UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

TONIELLI CRISTINA SOUSA DE LACERDA

**Papel do Complexo PrP^C-HOP e Vesículas
Extracelulares em Câncer Colorretal**

Versão Corrigida

A versão original encontra-se disponível na Secretaria de pós-graduação do
Instituto de Química USP

São Paulo
27/04/2016

TONIELLI CRISTINA SOUSA DE LACERDA

**Papel do Complexo PrP^C-HOP e Vesículas
Extracelulares em Câncer Colorretal**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vilma Regina Martins

**São Paulo
2016**

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

L131p Lacerda, Tonielli Cristina Sousa de
Papel do complexo PrP^C-HOP e vesículas extracelulares em
câncer colorretal / Tonielli Cristina Sousa de Lacerda -- São
Paulo, 2015.
1v.(numeração irregular)

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica
Orientador: Martins, Vilma Regina

1. Proteína-proteína : Interação : Bioquímica 2. Neoplasias
colorretais I. T. II. Martins, Vilma Regina, orientador.

574.19245 CDD

São Paulo, 18 de dezembro de 2013.

A

Dra. Vilma Regina Martins

Aluna: Tonielli Cristina Sousa de Lacerda (Doutorado – Instituto de Química USP).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1817/13

“Relevância funcional do complexo PrPC-HOP e de vesículas extracelulares na biologia dos tumores colorretais”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 10/12/2013, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 17/09/2013, aprovaram a realização do projeto (datado de maio de 2013), o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Versão 1.1) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Declaração sobre o plano de recrutamento dos sujeitos de pesquisa, circunstâncias e responsáveis pela obtenção do TCLE;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando Amostras Fornecidas e Processadas pelo Biobanco do AC Camargo Cancer Center;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE);
- Cronograma do Estudo;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Núcleo de Tumores Colorretais;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE).

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

Atenciosamente,

Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Aos meus pais e meu irmão

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por mais essa conquista na minha vida. O caminho foi árduo, mas tenho certeza que ao longo desses anos só tive ganhos e aprendizados para a vida profissional e pessoal.

A professora Vilma Martins por me aceitar em seu laboratório, permitir que eu fizesse parte da sua equipe de trabalho e pelos ensinamentos que tanto contribuíram para a minha vida profissional. Obrigada por ter confiado nessa aluna que chegou desesperada em sua sala por uma oportunidade! Se hoje terminei meu doutorado foi porque você acreditou no meu potencial.

Aos meus pais e meu irmão que sem o apoio incondicional de vocês nada disso na minha vida seria possível. Obrigada por serem meu alicerce, minha vida e pela pessoa que sou hoje. Essa conquista é dedicada a vocês Fátima, Antônio e Joan. Amor maior!

Ao meu melhor amigo e irmão Lucas Borges. Obrigada por essa parceria que já são quase dez anos, por me ouvir, pelas palavras sempre certas em todos os momentos da minha vida. Por acreditar e me fazer acreditar que tudo isso era possível e não me deixar desistir nunca. Amo muito você.

A Dra. Dirley por todo ensinamento e generosidade com os alunos. Obrigada pelas nossas conversas, pelo carinho e amizade que sempre teve comigo e principalmente por ser o espelho de um profissional exemplar.

Aos meus queridos amigos do laboratório. Conhecer vocês tornou a cidade cinzenta muito melhor e mais divertida. Em especial quero agradecer a vocês: Fernanda Giudice, Marcos Salles, Antuani, Gabriela, Bianca, Edson, Bruna, Juliana Rocha, Michele por tornarem meus dias muito mais felizes.

Fê e Má só tenho que agradecer por todos esses anos de ensinamento, orientação e amizade. Por acreditarem e mim e no meu potencial quando ninguém mais acreditava. Essa conquista está acontecendo porque tive ao meu lado os melhores profissionais, vocês! Amo muito os dois!

As meninas da “diretoria”: Juliana Laino, Iara, Fernanda Fortes, Hellen, Bianca, Marcilei, Gabriela e Vanessa são tantas histórias que só posso dizer que são muito importantes na minha vida e como amo cada uma. Obrigada por fazer parte dessa história. Com a amizade de vocês tudo foi muito mais fácil.

Aos queridos Felipe, Hil e Danilo obrigado por nos ajudar, sem vocês nosso trabalho não acontecia.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização desse sonho!

À FAPESP pelo apoio financeiro.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

Resumo

Lacerda, T.C.S. **Papel do Complexo PrP^C-HOP e Vesículas Extracelulares em Câncer Colorretal**. 2015. 110 pág. Tese de Doutorado- Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais comum no mundo. Apesar dos avanços nos tratamentos convencionais, aproximadamente dois terços dos pacientes com CCR são submetidos à cirurgia potencialmente curativa. Entretanto, grande parte desses pacientes evolui mal, apresentando recidivas e/ou metástases. A busca de novos alvos moleculares para a terapia do CCR revelou a proteína celular *Prion* (PrP^C) como um possível candidato. Trabalhos recentes sugerem participação direta ou indireta de PrP^C no crescimento de tumores, na formação de metástases, na composição de complexos multiproteicos e na indução de vias de sinalização envolvidas em diversos processos biológicos, como proliferação. Além disso, PrP^C foi descrito como um importante modulador do crescimento de tumor colorretal. Resultados prévios mostraram que a interação da proteína PrP^C com a proteína HSP70/HSP90 *Organizing Protein* (HOP) induz proliferação em glioblastomas. HOP é uma proteína predominantemente citoplasmática, podendo também ser secretada associada às vesículas extracelulares. Assim, o presente estudo objetivou avaliar o papel do complexo PrP^C-HOP e das vesículas extracelulares no desenvolvimento e progressão dos tumores colorretais. Os nossos resultados mostram que HOP induziu migração e invasão em linhagens de CCR de maneira dependente de PrP^C, uma vez que o uso do peptídeo sem atividade que compete pelo sítio ligação de HOP a PrP^C inibiu estes processos. Além disso, nossos dados apontaram que o aumento de migração e invasão das células de CCR induzida pela interação PrP^C-HOP é mediada pela ativação da via ERK1/2. Os achados *in vitro* estimularam a avaliação do perfil de expressão de PrP^C e HOP por imuno-histoquímica em tecidos de pacientes com diferentes tipos de tumores colorretais. Nossos resultados sugeriram que essas proteínas são importantes no início do desenvolvimento tumoral e na transição de adenomas para adenocarcinomas, não havendo correlação entre a presença de HOP e/ou PrP^C com metástase, linfonodos acometidos, estadiamento, sobrevida ou região tumoral versus tecido normal. Em relação ao papel das vesículas extracelulares na progressão dos tumores colorretais, nossos resultados mostraram que linhagens celulares que apresentam padrões parecidos de agressividade tumoral podem ter perfis de secreção de proteínas e vesículas extracelulares bastante diferentes, induzindo, portanto, processos biológicos com intensidades distintas. O meio condicionado e as vesículas extracelulares da linhagem WiDr apresentaram maior potencial de indução de migração quando comparado com a linhagem HCT8. Além disso, a modulação negativa da proteína VPS4, uma das responsáveis pela formação dos corpos multivesiculares, mostrou-se uma abordagem interessante no estudo da secreção de vesículas por células de CCR, uma vez que o dominante negativo de VPS4 promoveu diminuição do cargo proteico e da secreção de vesículas extracelulares, redução da proliferação celular e do efeito indutor do processo de migração na linhagem WiDr. Assim, em conjunto, o presente trabalho indicou que o complexo PrP^C-HOP pode ser um bom alvo terapêutico nos processos de migração e invasão em CCR. Ainda,

essas proteínas se mostraram importantes nos estágios iniciais da formação dos tumores. A modulação da secreção de vesículas extracelulares pode contribuir para retardar a progressão dos tumores colorretais.

Palavras-chave: proteína prion; proteína HOP; câncer colorretal; invasão; migração, vesícula extracelular.

Abstract

Lacerda, T.C.S. **Role of PrP^C-HOP Complex and Extracellular Vesicles in Colorectal Cancer.** 2015. 110 pages. PhD Thesis- Graduate Program in Biochemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo.

Colorectal cancer (CRC) is the third most common type of cancer in the world. Despite improvements in conventional treatments, approximately two-thirds of CRC patients undergo potentially curative surgery. However, most of these patients evolve poorly, showing recurrence and/or metastasis. Search of new molecular targets for CRC therapy revealed the cellular protein Prion (PrP^C) as a putative candidate. Recent studies have shown that PrP^C exhibit direct or indirect participation in tumor growth, formation of metastasis, composition of multiprotein complexes and induction of signaling pathways involved in many biological processes such as proliferation. Moreover, PrP^C has been described as an important modulator of colorectal tumor growth. Previous findings showed that the interaction between PrP^C and its ligand HSP70/90 heat shock organizing protein (HOP) induces glioblastoma proliferation. It is well known that HOP localizes mainly in the cytoplasm but HOP is also secreted associated with extracellular vesicles. In this way, the present study sought to evaluate the role of PrP^C-HOP complex and extracellular vesicles in the development and progression of CRC. We demonstrate that HOP induces the migration and invasion of CRC cell lines in a PrP^C-dependent manner because the use of HOP peptide, which is able to bind to PrP^C, blocking PrP^C-HOP complex formation, inhibited the migration and invasion processes. In addition, our data showed that the enhancement of migration and invasion induced by PrP^C-HOP interaction is mediated by ERK1/2 pathway activation. These *in vitro* results lead us to evaluate the PrP^C and HOP expression by immunohistochemistry in tissues from patients with different tumor types. Our data showed that these proteins could be important for the initial steps of tumor development, represented by the transition from adenoma to adenocarcinoma. No correlation was found among HOP and/or PrP^C expression and metastasis, lymph node involvement, staging, survival or tumor area versus normal tissue. Regarding the role of extracellular vesicles in the progression of colorectal tumors, our results showed that cell lines exhibiting similar aggressive tumor behavior can have a different protein secretion pattern and a distinct profile of extracellular vesicles release, which could induce biological process with different intensities. The conditioned medium and the extracellular vesicles derived from WiDr cell line showed a higher potential to induce migration than HCT8 cell line. Moreover, the negative modulation of VPS4, one of the proteins responsible for multivesicular body formation, showed to be an interesting approach in the study of extracellular vesicles secretion secreted by CRC cells; the negative dominant of VPS4 promoted in the WiDr cell line a reduction in the protein cargo and secretion of the extracellular vesicles, a decrease of cell proliferation and induction of migration process. Therefore, taken together, our data highlights that PrP^C-HOP complex can be considered a new therapeutic target in migration and invasion processes of CRC. Moreover, these proteins appeared to be important at onset of tumor formation. The modulation of extracellular vesicles secretion may contribute for delaying the progression of colorectal tumors.

Key words: prion protein; HOP protein; colorectal cancer; invasion; migration, extracellular vesicle.

Listas de Figuras

Figura 1- Distribuição dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para o ano de 2014 distribuídos por sexo, exceto pele não melanoma.....	20
Figura 2- Histopatologia do desenvolvimento do câncer colorretal e principais mutações..	23
Figura 3- Imagem representativa da transição epitélio-mesenquima.....	25
Figura 4- Esquema da transição epitélio-mesenquima na progressão do câncer....	26
Figura 5- - Representação esquemática da PrP^C..	28
Figura 6- Esquema representativo de PrP^C atuando como plataforma de sinalização.....	30
Figura 7- Esquema ilustrativo da competição da proteína HOP e do peptídeo pelo sítio de interação com PrP^C.....	33
Figura 8- Via de secreção convencional de proteínas que apresentam peptídeo sinal.....	34
Figura 9- Via de secreção não convencional de proteínas.....	35
Figura 10- Estrutura e composição dos exossomos.	37
Figura 11- Figura esquemática do princípio de funcionamento do NanoSight	44
Figura 12- Análise da expressão de PrP^C nas linhagem tumorais de cólon WiDr e HCT8.....	51
Figura 13- Análise da expressão de HOP em linhagens celulares de CCR.....	52
Figura 14- Potencial de migração e invasão das células colorretais.	53
Figura 15- A proteína recombinante HOP promove a migração celular em linhagens de câncer de cólon.....	54
Figura 16- Construção da linhagem WiDr knockdown para PrP^C.....	55
Figura 17- Análise da redução da expressão da proteína PrP^C na linhagem celular HCT8.....	56

Figura 18- PrP^C desempenha um papel fundamental no processo de invasão celular mediado por HOP.	57
Figura 19- A interação do complexo PrP^C-HOP é importante para os processos de migração e invasão nas linhagens celulares WiDr e HCT8.	59
Figura 20- O complexo PrP^C-HOP promove invasão via fosforilação de ERK1/2.	61
Figura 21- Sobrevida global dos pacientes com tumores metastáticos (A) ou linfonodos acometidos (B).	63
Figura 22- Perfil de expressão imuno-histoquímica das proteínas HOP em CCR esporádicos.	64
Figura 23- Perfil de expressão imuno-histoquímica da proteína PrP^C em CCR esporádicos.	65
Figura 24- Expressão da proteína PrP^C e sua correlação com dados clínicos de pacientes portadores de CCR.	66
Figura 25- Expressão da proteína HOP e sua correlação com dados clínicos de pacientes portadores de CCR.	68
Figura 26- Análise da correlação da expressão do complexo PrP^C-HOP versus sobrevida global de pacientes com CCR.	69
Figura 27- Análise imuno-histoquímica da expressão de PrP^C e HOP nas amostras de tumores de adenocarcinoma colorretal.	70
Figura 28- Análise imuno-histoquímica da expressão de PrP^C em amostra de tecido tumoral benigno e maligno de pacientes portadores de FAP.	72
Figura 29- Análise imuno-histoquímica da expressão de PrP^C em amostra de tecido tumoral benigno e maligno de pacientes portadores de FAP.	73
Figura 30- Avaliação do padrão de secreção de HOP em linhagens celulares de CCR.	74
Figura 31- Meio condicionado das linhagens celulares de CCR promovem migração.	75

Figura 32- Caracterização das vesículas extracelulares secretadas pelas linhagens celulares de CCR.....	76
Figura 33- Western Blot representativo do perfil de secreção de HOP nas diferentes frações de vesículas extracelulares em células de CCR.....	77
Figura 34- Meio condicionado, vesículas extracelulares e sobrenadante promovem migração celular em linhagens de CCR.....	78
Figura 35- A transfecção da proteína VPS4 dominante negativo promove a retenção dos corpos multivesiculares na linhagem de CCR.....	79
Figura 36- Caracterização das vesículas extracelulares secretadas pelas células WiDr após modulação da proteína VPS4.....	81
Figura 37- Perfil da secreção total das proteínas nos pellets de 2 e 16 horas das linhagens WiDr e VPS4-E228-GFP (DN).....	82
Figura 38- Curva de proliferação celular.	83
Figura 39- Tratamento da linhagem celular WiDr com meio condicionado das linhagens WiDr moduladas para a proteína VPS4.	84
Figura 40- Perfil de secreção de HOP nas vesículas extracelulares presentes nos pellets de 2 e 16 horas derivados das linhagens WiDr e VPS4-E228-GFP.	85

Listas de Tabelas

Tabela 1- - Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária.....	21
Tabela 2- Análise descritiva do <i>Tissue Microarrays</i> (TMA) para os casos de tumores colorretais.....	62
Tabela 3- Resultado (%) do padrão de imunoexpressão da proteína PrP^C em tumores de pacientes com CCR esporádico exibindo ou não acometimento linfonodal.....	67
Tabela 4- Resultado (%) do padrão de imunoexpressão da proteína PrP^C em tumores de pacientes com CCR esporádico exibindo ou não acometimento linfonodal.....	70

