto, a autofagia também pode induzir morte celular, denominada de morte celular programada tipo II, em resposta à RT (HU *et al.*, 2016).

A função da autofagia frente ao tratamento com RT parece depender do tipo, estadio e contexto genético do tumor, bem como da dose da RT (OUELLETTE; YAN, 2019). No entanto, seu uso como alvo terapêutico ainda precisa ser determinado, uma vez que tanto abordagens que inibem a autofagia quanto as que induzem tem demonstrado resultados positivos para a sensibilização do tumor à RT (ONDREJ *et al.*, 2016).

1.4 Formação de células de câncer poliploides gigantes

As PGCCs (do inglês, *Polyploid Giant Cancer Cells*) são uma subpopulação de células tumorais caracterizadas por possuírem um núcleo com tamanho cerca de três vezes maior quando em comparação ao núcleo regular de suas células parentais diploides (ZHANG; MERCADO-URIBE; LIU, 2013) e por apresentarem cariótipo anormal, o que contribui para a heterogeneidade de tumores sólidos (NIU *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2014b). Essas células podem se originar de processos de endoreduplicação ou fusão celular, dividindo-se de forma assimétrica, e possuem ciclo celular lento (ZHANG *et al.*, 2014b). As PGCCs são mais comumente observadas em tumores com maior potencial agressivo; em metástase e tumores recorrentes após quimioterapia (LV *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014a, 2014b; FEI *et al.*, 2015).

Niu e colaboradores (2016) descreveram através da observação da dinâmica dos cromossomos, do fuso acromático e do ciclo celular de células de ovário, o que representaria os estágios do processo de reprogramação pelos quais essas células passariam no desenvolvimento tumoral. Este processo foi denominado “*The Giant cell cycle*” (NIU *et al.*, 2016).

O ciclo celular das PGCCs pode ser dividido em quatro fases: iniciação; autorenovação; terminação e estabilidade. Na iniciação, temos células em G1 sob a ação de um agente causador de estresse, enquanto há células em G2 sob catástrofe mitótica e sofrendo morte celular. Já em outra subpopulação de células, o processo de replicação é “desvinculado” da mitose e da citocinese, os *checkpoints* clássicos em G1/S e G2/M são desativados e a divisão celular fica em segundo plano, dando espaço para os processos de apoptose ou senescência que ocorrem mediante supressão da atividade de proteínas mitóticas como H1, Aurora quinase A e Aurora quinase B. Desta forma, as células sobreviventes entram em endoreduplicação e ganham caráter poliploide. Em seguida, na fase de autorenovação, boa parcela das PGCCs morre; as células tetraploides permanecem ciclando por endomitose ou endoreplicação e perpetuando, assim, a formação de PGCCs mononucleadas ou multinucleadas. A partir do que, se segue a fissão celular a fim de que as novas células formadas tenham caráter poliploide. Com isso, encaminha-se para a fase de terminação, na qual os núcleos sofrerão despoliploidização o que resulta na geração de células filhas diploides. Os núcleos gigantes dão origem a núcleos menores, o que pode ocorrer por brotamento, fragmentação ou fissão nuclear seguida de citofissão. Por fim, essas células filhas formadas adquirem um novo genoma, são capazes de entrar em mitose e alcançam uma estabilização em seu cariótipo (NIU *et al.*, 2016). Assim, se estabelece o ciclo celular das PGCCs, o qual é ilustrado na figura abaixo (Figura 1.5).

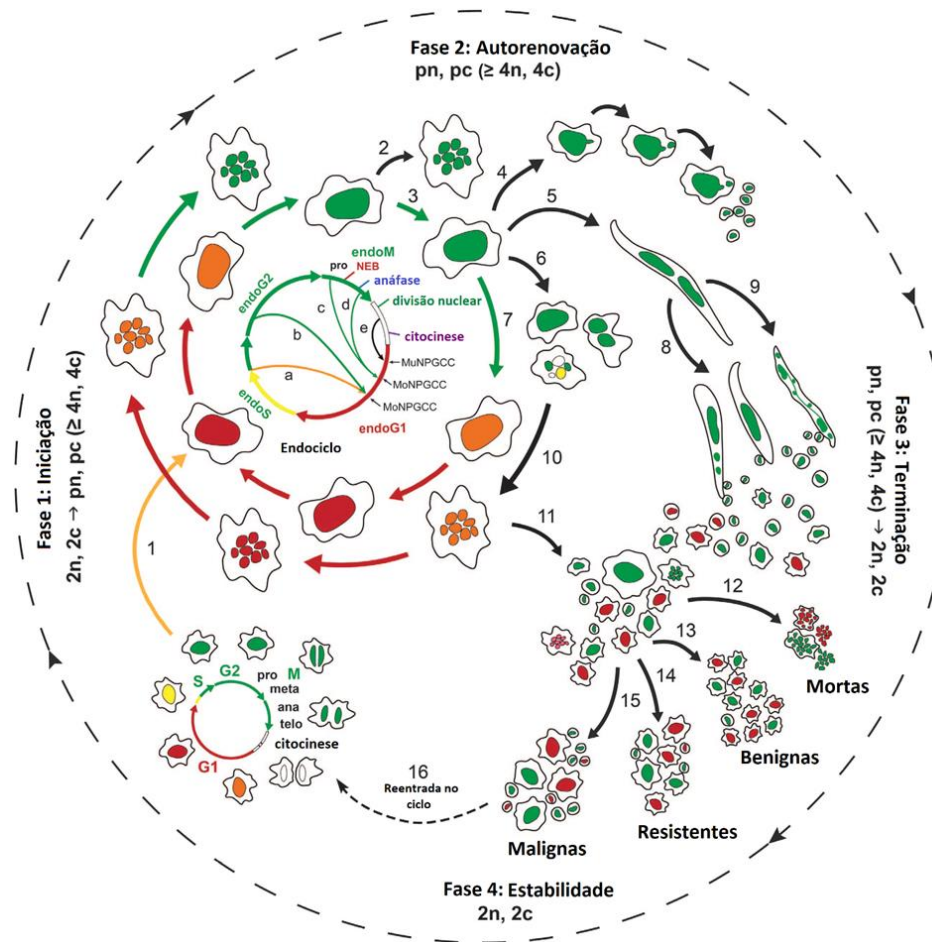


Figura 1.5- Ciclo celular das células de câncer poliploides gigantes. O ciclo celular das PGCCs pode ser dividido em quatro fases: iniciação; autorenovação; terminação e estabilidade. A cor do núcleo indica a fase do ciclo celular (G1: vermelho; S: laranja/amarelo; G2/M: verde; M: incolor). A seta rotulada 1 indica o início do endoreplicação de células diplóides para se tornarem tetraplóides após o término da mitose. As outras setas marcadas indicam possíveis resultados após o início da endoreplicação, como por exemplo: 2, endomitose para gerar uma PGCC multinucleada; 3, 7 e 10, endoreplicação contínua; 4, brotamento de células filhas; 5, fissão nuclear dentro de uma PGCC; 6, mitose multipolar seguida de citofissão. 8 e 9, fragmentação continuada e brotamento de PGCC; 11, retomada da mitose das células filhas; 12, morte de PGCC; 13, diferenciação em células estromais benignas; 14, novas células tumorais recém-adquiridas com paisagem genética/epigenética; 15, clones malignos com potencial metastático; 16, início do ciclo de células gigantes se as células tumorais enfrentarem um novo evento catastrófico. 2n, 2c: células tumorais diplóides ou pseudo-diplóides na fase G1. pn, pc: células tumorais poliploides definidas por ploidia $\geq 4n$, 4c na fase G1. Adaptado de NIU *et al.*, 2016.

Já foi demonstrado que a presença de PGCCs em amostras de tecidos de carcinoma de ovário seroso era gradativa conforme o seu grau de malignidade, além de terem sido detectadas em áreas de necrose e nas áreas de secção cirúrgica limite entre o tecido tumoral e seu normal adjacente, região caracterizada por um microambiente em estado de hipóxia (ZHANG *et al.*, 2014a).

Em um outro estudo do mesmo grupo, essas células se mostraram resistentes à cisplatina, no qual foi observado que, tanto em linhagem de células HEY quanto *in vivo*, a quantidade e o tamanho das PGCCs eram notadamente maiores quando comparados às células e às amostras de tecidos antes do tratamento com este quimioterápico (grupos controle) (ZHANG *et al.*, 2014b). Além de terem apresentado a capacidade de formarem esferoides a partir de linhagens de células de tumores de ovário HEY, SKOv3 e de mama MDA-MB-231, análises de imunohistoquímica revelaram marcação positiva para CD44 e CD133 *in vitro*; e de OCT3/4, Nanog, SOX-2 e ABCG2 nos tumores formados após a inoculação desses esferoides em camundongos nude. A presença destes marcadores revela a capacidade das PGCCs em formar novos tumores devido às características tronco-tumorais. O que foi corroborado pela diferenciação induzida dessas células em distintos tecidos como adiposo, cartilaginoso e ósseo (ZHANG *et al.*, 2014b).

As PGCCs também possuem capacidade de gerar células-filhas com potencial para migrar, invadir e estabelecer metástase, o que já foi visto em tumores de mama. Fei e colaboradores (2015) observaram maiores níveis proteicos de marcadores mesenquimais, como N-caderina e Vimentina, e menores níveis do marcador epitelial E-caderina em populações de células-filhas de PGCCs derivadas das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, quando comparado aos seus respectivos grupos controle. Através de ensaios funcionais, observou-se que esta mesma população celular possui maior capacidade para migrar e invadir. A análise imunohistoquímica de 167 amostras de câncer de mama também mostrou maior presença dos marcadores mesenquimais e menor nível do marcador epitelial E-caderina em células PGCC do estroma de tumores de mama com metástase para linfonodos. Assim, se supôs que esse aumento do potencial invasivo dessas células está correlacionado à capacidade de estas desencadearem mecanismos de migração e invasão a partir do programa de transição epitélio-mesenquimal (TEM) (FEI *et al.*, 2015), tido como um processo central na cascata metastática (PASTUSHENKO; BLANPAIN, 2019).

A observação de PGCCs no contexto da tumorigênese é um evento cada vez mais notável, no entanto, a compreensão de sua formação e as implicações disso vem se estabelecendo mais recentemente, bem como a necessidade de

mais estudos. Como relatado por Amend e colaboradores (2019), muitos estudos não levam em consideração essa subpopulação de células que sobrevivem muitas vezes em uma quantidade inferior ao limite de detecção de sua presença pelos testes diagnósticos realizados, mas em quantidade suficiente para a posterior formação de uma recidiva. Essas células desempenham importante papel na metástase, na expansão de células tumorais que se dividem de forma assíncrona e na resistência à terapia. Supõe-se que as PGCCs entram nesse estado a partir do ganho de características de células tronco-tumorais, o que lhes permitiria sobreviver à intervenção terapêutica e, por conseguinte, reentrar no ciclo celular e formar células filhas (ZHANG *et al.*, 2014b; AMEND *et al.*, 2019).

2 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a RT é amplamente utilizada como terapia neoadjuvante para o tratamento de tumores retais em estadiamento avançado, pois reduz o risco de recorrência local. No entanto, essa abordagem não possui impacto na sobrevida dos pacientes, tampouco na formação de metástases (YAMASHITA *et al.*, 2018; BANWELL *et al.*, 2019). Este fato contribui para o fracasso terapêutico, visto que o desenvolvimento de recidivas à distância, que ocorre em cerca de 35% dos pacientes dentro de 5 anos após o tratamento trimodal (cirurgia, QT e/ou RT), é a principal causa de mortalidade nessa população (FRANKE *et al.*, 2018).

Estudos demonstram que as células de CCR que persistem após a irradiação adquirem mecanismos de resistência e exibem um fenótipo mais agressivo do que as suas contrapartes não irradiadas. Embora muitos mecanismos de radioresistência já tenham sido descritos e novos radiosensibilizadores estejam em análises, o estudo de novos alvos terapêuticos ainda se justifica, pois poucos avanços no tratamento do CCR foram obtidos (GEORGE *et al.*, 2019; BUCKLEY *et al.*, 2020). Portanto, é de extrema importância que haja mais estudos tentando identificar os mecanismos celulares e os biomarcadores responsáveis pela aquisição de um fenótipo resistente a doses de irradiação clinicamente relevantes para que, assim, busque se desenvolver novas estratégias terapêuticas para aumentar o êxito da RT em pacientes com CCR.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar o perfil das alterações morfogenéticas em células de câncer colorretal resistentes ao tratamento com diferentes doses de irradiação.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos de diferentes doses de irradiação (25 Gy hipofracionados e doses únicas de 5 ou 10Gy) sobre a morfologia de células de CCR;
- Avaliar a sobrevivência de células submetidas a diferentes doses de irradiação;
- Identificar eventos celulares responsáveis pela sobrevivência das células resistentes à irradiação: poliploidia, autofagia e entose;
- Avaliar a inibição da autofagia, usando 3MA, sobre os eventos acima mencionados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura de células

Duas linhagens celulares derivadas de CCR humano foram utilizadas neste estudo: (I) células de carcinoma de cólon HCT-116 (catálogo ATCC: CCL-247), que se caracterizam por serem indiferenciadas, terem alto potencial invasivo e metastático, mutações em KRAS, PIK3CA e CTNNB1 (gene da β -catenina) (BERG *et al.*, 2017) e uma taxa de 6,8% de ocorrência de células poliploides (ATCC, 2021) e (II) células de adenocarcinoma de cólon SW-480 (catálogo ATCC: CCL-228), as quais são moderadamente diferenciadas e com perfil de mutação nos genes APC (ROWAN *et al.*, 2000), KRAS e TP53 (AHMED *et al.*, 2013).

As células HCT-116 foram cultivadas em meio DMEM (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (GIBCO - Life Technologies) e as células SW-480 foram mantidas em meio DMEM com *nutriente mixture F-12 ham* na proporção 1:1 (Sigma-Aldrich). Ambos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (GIBCO - Life Technologies), penicilina G (60 mg/L) e estreptomicina (100 mg/L) (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas em estufa úmida a 37°C sob atmosfera contendo 5% de CO₂.

Para a manutenção e os ensaios subsequentes as células foram cultivadas em garrafas para cultura celular, com 25 cm² e 75 cm² de área para crescimento, ou em placas de 6, 12 e 96 poços (Greiner Bio-One Inc., Áustria). Quando necessário, as células foram lavadas com PBS (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) pH 7,2 e tripsinizadas com 0,01% de tripsina/0,02% EDTA diluídos em PBS (Sigma-Aldrich). O monitoramento do cultivo e do crescimento, bem como o acompanhamento da morfologia celular foram realizados no microscópio Axio Observer. Z1 (Carl Zeiss Inc., Alemanha).

4.2 Modelos de irradiação

4.2.1 Protocolo de Irradiação Hipofracionada (25 Gy)

As células aderidas em placas ou garrafas e mantidas com seus respectivos meios de cultivo foram introduzidas em um irradiador ¹³⁷Cs (IBL 437C, Cis Bio International), sob uma taxa de irradiação de 1,80 Gy/min, o qual

fica alocado no Laboratório de Fracionamento do Hospital do Câncer I do Instituto Nacional de Câncer (HCI-INCA).

As células foram submetidas a uma dose diária de 5 Gy ao longo de cinco dias, totalizando 25 Gy. Uma hora antes de cada dose de irradiação as células tiveram seu meio de cultivo trocado. As células controles (não irradiadas) foram mantidas com seus respectivos meios e a sua troca foi realizada diariamente seguindo o mesmo protocolo das células irradiadas.

4.2.2 Dose única (5 ou 10 Gy)

O modelo de irradiação de dose única foi realizado de modo similar ao descrito anteriormente. No entanto, as células foram irradiadas com dose única de 5 ou 10 Gy e avaliadas após 96 h. Nas primeiras 48 h subsequentes à irradiação as células permaneceram com o meio irradiado e após este período o meio foi trocado e mantido por mais 48 h, totalizando 96 h.

4.3 Tratamento com 3-metiladenina (3MA): inibição da autofagia

Uma preparação estoque de 3MA a 25 M (Sigma-Aldrich) foi feita como segue: 3MA foi diluído em água Milli-Q[®] (Merck) estéril e aquecida a 100°C para dissolver o precipitado formado e resultar, assim, em uma solução homogênea. As células foram tratadas com esse inibidor de autofagia (3MA) na concentração de 5 mM, o qual foi preparado a partir da solução estoque de 25 M, irradiadas e mantidas por 48 h. Após, foram lavadas com PBS e incubadas por mais 48 h com meio sem droga e então submetidas aos ensaios funcionais subsequentes. Nos grupos não tratados (controles) foram realizadas apenas as trocas dos meios de cultivo.

4.4 MTT: viabilidade celular

Foram plaqueadas 1×10^4 células da linhagem HCT-116 e 8×10^3 células da linhagem SW-480 em placas de 96 poços, aguardou-se 48h para o crescimento das células, para então submetê-las aos tratamentos com 3MA e/ou irradiação. Ao término destes protocolos (96 h), foi realizado o ensaio de viabilidade celular com MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma - Aldrich). Para isso, os meios dos poços foram descartados e

adicionou-se uma solução de 0,5 mg/mL de MTT diluído em meio de cultivo, seguido por 3 h de incubação, sob privação da luz, em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Em seguida, para realizar a dissolução dos cristais de formazan formados no decorrer deste período, os meios com a solução de MTT foram descartados dos poços e adicionou-se 100 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido; Sigma-Aldrich) por poço. Após, as placas foram incubadas novamente durante 10 minutos na estufa e a seguir foram submetidas à agitação orbital por 5 minutos para finalizar a completa dissolução dos cristais de formazan. Por fim, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 492 nm.

4.5 Avaliação da poliploidia por citometria de fluxo

As células foram plaqueadas em garrafas de 75 cm² nas seguintes densidades: 3x10⁵ células para SW-480 controle (SW-480 - CTL) e SW-480 controle tratada com 3MA (SW-480 - CTL + 3MA), 4x10⁵ células para SW-480 irradiada com a dose de 5 Gy (SW-480 - 5 Gy) e SW-480 irradiada com a dose de 10 Gy (SW-480 - 10 Gy), 7x10⁵ células para SW-480 irradiada com a dose de 5 Gy e tratada com 3MA (SW-480 - 5 Gy + 3MA) e SW-480 irradiada com a dose de 10 Gy e tratada com 3MA (SW-480 - 10 Gy + 3MA), 2x10⁵ células para HCT-116 controle (HCT-116 - CTL) e HCT-116 controle tratada com 3MA (HCT-116 - CTL + 3MA), 8x10⁵ células para HCT-116 irradiada com a dose de 5 Gy (HCT-116 - 5 Gy) e HCT-116 irradiada com a dose de 5 Gy e tratada com 3MA (HCT-116 - 5 Gy + 3MA) e 1,1x10⁶ células para HCT-116 irradiadas com a dose de 10 Gy (HCT-116 - 10 Gy) e HCT-116 irradiadas com a dose de 10 Gy e tratadas com 3MA (HCT-116 - 10 Gy + 3MA). Aguardou-se 72 h para o crescimento das mesmas e então as células foram submetidas aos protocolos de tratamento com 3MA e/ou irradiação. Após, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, ressuspensas em PBS, contadas na câmara de Neubauer e 1x10⁶ células, de cada grupo, foram novamente ressuspensas em 1 mL de PBS. Então, seguiu-se para a etapa de fixação, onde as células foram centrifugadas, em uma minicentrífuga (*ependorf centrifuge 5415D*; Hamburgo, Alemanha) a 6000 rpm por 1 minuto, descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas — gotejando, com auxílio de um vórtex — em 1 mL de solução de etanol a 70% gelado. A solução foi armazenada *overnight* a -20°C até a etapa de marcação com o iodeto de propídeo (IP; Sigma-Aldrich).

Para a posterior marcação com IP, as células foram centrifugadas a 300 g por 5 minutos, ressuspendidas em 1 mL de PBS e centrifugadas novamente. Após, descartou-se o sobrenadante e por fim as células foram incubadas no escuro por 2 h com a solução de coloração [IP (20 µg/mL) + ribonuclease (RNAse) (500 µg/mL) (Sigma-Aldrich) diluídos em PBS)]. Por fim, a leitura foi feita em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences- EUA) e analisadas com o *software* FlowJo.

4.6 Imunofluorescência

As células foram plaqueadas em lâminas de vidro com um sistema de câmara em poliestireno Lab-Tek® (Merck) nas seguintes densidades: $0,5 \times 10^4$ células para SW-480 - CTL e SW-480 - CTL + 3MA, $0,8 \times 10^4$ células para SW-480 - 5 Gy e SW-480 - 10 Gy, 1×10^4 células para SW-480 - 5 Gy + 3MA e SW-480 - 10 Gy + 3MA, $0,5 \times 10^4$ células para HCT-116 - CTL e HCT-116 - CTL + 3MA, $0,8 \times 10^4$ células para HCT-116 - 5 Gy e HCT-116 - 5 Gy + 3MA e 1×10^4 células para HCT-116 - 10 Gy e HCT-116 - 10 Gy + 3MA.

Após 48 h, as células foram submetidas aos protocolos de tratamento com 3MA e/ou irradiação. Em seguida, foram lavadas três vezes com PBS e fixadas em paraformaldeído 4%, por 20 minutos em temperatura ambiente. Então, as células foram lavadas três vezes com PBS, incubadas com NH_4Cl 50 mM (diluído em PBS) por 10 minutos, permeabilizadas com Triton X-100 0,5% (diluído em PBS, pH 8,0) por 5 minutos, lavadas três vezes novamente e bloqueadas com BSA 0,2% em PBS por 1 h.

Posteriormente, as células foram incubadas com o anticorpo primário anti-LC3 (1:250) diluído na mesma solução de bloqueio, *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 1 h com o anticorpo secundário conjugado a Alexa 488 (diluição 1:500). Após lavagem com PBS, as células foram incubadas com faloidina conjugada ao Atto645 (1:250). Para a marcação do núcleo foi utilizado DAPI (1:1000) por 1 minuto.

As lâminas foram montadas com reagente *Antifade Prolong Glass* (Invitrogen) e observadas em microscópio confocal LSM 710 GE (Carl Zeiss, Alemanha) acoplado com câmera PCO Edge sCMOS (PCP AG, Alemanha).

4.7 Microscopia eletrônica de transmissão

As células foram plaqueadas em garrafas T25 nas seguintes densidades: 1×10^5 células para SW-480 - CTL e SW-480 - CTL + 3MA, $1,5 \times 10^5$ células para SW-480 - 5 Gy e SW-480 - 10 Gy, $2,5 \times 10^5$ células para SW-480 - 5 Gy + 3MA e SW-480 - 10 Gy + 3MA, 5×10^4 células para HCT-116 - CTL e HCT-116 - CTL + 3MA, 2×10^5 células para HCT-116 - 5 Gy e HCT-116 - 5 Gy + 3MA e $2,5 \times 10^5$ células para HCT-116 - 10 Gy e HCT-116 - 10 Gy + 3MA.

Após 48 h, as células foram submetidas aos protocolos de tratamento com 3MA e/ou irradiação. Em seguida, foram lavadas três vezes com PBS; raspadas, com um rodo próprio para células em cultura; e armazenadas em tubos de 1,5 mL. Ao tubo foi adicionado a solução de fixação (glutaraldeído 2,5%, sacarose 8% e tampão cacodilato de sódio 0,1 M), a qual foi mantida *overnight* a 4°C. Então, as células foram lavadas três vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1 M acrescido de sacarose 8% e pós-fixadas com uma solução de tetróxido de ósmio 1%, ferrocianeto de potássio 0,8% e cloreto de sódio 2 mM, por 1 h na ausência de luz. Novamente as células foram lavadas com o tampão cacodilato de sódio 0,1 M com sacarose 8%, por três vezes, e a seguir foram desidratadas com concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, 100% e super seca) por 10 minutos a temperatura ambiente. Então, procedeu-se com a inclusão das amostras em resina epóxi e após a polimerização, foram realizados cortes ultrafinos (entre 60 - 70 nm) utilizando ultramicrótomo (Leica Microsystem, Wetzlar, Alemanha). As células foram contrastadas com acetato de uranila 5% por 30 minutos, e citrato de chumbo por 5 minutos, e analisadas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai Spirit (Hitachi, CIDADE, PAÍS).

4.8 Análises estatísticas

Para análise estatística dos resultados apresentados nessa dissertação foi utilizado o programa GraphPad Prism 9, onde também foram confeccionados os gráficos apresentados. Foram realizados testes de análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias dependendo das variáveis a serem analisadas em cada resultado seguido de pós teste Sidak. Todos os dados passaram por teste de normalidade e esfericidade para verificar a necessidade de correção de Greenhouse-Geiser. O valor definido para significância foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Células de câncer colorretal passam por alterações morfológicas em resposta à irradiação

Inicialmente, para determinarmos o modelo celular a ser trabalhado, empregamos uma única dose de irradiação (5 Gy) nas cinco linhagens celulares de câncer de cólon que tínhamos disponíveis em nosso laboratório: LoVo, Caco-2, HT-29, HCT-116 e SW-480. Observamos que, 72 h após a irradiação, células de todas as linhagens testadas adquirem características morfológicas aberrantes como o ganho de volume celular, indícios de multinucleação, presença de vacúolos citoplasmáticos e aumento de projeções de membrana (Figura 5.1).

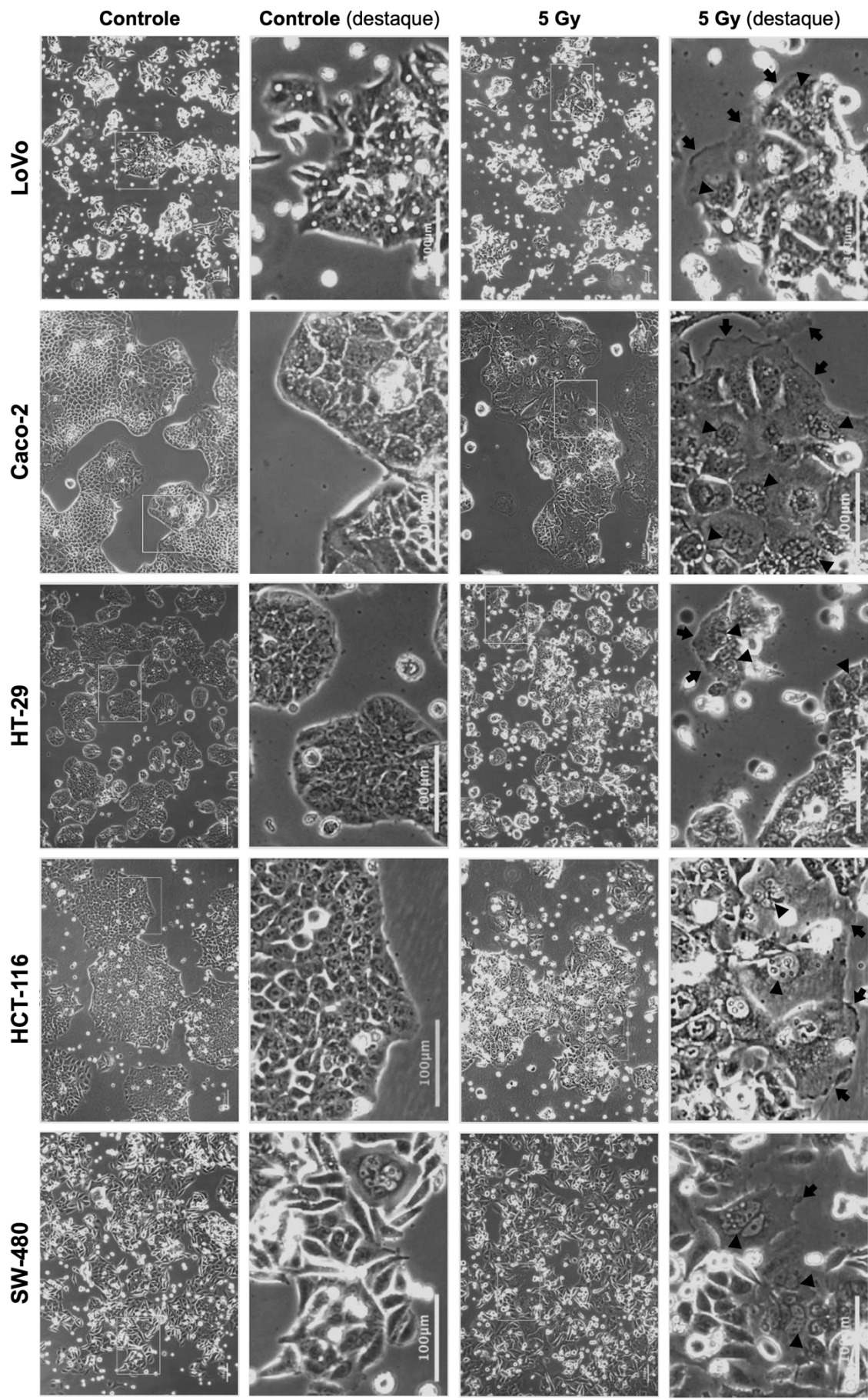


Figura 5.1- Alterações morfológicas em diferentes linhagens de câncer de cólon após irradiação com 5 Gy. As linhagens celulares LoVo, Caco-2, HT-29, HCT-116 e SW-480 foram plaqueadas, mantidas até atingirem 50% de confluência e depois submetidas a uma dose de 5 Gy, ou não (controles). Após 72 h foram obtidas as micrografias por microscopia de contraste de fase. Observam-se, com maior detalhe nas imagens em destaque, aumento do volume celular, indícios de multinucleação (indicadas pelas cabeças de seta), aumento de projeções de membrana do tipo lamelípódio (indicadas pelas setas). As micrografias são representativas de 3 experimentos independentes. Barra de escala: 100 μ m

5.2 Protocolo de irradiação hipofracionada leva a extensas alterações celulares que se assemelham ao fenótipo PGCC

Uma vez demonstrada a capacidade da irradiação em induzir alterações morfológicas sobre as linhagens celulares de câncer de cólon, desenvolvemos um protocolo de irradiação hipofracionada para mimetizar o que é praticado na clínica. As células foram plaqueadas e mantidas em crescimento por 72 h, quando então foram submetidas a um protocolo de dose diária de 5 Gy, totalizando 25 Gy ao longo de 5 dias. Após 72 h do período de irradiação essas células foram tripsinizadas e replaqueadas para a manutenção em cultura das células sobreviventes à irradiação. Após 48 h, essas células foram analisadas quanto a suas características morfológicas e ploidia (em conjunto com outra aluna de doutorado do laboratório). Este modelo é ilustrado na Figura 2A. Dentre todas as linhagens analisadas, obtivemos maior sucesso na manutenção em cultura das células sobreviventes das linhagens SW-480 e HCT-116. Levando isto em consideração e interessados em como o distinto perfil mutacional e as diferenças quanto a instabilidade genômica e de microssatélite entre essas duas linhagens impactam na resposta à radiação, optamos por continuar as posteriores análises com estas duas linhagens.

Ambas as linhagens após um total de 25 Gy de radiação apresentam multinucleação e aumento do volume celular. Na linhagem HCT-116 ainda é possível observar a presença de vacúolos no citoplasma. Na linhagem SW-480 é perceptível a perda da organização das células em ilhas. Essas características morfológicas nas células irradiadas diferem nitidamente das células dos grupos controle, as quais mantêm-se organizadas em ilhas, com os contatos celulares bem estabelecidos, volume citoplasmático preservado e número de núcleos dentro de seu padrão já estabelecido (Figura 5.2B).

A partir dessas alterações morfológicas, como o aumento do volume celular e do número de núcleos, e sabendo que a radiação é um processo físico que acarreta modificações no DNA e uma possível reconfiguração no número de cromossomos, buscamos avaliar a quantidade de material genético dessas células para verificar a ocorrência de poliploidia. Para isso foi realizado o ensaio de citometria de fluxo com marcação de iodeto de propídeo. Notamos que as células submetidas ao modelo de radiação hipofracionada tiveram seus genomas multiplicados quando comparadas aos grupos controles (Figura 5.2C). A porcentagem de células estratificadas nos grupos diploides (2N), tetraploides (4N) e demais poliploides (>4N) foi quantificada, a partir do que se verificou cerca de 55% das células sobreviventes à radiação (CSR) (56,46% na linhagem HCT-116 e 51,85% na linhagem SW-480) com o conteúdo de DNA superior a 4N, o que denota poliploidia. Nos grupos controles (CTL) houve predomínio de células diploides (2N): 47,76% na linhagem HCT-116 e 55,87% na linhagem SW-480 (Figura 5.2D).