Sumário

1	Introdução.....	20
1.1-	Tumores Coloretais	20
1.2-	Migração, Invasão e Metástase em Câncer Coloretal.....	24
1.3-	A Proteína Prion Celular (PrP ^C) e suas inúmeras funções	27
1.4-	Stress Inducible Protein 1 (STI1) ou HSP70-HSP90 Organizing Protein (HOP) e seu papel como ligante de PrP ^C	31
1.5-	Interação PrP ^C e HOP e o seu papel nos processos tumorais.....	32
1.6-	Importância da secreção de vesículas extracelulares no controle da progressão tumoral	33
1.7	O papel do complexo PrP ^C -HOP no CCR	38
2	Objetivo geral	40
2.1	Objetivos específicos	40
3	Materiais e Métodos	41
3.1	Linhagens celulares e condições de cultura.....	41
3.2	Ensaio de imunodeteção	41
3.3	Citometria de Fluxo	42
3.4	Análise da migração e invasão <i>in vitro</i>	42
3.5	Obtenção e fracionamento do meio condicionado	43
3.6	Análise do número de vesículas e mensuração.....	44
3.7	RNA de Interferência.....	45
3.8	Imunofluorescência	46
3.9	Elisa	46
3.10	Imunohistoquímica de Microarranjo de Tecido e Corte de Tumor.....	47
3.11	Transfecção Celular	48
3.12	Microscopia eletrônica.....	48
3.13	Curva de crescimento celular	49
3.14	Marcação de proteínas em gel de prata	49
3.15	Análise estatística	49
4-	Resultados	50
4.1-	Modelos celulares de tumores colorretais.....	50
4.1.1	Avaliação da expressão de PrP ^C e HOP em linhagens celulares de tumores colorretais humanos.....	50

4.1.2 Atividade de migração invasão das células WiDr e HCT8 mediada por SFB e HOP recombinante.....	52
4.1.3- <i>knockdown</i> de PrP ^C confirma a importância do complexo PrP ^C -HOP nos processos de migração e invasão tumorais	54
4.1.4 Bloqueio da interação PrP ^C -HOP inibe migração e invasão celulares ..	57
4.1.5- O complexo PrP ^C -HOP medeia o processo de Invasão via ativação de ERK1/2.....	60
4.2- Análise da expressão de PrP ^C e HOP em tumores colorretais	61
4.3- Potencial das vesículas extracelulares no processo de migração de células de tumores colorretais	73
5- Discussão	86
5.1- Análise <i>in vitro</i> do papel do complexo PrP ^C -HOP nos processos de migração e invasão celular de tumores colorretais malignos.	86
5.2- Análise da expressão de PrP ^C e HOP em tumores colorretais	89
5.3- Potencial da vesícula extracelular no processo de migração de células câncer colorretais	93
6- Conclusões.....	97
Referências	99

1 Introdução

1.1- Tumores Colorretais

O carcinoma de cólon e reto (CCR) é classificado como o terceiro tipo de câncer de maior incidência no mundo (Parkin, Bray et al. 2005) . A maior parte dos casos é diagnosticada de forma precoce em países desenvolvidos, ao contrário dos países em desenvolvimento, onde há um maior número de áreas exibindo status socioeconômico baixo, principal determinante do diagnóstico tardio dos CCR (Mandelblatt, Andrews et al. 1996). Estima-se que nos países desenvolvidos, em 2015, haverá aproximadamente 780 mil novos casos de CCR e o risco médio de vida (desenvolver ou morrer devido ao CCR) será de 4.3 a 5.3% para homens e de 2.7 a 4.9% para mulheres (Peters, Bien et al. 2015). No Brasil, as estimativas para o ano de 2014, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA 2014), apontaram 15.070 novos casos de CCR em homens e 17.530 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 15.44 novos casos a cada 100 mil homens e 17.24 a cada 100 mil mulheres (figura 1) (tabela 1) (Cancer 2014).

Localização primária	casos	%	Homens	Mulheres	Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%			Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4% ←
→ Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

Figura 1- Distribuição dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para o ano de 2014 distribuídos por sexo, exceto pele não melanoma. As setas em vermelho destacam o câncer colorretal, que é o nos homens é o terceiro mais incidente e nas mulheres o segundo.

Fonte: Adaptado da webpage <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf> (INCA 2014).

Tabela 1- Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária. Em vermelho destaque para o tumor colorretal.

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estado		Capitais		Estado		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	68.800	70,42	17.540	82,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.120	56,09	19.170	80,67
Colo do Útero	-	-	-	-	15.590	15,33	4.530	19,20
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	16,79	4.000	18,93	10.930	10,75	3.080	13,06
Cólon e Reto	15.070	15,44	4.860	22,91	17.530	17,24	5.650	23,82
Estômago	12.870	13,19	2.770	13,07	7.520	7,41	2.010	8,44
Cavidade Oral	11.280	11,54	2.220	10,40	4.010	3,92	1.050	4,32
Laringe	6.870	7,03	1.460	6,99	770	0,75	370	1,26
Bexiga	6.750	6,89	1.910	8,91	2.190	2,15	730	2,97
Esôfago	8.010	8,18	1.460	6,76	2.770	2,70	540	0,00
Ovário	-	-	-	-	5.680	5,58	2.270	9,62
Linfoma de Hodgkin	1.300	1,28	410	5,72	880	0,83	420	8,64
Linfoma não Hodgkin	4.940	5,04	1.490	6,87	4.850	4,77	1.680	7,06
Glândula Tireoide	1.150	1,15	470	1,76	8.050	7,91	2.160	9,08
Sistema Nervoso Central	4.960	5,07	1.240	5,81	4.130	4,05	1.370	5,81
Leucemias	5.050	5,20	1.250	5,78	4.320	4,24	1.250	5,15
Corpo do Útero	-	-	-	-	5.900	5,79	2.690	11,24
Pele Melanoma	2.960	3,03	950	4,33	2.930	2,85	1.150	4,57
Outras Localizações	37.520	38,40	9.070	42,86	35.350	34,73	8.590	36,49
Subtotal	203.930	208,77	51.100	241,30	190.520	187,13	58.710	248,46
Pele não Melanoma	98.420	100,75	19.650	92,72	83.710	82,24	22.540	95,26
Todas as Neoplasias	302.350	309,53	70.750	334,08	274.230	269,35	81.250	343,85

Fonte: Adaptado da webpage <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf> (INCA 2014)

A incidência do CCR apresenta padrões bastante diferentes de acordo com a região, sugerindo uma grande influência dos fatores locais. No Brasil, por exemplo, as regiões Sul e Sudeste exibem ocorrências elevadas de CCR em relação às regiões Norte e Nordeste. Essas diferenças possivelmente são resultado, por exemplo, dos padrões dietéticos e do índice de desenvolvimento socioeconômico da população (Cancer 2014).

Dados da literatura mostram que os principais fatores de risco para CCR são: o histórico familiar de CCR, a predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino (como as poliposes adenomatosas) e o risco individual devido à retocolite ulcerativa, a dieta rica em gorduras animais, a baixa ingestão de frutas, vegetais e cereais, o consumo excessivo de álcool, o tabagismo, o sedentarismo, a diabetes do tipo II, a obesidade e a idade (Van den Brandt and Goldbohm 2006, Benson 2007, Garcia-Anguila, Kakourou et al. 2015).

Aproximadamente 75% dos casos de CCR são de origem esporádica, resultado da ação cumulativa de agentes carcinogênicos ambientais ou alimentares que, na maioria dos casos, levam a instabilidade genética. Os demais 25% estão associados ao histórico familiar (Kitisin and Mishra 2006), destacando-se o CCR hereditário não poliposo (HNPCC), que está ligado a mutações em variados genes, especialmente àqueles pertencentes à família de genes de reparo de DNA do tipo *mismatch*, como MLH1 e MSH2, com incidência de 2% a 5% dos casos herdáveis (Sancho, Batlle et al. 2004, Michor, Iwasa et al. 2005). A polipose adenomatosa familiar (FAP), com incidência aproximada de 1%, é outro exemplo de CCR correlacionado ao câncer colorretal hereditário, sendo ocasionada por instabilidade cromossômica, apresentando um cariótipo aneuplóide, responsável por mutações em genes supressores tumorais (APC - *adenomatous polyposis coli* e p53) e oncogenes (*k*-RAS) que são responsáveis por desempenhar funções na adesão célula-célula, regulação do ciclo celular e apoptose (Fearnhead, Britton et al. 2001, Rowley 2005).

Dois tipos de instabilidade genética têm sido identificados em CCR. Aquelas relacionadas à instabilidade de microssatélite (MIN) e as instabilidades cromossômicas (CIN). A MIN é resultado da inativação de genes somáticos que levam ao dano de reparo ao DNA. Já a CIN está associada à perda do alelo e a aneuploidia. Dentro dos casos esporádicos em CCR, aproximadamente 85% dos casos são do tipo CIN (Mouradov, Domingo et al. 2013). Nos tumores hereditários do tipo FAP a maioria dos casos também se devem a instabilidade cromossômica, como mencionado acima principalmente nos genes APC, TP-53 e K-RAS (Fearnhead, Britton et al. 2001, Rowley 2005). Por sua vez, a maioria dos casos de HNPCC apresentam instabilidades de microssatélite (Sancho, Batlle et al. 2004, Michor, Iwasa et al. 2005). A figura 2 mostra a transformação do epitélio normal até a formação do carcinoma associadas às instabilidades cromossômicas, resultante das mutações dos genes APC, K-ras e TP-53.

Figura 2- Histopatologia do desenvolvimento do câncer colorretal e principais mutações. As setas em vermelho indicam as principais mutações ao longo do desenvolvimento do tumor. O gene APC aparece no início do processo resultando na transformação maligna do tumor. O oncogene (K-RAS) e o gene supressor de tumor (TP-53) promovem alterações morfológicas.

Fonte: Adaptado de Fodde, Smits et al. 2001

A expectativa de vida dos pacientes portadores desse tipo de neoplasia é considerada boa, com uma sobrevida média global em cinco anos de 55% nos países desenvolvidos e 40% para países em desenvolvimento. Esses dados estão sendo atribuídos as mudanças nos fatores de riscos. A população tem melhorado o habito alimentar reduzindo ingestão de carne vermelha, carnes processadas (mortadela, presunto, salsichas, linguiças), bebidas alcoólicas e tabagismo. O aumento do consumo de alimentos ricos em fibras dietéticas, de origem vegetal (frutas e legumes) e cereal bem como a prática de atividade física tem levado a redução da gordura corporal e abdominal. Associado a esses fatores está ocorrendo um aumento do rastreamento da doença em adultos com mais de 50 anos (Mandelblatt, Andrews et al. 1996, AmericanCancerSociety's 2014). Contudo, apesar dos avanços cirúrgicos, farmacológicos e o tratamento cada vez mais precoce dos pacientes com CCR, o número de casos estimados da doença ainda é considerado alto (INCA 2014), o que torna o estudo desse tipo de câncer bastante relevante do ponto de vista terapêutico e científico.

A busca de moléculas que possam estar envolvidas com os mecanismos associados ao processo de invasão pode apoiar o entendimento da biologia dos CCR e principalmente possibilitar a identificação de possíveis alvos terapêuticos que permitam o controle da progressão tumoral com consequente ocorrência de

metástase. Sabe-se que nos CCR, mais de dois terços dos pacientes são submetidos à cirurgia de colectomia total ou parcial. Aproximadamente 30 a 50% dos pacientes em estadiamento II ou III, submetidos à cirurgia, apresentam recidiva local, metástase a distância ou lesões colorretais metacrônicas em 5 anos (Lin, Lin et al. 2015). A metástase no fígado representa a principal causa de morbidade e mortalidade relacionada ao CCR. Apenas 15 a 20% dos pacientes que apresentam metástase hepática podem fazer a cirurgia de ressecção (Lintoiu-Ursut, Tulin et al. 2015). Atualmente, o tratamento para o CCR tem sido feito por meio da combinação de quimioterapia adjuvante pós-operatória com 5-fluoracil (5-FU) (Lin, Lin et al. 2015). Assim a descoberta de moléculas relacionadas a progressão tumoral pode permitir seu uso como marcadores de prognóstico para identificar e seguir os pacientes portadores de CCR em estádios II ou III submetidos à cirurgia com maior risco de recidiva local ou à distância.

1.2- Migração, Invasão e Metástase em Câncer Colorectal

A metástase é responsável por mais de 90% de todas as mortes relacionadas ao câncer. É um processo de múltiplos passos que envolvem a migração, invasão e disseminação de células neoplásicas do tumor primário para órgãos distantes (Ganapathy, Moghe et al. 2015). Este processo é dependente da ativação de vias de sinalização que controlam a dinâmica do citoesqueleto, o volume de células-matriz, quimiotaxia, intravasamento (células tumorais entram na corrente sanguínea) e extravasamento (saída das células tumorais do sistema circulatório e fixação em um tecido específico). (Liao, Chen et al. 2009).

Nos últimos anos, vários estudos foram feitos para entender como uma célula maligna obtém o potencial de migrar, invadir e metastisar (Sy, Li et al. 2010). Sabe-se que a regulação da adesão celular, a dinâmica do citoesqueleto e a ativação de vias de sinalização de uma célula tumoral são bastante diferentes das células normais e que apenas uma pequena porção de células altamente especializadas são capazes de migrar e invadir (Entschladen, Drell et al. 2005).

A manutenção da homeostase do tecido epitelial é desempenhada pela adesão célula-célula. No tecido normal as células estão organizadas e ligadas por diferentes tipos de complexos celulares como: junções aderentes, desmossomas,

zônula oclusiva e junção comunicante, que possuem funções distintas. Além disso, o epitélio apresenta polarização basolateral-apical, que é decorrente da distribuição organizada de caderinas e algumas integrinas (Rodríguez-Rigueiro, Valladares-Ayerbes et al. 2011). A desorganização das proteínas responsáveis por esses mecanismos leva ao desenvolvimento da carcinogênese epitelial. Durante o desenvolvimento dos carcinomas, as células sofrem uma desorganização e desestabilização das junções aderentes e um dos principais efeitos é a redução da expressão de E-caderina (Gloushankova 2008). A diminuição da expressão dessa proteína pode ativar vias como a de EGFR-MEK/ERK e Wnt em vários tipos de tumores como, pulmão (Bae, Choi et al. 2013) e cólon induzindo processos tumorigênicos tais como proliferação e invasão (Fuchs, Ougolkov et al. 2005, Jeanes, Gottardi et al. 2008).

Assim, para que uma célula adquira um potencial tumorigênico é preciso que ocorra a transição epitélio-mesênquima (EMT), na qual uma pequena população celular adquire a capacidade de migrar e metastizar (Thiery 2002, Kalluri and Weinberg 2009, Huang, Xu et al. 2015). No primeiro momento as células tumorais perdem a polaridade e se desprendem da membrana basal, nesse processo as células começam a perder a expressão de alguns marcadores epiteliais e ganham a expressão de marcadores mesenquimais (figura 3). Estas alterações ocasionam a ocorrência de que várias alterações moleculares que dão à célula a capacidade de vencer a barreira da membrana basal e iniciar o processo de invasão (Kalluri and Weinberg 2009).

Figura 3- Imagem representativa da transição epitélio-mesênquima. Modificação do fenótipo epitelial para mesênquimal.

Fonte: Adaptado de KALLURI e WEINBERG (Kalluri and Weinberg 2009)

Assim para que a metástase ocorra é necessário que a célula entre (intravasão) e saia (extravasão) da circulação, sendo que o intravasamento é auxiliado pela transição epitélio-mesênquima (EMT) e o extravasamento pela transição mesênquima-epitélio (MET) (figura 4) (Liao, Chen et al. 2009).