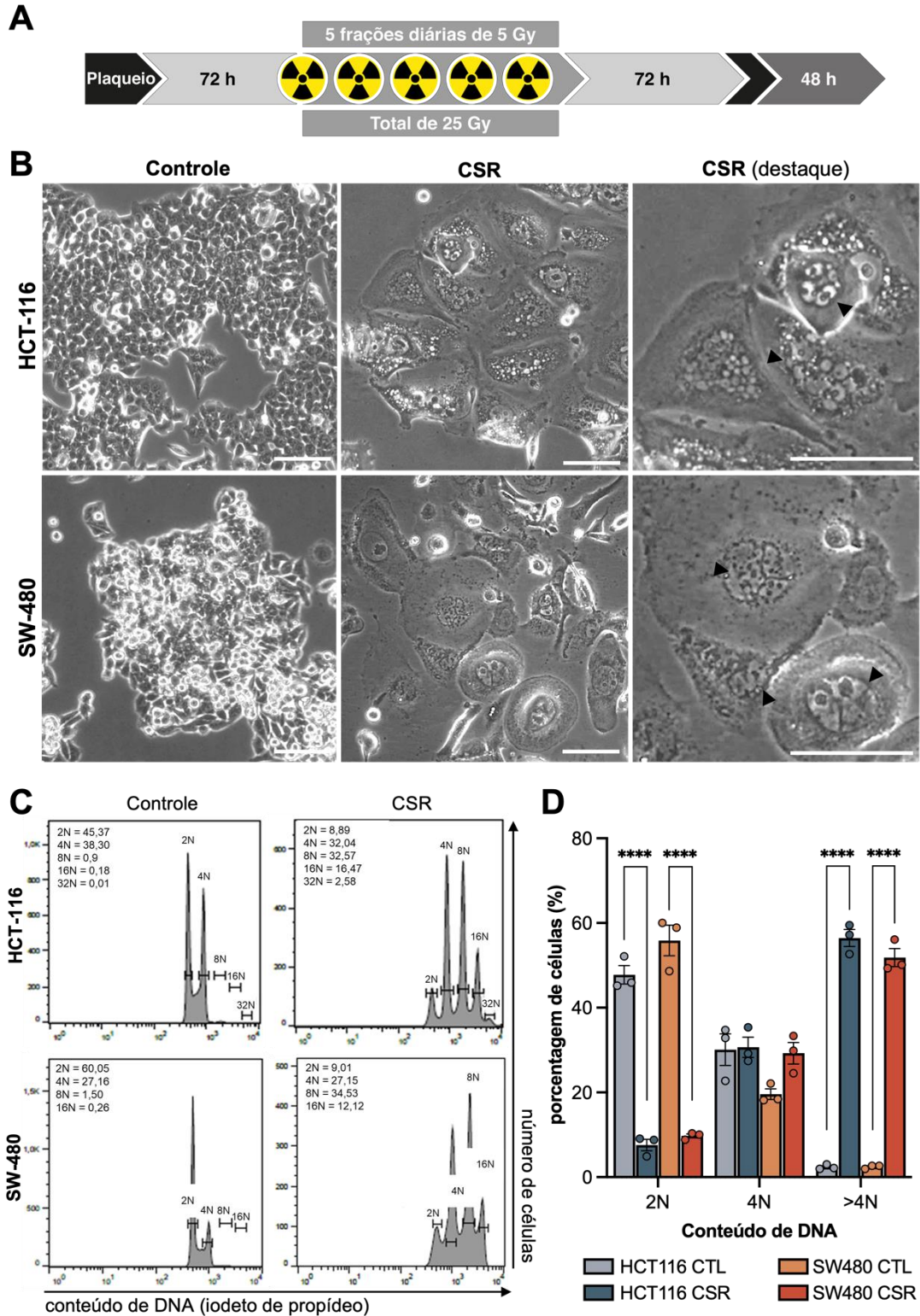


Figura 5.2- Modelo de irradiação hipofracionada favorece a formação de células poliploides gigantes. (A) Desenho experimental do modelo de irradiação hipofracionada. (B) Micrografias de contraste de fase da morfologia das células submetidas ao modelo e dos grupos controles. Nas micrografias destaca-se o aumento do volume celular e os indícios de multinucleação (cabeças de seta). Barra de escala: 100 μ m (C) Histograma representativo da análise por citometria de fluxo da ploidia celular. O pico com menor intensidade de fluorescência do iodeto de propídeo foi denominado 2N representando a ploidia celular habitual e as demais ploidias foram estimadas com base neste. (D) Quantificação da porcentagem de células

estratificadas quanto ao conteúdo de DNA (2N, 4N, >4N). Nota-se aumento do conteúdo de DNA nas células irradiadas quando comparadas aos seus grupos controle. CTL: controle. CSR: células sobreviventes à radiação. Dados estão representados por sua média \pm erro padrão. ANOVA de uma via realizado independentemente para cada estratificação (2N, 4N ou >4N) seguido de teste *post-hoc* Sidak **** $p < 0,001$.

Considerando as alterações induzidas pelo modelo de irradiação hipofracionada, levantamos a hipótese de que o surgimento do fenótipo PGCC (do inglês, *polyploid giant cancer cell*) seria decorrente de uma seleção progressiva a cada dose de irradiação e/ou consequência do dano celular cumulativo após subseqüentes doses de radiação. Logo, retornamos ao protocolo de irradiação em dose única, para poder analisar a resposta celular à radiação mediante uma única dose de 5 Gy (semelhante a uma dose diária do modelo hipofracionado) ou uma única dose de 10 Gy (equivalente ao dobro da dose diária para avaliar de forma pontual as consequências do dano cumulativo).

5.3 Irradiação em dose única leva a uma redução moderada na viabilidade celular após 96 horas

Para avaliar a hipótese de seleção progressiva de um fenótipo aberrante nas células irradiadas, realizamos o ensaio de viabilidade celular por MTT. As células de ambas as linhagens uma vez submetidas ao modelo de irradiação hipofracionada exibiram uma redução de 83% na viabilidade celular (Figura 5.3A). O tratamento com apenas uma dose de irradiação levou a uma redução menor da viabilidade celular. Após 96 horas, a linhagem HCT-116 apresentou redução de 53,5% após irradiação de 5 Gy e 59% após 10 Gy (Figura 5.3B). A linhagem SW-480 teve redução de 33,9% após 5 Gy e 37% após 10 Gy (Figura 5.3C). Surpreendentemente, não houve diferença estatística entre a viabilidade dos grupos 5 Gy e 10 Gy em nenhuma das duas linhagens.

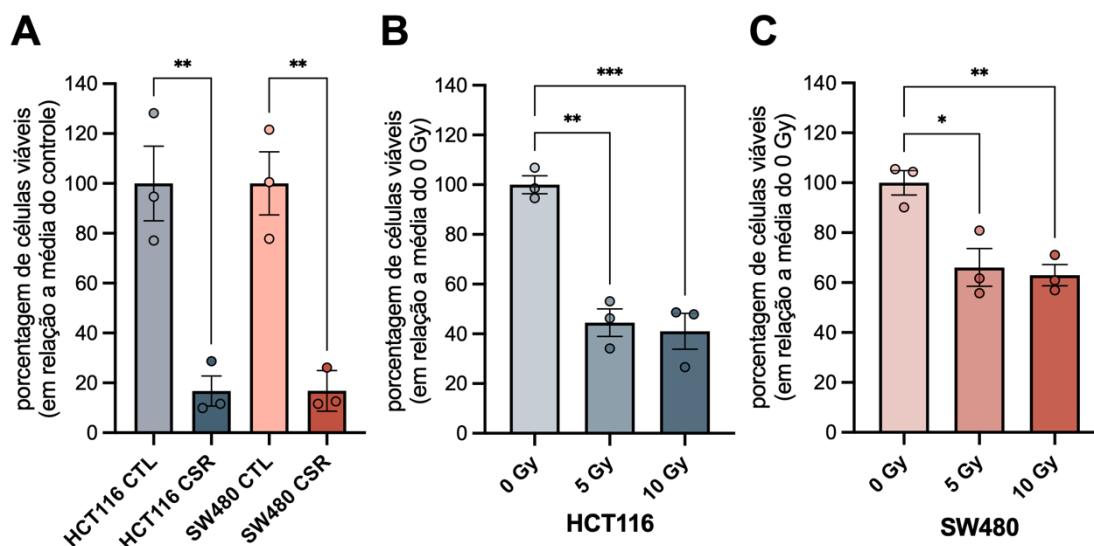


Figura 5.3- Análise da viabilidade celular após irradiação. (A) Quantificação da viabilidade celular após o modelo de irradiação hipofracionada. As células foram submetidas aos 5 dias de irradiação com trocas diárias do meio de cultura e 72 horas após a última dose de irradiação tiveram sua viabilidade celular mensurada através do ensaio com MTT. CTL: Controle CSR: Células Sobreviventes a Radiação. (B e C) Quantificação da viabilidade celular após 96 horas de uma dose única de irradiação por meio do ensaio de MTT (B – HCT116 / C – SW480). Dados são apresentados por sua média \pm erro padrão. ANOVA de uma via seguido de teste *post-hoc* Sidak * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$.

5.4 Células de câncer colorretal passam por extensas alterações morfológicas independente do protocolo de irradiação utilizado

Por meio de registro em microscopia de contraste de fase pudemos observar, assim como esperado, que as células do grupo controle de ambas as linhagens se mantêm organizadas e delimitadas em ilhas com os contatos celulares bem estabelecidos. Após uma dose de 5 Gy as células começam a apresentar aumento do volume celular, se apresentam um pouco mais fusiformes, sugerindo um afrouxamento dos contatos celulares, multinucleadas, menos organizadas em ilhas e com aumento de projeções de membrana do tipo lamelipódio e filopódio. É possível observar também que essas características se intensificam nas células irradiadas com 10 Gy, evidenciando-se ainda mais o aumento do volume celular e da multinucleação (Figuras 5.4A e B). Nas células HCT-116 irradiadas com 10 Gy detectou-se ainda a presença de “vacúolos” intracelulares (Figura 5.4A), assim como nas células desta linhagem submetidas ao modelo de radiação hipofracionada (Figura 5.2B).

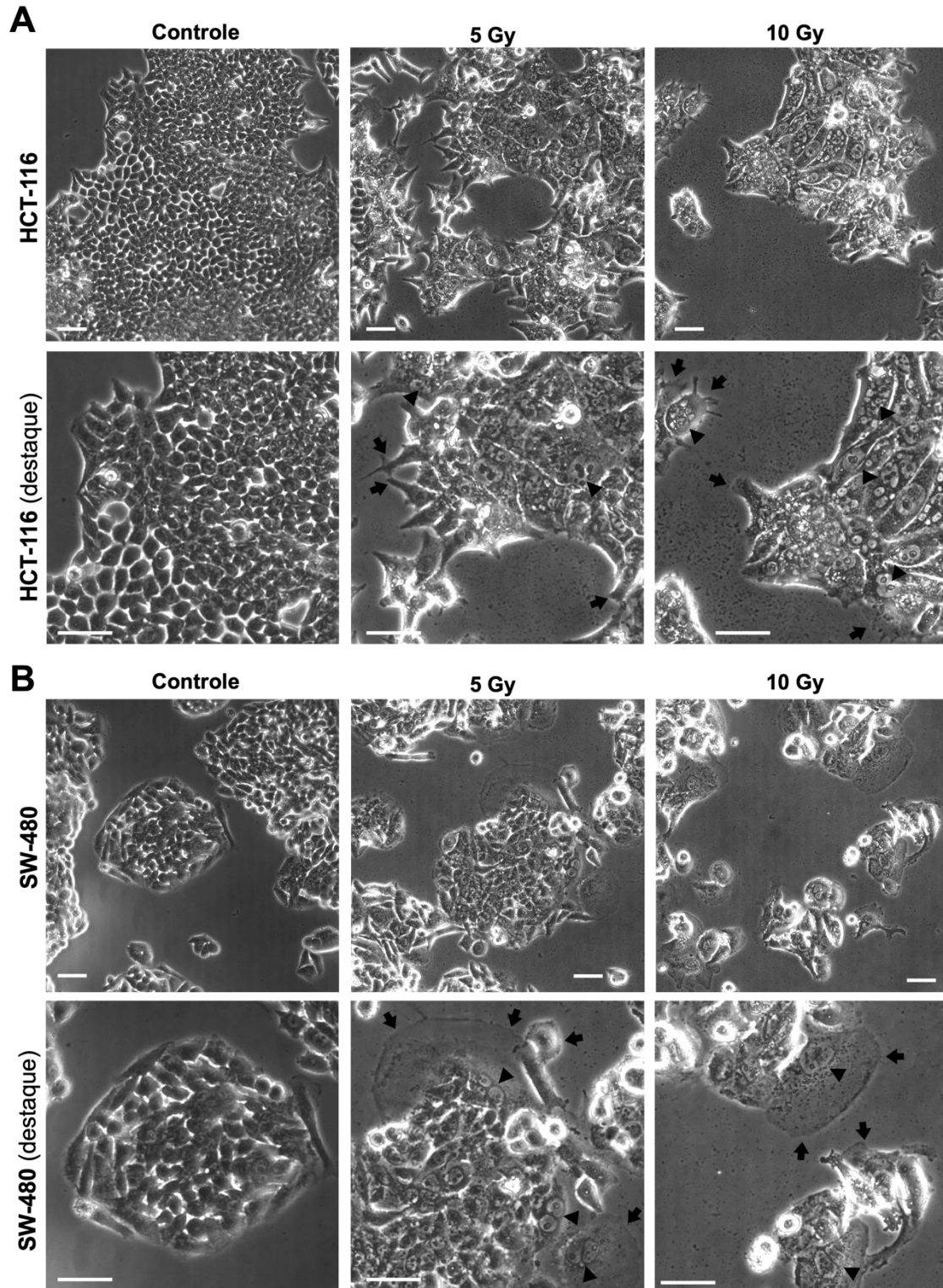


Figura 5.4- Irradiação em dose única recapitula alterações morfológicas do modelo de irradiação hipofracionada de forma dose-dependente. Células HCT-116 (A) e SW-480 (B) foram submetidas ao protocolo de irradiação em dose única com 5 ou 10 Gy e avaliadas por microscopia de contraste de fase quanto à morfologia 96 h após o período de irradiação. Nota-se em destaque o aumento do volume celular, os indícios de multinucleação (cabeças de seta) e o aumento no número de projeções citoplasmáticas como filopódios e lamelipódios (setas). Imagens representativas de 3 experimentos independentes. Barra de escala: 100 μm

5.5 Células irradiadas sofrem alterações quanto à ploidia de forma dose-dependente

Considerando as alterações morfológicas observadas anteriormente, buscamos avaliar o conteúdo de material genético dessas células para confirmar a ocorrência de poliploidia, visto que a irradiação é um processo físico que acarreta modificações no DNA podendo resultar em uma reconfiguração do número de cromossomos. Para isso, foi realizado o ensaio de citometria de fluxo com marcação de iodeto de propídeo.

Observamos que as células submetidas ao protocolo de dose única de irradiação apresentam um número maior de células com conteúdo de DNA superior a 4N. A linhagem HCT-116 parte de 2,6% de células poliploides aumentando para 13,41% após irradiação de 5 Gy e para 31,47% após 10 Gy (todos os grupos diferem significativamente com $p < 0,05$). Na linhagem SW-480 encontramos 3,4% de células $>4N$ no grupo não irradiado com aumento progressivo para 8,96% e 19,33% (a comparação post-hoc entre 0 Gy - 10 Gy e 5 Gy - 10 Gy apresentou significância, $p < 0,05$) (Figura 5.5). Em conjunto, esses dados sugerem que a irradiação induz a formação de PGCCs e que o aumento dessas células ocorre de forma dose dependente.