Figura 4- Esquema da transição epitélio-mesênquima na progressão do câncer. A imagem representa a transição do epitélio normal para carcinoma invasivo perdendo a sua polaridade e promovendo o rompimento da membrana basal. O ganho da corrente sanguínea pela célula tumoral até o estabelecimento da metástase a distância com a reversão do fenotipo mesênquima-epitelial.

Fonte: Adaptado de Kalluri and Weinberg 2009

Dados recentes na literatura têm mostrado 20 a 40% da ocorrência dos casos de invasão linfática, linfonodos e metástase a distância em câncer colorretal têm vindo do processo de “*Budding*” que é o desprendimento de uma célula ou de um pequeno grupo de células tumorais da massa tumoral principal (De Smedt, Palmans et al. 2015). Contudo pouco se sabe qual o “padrão-ouro” que direciona os mecanismos que levam ao desprendimento de células tumorais do tumor primário e o aumento do potencial invasivo (De Smedt, Palmans et al. 2015).

A comunicação intercelular e entre as células e o meio externo é de fundamental importância para o controle da fisiologia celular. Essa comunicação permite a indução do crescimento, proliferação, apoptose e principalmente os processos de invasão e metástase. Esses mecanismos são guiados pela sinalização de moléculas sensoras que ativam vias de sinalização através de proteínas aceptoras, que transduzem o sinal até as proteínas efetoras (Liberali, Rämö et al. 2008).

Já é bem descrito que diversas vias de sinalização estão relacionadas com o processo tumorigênico, principalmente as que envolvem as proteínas quinases,

enzimas que atuam na modificação pós-traducional de proteínas, catalizando a transferência de um radical fosfato do nucleotídeo de adenosina trifosfato (ATP) para resíduos de serina/treonina ou tirosina.

Em câncer gástrico o fator de crescimento epidermal (EGF) está associado com a ativação das proteínas da família PKC (Yoshida, Kanaoka et al. 2005), já em tumores colorretais EGFR e proteína PKC estão relacionadas com a desorganização da adesão celular (Barbosa, Goto-Silva et al. 2003). Kang e colaboradores mostraram que PKC ativa a via de ERK/NFkB levando ao escape da apoptose e a invasão em tumores de cólon (Kang, 2009). Assim o estudo de moléculas que possam ser possíveis alvos terapêuticos bem como as vias que podem estar relacionadas com a ativação da progressão tumoral é extramamente promissor.

1.3- A Proteína Prion Celular (PrP^C) e suas inúmeras funções

A PrP^C é constituída por aproximadamente 250 aminoácidos com peso molecular aparente de 27 kDa; pode ser encontrada em formas mono- ou diglicosiladas e está presente na face externa da membrana plasmática através de uma âncora de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (HUNTER 1997). Sua estrutura secundária é rica em α -hélices (42%) e possui poucas estruturas de folha- β (3%) e é altamente conservada ao longo da evolução (Caughey, Race et al. 1989). Localiza-se preferencialmente em domínios de membranas ricos em colesterol denominados *lipid rafts* (Prusiner 1991, Linden, Martins et al. 2008).

PrP^C é altamente expressa em tecidos neurais e também em sistema linfóide, coração, rim, músculo, glândulas parótidas e adrenais, pulmão, útero, fígado, epitélio gastrointestinal, pâncreas e melanócitos (Manson, West et al. 1992, Horiuchi, Yamazaki et al. 1995, Fournier, Escaig-Haye et al. 1998, Linden, Martins et al. 2008).

O papel de PrP^C em doenças neurodegenerativas denominadas encefalopatias espongiformes transmissíveis (EET) têm sido largamente estudado (Mays, van der Merwe et al. 2015). Particular atenção têm sido dada a característica de “self-propagation” associada a forma infecciosa desta proteína denominada de príon. Recentemente, uma atividade “prion-like” tem sido atribuída

a outras moléculas e cujo papel pode estar associado tanto a processos fisiológicos quanto patológicos (Agosta, Weiler et al. 2015).

O papel fisiológico de PrP^C passou a ser melhor entendido alguns anos depois do estabelecimento do seu papel nas EET. Vários estudos demonstraram que PrP^C é capaz de se associar a diversos ligantes como, por exemplo, plasminogênio, N-CAM e receptor de laminina (LRP1) (Yehiely, Bamborough et al. 1997, Brown and Besinger 1998, Meggio, Negro et al. 2000, Ellis, Daniels et al. 2002, Santucci, Sytnyk et al. 2005). E que estes interagem em diferentes regiões da molécula conferindo-lhe funções específicas, demonstrando uma atividade pleiotrópica de PrP^C através da formação de complexos macromoleculares (Linden, Martins et al. 2008)(Figura 5).

Figura 5- - Representação esquemática da PrP^C. (SP) indica a região do peptídeo sinal na região N-terminal, (GPIp) indica o sítio de ligação da âncora de GPI na região C-terminal, (OR) região do octapeptídeo e (HC) representa o domínio hidrofóbico. As sequências H1, H2 e H3 representam regiões de α -hélice. Em destaque há os principais domínios de interação dos ligantes de PrP^C

Fonte: Adaptado de Linden, Martins et al. 2008.

Já foi descrito que PrP^C está associada a diversas funções fisiológicas como plasticidade neuronal (Manson, West et al. 1992, Collinge, Whittington et al. 1994, Colling, Khana et al. 1997), controle da atividade motora (Roesler, Walz et al. 1999), participação na regulação do ritmo circadiano (Tobler, Gaus et al. 1996),

modulação do sistema glutamatérgico (Coitinho, Dietrich et al. 2002) e a formação de memória (Coitinho, Freitas et al. 2006).

Nosso grupo mostrou que a interação específica da PrP^C com proteínas de matriz extracelular, laminina e vitronectina, está envolvida em vias de sinalização levando ao desenvolvimento e plasticidade neural (figura 6) (Graner, Mercadante et al. 2000, Graner, Mercadante et al. 2000, Hajj, Lopes et al. 2007). Por sua vez a interação com a co-chaperona STI1/HOP é capaz de promover proteção neuronal e plasticidade a partir da ligação com complexo PrP^C-STI1/HOP com o receptor alfa-7 de acetilcolina (Martins, Graner et al. 1997, Zanata, Lopes et al. 2002, Beraldo, Soares et al. 2013). Trabalhos envolvendo camundongos mutantes para PrP^C, mostraram que mutações em sítios específicos levam a desmielinização e perda axonal severa tanto na medula espinhal como na substância branca cerebelar, ataxia grave e apoptose no cerebelo (Shmerling, Hegyi et al. 1998, Radovanovic, Braun et al. 2005, Caetano, Beraldo et al. 2011).

Em associação estes resultados levaram-nos a propor que PrP^C seria responsável pela organização de plataformas lipídicas de sinalização, que dependendo de sua composição poderiam ser responsáveis por desencadear uma grande diversidade de funções biológicas (Linden, Martins et al. 2008).

Figura 6- Esquema representativo de PrP^C atuando como plataforma de sinalização. PrP^C por ser uma proteína de membrana pode ligar com diversas proteínas, algumas delas representadas aqui, levando a modulação de diversas vias de sinalização. **Fonte:** Adaptado de Resenberger, Harmeier et al. 2011

Nos últimos anos PrP^C tem sido descrito como um importante alvo na biologia dos tumores (Eustace and Jay 2004, Erlich, Kahn et al. 2007, McEwan, Windsor et al. 2009, Hajj 2013). Sua importância foi vista na metástase de câncer de cólon, redox-regulação no câncer de próstata, invasão e metástase em tumores gástricos (Eustace and Jay 2004, Murray, Telfer et al. 2006, Erlich, Kahn et al. 2007, Meslin, Hamaï et al. 2007, Kubota, Yamamoto et al. 2010, Wang, Chao et al. 2010, Cheng, Tao et al. 2014). Já foi mostrado que a modulação de PrP^C em CCR está correlacionada com a captação de glicose e regulação da taxa glicolítica, por meio da modulação dos níveis de GLUT1 (Li, Sun et al. 2011), resultando na inibição do CCR tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Além disso, PrP^C também foi apontado como modulador de proliferação e apoptose (Chieng and Say 2015). Experimentos realizados com células CCR humanas (HTC116), xenoenxertadas em camundongos, mostraram que os anticorpos anti-PrP^C em combinação com o tratamento de quimioterapia levou uma redução significativa

do volume do tumor quando comparado com o tratamento de quimioterapia isolado (McEwan, Windsor et al. 2009).

Além disso, várias evidências apontaram para PrP^C como um potencial modulador da progressão tumoral e um fator de prognóstico negativo em diversos tipos de câncer como: glioblastoma, câncer gástrico e cólon (Pan Y, Zhao L et al., Lopes, Santos et al. 2014, Zhou, Shang et al. 2014, Chieng and Say 2015). A literatura tem mostrado que complexos proteicos organizados por PrP^C podem promover processos fisiológicos, bem como podem estar relacionados com a biologia dos tumores. A interação entre CD44 e PrP^C, por exemplo, promove efeitos sobre a migração celular, invasão e proliferação (Cheng, Tao et al. 2014). Portanto, PrP^C tem apontado como um alvo terapêutico promissor em diversos tumores.

1.4- Stress Inducible Protein 1 (STI1) ou HSP70-HSP90 Organizing Protein (HOP) e seu papel como ligante de PrP^C

A *Stress Inducible Protein1* (STI1) é uma co-chaperonina que foi primeiramente descrita em leveduras, formando complexos macromoleculares com as chaperonas HSP70 (*Heat Shock Proteins-70*) e HSP90 (*Heat Shock Proteins-90*), modulando a atividade destas proteínas (Blatch, Lassar et al. 1997, Lassar, Blatch et al. 1997, Song and Masison 2005). Em mamíferos, o ortólogo de STI1 é denominado HOP (*HSP70/HSP90 Organizing Protein*), e possui 2079 pares de bases que codificam uma sequência de 573 aminoácidos e peso molecular aparente de 66kDa (Scheufler, Brinker et al. 2000). Nosso grupo identificou e caracterizou a ligação desta co-chaperonina com PrP^C (Zanata, Lopes et al. 2002).

HOP está localizada predominantemente no citoplasma, contudo sua presença no núcleo já foi descrita (Lassar, Blatch et al. 1997, Longshaw, Dirr et al. 2000). Além disso, HOP pode ser encontrada no espaço extracelular tanto na forma solúvel quanto associada a vesículas (exossomos) (Hajj, Arantes et al. 2013).

Nosso grupo mostrou que a interação entre HOP e PrP^C está relacionada a importantes efeitos biológicos como a ativação de sinais de neuroproteção dependentes de PKA em neurônios hipocampusais (Chiarini, Freitas et al. 2002), indução do crescimento neurítico por meio da ativação da via de Erk1/2 (Lopes,

Hajj et al. 2005). Foi demonstrado ainda que a interação PrP^C-HOP é importante na biologia de células-tronco precursoras neurais, modulando sua auto-renovação e proliferação (Santos, Silva et al. 2011). Interessantemente, foi demonstrado que HOP também pode apresentar atividade biológica independente de PrP^C como, por exemplo, na modulação da proliferação celular em células da retina e em cultura primária de astrócitos (Arruda-Carvalho, Njaine et al. 2007, Arantes, Nomizo et al. 2009).

Apesar de HOP ser uma co-chaperona, dados recentes mostraram que ela pode desempenhar papel na sinalização celular, promovendo a proliferação tumoral, invasão e/ou metástase (Walsh, Larkin et al. 2011, Tsai, Tsai et al. 2012). Além disso, o aumento da expressão de HOP em CCR foi associado com uma menor sobrevida dos pacientes (Kubota, Yamamoto et al. 2010, Ruckova, Muller et al. 2012), altos níveis de HOP também foram observados em outros tumores como pâncreas, ovário e carcinoma hepatocelular (Walsh, O'Donovan et al. 2009, Wang, Chao et al. 2010, Walsh, Larkin et al. 2011, Wang, Ye et al. 2011).

1.5- Interação PrP^C e HOP e o seu papel nos processos tumorais

Trabalhos relacionados à importância da interação de PrP^C com seus ligantes, em especial HOP, na biologia de células tumorais estão trazendo um novo enfoque para o estudo dessa proteína. Nosso grupo demonstrou que a interação PrP^C com a forma secretada de HOP, que atua de forma autócrina, induz as vias de ERK1/2 e PI3K promovendo um aumento na proliferação celular de linhagens derivadas de glioblastoma humano (Erlich, Kahn et al. 2007). Foi observado também que pacientes exibindo altos níveis tanto de PrP^C como de HOP apresentaram pior sobrevida global do que aqueles com concentrações aumentadas de apenas uma das proteínas ou daqueles que não expressavam ambas as proteínas. O bloqueio da ligação de PrP^C- HOP pelo uso de um peptídeo (HOP₂₃₀₋₂₄₅) que mimetiza o sítio de HOP responsável pela ligação a PrP^C, promoveu a diminuição da proliferação de glioblastomas *in vitro* e *in vivo* com consequente aumento na sobrevida de animais portadores destes tumores. Estes dados sugeriram que a interação PrP^C- HOP poderia ser um importante alvo terapêutico (Lopes, Santos et al. 2014). Além disso, esse peptídeo pode ser uma ferramenta anti-proliferativa para o tratamento de tumores (figura 7).

Figura 7- Esquema ilustrativo da competição da proteína HOP e do peptídeo pelo sítio de interação com PrP^C. A interação entre a proteína HOP e PrP^C induz a proliferação em linhagens de glioblastoma e o peptídeo HOP₍₂₃₀₋₂₄₅₎ bloqueia o efeito.

Fonte: Adaptado de Lopes, 2015

1.6- Importância da secreção de vesículas extracelulares no controle da progressão tumoral

Nosso grupo mostrou recentemente que HOP é secretado das células em vesículas extracelulares do tipo exossomos e que HOP presente na face externa destes exossomos interage com PrP^C na superfície celular modulando sinalização celular específica (Hajj, Arantes et al. 2013).

Vários estudos têm abordado a importância de proteínas secretadas por células tumorais, uma vez que estas podem ser boas candidatas a marcadores tumorais (Mathivanan, Lim et al. 2010). Aproximadamente 10% do genoma humano é responsável por transcrever mRNAs que são traduzidos em proteínas secretadas, apresentando funções relevantes tanto em processos fisiológicos

Figura 9- Via de secreção não convencional de proteínas. Desenho esquemático da via de secreção não convencional, as proteínas são secretadas por um complexo mecanismo de vesículas e são reguladas por uma série de proteínas da família Rab. As principais formas de secreção são microvesículas e exossomos.

Fonte: Adaptado de Alenquer and Amorim 2015

Entre os mecanismos de secreção não clássicos descritos podemos destacar microvesículas geradas por “*shedding*” da membrana plasmática ou liberação de vesículas extracelulares, em particular os exossomos, produzidos nos corpos multivesiculares (Nickel and Rabouille 2009).

As vesículas extracelulares podem ser divididas em três classes principais, dependendo do seu tamanho, exossomos (20 - 100 nm), microvesículas (100 - 1000 nm), e os corpos apoptóticos (1 - 5 μ m) (Yu, Cao et al. 2015). Os exossomos são estruturas de tamanho entre 50-100nm, secretados por diferentes tipos celulares e revestidos por bicamada lipídica de composição similar a membrana plasmática da célula a partir da qual foram liberados (figura 10). Os

exossomos expressam algumas proteínas envolvidas em endocitose (Flotillin-1 - Otto, G. JCS, 2011), *sorting* endossomal-lisossomal (Alix e Tsg101, e uma série de proteínas de superfície, incluindo integrinas, tetraspaninas e antígenos MHC classe I e II (Chahar, Bao et al. 2015). Além disso, os exossomos contêm proteínas de citoesqueleto, receptor de transferrina, clatrina e proteínas ancoradas a GPI (Glicosilfosfatidilinositol) como acetilcolinesterase (Smalheiser 2007). Exossomos contêm ainda algumas proteínas como Hsp70, Hsp90 e anexinas, conhecidas por terem papel importante em vias de sinalização, e devido a ausência de peptídeo sinal não são secretadas pela via clássica (ER-Golgi).

Vários miRNAs, mRNAs e non-coding RNAs também são encontrados nos exossomos e estes desempenham um papel crítico na regulação da sinalização célula-célula promovida por estas vesículas (Tominaga, Yoshioka et al. 2015, Mannavola, Tucci et al. 2016). O conteúdo lipídico ou a proporção de cada tipo de lipídeo nestas vesículas também pode diferir daquele encontrado normalmente na membrana plasmática (Penfornis, Vallabhaneni et al. 2016).

A figura 10 apresenta algumas das proteínas já descritas por sua secreção em exossomos. Além disso, um banco de dados denominado Exocarta é dedicado a listar todos os componentes proteicos, lipídicos e de ácidos nucleicos presentes nos exossomos tanto de células normais como tumorais (Keerthikumar, Chisanga et al. 2015).

Figura 10- Estrutura e composição dos exossomos. Esquema representativo das principais moléculas que compõe a estrutura dos exossomos.

Fonte: Adaptado de Chahar, Bao et al. 2015

Exossomos exibem papéis importantes na comunicação intercelular e essa comunicação pode, por exemplo, mediar a ativação da resposta imune. Assim, no câncer, células tumorais podem secretar exossomos que induzem apoptose de células T citotóxicas ativadas, perturbam a diferenciação de monócitos e induzem proliferação de células mielóides supressoras e células T regulatórias. Além disso, os exossomos secretados pelos tumores possuem moléculas envolvidas na promoção da angiogênese (Ribeiro, Zhu et al. 2013), no remodelamento da matriz extracelular e na ativação de vias de sinalização, transferência de receptores/fatores de crescimento. Um ambiente pró-inflamatório, por exemplo, pode ser gerado por meio da secreção de citocinas produzidas por macrófagos estimulados pela presença de fibronectina em exossomos (Taylor, Atay et al. 2010). Como resultado, os exossomos podem representar um mediador central do microambiente tumoral (Mannavola, Tucci et al. 2016).

Em colaboração com o grupo do Dr. David Lyden da Cornell University mostramos que exossomos derivados de melanomas podem modular o microambiente tumoral. Além disso, esses exossomos podem recrutar e reprogramar precursores celulares da medula óssea para o sítio metastático. Assim organizando um ambiente pro-inflamatório com formação de novos vasos conhecido como nicho pré-metastático, que guarda todas as características que

permitem não somente uma melhor recepção às células tumorais metastáticas, mas também a criação de uma condição ideal para o desenvolvimento da metástase (Peinado, Alečković et al. 2012).

Mathivanan e colaboradores observaram a presença de várias proteínas associadas com exossomos de células tumorais de cólon. O estudo proteômico permitiu identificá-las e verificar que suas funções facilitavam o desenvolvimento do tumor, desde a angiogênese, preparação do microambiente tumoral até a formação de metástases (Mathivanan, Lim et al. 2010). Dentre as proteínas identificadas estão TSG101, um marcador exosomal, proteínas vacuolares (VPS25 e VPS28), proteínas de choque térmico, proteínas de corpos multivesiculares, proteínas da família Rabs, entre outras. Esse trabalho mostrou que estes exossomos continham ainda CD9 e CD82, que são mediadores na inibição de metástase, mas que por outro lado observava-se um alto conteúdo de CD151, proteína que oferece suporte para a progressão do tumoral, pois desencadeia a ativação de metaloproteínas da matriz extracelular (Mathivanan, Lim et al. 2010).

Por outro lado, além dos exossomos, sabe-se que fatores solúveis secretados pelas células tumorais também podem facilitar a progressão tumoral. Dentro deste contexto, os estudos dos secretomas em CCR ainda são bastante limitados, sabe-se hoje, por exemplo, que a CRMP-2, uma proteína mediadora da resposta a colapsina tipo 2, envolvida na progressão do câncer de mama (Shimada, Ishikawa et al. 2014) é um importante marcador sérico de CC (WU, Chen et al. 2008).

1.7 O papel do complexo PrP^C-HOP no CCR

Dados consistentes desenvolvidos pelo nosso grupo ao longo dos últimos anos mostram a importância do complexo PrP^C-HOP em vários mecanismos de sinalização e seu papel na homeostase celular (Linden, Martins et al. 2008). Recentemente, mostramos que HOP é secretada em exossomos (Hajj, Arantes et al. 2013), que o complexo PrP^C-HOP está relacionado a proliferação de glioblastomas (Lopes, Santos et al. 2014) e também associado a uma menor sobrevida dos pacientes portadores destes tumores.

Vários trabalhos publicados na literatura apontam para o envolvimento tanto PrP^C quanto HOP em CCR. Alguns estudos verificaram um aumento na expressão de PrP^C ou de HOP em carcinomas de cólon (CC) (McEwan, Windsor et al. 2009, Kubota, Yamamoto et al. 2010). Foi demonstrado que anticorpos contra PrP^C são capazes de retardar o processo de proliferação celular e de induzir a apoptose em linhagens humanas de cólon (McEwan, Windsor et al. 2009). HOP foi ainda detectada no sangue de pacientes portadores de tumores de ovário, sugerindo que esta proteína pode ser considerada um importante biomarcador desse tipo de tumor (Wang, Chao et al. 2010).

Entretanto nenhum estudo abordou o papel do complexo PrP^C-HOP na progressão destes tumores. Resultados preliminares do nosso grupo mostram que linhagens de câncer de cólon apresentaram resposta proliferativa frente ao tratamento com HOP recombinante. Além disso, o uso de anticorpos contra PrP^C ou HOP e peptídeos HOP₍₂₃₀₋₂₄₅₎ ou PrP^C₍₁₁₃₋₁₃₂₎, que mimetizam o sítio de ligação entre estas moléculas, são capazes de inibir a proliferação celular, indicando que PrP^C medeia o sinal proliferativo proveniente de HOP (Costa-Silva 2011).

A caracterização do mecanismo pelo qual o complexo PrP^C-HOP pode atuar na progressão do CCR bem como a possibilidade de modula-lo mostra-se de grande interesse na caracterização destas moléculas como alvos terapêuticos, bem como seu uso como marcadores de prognóstico de recidiva local ou à distância.

2 Objetivo geral

O presente estudo objetivou entender a participação do complexo PrP^C-HOP e das vesículas extracelulares no padrão de agressividade de tumores colorretais.

2.1 Objetivos específicos

1- Avaliar in vitro a influência do complexo PrP^C-HOP nos processos de migração e invasão de linhagens celulares de adenocarcinoma colorretais;

2- Verificar se a via de sinalização ERK1/2 está correlacionada com o processo de invasão induzido por HOP mediado por PrP^C;

3- Analisar a expressão das proteínas PrP^C e HOP em amostras de pacientes portadores de câncer colorretal e sua possível relevância com dados clínicos;

4- Entender o papel das vesículas extracelulares tumorais em processos biológicos como proliferação e migração.

3 Materiais e Métodos

3.1 Linhagens celulares e condições de cultura

As linhagens de adenocarcinoma colorretal, WiDr e HCT8, foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC®, Manassas, VA, USA). Elas foram mantidas rotineiramente em meio Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Carlsbad, CA, USA) e RPMI medium (Gibco, Carlsbad, CA, USA), respectivamente. Cada meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco, Carlsbad, CA, USA) e 40µg/ml de gamicina (Hipolabor Farmacêutica, Belo Horizonte, MG, Brazil). As células foram cultivadas a 37°C e atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂.

3.2 Ensaio de imunodeteção

As células tumorais foram lisadas com tampão de lise celular (Tris 50mM, EDTA 1mM, 0,2% de deoxicolato de sódio, 0,5% de Triton X-100) suplementado com cocktail de inibidores de proteases (Roche, Indianapolis, IN). As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% contendo dodecil sulfato de sódio SDS (SDS-PAGE) e transferida e imobilizadas em membrana de nitrocelulose (0,45µm; GE Healthcare, Freiburg im Breisgau, Germany). As membranas foram bloqueadas (5% de leite molido em TBS-T, 1 hora, temperatura ambiente) e posteriormente incubadas com os anticorpos primários anti-PrP^C (1:500, clone 3F4, Covance, Princeton, NJ, EUA); anti-HOP (0.5 ng/µL, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA), anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (1:1000, Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA) e anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) (1:1000, Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA), a 4°C, overnight. Logo após as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários apropriados, conjugados com peroxidases (1:3000, 1 hora, temperatura ambiente Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). A membrana foi revelada com ECL Western Blot analysis system (Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). A tubulina (1:10000, cloneB-5-1-2, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi usada como controle. A quantificação foi feita através do software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA).

3.3 Citometria de Fluxo

As culturas de células foram soltas com tripsina 1X (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), lavadas duas vezes com PBS (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). As células foram mantidas em 10% SFB por 1 hora a 37°C em 5% CO₂, para recuperação membranar. Em seguida as células foram lavadas duas vezes com PBS (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), bloqueadas com 5% de albumina de soro bovino (BSA, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em PBS (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), durante 1 hora à 4°C. Logo em seguida foram incubadas com o anticorpo primário anti-PrP^C (1: 100, clone 3F4, Covance, Princeton, NJ, EUA) por 40min a 4°C, seguido do anticorpo secundário anti-mouse IgG (H+L) conjugado com Alexa-488 ou anticorpo Alexa-405 (1:200; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) por 40 min a 4°C. Como controle foi usado as células marcadas apenas com os anticorpos secundários. As análise de FACS foram feitas com o FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

3.4 Análise da migração e invasão *in vitro*

A migração e a invasão celular foram investigadas através de ensaios com câmara de Boyden (cat.#3422, Corning Costar, Tewksbury, MA, USA). 5 x 10⁴ células foram plaqueadas na parte superior da câmara de Boyden. Para o ensaio de migração a membrana não foi revestida já para o ensaio de invasão a membrana de polycarbonato foi revestida com matrigel® (matrigel®: 200 µg/ml, BD Matrigel Matrix High Concentration, BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Para os diferentes ensaios abordados no nosso estudo temos:

- Foi adicionado na parte inferior da câmara de Boyden como quimioatrativo, HOP recombinante (0,5; 2; 5 e 10 µM – purificada utilizando protocolo padronizado em nosso laboratório) (REF 19, 39, 44); HOP_{Δ230-245} mutante (5 µM- mutante com sítio de deleção de aminoácidos que interage com a proteína PrP^C 230-245) ou SFB (10%, Gibco, Carlsbad, CA, USA).
- Em alguns ensaios de migração e invasão, as células foram pré-tratadas durante 2 horas com o peptídeo HOP₂₃₀₋₂₄₅ (5 µM, ELGNDAYKKKDFDTAL,

GenScript, Piscataway, NJ, USA); peptídeo HOP₆₁₋₇₆(5μM, GCKTVDLKPDWGKGYS, GenScript, Piscataway, NJ, USA); anticorpo anti-PrPC (13 ng/ml) (Zanata, Lopes et al. 2002); como controle IgG não-imune (13 ng/ml) (Zanata, Lopes et al. 2002); inibidor de MAPK (ERK1/2) (U0126, 10μM, Calbiochem, San Diego, CA, USA) ou DMSO (0.1%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

- Outros ensaios foram usados como quimioatrativo meio condicionado (protocolo descrito no item 3.5) provenientes das linhagens WiDr, HCT8 e as linhagens moduladas WiDr (pEGFP; pEGFP-VPS4c1 e VPS4-EQ228-GFP).
- Também foram usados como quimioatrativo as frações de 2 horas e o sobrenadante proveniente da ultracentrifugação (protocolo descrito no item 3.5) do meio condicionado das linhagens WiDr e HCT8.

Após incubação, durante 24 horas, as células que migraram ou invadiram (que estavam na superfície inferior da câmara de Boyden) foram fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:500, BioChemica, Billingham, Stockton-on-Tees, UK). As células na parte superior da câmara de Boyden foram removidas mecanicamente com cotonetes. As imagens das células que migraram ou invadiram foram capturadas com a objetiva de 20X (Nikon TE2000-U fluorescence microscope, Tokyo, Japan) e analisadas com ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

3.5 Obtenção e fracionamento do meio condicionado

As linhagens (WiDr, HCT8 e WiDr modulada) foram plaqueadas em pelo menos duas garrafas de 25 ml. Após atingirem 70% de confluência em meio DMEM ou RPMI com 10% de SFB, foram lavadas três vezes com PBS e carenciadas por 48 horas em seus respectivos meios descritos no item 3.1. O meio condicionado de cada linhagem celular foi coletado, pré- centrifugado por centrifugação (300 X g durante 10 min, 2000 X g por 10min e 10000 X g durante 30min), para eliminar possíveis “debris”.

O fracionamento do meio condicionado foi feito por ultracentrifugação. Foram realizadas ultracentrifugações sequenciadas. Para a obtenção das frações

de 2 e 16 horas foram feitas duas ultracentrifugações. A primeira a 100.000 X g, por 2 horas a 4°C, para isolar a fração referente aos exossomos, seguida de 2 horas de lavagem do pellet com PBS. A obtenção da fração de 16 horas, referente a fração de microvesículas, foi adquirida do sobrenadante remanescente da fração de 2 horas, esse sobrenadante foi ultracentrifugado, 100.000 X g, overnight a 4°C e o pellet lavado overnight com PBS. Após os procedimentos de ultracentrifugação os pellets foram ressuspensos em volumes de 50 a 200µl a depender do experimento. O sobrenadante final após ultracentrifugação de 16 horas foi concentrado 100X no concentrador Amicon ((Millipore, Tullagreen, Carrigtwohill, County Cork, Ireland)) e analisado em experimentos. Todos os experimentos foram feitos com o rotor SW40Ti (Beckman-Coulter).

3.6 Análise do número de vesículas e mensuração.

Após a obtenção das vesículas por ultracentrifugação, descrita no item 3.3, foi feita a análise do número e do tamanho de vesículas presentes nos pellets, utilizando o aparelho NanoSight LM10 (NanoSight Ltd., Amesbury, Reino Unido). O sistema utiliza um feixe de laser fino que é introduzido na amostra (vesículas em suspensão diluída em PBS 1X estéril) através de um prisma de vidro (Fig. 11).

Figura 11- Figura esquemática do princípio de funcionamento do NanoSight (R.A. Dragovic *et al*/ Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 7 (2011) 780–788).

O feixe refrata a um ângulo menor à medida que entra na amostra, o que resulta em um feixe fino de laser que acende as partículas presentes na amostra.

Partículas que se encontram dentro do feixe são visualizadas utilizando um microscópio óptico convencional, equipado com uma câmara de vídeo, normalmente alinhado com o eixo do feixe, que recolhe a luz dispersa de todas as partículas do campo de visão. A câmara da amostra é de 500 μm de profundidade, mas a profundidade do feixe é de cerca de 20 μm , no ponto de análise, a condizer com a profundidade do foco do sistema óptico de imagem. Um vídeo de 60 segundos de duração é obtido, com uma taxa de 30 *frame* por segundo, e o movimento de partículas é analisada por NTA software (NanoSight Ltd.). O software é otimizado para o NTA primeiro identificar e acompanhar cada partícula em uma base *frame a frame*, e seu movimento browniano é monitorado e medido *frame a frame*. A velocidade do movimento de partículas é utilizada para calcular o tamanho da mesma, aplicando a equação bidimensional de *Stokes Einstein*:

$$\langle x,y \rangle^2 = \frac{K_B T_{ts}}{3\pi\eta d_h}$$

Onde $\langle x,y \rangle^2$ é o deslocamento quadrático médio, K_B é a constante de Boltzmann's, T é a temperatura para o solvente em kelvin, t_s é o tempo de amostragem, η viscosidade e d_h é o diâmetro hidrodinâmico. O software gera um relatório com o número de vesículas $n \times 10^7$, e esse valor é relativizado por 1×10^6 células.