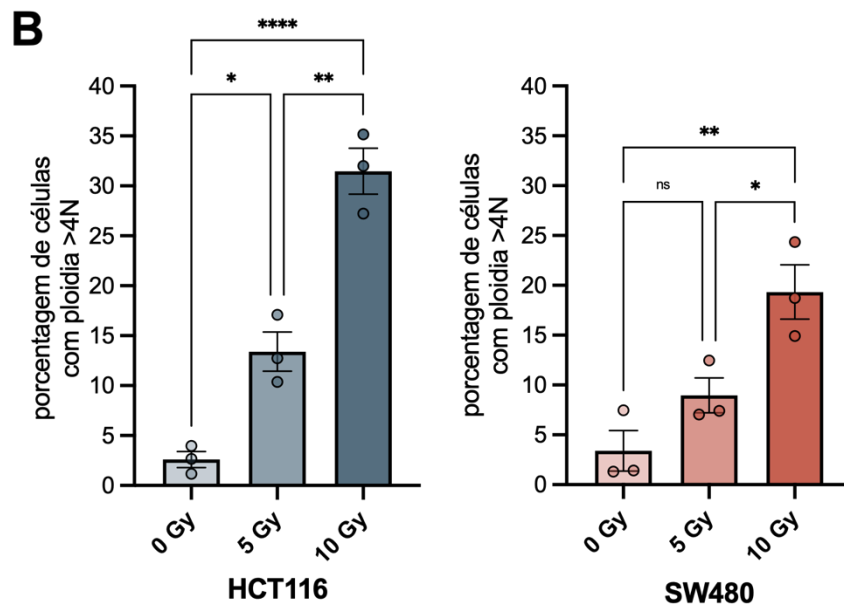
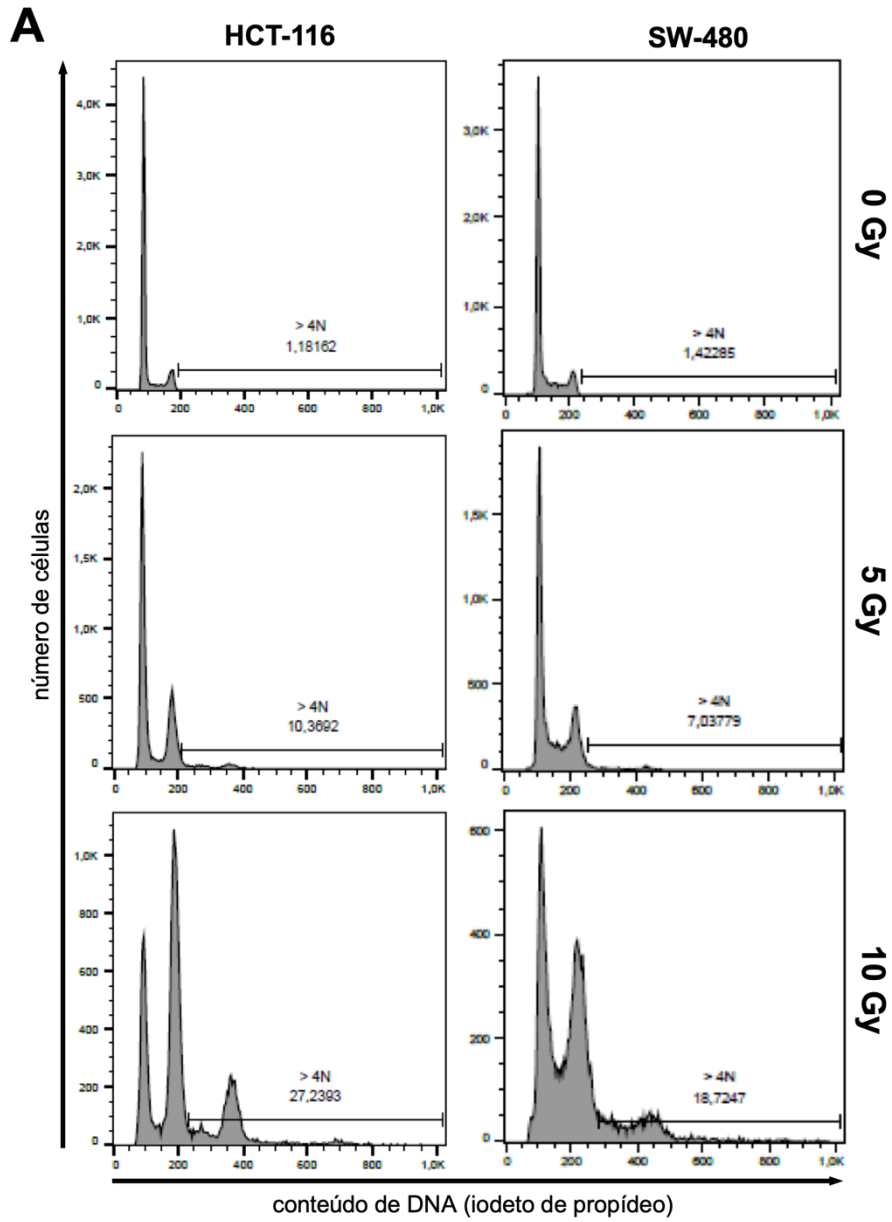


Figura 5.5- Aumento do número de células poliploides após irradiação ocorre de forma dose-dependente. (A) Histograma representativo da análise por citometria de fluxo da ploidia celular. O segundo pico com menor intensidade de fluorescência do iodeto de propídeo foi denominado 4N, foram quantificados todos os eventos com intensidade superior a este pico (>4N) representando células com ploidia superior a de uma célula habitual em mitose. (B) Quantificação da porcentagem de células poliplóides 96 horas após irradiação. Nota-se aumento dose-dependente da quantidade de células poliplóides. Dados estão representados por sua média \pm erro padrão. ANOVA de uma via seguido de teste *post-hoc* Sidak * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ **** $p < 0,001$.

5.6 Análise das alterações morfológicas por microscopia eletrônica de transmissão

Para poder avaliar com maior detalhe as alterações ultraestruturais decorrentes da irradiação realizamos a análise por microscopia eletrônica de transmissão. As células não irradiadas de ambas as linhagens apresentam organização citoplasmática normal com a presença de mitocôndrias em sua morfologia habitual e a presença de junções intercelulares estabelecidas (Figura 5.6A e 5.7A). As células da linhagem HCT-116 irradiadas com 10 Gy apresentaram grande aumento do número de mitocôndrias com morfologia aberrante (Figura 5.6C). Observamos também que grande parte dos vacúolos observados na microscopia de contraste de fase (Figura 5.4) se tratam na realidade de corpúsculos lipídicos, como mostrado na Figura 6B. As células irradiadas com 10 Gy da linhagem SW-480 mostraram um padrão mitocondrial semelhante às HCT-116, com elevado número de mitocôndrias aberrantes (Figura 5.7B). Além disso é possível observar um grande número de vesículas citoplasmáticas de origem desconhecido. Após uma análise detalhada, encontramos também a presença de células internalizadas dentro de outras células. Como pode ser observado no destaque da Figura 5.7 (Figura 5.7Entose), uma célula com o citoplasma mais eletrodense pode ser observado dentro do citoplasma menos eletrodense de outra célula. Esse evento é característico do processo de entose.

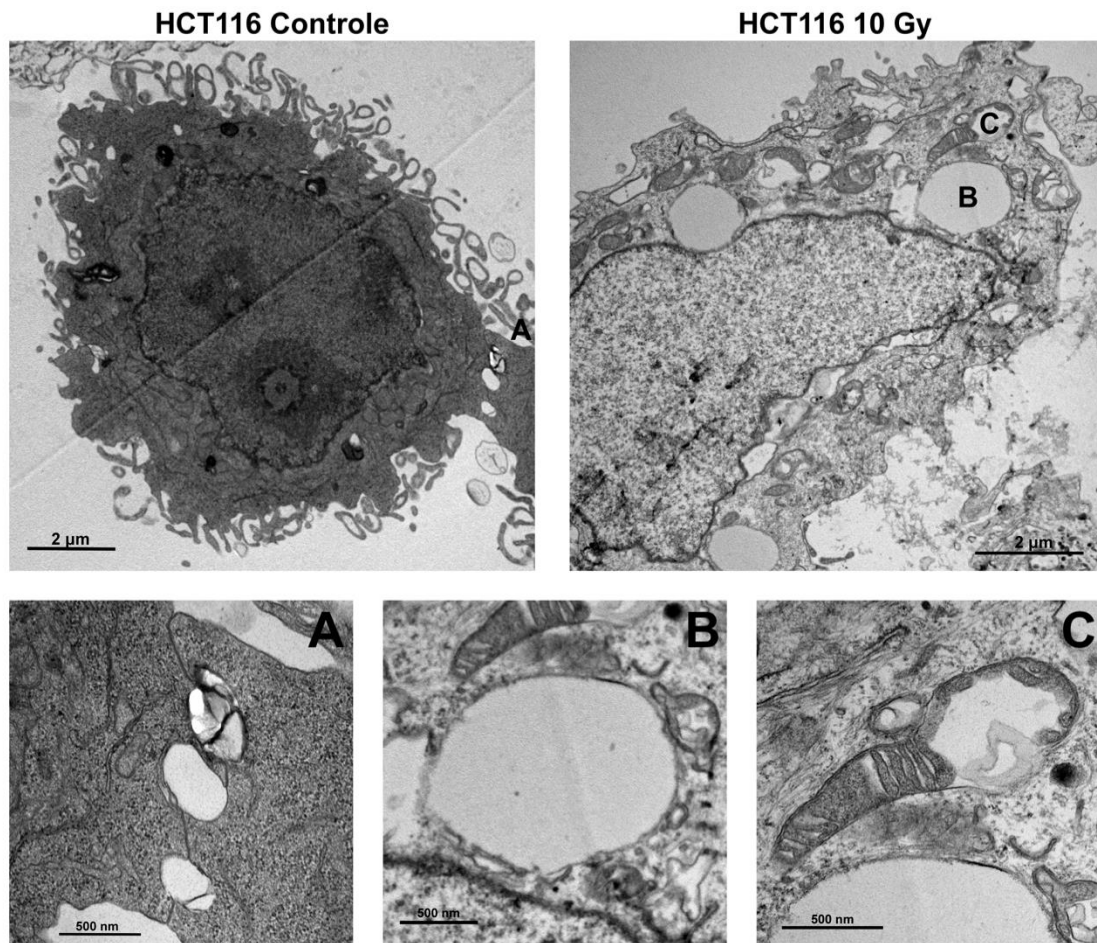


Figura 5.6- Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão de células da linhagem HCT-116. Células controle apresentam organização citoplasmática habitual e a presença de junções intercelulares em destaque (A). As células irradiadas com 10 Gy apresentam citoplasma com presença de corpúsculos lipídicos (B) e elevado número de mitocôndrias com morfologia aberrante (C). Barra de escala indicada em cada imagem.

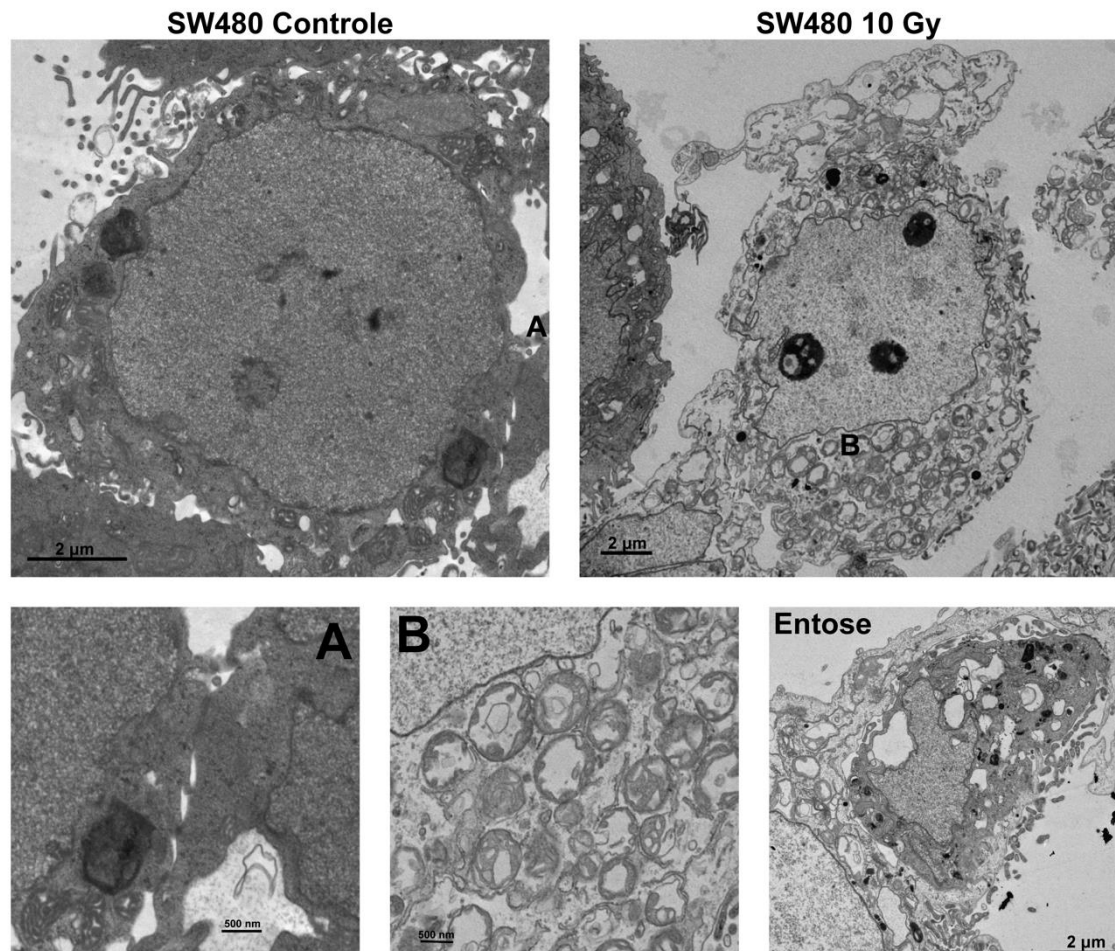


Figura 5.7- Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão de células da linhagem SW-480. Células controle apresentam organização citoplasmática habitual e a presença de junções intercelulares em destaque (A). As células irradiadas com 10 Gy apresentam citoplasma repleto de mitocôndrias com morfologia aberrante (B). No canto inferior direito destacamos a presença de uma célula (com citoplasma mais eletrodense) internalizada por outra de citoplasma menos eletrodense. Essa estrutura é característica do processo de entose (Entose). Barra de escala indicada em cada imagem.

5.7 Células de câncer colorretal ativam o processo de entose em resposta à irradiação

Mediante as evidências da presença de células completamente internalizadas no citoplasma de outras células e do aumento de células poliplóides, buscamos averiguar por microscopia confocal se o processo de entose estaria sendo ativado nas células irradiadas. Ilustrado de maneira concisa na Figura 5.8A, o processo inicial da entose é composto por três etapas: (1) a formação de adesão aberrante, a partir da adesão da célula a ser englobada; (2) a internalização desta e (3) a fusão completa demonstrada na configuração denominada “célula em célula”. Em seguida, a célula pode sofrer um processo

de morte caracterizado pela fusão de lisossomos à célula internalizada por meio da maquinaria de autofagia; escapar ou até mesmo proliferar dentro da célula que a englobou.

Para avaliarmos esse processo, realizamos imunofluorescência com marcação de faloidina, para marcar o citoesqueleto de actina e anticorpo anti-LC3B para avaliar a presença de proteínas relacionadas à autofagia ao redor das células englobadas. Realizamos a marcação do citoesqueleto de actina pois a entose é um processo ativo, no qual se requer a dinâmica de polimerização da actina na presença da sinalização Rho/ROCK para que ocorra a internalização da célula a ser englobada.

Foram encontradas células internalizadas 96 horas após a irradiação de 10 Gy em ambas as linhagens utilizadas. Na Figura 5.8B observamos que as células internalizadas apresentam intensa marcação de F-actina, denotando um aumento do remodelamento do citoesqueleto nessas células; e também uma maior concentração da proteína LC3B ao redor da estrutura “célula em célula”.