3.7 RNA de Interferência

A infecção foi realizada usando o sistema lentiviral shRNA SmartChoice system (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). 1×10^4 células foram plaqueadas numa placa de 96 poços em meio completo e infectadas com as sequências (shRNA-PrP^C) sh07-011101-01, sh07-011101-02, sh07-011101-03 e com a sequência non-target s0700500001 (shRNA NT), ambos com o MOI de 20. Após 72 horas de infecção, as células foram selecionadas com puromicina (1 $\mu\text{g/ml}$, Gibco, Grand Island, NY, USA) por sete dias.

3.8 Imunoflorescência

As linhagens WiDr shRNA-PrP^C-3 e WiDr shRNA-NT (2×10^4 células) foram plaqueadas em lamínulas e fixadas com paraformaldeído 4%, durante 20 minutos a temperatura ambiente e lavadas com PBS (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), por 1 hora a temperatura ambiente. Logo depois as células foram incubadas com o anticorpo primário anti-PrP^C (1:100, clone 3F4, Covance, Princeton, NJ, EUA), seguido do anticorpo secundário anti-mouse IgG (H+L) conjugated to Alexa-488 (1:200; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) e 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI - BioChemica, Billingham, Stockton-on-Tees, UK) por 1 hora, a temperatura ambiente. As lamínulas foram montadas usando o reagente Fluor-Save reagent (Calbiochem, San Diego, CA, USA) e todas as imagens de fluorescência foram adquiridas no microscópio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Cambridge, Cambridgeshire, UK).

3.9 Elisa

As linhagens HCT8 e WiDr foram carenciadas por 48 horas (confluência de 70%). O meio condicionado obtido conforme descrito no item 3.5, de cada linhagem celular foi coletado, pré-centrifugado por centrifugação (300 X g durante 10 min, 2000 X g por 10min e 10000 X g durante 30min). Logo após o meio condicionado foi concentrado 100X através do concentrador da Amicon (Millipore, Tullagreen, Carrigtwohill, County Cork, Ireland). O meio condicionado foi imobilizado por 12 horas a 4°C em placas de 96 poços contendo poliestireno, para maior grau de ligação, placa de ELISA (cat.# 3590, Corning Costar, Tewksbury, MA, USA), bloqueadas com 5% molico em PBS (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), e incubadas com o anticorpo primário anti-HOP (1:300, 0.5 ng/μL, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA), seguido pelo anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anti-rabbit, 1:2000, Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). As reações foram reveladas com 0,4 M de NA₂HPO₄, 0,4M ácido cítrico, 0,045% de peróxido de hidrogênio e 1mg/ml de orto fenil diamina pH 5,3. A reação enzimática foi parada com adição de 50 μl de ácido sulfúrico 4M. A absorbância (490 nm) foi medida através do leitor de microplacas

Bio-Rad. A concentração de HOP secretada foi determinada utilizando a curva padrão de HOP recombinante (intervalo de 23,4 a 1500 pM).

3.10 Imunohistoquímica de Microarranjo de Tecido e Corte de Tumor

As amostras de tecidos com CCR foram obtidas do banco de Tumores do Hospital AC Camargo. Foram selecionadas áreas representativas de tumores para a montagem de micro arranjos de tecidos (TMAs), compreendendo um cilindro de 1 mm de diâmetro de cada amostra de tecido. Cortes seriados destes TMAs foram corados com hematoxilina e eosina. Para marcações os TMAs e dos cortes de tumores foram secos por 30 min a 37°C, desparafinizados em estufas a 60°C, *overnight*. Logo após foram colocados em xilol a 56°C por 30 min, para remoção dos resíduos de parafina. Em seguida foram reidratados em soluções de etanol 100%, 95%, 80% e 70% todos por 3min. Logo em seguida foi feita a recuperação antigênica, em tampão citrato 10mM, pH 6 por 4 min na panela de pressão. Deixar as lâminas esfriando dentro da solução de recuperação antigênica a temperatura ambiente. Em seguida os TMAs e as amostras dos cortes inteiros foram lavados duas vezes com tris-HCL 0,1M, pH 7.6 por 5min. Foi feito o bloqueio com peroxidase endógena com H₂O₂ por 20min. Permeabilizamos com tris (0,1M) e 0,1% triton por 15min. Em seguida foi feito o bloqueio das lâminas com a solução de bloqueio Block Protein serum-free (Dako, Carpinteria, CA, USA), por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários anti-HOP (1:75, Stressgen Assay Designs, Plymouth Meeting, PA, USA) e anti-PrP^C (1:50, Prionics, Zurique, Suíça), diluídas na solução Antibody Diluent ((Dako, Carpinteria, CA, USA), *overnight*. No dia seguinte foram feitas mais duas lavagens seriadas com a solução de lavagem Wash Buffer 20X (Dako, Carpinteria, CA, USA), cada uma por 5min. Os TMAs e os cortes foram incubados com *Advance HRP Link* por 30min. Incubamos com *Advance HRP Enzyme* por 30min. A marcação foi revelada com DAB (líquido, Dako) até o aparecimento do precipitado. A reação foi parada com tris-HCL pH 6 e contracorada com hematoxilina de Harris por 10min. Em seguida foram lavadas em água corrente e montadas. O critério de avaliação para análise do padrão de expressão dessas proteínas foi a intensidade de marcação. Tanto para HOP quanto para PrP^C a intensidade de marcação foi classificada como fraca (1),

moderado (2) e forte (3). A intensidade de marcação para cada proteína foi correlacionada com os dados clínicos dos pacientes (sobrevida, metástase, linfonodo acometido e estadiamento clínico). Os dados clínicos foram fornecidos pelos patologistas do Hospital A C Camargo. Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism Software (La Jolla, CA, USA). As análises estatísticas foram feitas pelo método Kaplan-Meier para sobrevivência e a análise de diferença entre as curvas de sobrevivência foi o log-rank com intervalo de confiança de 95%. Os outros dados foram analisados como descrito no item 3.15.

3.11 Transfecção Celular

Para a transfecção dos diferentes vetores da via de secreção descritos abaixo, células da linhagem WiDr foram incubadas com 6µl de lipofectamina (invitrogen) e DNA diluídos em 250µl de meio Optimen (Gibco). As células foram incubadas por 6 horas e o meio de transfecção foi substituído por DMEM enriquecido com 10% de Soro Fetal Bovino. Essas células foram mantidas por 48 horas nesse meio e logo após iniciou-se o processo de seleção, utilizando o antibiótico neomicina (G418) 1mg/ml durante 14 dias. O meio foi trocado a cada dois dias.

Vetores eucarióticos que foram utilizados nesse trabalho:

- GFP-Vps4: cDNA do gene Vps4 clonado em vetor de superexpressão pEGFP (Chen et al. 2009).
- GFP-E228Q-Vps4: mutante dominante negativo de Vps4 que bloqueia a hidrólise de ATP (Chen et al. 2009).
- pEGFP: vetor vazio controle, com GFP (Chen et al. 2009).

3.12 Microscopia eletrônica

A linhagem WiDr VPS4-DN foi plaqueada (10^6 células) em meio DEMEM, com SFB 10%. As células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1.500g por 3min. Logo após o pellet foi lavado com 1ml de PBS 1X e re-centrifugação por 1 hora, o pellet final foi fixado por 2 horas com glutaraldeído 2% em tampão cacodilato de sódio, seguido de tetróxido de ósmio 2% em sacarose 10,56% por mais 2 horas, e

incubação overnight com uranil acetato 0,5% em sacarose 10,56%. As amostras foram então desidratadas por 10 minutos em etanol 70% (2X), etanol 95% (2X), etanol 100% (4X) e óxido de propileno (2X). Em seguida as amostras foram rodadas por 4 horas em solução 1:1 de óxido de propileno e resina Spurr (EMS, Halfield, PA, EUA), e então incluídas em blocos de resina pura polimerizados com incubação a 72°C por 48 horas. Cortes ultra-finos de 65-75 nm feitos em ultramicrotomo com lâmina de diamante foram depositados em grades de cobre 200-mesh (EMS, Halfield, PA, EUA), contrastados com uranil acetato 0,5% por 5 minutos e chumbo por 4 minutos, e observados ao microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM -1010) operado a 80kV.

3.13 Curva de crescimento celular

2×10^4 células de cada linhagens WiDr, WiDr modulada (GFP-Vps4, GFP-E228Q-Vps4, pEGFP) foram plaqueadas em placas de seis *wells* em meio de DMEM com 10% SFB. A cada dois dias as células de um dos *wells* foram tripsinizadas, lavadas com PBS 1X e logo em seguida foi feito a contagem do número de células utilizando a câmara de Neubauer.

3.14 Marcação de proteínas em gel de prata

Os extratos foram preparados conforme descrito no item e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida conforme descrito no item 3.2. A marcação para o gel de prata foi realizada segundo protocolo descrito no kit *PageSilver™ Silver Staining Kit* (Fermentas).

3.15 Análise estatística

Todos os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas usando o teste de variância One-Way (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey, para comparações múltiplas ou para comparações individuais entre dois grupos foi realizado o teste t

Student. Todos os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism Software (La Jolla, CA, USA) e mostra a média $\pm$ SD. $P < 0.05$ e foi considerado estatisticamente significativo.

4- Resultados

4.1- Modelos celulares de tumores colorretais

4.1.1 Avaliação da expressão de PrP^C e HOP em linhagens celulares de tumores colorretais humanos

O modelo celular escolhido para este estudo foram as linhagens WiDr e HCT8. Inicialmente avaliamos a expressão celular das proteínas PrP^C e HOP e como pode ser visto nas figuras 12 e 13 respectivamente ambas as linhagens expressam estas proteínas. Entretanto a linhagem WiDr expressa quantidades superiores tanto de PrP^C quando de HOP quando comparada a HCT8.

Figura 12- Análise da expressão de PrP^C nas linhagem tumorais de cólon WiDr e HCT8. A) Western Blot representativo da expressão total de PrP^C (25-37 kDa) nas linhagens celulares WiDr e HCT8. A proteína tubulina foi utilizada na reação como controle de carregamento das amostras. O gráfico representa a análise densitométrica das bandas obtidas, sendo apresentado os níveis de PrP^C encontrados na linhagem celulares WiDr em relação aos níveis de PrP^C expressos pela linhagem HCT8. Os dados representam a média de pelo menos três experimentos independentes $\pm$ erro padrão. Foi realizado o teste estatístico t Student, $*p < 0,05$. (C e D) Expressão PrP^C avaliada por citometria de fluxo nas células WiDr e HCT8. A área branca do histograma representa células marcadas com anti-PrP^C e a área cinza representa células incubadas somente com o anticorpo secundário.

Figura 13- Análise da expressão de HOP em linhagens celulares de CCR. (A) Western blot para a análise da expressão de HOP para as linhagens celulares de CCR. A expressão da proteína tubulina foi usada na reação para controle de carregamento das amostras. (B) O gráfico apresenta a análise densitométrica das bandas obtidas, sendo apresentado os níveis de HOP encontrados na linhagem celular WiDr em relação aos níveis de HOP expressos pela linhagem celular HCT8. Os valores representam a média de quatro experimentos independentes $\pm$ erro padrão. Foi realizado o teste estatístico t Student, $*p < 0,05$.

4.1.2 Atividade de migração invasão das células WiDr e HCT8 mediada por SFB e HOP recombinante

Inicialmente, avaliamos o potencial migratório (Fig. 14A) e invasivo (Fig. 14B) das linhagens WiDr (em preto) e HCT8 (em branco). Essas linhagens celulares foram quimioatraídas por 10% SFB e ambas migraram e invadiram frente ao estímulo. Entretanto, as células HCT8 apresentaram um potencial migratório e invasivo maior que a linhagem HCT8.

Figura 14- Potencial de migração e invasão das células colorretais. A capacidade de migração (A) e invasão (B) das células WiDr e HCT8 frente ao estímulo com SFB foi avaliada após 24 horas de estímulo. Os dados representam a média de pelo menos três experimentos independentes $\pm$ erro padrão. Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA, seguido pelo pós teste de comparação múltipla de Tukey, * $p < 0.05$.

Tendo em mente dados da literatura que descrevem a expressão de PrP^C e HOP em câncer de cólon (Murray, Telfer et al. 2006, Antonacopoulou, Grivas et al. 2008) buscamos, em um primeiro momento, validar um modelo experimental que pudesse determinar possíveis efeitos biológicos da interação do complexo PrP^C-HOP. Para tal, foi avaliado um possível papel de HOP como quimioatrativo no processo de migração das células tumorais de cólon, linhagens celulares WiDr e HCT8. Todos os resultados aqui descritos foram realizados nas duas linhagens, objetivando demonstrar que os resultados não representam um efeito biológico pontual de somente um tipo celular.

O potencial migratório das células tumorais foi avaliado mediante ao estímulo (quimioatrativo) da proteína recombinante HOP em diferentes concentrações (0.5 μ M, 2 μ M, 5 μ M e 10 μ M). Todas as condições testadas demonstraram que as células quando estimuladas pela presença de HOP apresentam aumento do potencial de migração. Dentre as concentrações avaliadas a que melhor promoveu efeito no processo migratório foi a de 5 μ M (Fig. 15).

Figura 15- A proteína recombinante HOP promove a migração celular em linhagens de câncer de cólon. O efeito da proteína HOP foi avaliado por ensaios de migração *in vitro*. As células WiDr (A) e HCT8 (B) foram semeadas na parte superior das câmaras de Boyden. Na parte inferior da câmara foi adicionado quatro concentrações diferentes de HOP recombinante. Após 24 horas, as células que migraram foram fixadas, fotografadas e contadas utilizando o software ImageJ. A concentração de HOP que estimulou maior migração para ambas as linhagens celulares foi de 5µM. Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA, seguido pelo pós teste de comparação múltipla de Tukey, * $p < 0.05$.

4.1.3- *knockdown* de PrP^C confirma a importância do complexo PrP^C-HOP nos processos de migração e invasão tumorais

Para comprovar que os mecanismos de migração e invasão induzidos por HOP são dependentes de PrP^C, foram geradas linhagens celulares WiDr e HCT8 *knockdown* para a proteína PrP^C por meio da técnica de shRNA mediada por vetores lentivirais (*SMARTchoice Lentiviral shRNA*).

A linhagem celular WiDr foi infectada com três sequências diferentes de shRNA para o silenciamento de PrP^C e uma sequência de shRNA-Non-Target (controle). Após infecção e seleção, a sequência com melhor eficiência na diminuição de PrP^C (95%) foi a shRNA-PrP^C-3 (sh07-011101-03), como demonstrado pela técnica de Western Blot (Fig. 16A). Além disso, por meio dos ensaios de imunofluorescência (Fig.16B) e citometria de fluxo (Fig. 16C), foi

possível verificar que a mesma sequência (shRNA-PrP^C-3) também reduziu significativamente os níveis de PrP^C na superfície da membrana celular.

Figura 16- Construção da linhagem WiDr knockdown para PrP^C. (A) Western blot - Análise da expressão de PrP^C nas células WiDr infectadas com a sequência shRNA controle (non-target shRNA - shRNA-NT) ou com as três sequências de shRNA para silenciamento de PrP^C (shRNA-PrP^C). A proteína tubulina foi utilizada na reação como controle de carregamento das amostras. O gráfico representa a análise densitométrica das bandas obtidas, sendo apresentado os níveis de PrP^C encontrados nas amostras infectadas com as sequências shRNA-PrP^C-1, 2 e 3 em relação aos níveis de PrP^C expressos na amostra infectada com a sequência shRNA-NT. Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA, seguido pelo pós teste de comparação múltipla de Tukey, * p < 0.05; (B) Imunofluorescência - Análise da expressão de PrP^C na superfície das células infectadas com as sequências shRNA-PrP^C-3 shRNA-NT. Coloração verde

representa a expressão PrP^C e coloração azul representa núcleos (DAPI); (C) Citometria de fluxo – As linhagens WiDr PrP^C-knockdown (shRNA-PrP^C) e controle (shRNA-NT ou wilde type) foram incubadas com anticorpo anti-PrP^C (3F4) e em seguida incubadas com o secundário anti-IgG conjugado com Alexa-405). Como controle foram usadas células marcadas apenas com anticorpo secundário. As linhas com cor representam a expressão de PrP^C e a linha tracejada a célula controle marcada apenas com anticorpo secundário.

Para a linhagem celular HCT8 também foi feito o silenciamento de PrP^C utilizando a técnica de shRNA. As sequências shRNA-PrP^C-1 e 3 levaram a uma redução de apenas 30 a 40% nos níveis de PrP^C quando comparados a célula não infectada (WT) (Fig. 17). Contudo, de forma inesperada, o controle shRNA-Non-Target aumentou a expressão de PrP^C em 50% em relação a célula não infectada (WT). Além disso, a sequência shRNA-PrP^C-2 também levou a um aumento de PrP^C de aproximadamente 30% em relação a WT (Fig. 17). Estes problemas observados com relação a infecção da célula HCT8 levou-nos a optar por não seguir com este modelo celular para estes experimentos uma vez que apenas o knockdown de PrP^C em células WiDr seria suficiente para testarmos a nossa hipótese.

Figura 17- Análise da redução da expressão da proteína PrP^C na linhagem celular HCT8. Western blot - Análise da expressão de PrP^C nas células HCT8 selvagens (WT), infectadas com a sequência shRNA controle (non-target shRNA - shRNA-NT) ou com as três sequências de shRNA para silenciamento de PrP^C (shRNA-PrP^C). A proteína tubulina foi utilizada na reação como controle de carregamento das amostras. O gráfico representa a análise densitométrica das bandas obtidas, sendo apresentado os níveis de PrP^C encontrados nas amostras infectadas com as sequências shRNA-NT, shRNA-PrP^C-1, 2 e 3 em relação aos níveis de PrP^C expressos pela linhagem celular HCT8 WT.

Um ensaio utilizando a linhagem celular WiDr *knockdown* foi conduzido para comprovar a participação de PrP^C na invasão mediada por HOP. Os resultados mostraram que existe um padrão semelhante entre a migração mediada por SFB entre as células WiDr que expressam ou não PrP^C. Entretanto, a invasão mediada por HOP só ocorre se as células apresentarem PrP^C. (Fig. 18). A linhagem celular infectada com o shRNA-non-target apresenta padrão de resposta semelhante ao das células controle. Portanto, este dado indica que HOP é um quimioatraente que promove a invasão celular de maneira dependente da presença de PrP^C na superfície da célula tumoral.

Figura 18- PrP^C desempenha um papel fundamental no processo de invasão celular mediado por HOP. Após infecção da célula WiDr com shRNA-PrP^C ou com o shRNA-NT foi realizado o ensaio de invasão celular, na presença ou ausência de HOP recombinante (5µM) e SFB (10%). Os dados representam a média de pelo menos quatro experimentos independentes $\pm$ erro padrão. Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA, seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Tukey, * $p < 0,05$.

4.1.4 Bloqueio da interação PrP^C-HOP inibe migração e invasão celulares

Uma vez caracterizada a importância de PrP^C-HOP na invasão celular, foram conduzidos ensaios na tentativa de interferir na invasão assim como na migração celulares pelo bloqueio da interação entre PrP^C e HOP. Inicialmente, o complexo PrP^C-HOP foi bloqueado nas linhagens tumorais pelo uso do peptídeo HOP₍₂₃₀₋₂₄₅₎, que mimetiza o sítio de interação de HOP a PrP^C ou com um

anticorpo anti-PrP^C. O tratamento celular por 2 horas com o peptídeo HOP₍₂₃₀₋₂₄₅₎ (Fig. 19A e 19B) ou com o anticorpo anti-PrP^C (Fig. 19C e 19D) promoveu a redução da migração (Fig. 19A e 19C) e invasão (Fig. 19B e 19D) das células tumorais WiDr (barras pretas) e HCT8 (barras brancas) estimuladas por HOP. Por outro lado, o tratamento prévio das células com um peptídeo controle não ligante de PrP^C HOP₍₆₁₋₇₆₎ ou com uma IgG irrelevante (anti-IgG) não mostrou efeito sobre a migração e invasão celulares frente ao estímulo de HOP. Além disso, uma molécula de HOP deletada do sítio de ligação a PrP^C, HOP_{Δ230-245}, não promoveu nenhum efeito sobre a migração e invasão das células de CCR. Finalmente ressalta-se que nenhum dos peptídeos usados isoladamente promove qualquer efeito nestas linhagens celulares, indicando que para ocorrer o processo de migração e invasão celulares é necessária a proteína HOP inteira (Fig. 19).

Figura 19- A interação do complexo PrP^C-HOP é importante para os processos de migração e invasão nas linhagens celulares WiDr e HCT8. O efeito da interação PrP^C-HOP nas células WiDr (em preto) e HCT8 (em branco) foi avaliado através dos processos de migração (A e C) ou invasão (B e D). PrP^C foi bloqueado com o peptídeo HOP₍₂₃₀₋₂₄₅₎ (A e B), que mimetiza a região de interação com HOP, ou com o anticorpo anti-PrP^C (C e D). Inicialmente, as células foram incubadas durante 2 horas com o peptídeo HOP₍₂₃₀₋₂₄₅₎, peptídeo irrelevante HOP₍₆₁₋₇₃₎, anti-PrP^C ou anti-IgG seguidos pela proteína HOP recombinante. Como controle também foi usado a proteína HOP_{Δ230-245}. Após 24 horas, as células que migraram/invadiram foram fixadas, fotografadas e contadas utilizando o software ImageJ. Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA, seguido pelo pós teste de comparação múltipla de Tukey, * $p < 0.05$.

4.1.5- O complexo PrP^C-HOP medeia o processo de Invasão via ativação de ERK1/2

Mediante os dados obtidos, buscamos mapear uma via de sinalização que poderia estar envolvida no processo de invasão de células de CCR. Dados prévios do nosso grupo mostraram que o complexo PrP^C-HOP medeia a proliferação em glioblastomas via ativação de ERK1/2 (Lopes, Santos et al. 2014).

A fim de determinar a possível participação da via de sinalização ERK1/2, na invasão celular modulada pelo complexo PrP^C-HOP, seus níveis de fosforilação foram medidos nas linhagens WiDr e WiDr PrP^C-*knockdown* antes e depois do tratamento com HOP. Os dados apontam que a fosforilação de ERK1/2 foi altamente induzida após tratamento de células controle (shRNA-NT) com HOP recombinante, porém o mesmo efeito não foi visto nas células PrP^C-*knockdown* (shRNA-PrP^C-3) (Fig. 20A e 20B).

Além disso, células WiDr tratadas com o inibidor de ERK1/2 (U0126) e estimuladas com HOP recombinante apresentaram uma redução de 80% no seu potencial invasivo em comparação as células que não foram tratadas com o inibidor e apenas estimuladas com HOP recombinante, indicando que ERK1/2 está envolvida com o processo de invasão mediado por HOP, sendo a presença de PrP^C é fundamental nesse processo. (Fig. 20C).

Em conjunto os experimentos realizados com linhagens celulares de CCR apontam que o complexo PrP^C-HOP promove aumento de migração e invasão celulares por induzir a via de ERK1/2. O peptídeo HOP₂₄₀₋₂₄₅ assim como anticorpos para PrP^C são capazes de inibir a interação PrP^C-HOP e impedir a migração e invasão celulares.

Figura 20- O complexo PrP^C-HOP promove invasão via fosforilação de ERK1/2. (A) Western blot – Análise da atividade de ERK1/2 nas células WiDr controle (shRNA-NT) e PrP^C-*knockdown* (shRNA-PrP^C-3). A expressão das proteínas ERK1/2 total e tubulina foram usadas na reação para controle de carregamento das amostras. (B) O gráfico apresenta a análise densitométrica das bandas obtidas, sendo que os valores relativos da ativação de ERK1/2 (p-ERK1/2) estão representados como a razão entre p-ERK1/2 com ERK1/2 e tubulina. Os valores representam a média de cinco experimentos independentes $\pm$ erro padrão. Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey, $*p<0,05$. (C) O ensaio de invasão foi realizado com a linhagem celular WiDr na presença ou ausência de HOP recombinante e do inibidor de ERK1/2 (U0126). DMSO foi usado como veículo de diluição da droga U0126. Os dados representam a média de pelo menos quatro experimentos independentes $\pm$ erro padrão. Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey, $*p<0,05$.

4.2- Análise da expressão de PrP^C e HOP em tumores colorretais

A partir dos nossos dados *in vitro* passamos para uma análise da expressão de PrP^C e HOP em tumores colorretais humanos e sua possível correlação com invasão linfonodal, metástase à distância e sobrevida global dos

pacientes. Foram analisados 142 amostras de pacientes com CCR esporádicos, distribuídos em um *Tissue microarrays* (TMA). A análise descritiva do TMA bem como dos dados demográficos dos pacientes encontra-se na tabela 2.

Tabela 2- Análise descritiva do *Tissue Microarrays* (TMA) para os casos de tumores colorretais

Tipo Tumor	Número de casos
Colorretal	142
Gênero	número
Feminino	89 (77%)
Masculino	53 (23%)
Idade (X)	Desvio Padrão
60,87	14,77
Estadiamento Clínico	Número de casos
I	36
II	27
III	41
IV	31
Não Relatado	7
Grau de Diferenciação	Número de casos
Baixo	18
Moderado	93
Alto	12
Não Relatado	19

Inicialmente avaliamos o perfil desses pacientes em relação à metástase e à sobrevida global (Fig. 21A). Como esperado, os pacientes que apresentaram metástase (fígado e pulmão) exibiram uma pior sobrevida (vermelho) quando comparados aos pacientes com metástases (azul).

A mesma análise foi feita para linfonodos clinicamente acometidos, uma vez que esse é um fator relevante para o prognóstico dos pacientes. Assim como na metástase, os pacientes que apresentaram linfonodos (cLymph node) acometidos mostraram uma pior sobrevida global (Fig. 21B).

Figura 21- Sobrevida global dos pacientes com tumores metastáticos (A) ou linfonodos acometidos (B). Foram analisados 142 casos distribuídos em um TMA. (A) Linhas azul e vermelha representam, respectivamente, pacientes sem e com metástase à distância. (B) Linha azul representa pacientes que não apresentaram linfonodos acometidos (0), linha amarela caracteriza pacientes com até 3 linfonodos acometidos (<3) e linha vermelha ilustra pacientes com mais de 3 linfonodos acometidos (>3). A probabilidade de sobrevida dos pacientes foi analisada pelo método Kaplan-Meier. O teste aplicado para analisar as diferenças entre as curvas de sobrevida foi o log-rank com intervalo de confiança de 95%.

O perfil de expressão das proteínas HOP (Fig. 22) e PrP^C (Fig. 23) foi padronizado e avaliado por imunohistoquímica nas amostras do TMA. A intensidade de marcação foi classificada como fraca (1), moderada (2) e forte (3). Em relação ao padrão de marcação, a proteína HOP apresentou-se dispersa pelo citoplasma e a proteína PrP^C localizada na membrana plasmática ou no núcleo.

A)

Figura 22- Perfil de expressão imuno-histoquímica das proteínas HOP em CCR esporádicos. O painel é composto por imagens representativas da expressão da proteína HOP, 10X, 20X e 40X. As marcações foram classificadas como fraca, moderada e forte.

B)

Figura 23- Perfil de expressão imuno-histoquímica da proteína PrP^C em CCR esporádicos. O painel é composto por imagens representativas da expressão da proteína PrP^C, 10X, 20X e 40X. As marcações foram classificadas como fraca, moderada e forte.

Com o intuito de caracterizar a participação das proteínas PrP^C e HOP na biologia de tumores CCR, foi avaliada a correlação entre a intensidade de imunomarcagem para PrP^C e HOP com a presença de metástase, acometimento linfonodal, estadiamento clínico ou sobrevida global dos pacientes

Inesperadamente, observou-se ausência de correlação positiva entre a expressão de PrP^C e presença de metástase (Fig. 24A) ou estadiamento clínico (Fig. 24C), sendo a maioria dos casos classificados como moderados ou fortes. Também não foi encontrada correlação positiva entre sobrevida global e intensidade de expressão de PrP^C (Fig. 24B). Contudo, a análise da correlação da expressão de PrP^C versus linfonodo acometido foi significativa (Fig. 24D). Aproximadamente 87% dos pacientes com tumores N2 (mais de três linfonodos acometidos) apresentaram o tecido tumoral com forte expressão de PrP^C (3). A tabela 3 representa o número de pacientes exibindo linfonodos acometidos,

nenhum linfonodo acometido (0), até 3 linfonodos acometidos (< 3) e mais de 3 linfonodos acometidos (> 3) versus intensidade de expressão de PrP^C (Tabela 3).

Figura 24- Expressão da proteína PrP^C e sua correlação com dados clínicos de pacientes portadores de CCR. (A) Ocorrência de metástases e a intensidade de expressão de PrP^C. Foi realizado o teste estatístico t Student, $p > 0,05$; (B) Sobrevida global analisada pelo método Kaplan-Meier e intensidade de expressão da proteína PrP^C. A probabilidade de sobrevida dos pacientes foi analisada pelo método Kaplan-Meier. O teste aplicado para analisar as diferenças entre as curvas de sobrevida foi o log-rank com intervalo de confiança de 95%; (C) Estadiamento clínico e a intensidade da imunoexpressão de PrP^C. Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey, $p > 0,05$ (D) Linfonodos acometidos e a intensidade de expressão de PrP^C. Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey, $*p < 0,05$.

Tabela 3- Resultado (%) do padrão de imunoexpressão da proteína PrP^C em tumores de pacientes com CCR esporádico exibindo ou não acometimento linfonodal

Linfonodo	Intensidade PrP ^C			Total
	Fraco (1)	Moderado (2)	Forte (3)	
0	(5) 9,25%	(13) 24%	(36) 66,75%	(54) 100%
< 3	(1) 6%	(6) 35%	(10) 59%	(17) 100%
> 3	(1) 5%	(2) 8,7%	(20) 86,3%	(23) 100%

Em relação a expressão de HOP, a maioria dos pacientes, independentemente de ter ou não metástase, apresentaram baixa ou moderada expressão, como pode ser visto no gráfico (fig. 25A). A análise dos dados indicou ausência de correlação p entre a expressão de HOP, a presença de metástase ou a sobrevida global, (Fig. 25B). Além disso, independente do estadiamento clínico (Fig. 25C) ou grau de acometimento linfonodal (Fig. 25D), em geral, os tumores apresentaram expressão fraca ou moderada para HOP e não mostraram correlação positiva com a sua intensidade de expressão.

Assim, os resultados sugerem que em CCR já estabelecidos a expressão de PrP^C e HOP não apresenta variações expressivas em relação aos indicadores clínicos mais relevantes de agressividade tumoral.