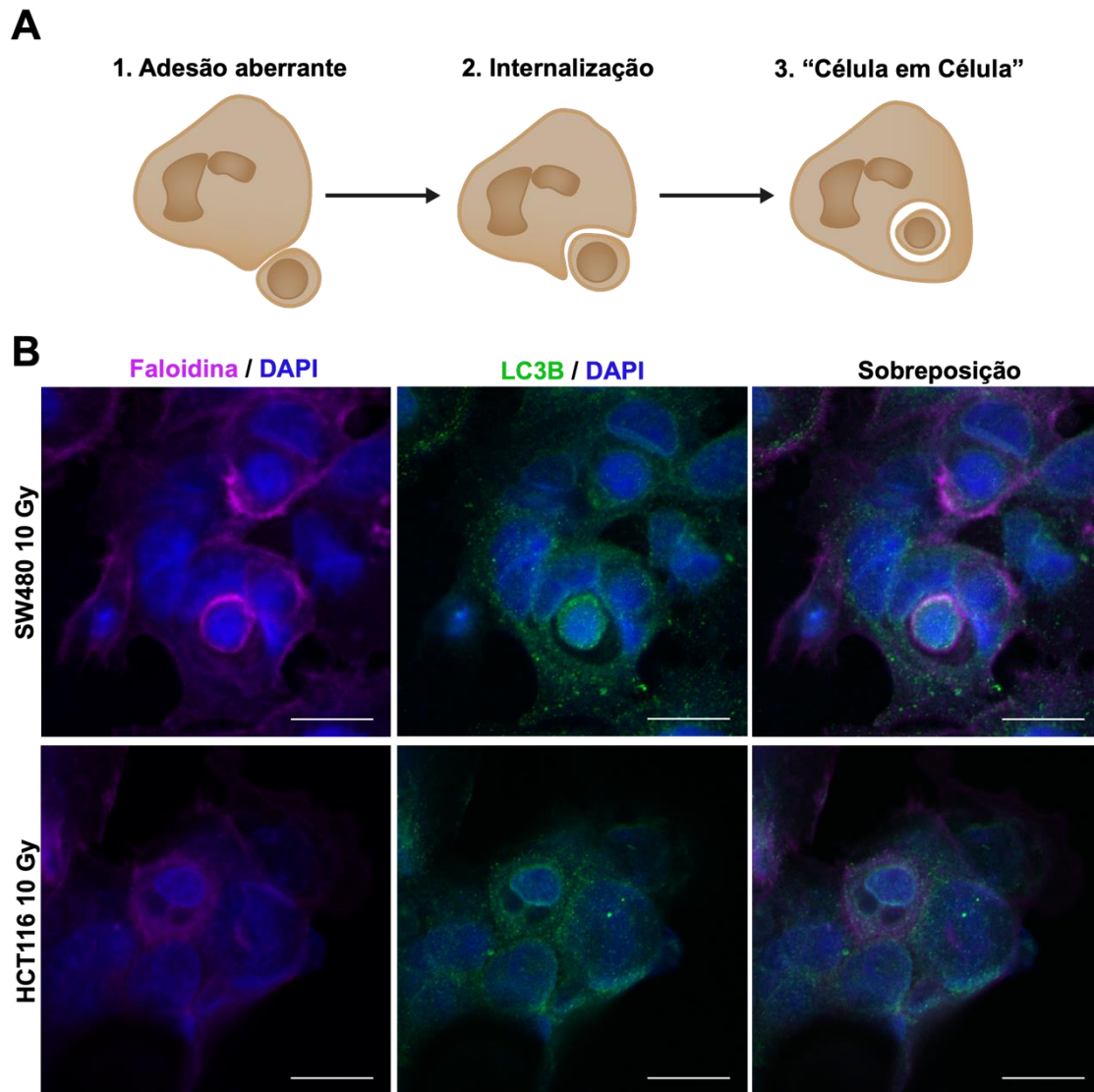


Figura 5.8- Ambas as linhagens analisadas ativam o processo de entose em resposta à irradiação. (A) Esquema sequencial representativo do processo de entose. Após o estabelecimento de uma adesão aberrante entre duas células, uma delas é internalizada culminando no estado de “célula em célula”. (B) As células SW-480 e HCT-116 irradiadas com dose de 10 Gy foram submetidas a fixação após 96 horas e a marcação com faloidina (pseudocor magenta) e anticorpo anti-LC3B (visualizado por marcação secundária com anticorpo conjugado a Alexa488). As imagens foram obtidas por microscopia confocal e são representativas de um experimento. Os núcleos das células foram marcados com o DAPI (coloração azul). Barra de escala: 20 μ m.

5.8 Células irradiadas redistribuem a proteína LC3B pelo citoplasma celular sugerindo aumento do processo autofágico

Além da participação no processo de entose, a regulação da autofagia é de grande importância nas células tumorais, em especial após um insulto terapêutico como a irradiação. Analisamos, portanto, a imunomarcação do anticorpo anti-LC3B através de microscopia confocal a fim de verificar como esta

proteína se distribui ao longo das células 96 horas após a irradiação. Na linhagem HCT-116 é possível observar um aumento da marcação puntiforme distribuída pelo citoplasma das células, em especial após irradiação de 10 Gy. (Figura 5.9A). Já na linhagem SW-480 a mudança mais evidente consiste na redistribuição da marcação da proteína LC3B para a região perinuclear das células irradiadas (Figura 5.9B).

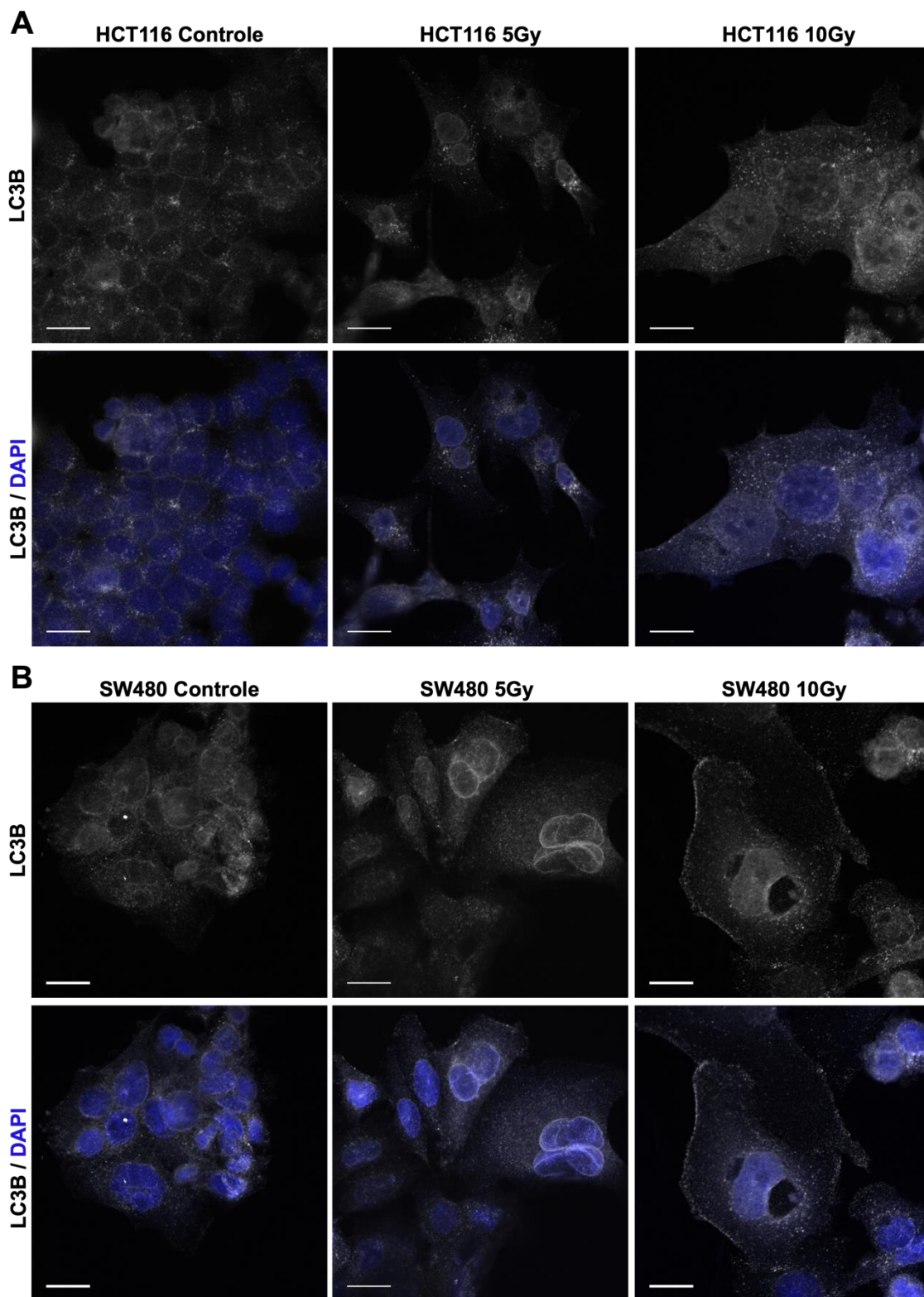


Figura 5.9- A irradiação induz a redistribuição da proteína LC3B. Imunofluorescência representativa de células HCT-116 (**A**) e SW-480 (**B**) controles ou irradiadas com 5 ou 10 Gy após 96 horas. A marcação da proteína LC3B está representada em branco e os núcleos em azul, após coloração com DAPI. As imagens foram obtidas por microscopia confocal e são representativas de um experimento. Barra de escala: 20 μ m.

5.8.1 O tratamento com 3MA induz a um fenótipo aberrante mais pronunciado frente a irradiação, em ambas as linhagens celulares

Depois de observarmos o rearranjo da imunomarcagem de LC3B, demos prosseguimento ao estudo avaliando as consequências da inibição da autofagia com o uso de 3-metiladenina (3MA), uma droga que atua inibindo a formação de autofagossomos. Assim, as células foram tratadas com 3MA, irradiadas e após 96 h os efeitos do tratamento foram analisados.

Verificamos, por microscopia de contraste de fase, que as células da linhagem SW-480 não irradiadas e tratadas com 3MA apresentaram pequena alteração nos contatos célula-célula, se apresentando um pouco mais fusiformes e dispersas nas ilhas do que as SW-480 não tratadas (Figura 5.10B). Essa alteração não ocorreu na linhagem HCT-116, com o tratamento de 3MA não causando alteração morfológica aparente (Figura 5.10A). Por outro lado, as células irradiadas e tratadas e com 3MA de ambas as linhagens tiveram alterações morfológicas semelhantes às encontradas nas células que sofreram apenas a irradiação, como aparência fusiforme, formação de vacúolos, aumento do volume celular e de projeções de membrana, principalmente do tipo lamelipódio, e multinucleação. No entanto, essas alterações foram mais pronunciadas nas células irradiadas e tratadas com 3MA (Figura 5.10A e B).

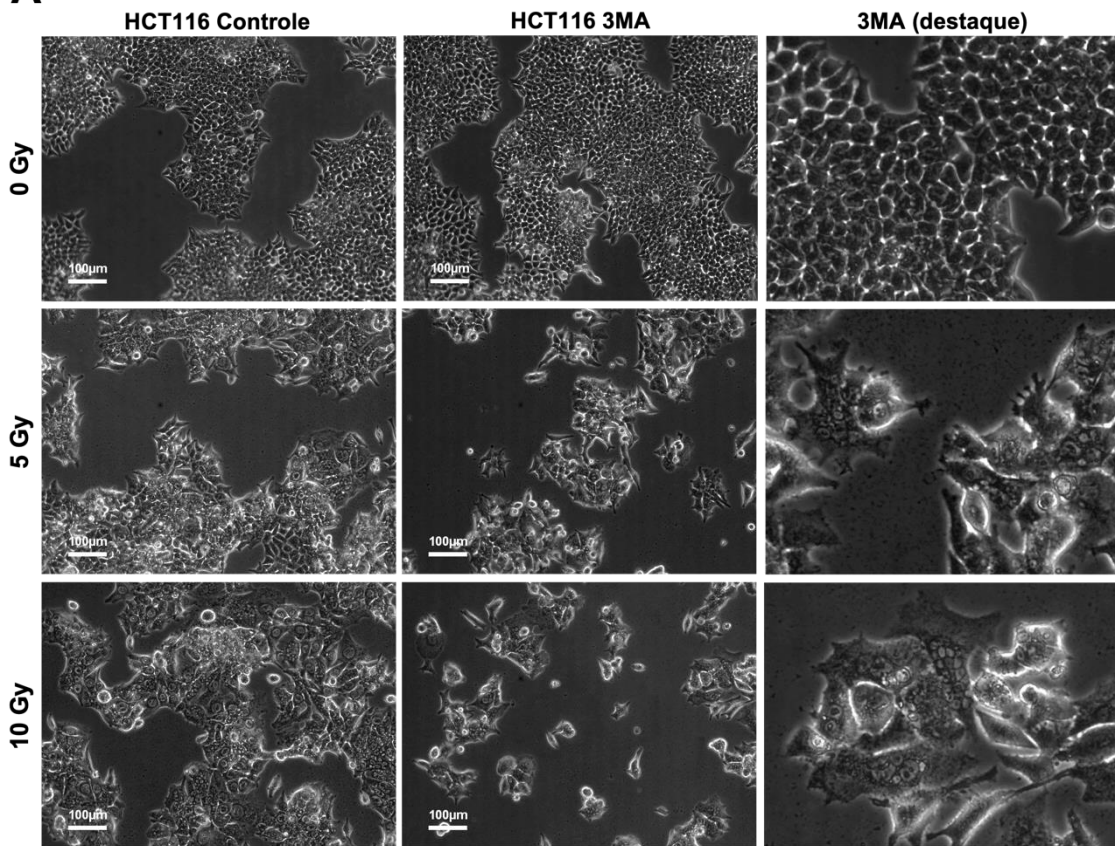
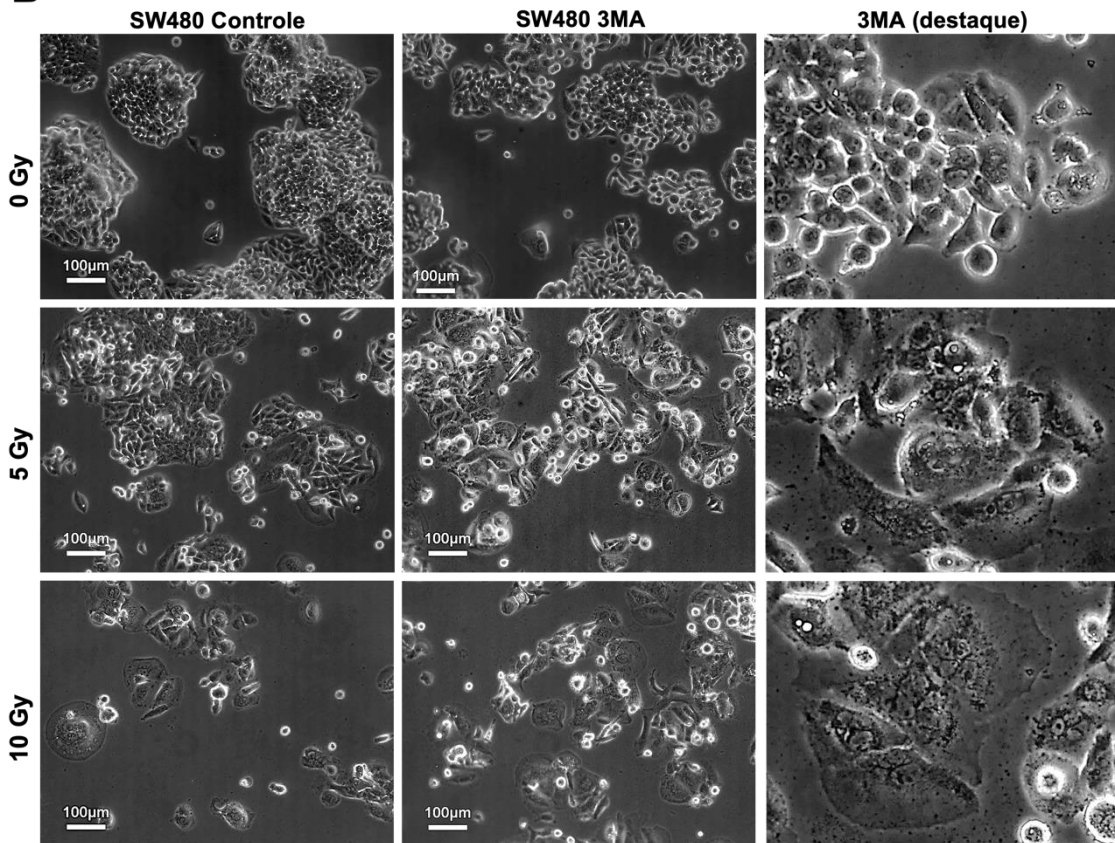
A**B**

Figura 5.10- O tratamento com 3MA nas células irradiadas resulta em um fenótipo aberrante pronunciado. (A) Micrografias de contraste de fase de células HCT-116 e (B) SW-480 irradiadas e tratadas com 5mM de 3MA. As micrografias são representativas de 3 experimentos independentes. Barra de escala: 100 µm.

5.8.2 O tratamento com 3MA reduz a viabilidade celular tanto nas células controle quanto nas irradiadas

Ao monitorarmos a morfologia das células irradiadas e tratadas com 3MA notamos uma redução na confluência dessas populações de células indicando um provável aumento na indução da morte celular, o que seria esperado tendo em vista que estaríamos inibindo um processo importante como a autofagia. Através do ensaio de MTT observamos que o tratamento com 3MA reduz significativamente a viabilidade celular de todos os grupos experimentais, em ambas as linhagens (Figura 5.11).

Da mesma forma que em resposta à irradiação, a linhagem SW-480 aparenta menor sensibilidade ao tratamento com 3MA, com uma queda de 33,26% na viabilidade celular comparada com 59,45% de redução na linhagem HCT-116. As células irradiadas com 5 Gy apresentaram queda de 55,5% (HCT-116) e 33,9% (SW-480); redução que foi acentuada pelo tratamento com 3MA para 82,04% e 53,40%, respectivamente. Uma resposta similar foi obtida nos grupos experimentais irradiados com 10 Gy, o tratamento com 3MA reduz ainda mais a viabilidade celular com reduções de 81,99% (comparado com 58,97% sem 3MA) na linhagem HCT-116; e redução de 56,18% (comparado com 37,02% sem 3MA) na linhagem SW-480.