Figura 25- Expressão da proteína HOP e sua correlação com dados clínicos de pacientes portadores de CCR. (A) Ocorrência de metástases e a intensidade de expressão de HOP. Foi realizado o teste estatístico t Student, $p > 0,05$; (B) Sobrevida global e intensidade de expressão da proteína HOP. A probabilidade de sobrevida dos pacientes foi analisada pelo método Kaplan-Meier. O teste aplicado para analisar as diferenças entre as curvas de sobrevida foi o log-rank com intervalo de confiança de 95%. (C) Estadiamento clínico e a intensidade da imunoexpressão de HOP. Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey, $p > 0,05$; (D) Linfonodos acometidos e a intensidade de expressão de HOP. Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey, $p > 0,05$.

Após análise do perfil de expressão das proteínas PrP^C e HOP com os principais dados clínicos de pacientes com CCR, analisamos se o complexo PrP^C-HOP poderia ter relevância sobre a sobrevida e o número de linfonodos afetados.

Foram analisados casos em que foi encontrada alta ou baixa expressão do complexo PrP^C-HOP. Esses casos estavam distribuídos em 13 amostras com alta expressão para o complexo (*High*_PrP^C-HOP) e 5 com baixa expressão para o complexo (*Low*_PrP^C-HOP). Contudo, não foi encontrada correlação positiva da sobrevida global com a expressão *Low* ou *High* do complexo PrP^C-HOP (Fig. 26). Aparentemente, a sobrevida desses pacientes com CCR esporádicos não está correlacionada com a co-expressão de PrP^C e HOP.

Figura 26- Análise da correlação da expressão do complexo PrP^C-HOP versus sobrevida global de pacientes com CCR. Os pacientes que apresentaram alta expressão (high) para PrP^C e HOP estão representados em vermelho e os com baixa expressão (low) em azul. Foram analisados 18 casos (13 casos com alta expressão de PrP^C e HOP e 5 casos com baixa expressão de PrP^C e HOP). A probabilidade de sobrevida dos pacientes foi analisada pelo método Kaplan-Meier. O teste aplicado para analisar as diferenças entre as curvas de sobrevida foi o log-rank com intervalo de confiança de 95%

Por fim, a análise da relação da expressão do complexo PrP^C-HOP com acometimento linfonodal não foi significativa. A tabela 4 mostra a porcentagem de casos com alta e baixa expressão do complexo PrP^C-HOP dentre os possíveis tipos de acometimento linfonodal. Observa-se que a maioria dos pacientes apresentam alta expressão das proteínas do complexo PrP^C-HOP, contudo não há diferença em se ter mais do que três linfonodos acometidos (N2) ou não ter linfonodos acometidos (N0).

Tabela 4- Resultado (%) do padrão de imunexpressão da proteína PrP^C em tumores de pacientes com CCR esporádico exibindo ou não acometimento linfonodal

Linfonodo	Intensidade Complexo PrP ^C -HOP		Total
	Baixo	Alto	
0	(3) 30%	(7) 70%	(10) 100%
< 3	(1) 100%	(0) 0%	(1) 100%
> 3	(1) 14%	(6) 86%	(7) 100%

Como os TMAs representam uma pequena região tumoral, resolvemos avaliar o corte inteiro do tumor desses 18 casos. Nessa análise objetivamos comparar a região total do tumor e o tecido normal para a expressão das nossas proteínas de interesse. Foram feitas duas avaliações: intensidade de marcação (1-fraco; 2-moderado ou 3-forte) e porcentagem de células positivas [0 (0%); 1 (1-25%); 2 (26%-75); 3 (>75%)].

Contudo, nossos resultados não mostraram diferenças em relação à intensidade e à porcentagem de células marcadas nas regiões tumorais e o tecido normal para as proteínas PrP^C e HOP (Fig. 27). Uma possível explicação é que essas proteínas sejam importantes no início do processo tumoral e não no final, quando os tumores já se encontram estabelecidos.

Figura 27- Análise imuno-histoquímica da expressão de PrP^C e HOP nas amostras de tumores de adenocarcinoma colorretal. (A) Imagem representativa dos cortes

referente as marcações positivas para expressão da proteína PrP^C, 10X; (B) Imagem representativa dos cortes referente à marcação positiva para expressão da proteína HOP, 10X.

É sabido que pacientes com FAP (Polipose Adenomatosa Familiar) (Snow, Tuohy et al. 2014) possuem mutação genética no gene APC, supressor de tumor. A perda da sua função leva a proliferação desordenada das células por ativação da via de Wnt. Esta, por sua vez, leva a ativação e expressão de proto-oncogenes como *c-myc* (Konsavage and Yochum 2014). Pacientes que possuem mutação no gene APC vão desenvolver vários pólipos ao longo da adolescência e, infelizmente, em 100% dos casos vão desenvolver tumores até os 50 anos.

Como abordado anteriormente, não foi encontrada correlação entre expressão de PrP^C e HOP com indicadores clínicos de agressividade de CCR, sugerindo que essas proteínas não apresentam papel em tumores já estabelecido, mas podem exibir importância na biologia de formação/desenvolvimento tumoral. Assim, pensando em entender o papel do complexo PrP^C-HOP em estágios tumorais iniciais, a análise de biópsias de pacientes diagnosticados com FAP seria um ótimo modelo, uma vez que poderiam ser avaliados tumores em diferentes graus de desenvolvimento, desde pólipos benignos até os tumores malignos.

O material utilizado para o estudo foi composto por uma biópsia de adenoma de baixo grau; duas biópsias de adenoma de alto grau, e uma adenocarcinoma. Os nossos resultados iniciais para a expressão da proteína HOP (Fig. 28) mostraram que há diferença da expressão ao longo da evolução da doença, ou seja, no adenoma de baixo grau (Fig. 28A) a intensidade e a porcentagem de células marcadas no citoplasma são baixas. Para os adenomas de alto grau (Fig. 28B e 28C) essa marcação no citoplasma é mais intensa. No adenocarcinoma 100% das células são marcadas fortemente (Fig. 28D).

Figura 28- Análise imuno-histoquímica da expressão de PrP^C em amostra de tecido tumoral benigno e maligno de pacientes portadores de FAP. (A) Adenoma de baixo grau; (B e C) Adenomas de alto grau; (D) Adenocarcinoma. As imagens foram capturadas com objetiva de 20X.

A mesma análise foi realizada para a proteína PrP^C (Fig. 29). Esta também apresentou um padrão de expressão igual à proteína HOP. Ou seja, durante a evolução dos pólipos até a formação do tumor, a expressão de PrP^C foi aumentando até que não se observou diferença na intensidade e porcentagem de células marcadas. Assim, adenomas de baixo grau exibiram baixa expressão de PrP^C (Fig. 29A), adenomas de alto grau (Fig. 29B e 29C) e o adenocarcinoma (Fig. 29D) apresentaram expressão elevada.

Portanto, esses dados sugerem que HOP e PrP^C podem ter uma importância no início da biologia dos CCR e não no final, como mostra a análise dos TMAs, uma vez que quando o tumor já se encontra estabelecido, a expressão dessas proteínas parece não variar.

Figura 29- Análise imuno-histoquímica da expressão de HOP em amostra de tecido tumoral benigno e maligno de pacientes portadores de FAP. (A) Adenoma de baixo grau; (B e C) Adenomas de alto grau; (D) Adenocarcinoma. As imagens foram capturadas com objetiva de 20X.

4.3- Potencial das vesículas extracelulares no processo de migração de células de tumores colorretais

O papel das vesículas extracelulares no desenvolvimento e progressão dos tumores tem sido bastante estudado (referência). Dados prévios do nosso grupo mostram que a secreção de vesículas extracelulares, particularmente exossomos, está correlacionada com os níveis de expressão celular de PrP^C (Dias et al. 2015, dados não publicados). Além disso, mostramos também que vesículas extracelulares carregam a proteína HOP (Hajj, Arantes et al. 2013).

Assim, inicialmente, foi analisado o padrão de secreção de HOP nas linhagens celulares WiDr e HCT8. Interessantemente, a linhagem celular WiDr expressa três vezes mais PrP^C (Fig. 12) e secreta seis vezes mais HOP (Fig. 30) do que a linhagem celular HCT8.

Figura 30- Avaliação do padrão de secreção de HOP em linhagens celulares de CCR. (A) Quantificação da secreção HOP em meio condicionado (CM) realizada por ensaio de ELISA. O dado representa a média de três experimentos independentes $\pm$ erro padrão. Foi realizado o teste estatístico t Student, $*p<0,05$.

Pensando nesses dados, foi verificado se o meio condicionado (CM) dessas linhagens celulares poderiam gerar efeitos importantes no processo de migração celular. Assim, os CM derivados das linhagens celulares WiDr e HCT8 foram utilizados como quimioatrativos para ambas linhagens celulares (Fig. 31). Os resultados mostraram que o CM de células WiDr promovem maior migração tanto de células WiDr como de HCT8 do que o CM desta última (Fig. 31). Vale ressaltar que o CM foi recuperado a partir do cultivo do mesmo número de células.

Figura 31- Meio condicionado das linhagens celulares de CCR promovem migração. O potencial de migração das células WiDr (preto) e HCT8 (branco) foi testado frente ao meio condicionado (CM) derivado de ambas as linhagens celulares. Meio de cultura sem e com SFB (10%) foram usados como controles negativo e positivo. Após 24 horas, as células que migraram foram contadas utilizando o software ImageJ. Os dados representam a média de pelo menos quatro experimentos independentes $\pm$ erro padrão. Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey, $*p < 0,05$.

A seguir o CM de cada uma das células foi avaliado para a composição de vesículas extracelulares. As células WiDr secretam aproximadamente duas vezes mais vesículas extracelulares do que as células HCT8 (Fig. 32C) entretanto a distribuição do tamanho destas vesículas é semelhante (Fig. 32A e 32B).

Figura 32- Caracterização das vesículas extracelulares secretadas pelas linhagens celulares de CCR. (A e B) Análise da concentração (E^7 partículas / ml) por tamanho das partículas secretadas pelas linhagens celulares WiDr (A) e HCT8 (B). (C) Concentração (E^9 partículas/ml) das vesículas extracelulares secretadas pelas linhagens celulares WiDr (preto) e HCT8 (branco). A análise da concentração e do tamanho das vesículas foi feita pela técnica NTA (nanoparticle tracking analysis), utilizando o equipamento NanoSight.

Em relação ao conteúdo dessas vesículas extracelulares, foi analisado o perfil de expressão da proteína HOP em dois tempos de ultracentrifugação previamente utilizados pelo nosso grupo para isolamento de vesículas extracelulares (Hajj, Arantes et al. 2013). Em ambas as linhagens celulares de CCR, a maior expressão de HOP foi encontrada na fração de 2 horas (Fig. 33). Esse resultado torna-se ainda mais interessante, uma vez que de acordo com dados publicados (Hajj, Arantes et al. 2013), no pellet de 2 horas estariam as frações de vesículas extracelulares caracterizadas como exossomos.

Figura 33- Western Blot representativo do perfil de secreção de HOP nas diferentes frações de vesículas extracelulares em células de CCR. A expressão da proteína HOP foi avaliada no extrato celular (input), vesículas extracelulares secretadas em diferentes tempos de ultracentrifugação (2 e 16 horas) e no sobrenadante (SN) obtido após o isolamento das vesículas extracelulares das linhagens WiDr (A) e HCT8 (B).

O próximo passo foi avaliar o papel destes exossomos na migração celular. (Fig. 34). O ensaio foi realizado utilizando-se como quimioatrativo CM de células WiDr e HCT8, vesículas extracelulares (pellet 2h de WiDr e HCT8) e sobrenadante obtido após o isolamento das vesículas extracelulares (SN WiDr e SN HCT8). Interessantemente, os resultados mostraram que o estímulo das células HCT8 (Fig. 34B) com o meio condicionado, vesículas extracelulares e o sobrenadante derivados das células WiDr promoveram uma maior migração do que os mesmos componentes provenientes de HCT8. Para a linhagem WiDr as mesmas condições estimulatórias não apresentaram resultados estatisticamente significantes (Fig. 34A).

Figura 34- Meio condicionado, vesículas extracelulares e sobrenadante promovem migração celular em linhagens de CCR. As linhagens de CCR WiDr (A) e HCT8 (B) foram quimioatraídas com meio condicionado, vesículas extracelulares (pellet 2 horas) e sobrenadante (SN) de ambas as células. (A) A linhagem WiDr migrou frente ao CM WiDr. (B) A linhagem HCT8 migrou frente a todas as condições provenientes da linhagem WiDr. Os dados representam a média de pelo menos quatro experimentos independentes $\pm$ erro padrão. Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey, $*p < 0,05$.

Pensando no mecanismo de secreção das vesículas extracelulares e na sua contribuição para o desenvolvimento dos tumores CCR, modulamos a secreção de vesículas extracelulares nas células WiDr utilizando um plasmídeo com um dominante negativo da proteína VPS4. Essa proteína está envolvida com a biogênese dos exossomos (Colombo, Raposo et al. 2014).

Primeiramente transfectamos as células WiDr com os vetores de expressão pEGFP-VPS4 (superexpressa VPS4 em fusão GFP), VPS4(E228Q)-GFP (dominante negativo de VPS4 em fusão GFP) e pEGFP (vetor vazio somente com GFP, utilizado como controle). Por microscopia eletrônica e fluorescência foi possível verificar o aumento de corpos multivesiculares nas células WiDr transfectadas com o vetor VPS4_DN (Fig. 35), sugerindo inicialmente um acúmulo dessas estruturas na região citoplasmática.

A)

B)

Figura 35- A transfecção da proteína VPS4 dominante negativo promove a retenção dos corpos multivesiculares na linhagem de CCR. (A) Microscopia de Fluorescência para verificar a eficiência da transfecção da linhagem celular WiDr com o vetor pVPS4-DN. As setas em vermelho representam a expressão da proteína VPS4-DN_GFP. Imagem capturada pelo microscópio confocal, 40x. (B) Microscopia Eletrônica das células WiDr transfectadas com o vetor pVPS4-DN. Cortes ultrafinos da linhagem transfectadas com o plasmídeo contendo a forma dominante negativo de VPS4 foram contrastados e analisados no microscópio eletrônico de transmissão. As imagens representam a morfologia da célula dominante negativo no aumento de 10K X, 25K X e 100K X. As setas em amarelo representam os corpos multivesiculares acumulados na região citoplasmática da célula.

Em seguida, foi avaliado o perfil de secreção das vesículas extracelulares (quanto à concentração e tamanho) pela linhagem celular modulada para a

expressão da proteína VPS4. As linhagens celulares WiDr parental, pVPS4_DN, pVPS4 e pEGFP tiveram uma diferença em relação à concentração (Fig. 36A) e no tamanho das vesículas extracelulares secretadas foram semelhantes (Fig. 36C, D, E e F). Como esperado, a célula pVPS4_DN apresenta uma quantidade de vesículas extracelulares bem menor do que a linhagem parental, a que superexpressa pVPS4 ou controle (pEGFP) (Fig. 36B). A linhagem celular dominante negativa obteve uma redução treze vezes na secreção de vesículas quando comparada as linhagens controle (parental ou pEGFP).

Figura 36- Caracterização das vesículas extracelulares secretadas pelas células WiDr após modulação da proteína VPS4. (A) Concentração (E^8 partículas/ml) das vesículas extracelulares secretadas pelas células WiDr parental (WiDr), pVPS4_{DN} (VPS4-E228Q-GFP), pVPS4 (Wisp01-pEGFP-VPS4c1) e pEGFP (pEGFPc1). Os dados representam a média de três experimentos independentes $\pm$ erro padrão. Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey, $*p < 0,05$; (B) imagem representativa das partículas analisadas pelo equipamento NanoSight. (C-F) Perfil do tamanho versus concentração das vesículas extracelulares

secretadas pelas células WiDr parental (WiDr - C), pVPS4_DN (VPS4-E228Q-GFP - F), pVPS4 (Wisp01-pEGFP-VPS4c1 - E) e pEGFP (pEGFPc1 - D).