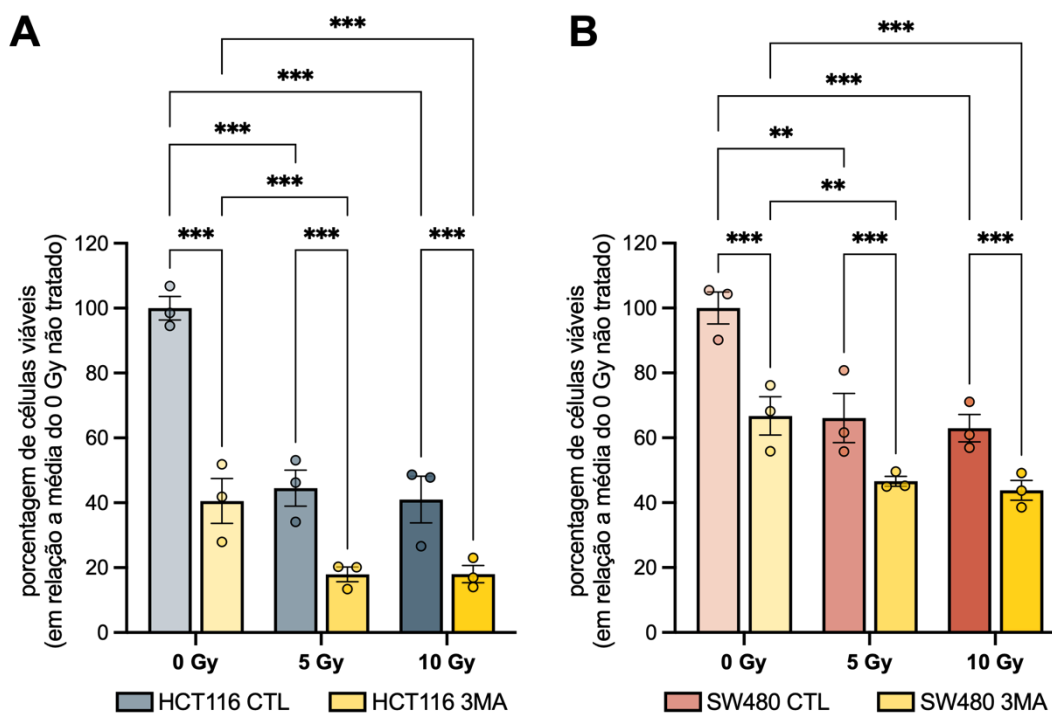


Figura 5.11- O tratamento com 3MA aumenta a redução de viabilidade celular pela irradiação. Quantificação do ensaio de viabilidade celular por MTT (A – HCT116) (B – SW480). A porcentagem de células viáveis foi obtida através da normalização da absorbância da média do grupo 0 Gy não tratado para 100. Os gráficos são representativos da média das replicatas de 3 experimentos \pm erro padrão. ANOVA de duas vias (tratamento e radiação) com teste *post-hoc* Sidak * $p \leq 0,05$. ** $p \leq 0,005$. **** $p \leq 0,001$. CTL: controle. 3MA: 3-metiladenina.

5.8.3 A inibição da autofagia induz à poliploidia em células SW-480 irradiadas

A fim de avaliar como a ploidia dessas células poderia ser afetada mediante a inibição da autofagia, realizamos o ensaio de citometria de fluxo com marcação de iodeto de propídeo. Assim como observado anteriormente as células irradiadas da linhagem HCT-116 e da linhagem SW-480 possuem maior percentual de células poliploides ($>4N$), o que ocorre de forma dose-dependente. O tratamento com 3MA não foi capaz de inibir esse aumento da poliploidia nas células irradiadas da linhagem HCT-116, que apresentaram quantidades semelhantes de células com ploidia $>4N$ com ou sem tratamento com 3MA. No entanto, na linhagem SW-480 ao contrário do que esperávamos, o tratamento com 3MA levou a um aumento da ploidia de forma independente e cumulativo com a irradiação. De 3,39% (controle), 8,96% (5 Gy) e 19,33% (10 Gy), a quantidade de células $>4N$ passou para 6,75%; 17,61% e 29,85%, respectivamente.

Isso indica que apesar de ocorrer diminuição da viabilidade celular nos grupos SW-480 - 5 Gy + 3MA e SW-480 - 10 Gy + 3MA, como demonstrado na Figura 5.11, a população de células remanescentes apresenta maior ploidia do que as células dos grupos SW-480 – 5 Gy e SW-480 – 10 Gy (Figura 5.12B).

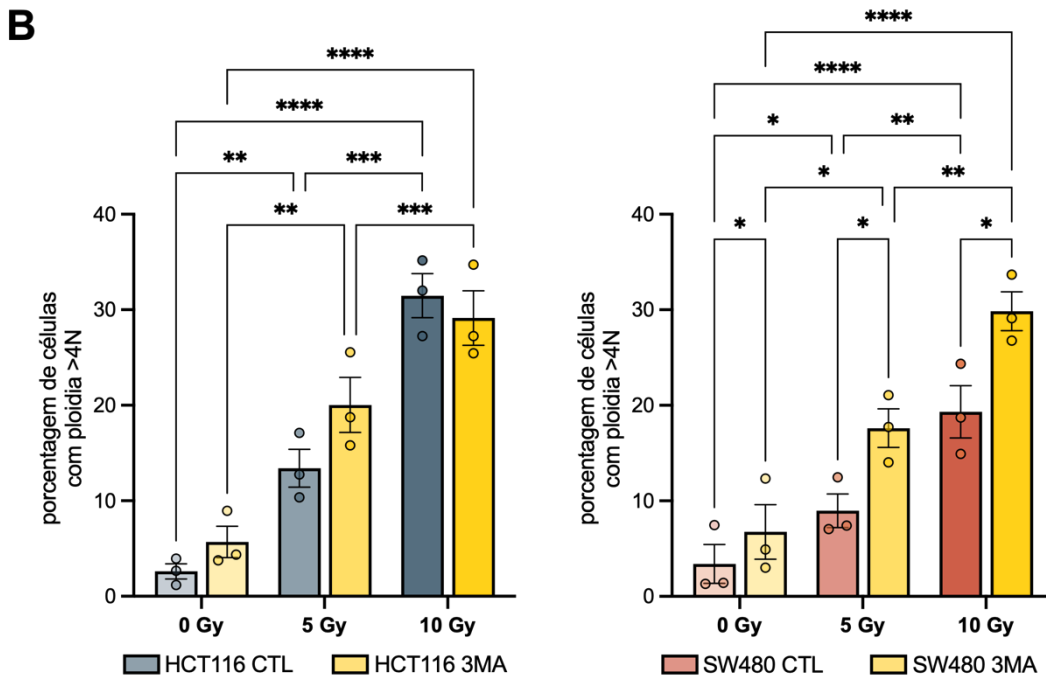
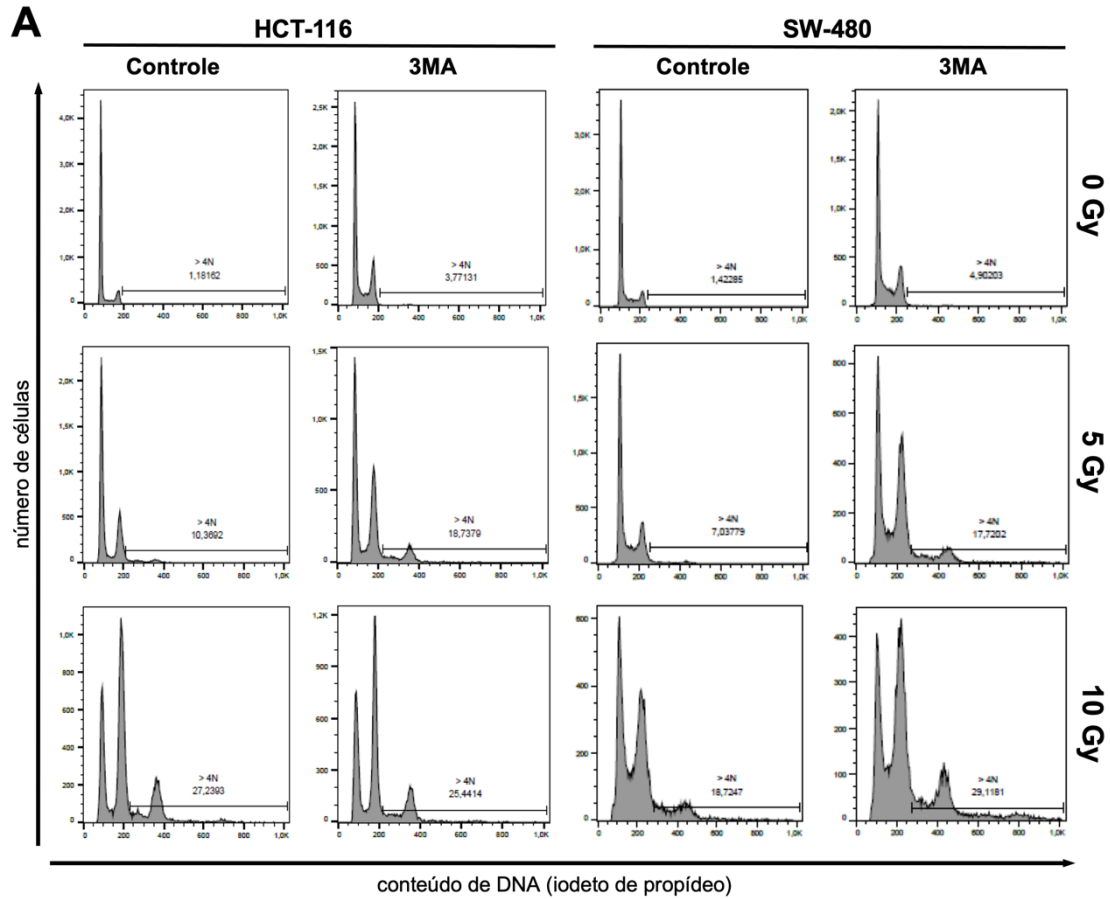


Figura 5.12- O tratamento com 3MA leva ao aumento da ploidia na linhagem SW-480. (A) Histograma representativo (de três experimentos independentes) da porcentagem de células com ploidia >4N. **(B)** Quantificação da porcentagem de células com ploidia >4N. As células foram avaliadas por citometria de fluxo com iodeto de propídeo e o segundo pico com menor intensidade de fluorescência foi caracterizado como tetraploidie (4N) e as células com ploidia acima desta foram quantificadas compondo o grupo >4N. ANOVA de duas vias (tratamento e

radiação) com teste *post-hoc* Sidak * $p < 0,05$. ** $p < 0,005$ *** $p < 0,001$ **** $p \leq 0,0001$. CTL: controle. 3MA: 3-metiladenina.

5.8.4 O tratamento com 3MA leva a uma redistribuição da proteína LC3B

Frente ao resultado inesperado quanto ao aumento do percentual de células poliploides após o tratamento com 3MA na linhagem SW480, realizamos ensaio de imunofluorescência para marcação da proteína LC3B nas células irradiadas, tratadas ou não com 3MA. O que pudemos observar foi que ao invés de uma marcação reduzida ou mais difusa pelo citoplasma, após o tratamento com 3MA, a proteína LC3B se encontrava ainda mais organizada na região perinuclear e com padrão puntiforme mais intenso no citoplasma para ambas as linhagens (Figura 5.13).

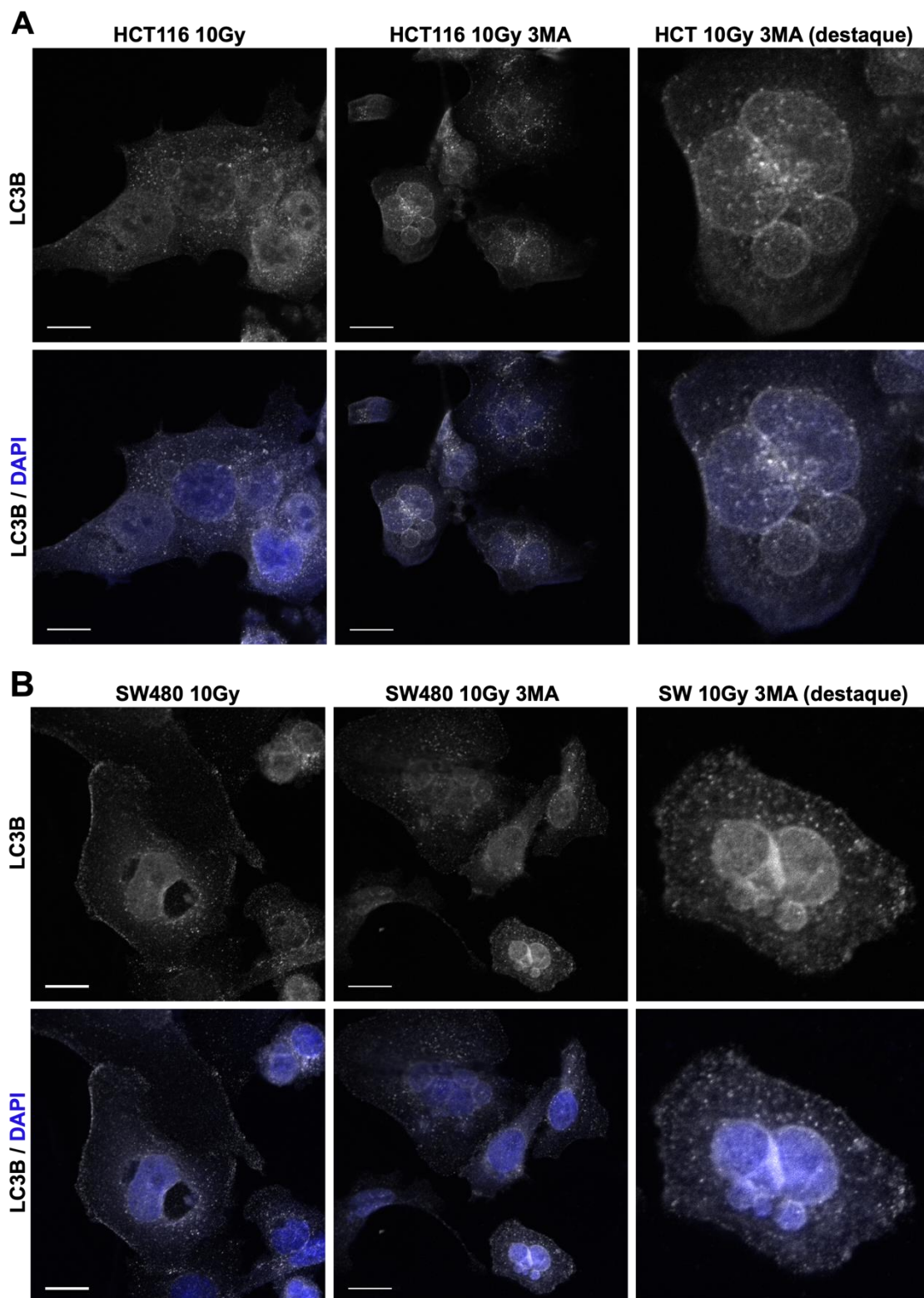


Figura 5.13- O tratamento com 3MA induz a redistribuição da proteína LC3B nas células irradiadas. Imunofluorescência representativa de células HCT-116 (A) e SW-480 (B) irradiadas com 10 Gy após 96 horas do tratamento ou não com 5 mM de 3MA. A marcação da proteína LC3B está representada em branco e os núcleos em azul, após coloração com DAPI. As imagens foram obtidas por microscopia confocal e são representativas de um experimento. Barra de escala: 20 μ m

O mesmo padrão de redistribuição ocorreu quando analisamos a imunomarcação de LC3B nas células controle. O tratamento com 3MA levou a uma marcação puntiforme intensa em uma região específica ao lado do núcleo na linhagem HCT-116 (Figura 5.14A). Na linhagem SW-480 também foi possível observar a marcação de LC3B ao redor de grandes vesículas, o que caracterizariam um grande autofagossomo (Figura 5.14B).

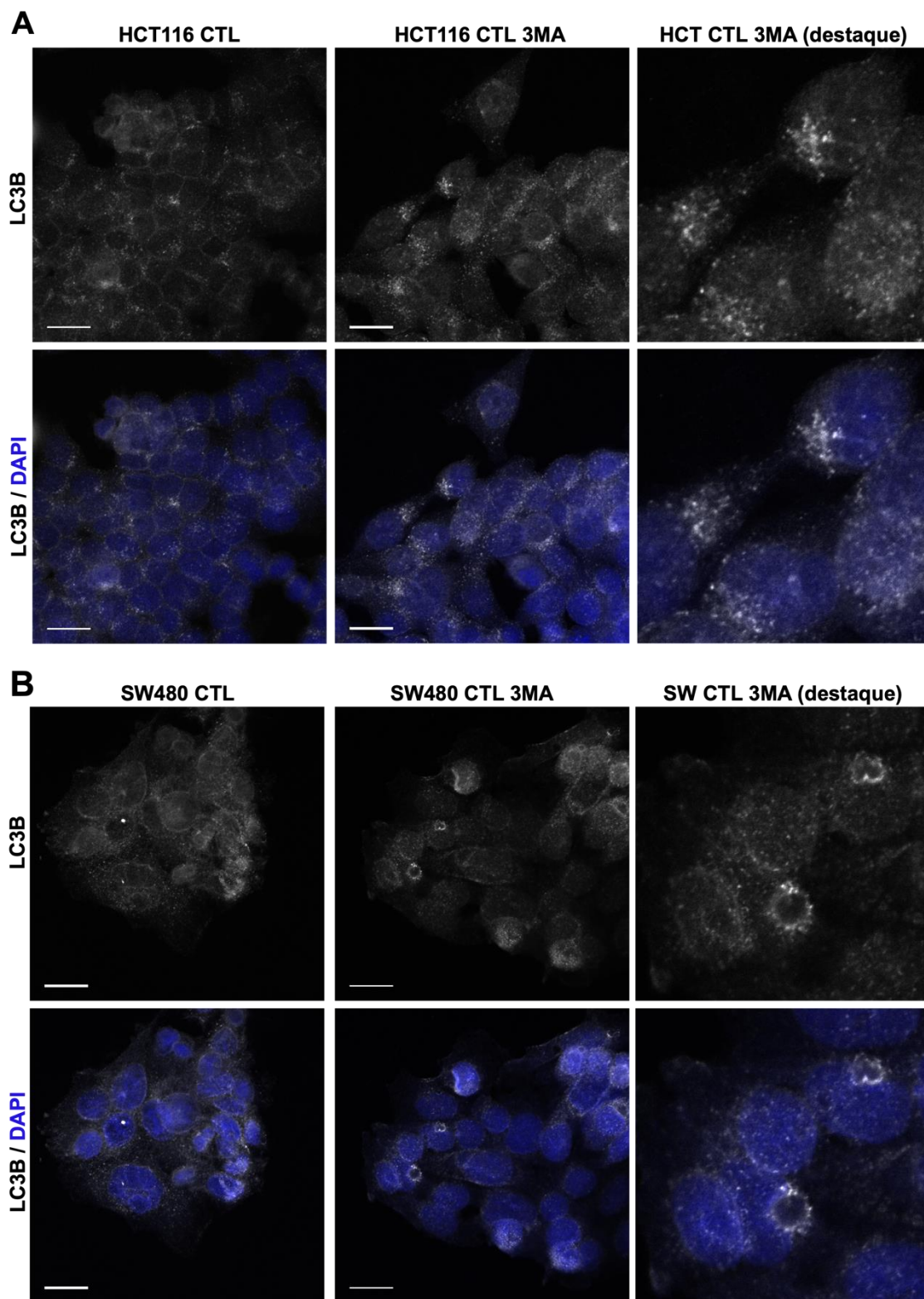


Figura 5.14- O tratamento com 3MA induz a redistribuição da proteína LC3B também nas células controle. Imunofluorescência representativa de células HCT-116 (A) e SW-480 (B) controles após 96 horas do tratamento ou não com 5 mM de 3MA. A marcação da proteína LC3B está representada em branco e os núcleos em azul, após coloração com DAPI. As imagens foram obtidas por microscopia confocal e são representativas de um experimento. Barra de escala: 20 μ m.

6 DISCUSSÃO

A RT é um tratamento amplamente utilizado em pacientes com CCR, no entanto, o desenvolvimento de radioresistência através de determinados mecanismos pode levar ao agravamento da doença, o que resulta em um desafio para a abordagem clínica e, por conseguinte, para a cura ou remissão do tumor. Assim, compreender os mecanismos que levam a aquisição deste evento é extremamente importante, pois contribuirá para uma melhor intervenção terapêutica neste tipo de câncer. Com isso, o presente estudo buscou avaliar o desenvolvimento de eventos morfogênicos em resposta a diferentes doses de irradiação, clinicamente relevantes, usando linhagens celulares de CCR.

Para definir o modelo celular a ser trabalhado, em experimentos iniciais utilizamos uma única dose de irradiação (5 Gy) em cinco linhagens celulares de câncer de cólon: LoVo, Caco-2, HT-29, HCT-116 e SW-480. Nossos resultados mostram que, 72 h após a irradiação, células de todas as linhagens testadas adquirem características morfológicas aberrantes como o ganho de volume celular, indícios de multinucleação, presença de vacúolos citoplasmáticos e aumento de projeções de membrana. Uma vez demonstrada a capacidade da irradiação em induzir essas alterações morfológicas que poderiam estar relacionadas com mecanismos de resistência, utilizamos um protocolo de radiação hipofracionada, um modelo já estabelecido em nosso laboratório, com base naquele definido pelo guia de diretrizes da ESMO (do inglês *European Society for Medical Oncology*) (LI *et al.*, 2016) para abordagem terapêutica do CCR. Este modelo foi criado a fim de mimetizar *in vitro* o que é praticado na clínica. Seguindo este protocolo, as células foram analisadas quanto as suas características morfológicas e de ploidia. Dentre as linhagens celulares submetidas ao modelo, obtivemos maior sucesso na manutenção em cultura das células sobreviventes a irradiação das linhagens SW-480 e HCT-116.

Neste modelo de irradiação observamos que ambas as linhagens apresentam multinucleação e aumento do volume celular após a irradiação. Na linhagem HCT-116 ainda foi possível observar a presença de vacúolos no citoplasma. Já na linhagem SW-480 foi perceptível a perda da organização das células em ilhas. A partir dessas alterações morfológicas e sabendo que a radiação é um processo físico que acarreta modificações no DNA e uma possível

reconfiguração no número de cromossomos, buscamos avaliar a quantidade de material genético dessas células para verificar a ocorrência de poliploidia. Assim, notamos que as células submetidas a este modelo tiveram seus genomas multiplicados quando comparadas aos grupos controles. Verificamos cerca de 55% das células sobreviventes à radiação com o conteúdo de DNA superior a 4N, o que denota poliploidia.

A partir disso, notamos também que entre essas linhagens a fração de células poliploides sobreviventes ao final do protocolo de irradiação hipofracionada foi maior na linhagem HCT-116 (56,46%). Importante ressaltar que essa linhagem já possui uma porcentagem basal de 6,8% de células poliploides (ATCC, 2021). E também que ambos tipos celulares apresentam distintos níveis de instabilidade genômica (KUIPERS *et al.*, 2015). As células SW-480 são aneuploides e exibem um cariótipo hipotriploide; altos níveis de CIN (instabilidade cromossômica) e MSS (estabilidade de microssatélite). Já a linhagem HCT-116 é diploide, cromossomicamente estável e possui MSI (instabilidade de microssatélite) (AHMED *et al.*, 2013). Essas células também diferem quanto ao perfil mutacional de TP53. As células HCT-116 possuem esse gene do tipo selvagem, enquanto a SW-480 apresenta duas mutações *missenses*, a R273H e a P309S. A mutação P309S é pouco documentada na literatura, mas se sabe que ela não está presente em nenhuma região conservada de TP53, denotando assim um caráter menos relevante. Já a R273H está localizada no domínio de ligação ao DNA, o que configura uma mutação relevante para ganho de função (ROCHETTE *et al.*, 2005). Isso revela que a p53 pode adquirir novas funções de caráter carcinogênico, as quais não estão presentes na proteína do tipo selvagem (ZHOU; HAO; LU, 2019; LI *et al.*, 2019a). Como o gene TP53 encontra-se mutado em mais de 40% dos casos de CCR, essa diferença entre as linhagens é interessante para o presente estudo (BOUAOUN *et al.*, 2016).

Além disso, p53 é crítico na resposta celular à irradiação, principalmente na regulação dos mecanismos de reparo a danos no DNA, controle do ciclo celular, apoptose e senescência (MIJIT *et al.*, 2020). E flutuações na sinalização de p53 propiciam escape do ciclo celular. Isso já foi demonstrado em um estudo no qual células que foram submetidas à irradiação, e portanto sofreram danos

no DNA, inicialmente foram acometidas por uma parada no ciclo celular, no entanto, a partir dessas flutuações na sinalização de p53 desencadeou-se um “switch” de p21 e de CDK2 que resultou em um escape dessa parada no ciclo permitindo, assim, com que essas células retornassem à divisão celular (REYES *et al.*, 2019).

Diante disso e interessados em definir como esse distinto perfil mutacional e essas diferenças quanto a instabilidade genômica e de microssatélite entre essas duas linhagens celulares impactam na resposta à radiação, optamos por continuar as posteriores análises com estas duas linhagens. Além disso, a escolha dessas duas linhagens com diferentes perfis genéticos foi relevante para nosso estudo, pois contempla uma grande parte dos pacientes com CCR. Assim, prosseguimos as análises para melhor compreender como essas células adquirem o fenótipo PGCC.

Alguns estudos demonstraram que a expressão anormal de proteínas relacionadas ao ciclo celular, ou mudanças na sua localização subcelular, possuem um papel importante na formação do fenótipo de células de câncer poliploides gigantes (PGCCs). Em células de câncer de ovário e de mama observou-se que as vias p38MAPK-ERK-JNK participam da formação das PGCCs através da regulação de *cell division cycle 25C* (CDC25C), uma fosfatase que ativa o complexo ciclina B1/CDK1 controlando a transição da fase G2 para a mitose (LIU *et al.*, 2020a). Em uma linhagem de câncer de pulmão de células não pequenas foi mostrado que a inibição das auroras quinases A, B, e C, as quais atuam na segregação cromossômica durante a mitose, promove a formação das PGCCs. Esses dados sugerem que a irradiação pode causar alterações nessas proteínas e assim promover o aumento da população de PGCCs nas células radioresistentes. Com esses resultados é possível levantar a hipótese de que o surgimento do fenótipo dessas células tumorais poliploides gigantes como um mecanismo de radioresistência seria decorrente de uma seleção progressiva a cada dose de irradiação e/ou consequência do dano celular cumulativo após subsequentes doses de irradiação.

Para avaliar de forma pontual as consequências do dano cumulativo da resposta celular à radiação em dose única, retornamos ao protocolo de irradiação usando uma única dose de 5 Gy (semelhante a uma dose diária do

modelo hipofracionado) ou uma única dose de 10 Gy (equivalente ao dobro da dose diária) a fim de verificar a hipótese de seleção progressiva de um fenótipo aberrante nas células irradiadas e avaliamos a viabilidade celular. Os resultados mostram que as células de ambas as linhagens (HCT-116 e SW-480) submetidas ao modelo de irradiação hipofracionado exibiram uma redução de 83% na viabilidade celular e que o tratamento com apenas uma dose de irradiação levou a uma menor redução da viabilidade celular. Surpreendentemente, não houve diferença estatística entre a viabilidade dos grupos 5 Gy e 10 Gy em nenhuma das duas linhagens, mas sabe-se que a célula apresenta um ponto chave de decisão onde ela pode reparar seu DNA ou morrer. Esses resultados de viabilidade, portanto, indicam que a diferença entre as doses de 5 Gy e 10 Gy não são suficientes para alterar a quantidade de células que terão o programa de morte celular induzido. No entanto, essa diferença foi grande o suficiente para induzir algumas alterações abordadas (morfologia e ploidia). No modelo hipofracionado foi visto um nível maior de perda da viabilidade celular, o que é provável de ter ocorrido pois quando a célula é irradiada na fase G2 há uma maior probabilidade de indução da morte, em comparação com células irradiadas na fase G1 ela seria um pouco mais resistente (NIU *et al.*, 2016). Considerando que as células estão ciclando, a radiação em dose única é capaz de induzir a morte principalmente do grupo de células que está em G2 naquele momento, e talvez por isso o tratamento com 5 Gy ou 10 Gy não apresentem tanta diferença quanto à viabilidade. Mas a irradiação ao longo de 5 dias consecutivos acaba por atingir a cada dia um novo grupo de células que, talvez, estivesse em G1 na primeira dose, mas já se encontra em G2 na segunda dose, e, portanto, se tornou mais “vulnerável” ao dano causado pela radiação (NIU *et al.*, 2016).

Diante disso, é importante assinalar também que o ciclo celular de células poliploides gigantes acarreta alguns mecanismos importantes na resistência e recidiva da doença. A reorganização genômica e instabilidade genômica propiciada pela aneuploidia/poliploidia facilita uma rápida reorganização genômica, tendo em vista que há uma supressão dos pontos de checagem do ciclo celular durante esse evento e além disso serve como fonte de formação de células iniciadoras de tumor (NIU *et al.*, 2016). Mas também, as PGCCs, além

de proliferarem de forma assíncrona, são resistentes à apoptose e senescência, o que as torna mais resistentes também à QT (NIU *et al.*, 2016) e, possivelmente, à RT. Por fim, o ciclo celular dessas células evidencia o porquê essas células adquirem características de células-tronco tumorais. NIU e colaboradores (2016) pontuam que essas características evidenciam como o ciclo celular das PGCCs propicia que elas sobrevivam e gerem células filhas diploides com capacidade de iniciarem a formação de tumores instáveis genomicamente, o que contribui para a recidiva da doença.

As análises morfológicas por microscopia de contraste de fase e por microscopia eletrônica de transmissão mostraram que a irradiação induz diferentes alterações morfológicas as quais se intensificam em dose maior de irradiação. É importante ressaltar que as células HCT-116 irradiadas com 10 Gy apresentaram “vacúolos intracelulares” da mesma forma que em células submetidas ao modelo hipofracionado. Vários estudos têm mostrado que a irradiação danifica não somente o DNA, mas também a célula desenvolve aumento do volume celular, projeções citoplasmáticas, perda dos contatos intercelulares, além de dano e aumento do número de mitocôndrias (DE CARVALHO; DE SOUZA; MORGADO-DÍAZ, 2006; ACCIOLY *et al.*, 2008; DE ALBUQUERQUE-XAVIER *et al.*, 2012). Apesar das várias alterações em comum, a formação de corpúsculos lipídicos nas células HCT-116 mostra que existem sutis diferenças que podem refletir na questão da sensibilidade ao tratamento. E, interessante, após uma análise detalhada por microscopia eletrônica de transmissão, foi possível observar também a presença de células internalizadas dentro de outras células, o que caracterizaria um evento de entose.

Além da apoptose, autofagia e necrose como formas de morte celular, ainda existem outros mecanismos representando caminhos adicionais pelos quais as células podem ser eliminadas. Dentre esses mecanismos encontra-se a entose, na qual as células viáveis são engolfadas ou sofrem o chamado canibalismo celular e então podem ser mortas. Esse canibalismo celular pode também contribuir com o *turnover* celular em condições normais ou no contexto patofisiológico. E as estruturas celulares que lembram aquelas formadas durante a entose tem sido relatadas em vários tipos de câncer, incluindo mama, cólon,

fígado e pâncreas (KRISHNA; OVERHOLTZER, 2016). Acredita-se que a entose na carcinogênese pode promover um processo de competição entre células vizinhas, em que as células engolfadas (perdedora) morrem às custas das células engolfadoras (ganhadoras), as quais se beneficiam ao adquirir nutrientes daquelas. Nesse contexto, os indutores de entose conhecidos nas populações celulares são, por exemplo, o destacamento de células da matriz extracelular como ocorre em alguns cânceres (OVERHOLTZER *et al.*, 2007), o desbalanço por tensão mecânica (WAN *et al.*, 2012) e a diferença no tamanho celular (LI; SUN; DEY, 2015) entre células vizinhas. Desta forma, como uma clara consequência da entose é a aquisição de nutrientes através do engolfamento celular, seria importante determinar se formas de privação de nutrientes, como a que ocorre em células submetidas à irradiação, poderia também induzir entose como observado no presente trabalho.

A autofagia é uma resposta metabólica da célula a insultos químicos e físicos, tais como a privação de fatores de crescimento ou nutrientes, danos ao DNA, entre outros. É um processo que mantém a homeostase do metabolismo intracelular principalmente ao degradar proteínas e organelas celulares (XIN *et al.*, 2017). Quando células tumorais são submetidas a irradiação, seu material genético (DNA) é destruído e a sua habilidade para autorenovação, divisão e proliferação é perdida (Baskar *et al.*, 2012). Assim, para manter a estabilidade de sobrevivência as células tumorais ativam a autofagia (Wang *et al.*, 2014). Portanto, este é mecanismo potencialmente aceito no contexto da resistência à irradiação. Apesar de os mecanismos específicos de radiosensibilização que regulam autofagia não serem ainda bem elucidados, seu efeito protetor sobre células tumorais tem aumentado o interesse sobre a possibilidade de que interferências na autofagia poderiam reverter a resistência e aumentar a radiosensibilidade dos tumores (Palumbo and Comincini, 2013; Ko *et al.*, 2014). Portanto, decidimos analisar este evento nas células após irradiação e observamos uma notável redistribuição do marcador de autofagia, LC3B. Na linhagem HCT-116 observamos um aumento da marcação puntiforme da LC3B distribuída pelo citoplasma das células, em especial após irradiação de 10 Gy. Já na linhagem SW-480 a mudança mais evidente consistiu na redistribuição da desta proteína para a região perinuclear das células irradiadas. Logo, decidimos

avaliar as consequências da inibição da autofagia com o uso de 3MA, uma droga que atua inibindo a formação de autofagossomos.

Uma série de drogas tem sido relatadas na literatura como promotoras do aumento da radiosensibilidade e da diminuição da autofagia, dentre elas o 3MA, o qual inibe a enzima PI3KIII. Já foi mostrado que esse inibidor combinado com a irradiação aumenta a radiosensibilidade inibindo autofagia em células de vários tipos tumorais, incluindo o câncer colorretal (XIN *et al.*, 2017). No presente trabalho observamos que o tratamento com este inibidor induziu um fenótipo aberrante mais pronunciado em ambas as linhagens, reduziu a viabilidade celular tanto em células controle como as irradiadas, e induziu maior poliploidia em células SW-480 irradiadas. Surpreendentemente, observamos que o inibidor causou uma redistribuição, mas não diminuição de LC3B, indicando que aparentemente não inibiu a autofagia. Em um prévio estudo de nosso laboratório mostramos que a autofagia induzida por irradiação é um mecanismo inicial de sobrevivência de células tumorais e que a inibição da autofagia com 3MA induziu uma demora do ciclo celular em fase S. Assim, a resposta a inibição de autofagia pode variar dependendo do tipo de células tumorais e em que este processo está sendo ativado devido às diferentes características biológicas e de tratamentos terapêuticos empregados (DE ALBUQUERQUE-XAVIER *et al.*, 2012). E já foi documentado também que o 3MA possui um papel dual na modulação da autofagia (SHI *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2010), de modo que o seu uso por tempo prolongado, em meio completo, pode resultar na indução deste mecanismo (WU *et al.*, 2010). Além disso, tem sido proposto o conceito do “*switch*” autofágico que difere da ideia de aumento ou diminuição da autofagia e se refere a tornar a autofagia citoprotetiva em citotóxica ou citostática. A manipulação desse “*switch*” poderia também aumentar a sensibilidade à radioterapia. Observamos também que em células de câncer de mama com p53 funcional, análogos de vitamina D podem participar da indução desse “*switch*” autofágico (Wilson *et al.*, 2011), no entanto, o mecanismo pelo qual isto ocorre ainda não está bem descrito. Bem como o papel da p53 e de outras drogas podem ter algum papel nesse *switch* ainda permanece por ser investigado. Finalmente, o efeito da autofagia varia e, com isso, permite vários caminhos que resultam no aumento da radiosensibilidade, seja por inibição, aumento ou alteração deste mecanismo

(XIN *et al.*, 2017). Por fim, são necessários mais experimentos para elucidar melhor qual foi o real efeito do tratamento com 3MA sobre o processo autofágico nestas células.

7 CONCLUSÃO

No presente trabalho mostramos que a irradiação em células tumorais de câncer colorretal induz severas mudanças morfológicas, independente do protocolo de tratamento: dose única (5 ou 10 Gy) ou hipofracionada (um total de 25 Gy a partir de 5 doses diárias 5 Gy). Além disso, mostramos que aparentemente as alterações causadas com a dose hipofracionada seria resultado tanto de uma progressiva seleção de células com o fenótipo aberrante como de um dano cumulativo de cada dose diária de 5 Gy. Mostramos que, além das alterações morfológicas, as células tratadas com dose única de irradiação desenvolvem um fenótipo de células tumorais poliploides gigantes com aparente ativação da autofagia, a qual seria o mecanismo responsável pela sobrevivência das células radioresistentes neste modelo de estudo. Finalmente, o uso de um inibidor da formação de autofagossomos, 3MA, induziu um fenótipo aberrante mais pronunciado em ambas as linhagens, reduziu a viabilidade celular tanto em células do grupo controle quanto dentre as irradiadas, e induziu a poliploidia em células SW-480 irradiadas. Isso ressalta a importância desse processo na regulação das alterações decorrentes da irradiação. Surpreendentemente, observamos também que esse inibidor causou uma redistribuição, e não uma diminuição do marcador de autofagia, LC3B, indicando que aparentemente não houve inibição da autofagia. Os efeitos deste inibidor sobre o processo autofágico nessas células ainda precisam ser melhor elucidados. Ainda assim, nossos resultados contribuem para um melhor entendimento de como a aquisição do fenótipo PGCC e suas implicações interferem no estabelecimento da radioresistência o que, conseqüentemente, fundamenta e assinala a formação dessas células como um mecanismo celular importante desencadeado a partir da radioterapia.

8 REFERÊNCIAS

ACCIOLY, M. T. et al. Lipid Bodies Are Reservoirs of Cyclooxygenase-2 and Sites of Prostaglandin-E2 Synthesis in Colon Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 68, n. 6, p. 1732–1740, 15 mar. 2008.

AHMED, D. et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. **Oncogenesis**, v. 2, n. 9, p. e71, set. 2013.

AMEND, S. R. et al. Polyploid Giant Cancer Cells: Unrecognized Actuators of Tumorigenesis, Metastasis, and Resistance. **The Prostate**, v. 79, n. 13, p. 1489–1497, set. 2019.

ATCC - AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. Disponível em: <<https://www.atcc.org/>>. Acesso em 09 Nov. 2021.

ATCC - AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION - Thawing, propagating, and cryopreserving protocol. NCI-PBCF-CCL247 (HCT116). Colon carcinoma. (ATCC® CCL-247™). version 1.6, 2012a.

ATCC - AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION - Thawing, propagating, and cryopreserving protocol. NCI-PBCF-CCL228 (SW480). Colon adenocarcinoma. (ATCC® CCL-228™). version 1.6, 2012b.

BASKAR, R. et al. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 193–199, 2012.

BANWELL, V. *et al.* Five-year oncological outcomes after selective neoadjuvant radiotherapy for resectable rectal cancer. **Acta Oncologica**, v. 58, n. 9, p. 1267–1272, 2019.

BERG, K. *et al.* Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. **Molecular Cancer**, v. 16, n. 116, 2017.

BOUAOUN, L. *et al.* TP53 variations in human cancers: new lessons from the IARC TP53 database and genomics data. **Human Mutation**, v. 37, n. 9, p. 865–876, 2016.

BUCKLEY, A. M. *et al.* Targeting hallmarks of cancer to enhance radiosensitivity in gastrointestinal cancers. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, n. 5, p. 298–313, 2020.

CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive Molecular Characterization of Human Colon and Rectal Cancer. **Nature**, v. 487, n. 7407, p. 330–337, 18 jul. 2012.

CHEN, S. *et al.* Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1806, n. 2, p. 220–229, 2010.

CORLEY, D. A. et al. Variation of Adenoma Prevalence by Age, Sex, Race, and Colon Location in a Large Population: Implications for Screening and Quality Programs. **Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association**, v. 11, n. 2, p. 172–180, fev. 2013.

DE ALBUQUERQUE-XAVIER, A. C. et al. Blockade of irradiation-induced autophagosome formation impairs proliferation but does not enhance cell death in HCT-116 human colorectal carcinoma cells. **International Journal of Oncology**, v. 40, n. 4, p. 1267–1276, 1 abr. 2012.

DE CARVALHO, A. D.; DE SOUZA, W.; MORGADO-DÍAZ, J. A. Morphological and molecular alterations at the junctional complex in irradiated human colon adenocarcinoma cells, Caco-2. **International Journal of Radiation Biology**, v. 82, n. 9, p. 658–668, 1 jan. 2006.

DEKKER, E. et al. Colorectal Cancer. **Lancet (London, England)**, v. 394, n. 10207, p. 1467–1480, 19 out. 2019.

ENGELEN, S. *et al.* Modern multidisciplinary treatment of rectal cancer based on staging with magnetic resonance imaging leads to excellent local control, but distant control remains a challenge. **European Journal of Cancer**, v. 49, n. 10, p. 2311–2320, 2013.

FEI, F. et al. The number of polyploid giant cancer cells and epithelial-mesenchymal transition-related proteins are associated with invasion and metastasis in human breast cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR**, v. 34, p. 158, 24 dez. 2015.

FRANKE, A. J. *et al.* Total Neoadjuvant Therapy: A Shifting Paradigm in Locally Advanced Rectal Cancer Management. **Clinical Colorectal Cancer**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2018.

GEORGE, T. J. *et al.* National Cancer Institute (NCI) state of the science: Targeted radiosensitizers in colorectal cancer. **Cancer**, v. 125, n. 16, p. 2732–2746, 2019.

HU, L. *et al.* Crosstalk between autophagy and intracellular radiation response (Review). **International Journal of Oncology**, v. 49, n. 6, p. 2217–2226, 2016.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA/MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil (2019). Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 15 Out. 2021.

KO, A. et al. Autophagy Inhibition Radiosensitizes in Vitro, yet Reduces Radioresponses in Vivo Due to Deficient Immunogenic Signalling. **Cell Death and Differentiation**, v. 21, n. 1, p. 92–99, jan. 2014.

KRISHNA, S.; OVERHOLTZER, M. Mechanisms and Consequences of Entosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 11, p. 2379–2386, 1 jun. 2016.

- KUIPERS, E. *et al.* Colorectal cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 1–25, 2015.
- LI, H. *et al.* Targeting the oncogenic p53 mutants in colorectal cancer and other solid tumors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, 2019a.
- LI, X.; HE, S.; MA, B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. **Molecular Cancer**, v. 19, n. 1, p. 1–16, 2020.
- LI, Y. *et al.* A Review of Neoadjuvant Chemoradiotherapy for Locally Advanced Rectal Cancer. **International Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 8, p. 1022–1031, 17 jul. 2016.
- LI, Y.; SUN, X.; DEY, S. K. Entosis Allows Timely Elimination of the Luminal Epithelial Barrier for Embryo Implantation. **Cell Reports**, v. 11, n. 3, p. 358–365, 21 abr. 2015.
- LIN, J. E. *et al.* Guanylyl cyclase C in colorectal cancer: susceptibility gene and potential therapeutic target. **Future oncology (London, England)**, v. 5, n. 4, p. 509–522, maio 2009.
- LIU, K. *et al.* Association and clinicopathologic significance of p38MAPK-ERK-JNK-CDC25C with polyploid giant cancer cell formation. **Medical Oncology**, v. 37, n. 1, 2020a.
- LV, H. *et al.* Polyploid Giant Cancer Cells with Budding and the Expression of Cyclin E, S-Phase Kinase-Associated Protein 2, Stathmin Associated with the Grading and Metastasis in Serous Ovarian Tumor. **BMC cancer**, v. 14, p. 576, 8 ago. 2014.
- MÁRMOL, I. *et al.* Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 197, 19 jan. 2017.
- MIJIT, M. *et al.* Role of p53 in the regulation of cellular senescence. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, 2020.
- MO, N. *et al.* Inhibition of autophagy enhances the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma by reducing Rad51 expression. **Oncology Reports**, v. 32, n. 5, p. 1905–1912, 2014.
- NIU, N. *et al.* Linking genomic reorganization to tumor initiation via the giant cell cycle. **Oncogenesis**, v. 5, n. 12, p. e281, dez. 2016.
- ONDREJ, M. *et al.* To live or let die: Unclear task of autophagy in the radiosensitization battle. **Radiotherapy and Oncology**, v. 119, n. 2, p. 265–275, 2016.
- OUELLETTE, M. M.; YAN, Y. Radiation-activated prosurvival signaling pathways in cancer cells. **Precision Radiation Oncology**, v. 3, n. 3, p. 111–120, 2019.

OVERHOLTZER, M. et al. A Nonapoptotic Cell Death Process, Entosis, That Occurs by Cell-in-Cell Invasion. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 966–979, 30 nov. 2007.

PALUMBO, S.; COMINCINI, S. Autophagy and Ionizing Radiation in Tumors: The “Survive or Not Survive” Dilemma. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 1, p. 1–8, 2013.

PASTUSHENKO, I.; BLANPAIN, C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. **Trends in Cell Biology**, v. 29, n. 3, p. 212–226, 2019.

RASKOV, H. et al. Colorectal carcinogenesis-update and perspectives. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 20, n. 48, p. 18151–18164, 28 dez. 2014.

REYES, J. et al. Fluctuations in P53 Signaling Allow Escape from Cell-Cycle Arrest. **Molecular Cell**, v. 73, n. 6, p. 1306, 21 mar. 2019.

RYCAJ, K.; TANG, D. G. Cancer stem cells and radioresistance. **International Journal of Radiation Biology**, v. 90, n. 8, p. 615–621, 2014.

ROCHETTE, P. J. *et al.* SW480, a p53 double-mutant cell line retains proficiency for some p53 functions. **Journal of Molecular Biology**, v. 352, n. 1, p. 44-57, 2005.

ROWAN, A. J. et al. APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational “hotspot” and interdependence of the “two hits”. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 7, p. 3352–3357, 28 mar. 2000.

SAUER, R. *et al.* Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 17, p. 1731–1740, 2004.

SEBAG-MONTEFIORE, D. *et al.* Preoperative radiotherapy versus selective postoperative chemoradiotherapy in patients with rectal cancer (MRC CR07 and NCIC-CTG C016): a multicentre, randomised trial. **The Lancet**, v. 373, n. 9666, p. 811–820, 2009.

SHI, Y. et al. Delayed Treatment with an Autophagy Inhibitor 3-MA Alleviates the Progression of Hyperuricemic Nephropathy. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 6, p. 1–16, 17 jun. 2020.

STOFFEL, E. M.; KASTRINOS, F. Familial CRC—Beyond the Lynch Syndrome. **Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association**, v. 12, n. 7, p. 1059–1068, jul. 2014.

SUN, Q. *et al.* MiR-200c inhibits autophagy and enhances radiosensitivity in breast cancer cells by targeting UBQLN1. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. 1003–1012, 2015.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TAM, S.Y.; WU, V. W. C.; LAW, H. K. W. Influence of autophagy on the efficacy of radiotherapy. **Radiation Oncology**, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2017.

TANG, L. *et al.* Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 37, n. 87, 2018.

TOWERS, C. G.; THORBURN, A. Therapeutic Targeting of Autophagy. **EBioMedicine**, v. 14, p. 15–23, 2016.

VAN GIJN, W. *et al.* Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. **The Lancet Oncology**, v. 12, n. 6, p. 575–582, 2011.

WANG, H. *et al.* Cancer Radiosensitizers. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 39, n. 1, p. 24–48, 2018b.

WAN, Q. et al. Regulation of Myosin Activation during Cell-Cell Contact Formation by Par3-Lgl Antagonism: Entosis without Matrix Detachment. **Molecular Biology of the Cell**, v. 23, n. 11, p. 2076–2091, jun. 2012.

WANG, W. et al. NVP-BEZ235, a Novel Dual PI3K/MTOR Inhibitor, Enhances the Radiosensitivity of Human Glioma Stem Cells in Vitro. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 5, p. 681–690, maio 2013.

WILSON, E. N. et al. A Switch between Cytoprotective and Cytotoxic Autophagy in the Radiosensitization of Breast Tumor Cells by Chloroquine and Vitamin D. **Hormones & Cancer**, v. 2, n. 5, p. 272–285, out. 2011.

WU, Y.-T. et al. Dual Role of 3-Methyladenine in Modulation of Autophagy via Different Temporal Patterns of Inhibition on Class I and III Phosphoinositide 3-Kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 14, p. 10850–10861, 2 abr. 2010.

XIN, Y. et al. Role of Autophagy in Regulating the Radiosensitivity of Tumor Cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 143, n. 11, p. 2147–2157, 1 nov. 2017.

YAMASHITA, K. *et al.* Recent advances of neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer: Future treatment perspectives. **Annals of Gastroenterological Surgery**, v. 3, n. 1, p. 24–33, 2018.

YUN, C. W.; LEE, S. H. The roles of autophagy in cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 1–18, 2018.

ZHANG, L. et al. Number of Polyploid Giant Cancer Cells and Expression of EZH2 Are Associated with VM Formation and Tumor Grade in Human Ovarian Tumor. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 903542, 2014a.

ZHANG, S. et al. Generation of Cancer Stem-like Cells through the Formation of Polyploid Giant Cancer Cells. **Oncogene**, v. 33, n. 1, p. 116–128, 2 jan. 2014b.

ZHANG, S.; MERCADO-URIBE, I.; LIU, J. Generation of erythroid cells from fibroblasts and cancer cells in vitro and in vivo,. **Cancer letters**, v. 333, n. 2, p. 205–212, 10 jun. 2013.

ZHOU, X.; HAO, Q.; LU, H. Mutant p53 in cancer therapy-the barrier or the path. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 4, p. 293–305, 2019.