Ao mesmo tempo, quando foi analisado a quantidade de proteína total secretada nas vesículas extracelulares derivadas dos pellets de 2 e 16 horas da linhagem parental WiDr e da dominante negativa, verificou-se que houve uma redução de quase 2x da carga proteica principalmente na fração de 2h (Fig. 37), indicando que a modulação da proteína VPS4 implica na diminuição da secreção de vesículas extracelulares e também na menor quantidade de proteína secretada nessas vesículas.

Figura 37- Perfil da secreção total das proteínas nos pellets de 2 e 16 horas das linhagens WiDr e VPS4-E228-GFP (DN). (A) O meio condicionado foi ultracentrifugado a 100.000g, e os pellets de 2 e 16 horas foram avaliados por prata. (B) O gráfico apresenta a análise densitométrica das bandas obtidas, sendo apresentado os níveis de proteínas encontrados na linhagem celular WiDr e VPS4-E228-GFP em relação aos níveis de proteínas expressas pela linhagem celular VPS4-E228-GFP.

O padrão de proliferação das células WiDr após modulação da proteína VPS4 também foi avaliado. Os resultados mostraram que as células transfectadas com pVPS4-DN apresentaram crescimento quatro vezes mais lento quando comparado com a parental ou o controle GFP. Já a célula transfectada com pVPS4 apresentou crescimento de quase duas vezes mais do que as células não transfectadas (Fig. 38).

Figura 38- Curva de proliferação celular. O gráfico representa a proliferação das células WiDr parental (NT - azul) e das células WiDr transfectadas com pVPS4 (Wisp01-pEGFP-VPS4c1 - verde), VPS4_DN (Vps4-E228Q-GFP - vermelho), pEGFP (pEGFPc1 - roxo).

Assim, para verificar o papel das vesículas extracelulares no processo tumoral foram feitos ensaios de migração. A indução da célula parental (WiDr) com o meio condicionado das células pVPS4_NT não apresentou efeito sobre o processo migratório, porém a estimulação com o meio condicionado derivado da linhagem que superexpressa VPS4 aumentou o potencial de migração da célula WiDr parental em uma vez (Fig. 39A).

Figura 39- Tratamento da linhagem celular WiDr com meio condicionado das linhagens WiDr moduladas para a proteína VPS4. A linhagem WiDr parental foi quimioatraída com o meio condicionado de cada linhagem modulada para VPS4 e com o CM dela mesma. Após período de indução as células que migraram foram fixadas coradas com DAPI e contadas. O CM da linhagem modulada negativamente para proteína VPS4-E228Q-GFP não promoveu efeito migratório. Os dados representam a média de três experimentos independentes $\pm$ erro padrão. Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey, $*p < 0,05$.

Por fim, foi avaliado o padrão de secreção da proteína HOP para linhagem celular WiDr pVPS_DN. A análise por western blotting mostrou que tanto a linhagem parental como aquela expressando o dominante negativo secretam mais HOP nas vesículas extracelulares na fração de 2 horas. Contudo, independente da fração analisada, a linhagem celular dominante negativa mostrou redução da expressão de HOP em suas vesículas extracelulares em relação a linhagem celular parental (Fig. 40 A e B).

A)

B)

Figura 40- Perfil de secreção de HOP nas vesículas extracelulares presentes nos pellets de 2 e 16 horas derivados das linhagens WiDr e VPS4-E228-GFP. (A) A expressão da proteína HOP (66kDa) foi avaliada por western blot nos pellets obtidos da ultracentrifugação de 2 e 16 horas do meio condicionado das células WiDr e Vps4-E228-GFP (DN). Observa-se uma redução da secreção de HOP nos pellets de 2 e 16 horas das células VPS4_DN (VPS4-E228-GFP). (B) O gráfico apresenta a análise densitométrica das bandas obtidas, sendo apresentado os níveis de HOP encontrados na linhagem celular WiDr e VPS4-E228-GFP em relação aos níveis de proteínas expressas pela linhagem celular VPS4-E228-GFP.

Assim, os dados apresentados mostram que a modulação da secreção de vesícula extracelular pode ser uma importante estratégia para estudar a progressão dos tumores de CCR, uma vez que a redução da secreção de vesículas extracelulares, e consequentemente menor secreção de proteínas no CM, implicou em um menor estímulo do processo de migração de células de CCR.

5- Discussão

Este trabalho abordou diversos aspectos relacionados à importância das proteínas PrP^C e HOP no desenvolvimento de tumores colorretais. Dentre eles, podem ser citados, processos de migração, invasão e secreção de vesículas extracelulares. Através de ensaios *in vitro* de migração e invasão, além da análise da via não clássica de secreção celular, conseguimos entender alguns aspectos da importância do complexo PrP^C-HOP e das vesículas extracelulares tumorais na progressão dos tumores colorretais.

Determinamos que a interação PrP^C-HOP participa de processos de migração e invasão de células de tumores colorretais e que esta é desencadeada pela via de sinalização ERK1/2. Além disso, o peptídeo que representa o sítio de interação de HOP a PrP^C (HOP₂₃₀₋₂₄₅) pode inibir esta interação bloqueando os processos de migração e invasão. Sugerindo que o complexo PrP^C-HOP pode de alguma forma auxiliar em mecanismos celulares que são relevantes para a metástase de CCR e que este efeito pode ser inibido pelo peptídeo HOP₂₃₀₋₂₄₅. Além disso, foi observado que vesículas extracelulares secretadas por estas células também participam do processo de migração e invasão, sugerindo que essas possam desempenhar um papel importante no microambiente tumoral. Através do estudo da expressão destas proteínas em tecidos de tumores colorretais apontamos que o complexo PrP^C-HOP está mais relacionado aos estágios iniciais do desenvolvimento dos tumores colorretais, ou seja, na fase de transição entre pólipos benignos e a formação da neoplasia maligna.

5.1- Análise *in vitro* do papel do complexo PrP^C-HOP nos processos de migração e invasão celular de tumores colorretais malignos.

Dados da literatura mostram que as proteínas PrP^C e HOP são expressas em diversos tipos de cânceres como, por exemplo, colorretal (Murray, Telfer et al. 2006, Antonacopoulou, Grivas et al. 2008), glioblastoma, retina e ovário, estando envolvidas em diversos processos como proliferação (glioblastoma, retina, ovário); metástase em cólon, captação de glicose em tumores corretais (Arruda-Carvalho, Njaine et al. 2007, Kim, Cho et al. 2010, Li, Sun et al. 2011, Lopes, Santos et al. 2014). Nossos experimentos foram conduzidos utilizando linhagens

celulares que expressam diferentes concentrações das proteínas PrP^C e HOP. Buscamos inicialmente determinar possíveis efeitos biológicos da interação do complexo PrP^C-HOP, uma vez que nosso grupo demonstrou que HOP é um ligante de PrP^C (Zanata, Lopes et al. 2002, Lopes, Hajj et al. 2005). Por ser secretado na forma solúvel (Hajj 2013), testamos o possível papel de HOP como quimioatrativo no processo de migração/invasão celular.

Assim, nossos resultados mostraram que a proteína recombinante HOP tem potencial para estimular a migração de células tumorais de CCR. Interessantemente, quando as mesmas células foram estimuladas pela proteína recombinante HOP deletada do sítio de interação com PrP^C (HOP_{Δ230-245}), a migração celular foi bloqueada. Um resultado intrigante foi que o perfil de migração da linhagem HCT8, que expressa os níveis mais baixos de PrP^C, na sua superfície, migra numa extensão maior que a linhagem WiDr, quando quimioatraída com 5μM de HOP recombinante. Uma diferença menor entre as linhagens foi observada no ensaio de invasão. Estas diferenças também foram observadas quando o SFB foi usado como quimioatrativo. Esses dados refletem um maior potencial intrínseco de migração/invasão da célula HCT8 quando comparado com a célula WiDr. Buscando avaliar a importância da proteína nesses processos, foi feito o silenciamento (*knockdown*) de PrP^C nas linhagens celulares de CCR. Somente a linhagem WiDr apresentou uma redução significativa da expressão de PrP^C e esta foi usada nos experimentos. E assim nossos resultados mostraram que o *Knockdown* de PrP^C promoveu significativa redução dos níveis de invasão mediados por HOP na linhagem WiDr. Portanto, apontando que a migração e invasão de células de tumores colorretais é mediada pelo complexo PrP^C - HOP.

Inicialmente, foi descrito que a interação PrP^C-HOP é importante em processos não tumorais como a ativação das vias de sinalização PKA e ERK1/2, levando a neuroproteção e neuritogênese (Lopes, Hajj et al. 2005). Estes dados estão de acordo com resultados da literatura que apontam a importância de PrP^C e de HOP na evolução da biologia tumoral. Recentemente, foi demonstrado que o complexo PrP^C-HOP é importante para a proliferação dos glioblastomas, estando correlacionado com a pior sobrevida dos pacientes (Lopes, Santos et al. 2014). Ainda, o *knockdown* de PrP^C induz alterações morfológicas e morte celular, além de promover a redução do volume do tumor em camundongos (Barbieri,

Palumbo et al. 2011). Em câncer de mama, por exemplo, o silenciamento de PrP^C não afetou a proliferação ou a formação de colônia, mas influenciou na resposta celular a estímulos citotóxicos, pois levou a um aumento da susceptibilidade a apoptose induzida por privação de soro (Yu, Jiang et al. 2012).

Após caracterização da importância de PrP^C-HOP na migração e invasão celular, verificamos como controlar esses eventos relacionados agressividade em CCR. O uso do peptídeo que mimetiza o sítio de interação com PrP^C (HOP₂₃₀₋₂₄₅) ou do anticorpo anti-PrP^C foi capaz de bloquear a indução tanto da migração quanto da invasão mediada por HOP. Interessantemente, o tratamento com o peptídeo irrelevante (HOP₆₁₋₇₆), ou seja, que não apresenta sítio de interação com PrP^C, não bloqueou o efeito.

Dados do nosso grupo mostraram que o complexo PrP^C-HOP medeia a proliferação celular em glioblastoma por meio da ativação da via de sinalização ERK1/2 (Lopes, Santos et al. 2014). Buscando entender se o efeito da invasão celular estimulada por HOP em CCR também poderia ser resultado da ativação da via ERK1/2, medimos os níveis de fosforilação de ERK1/2 na linhagem celular WiDr e na sua contraparte onde a expressão de PrP^C foi abolida. Os nossos resultados mostraram que mediante ao estímulo com HOP as células depletadas de PrP^C apresentavam níveis mais baixos de fosforilação de ERK1/2 quando comparadas com as células controle. Além disso, um ensaio funcional mostrou que o bloqueio da via de ERK1/2 pelo inibidor U0126 abole o processo de invasão estimulada por HOP. Esses dados evidenciam que o complexo PrP^C-HOP sinaliza o processo de invasão via ativação de ERK1/2 e que a presença de PrP^C é fundamental para essa indução.

Dados da literatura já mostraram a importância de PrP^C para os processos de invasão e metástase em câncer gástrico. Altos níveis de expressão de PrP^C promoveram a adesão, invasão e metástase *in vivo*, além de terem aumentado os níveis da metaloproteinase do tipo 11, por meio da ativação da via de sinalização ERK1/2 em linhagens celulares gástricas (Pan, Zhao et al. 2006). Já foi evidenciado também que HOP secretada por linhagens celulares de glioblastoma induz proliferação, sendo esse efeito via ERK e PI3K. Além disso, a proliferação foi dependente da interação do complexo PrP^C-HOP (Erich, Kahn et al. 2007). O mesmo efeito foi visto em células da microglia onde HOP secretada por estas

células induziu a proliferação de linhagens de glioblastoma (Fonseca, Romão et al. 2012).

Assim esses dados corroboram para mostrar a importância do complexo PrP^C-HOP em diversos processos biológicos relacionados a progressão tumoral. Assim, o controle através da modulação ou bloqueio dessas proteínas pode representar os passos iniciais para o entendimento dos mecanismos associados ao desenvolvimento e progressão dos tumores colorretais. Além disso, estes dados apontam que o complexo PrP^C-HOP pode ser considerado um novo alvo terapêutico nestes tumores.

5.2- Análise da expressão de PrP^C e HOP em tumores colorretais

Dados da literatura têm mostrado que a presença de PrP^C e/ou HOP exibe grande influência na progressão do câncer (Santos, Lopes et al. 2015). Sabe-se que PrP^C está envolvido com proliferação, apoptose, invasão, metástase, resistência a drogas em diferentes tipos de tumores (Mehrpour and Codogno 2010). Em pacientes com câncer gástrico foi visto que aumento da expressão de PrP^C estava relacionado com o pior prognóstico, invasão e metástase linfonodal (Wang, Du et al. 2011, Zhou, Shang et al. 2014). Interessantemente, De Wit e colaboradores mostraram por proteômica que PrP^C pode ser um candidato a biomarcador na progressão de adenomas para carcinomas em câncer colorretal (de Wit, Jimenez et al. 2012). A expressão de uma forma alternativa de PrP^C, pró-PrP^C, foi observada em células de melanoma (Li, Yu et al. 2010), câncer gástrico metastático (Pan Y, Zhao L et al.) e adenocarcinoma de pâncreas (Li, Xin et al. 2010, Sy, Li et al. 2010), estando associada com pior prognóstico nesses tumores.

Em relação a proteína HOP, trabalhos recentes têm apontado sua presença em plasma de pacientes com câncer de ovário, sendo seus níveis séricos mais elevados do que em amostras de indivíduos controle (Wang, Chao et al. 2010). Esse dado, juntamente com o rastreamento do CA125 (*cancer antigen 125*), um marcador tumoral identificado no sangue de alguns tipos de câncer, está sendo alvo de estudo como estratégia terapêutica (Wang, Chao et al. 2010). Kubota e colaboradores também mostraram que em câncer colorretal 68% dos pacientes apresentam expressão elevada da proteína HOP e das chaperonas

HSP70/90. A correlação positiva para o complexo HSP70/90/HOP em pacientes com câncer colorretal mostrou que este pode ser um bom alvo para terapia (Kubota, Yamamoto et al. 2010).

Assim, mediante as evidências de que essas proteínas de alguma forma poderiam ser bons alvos terapêuticos e juntamente com os nossos dados *in vitro* que mostraram que o complexo PrP^C-HOP auxilia nos processos de migração e invasão em linhagens celulares de CCR, avaliamos a expressão dessas proteínas em amostras de pacientes (142 casos) e correlacionamos com dados clínicos como sobrevida global, acometimento linfonodal, estadiamento clínico e metástase.

As análises dos 142 casos de CCR mostraram que pacientes apresentando metástase ou linfonodos acometidos mostraram uma pior sobrevida global, como já esperado e relatado na literatura. Contudo, ao tentarmos correlacionar esses dados com a intensidade expressão das proteínas HOP e PrP^C nas diferentes amostras, observou-se um perfil variado de marcação em todos os estadiamentos clínicos, portanto, não apresentando correlação com acometimento linfonodal, metástase ou sobrevida global. Assim apesar de já ter sido descrito acima que em alguns tumores há uma correlação entre a expressão das proteínas HOP e PrP^C com esses dados clínicos, para câncer colorretal não foi observado o mesmo perfil.

Em relação a localização celular, a marcação para proteína HOP é bem definida no citoplasma, enquanto que PrP^C apresentou-se expresso tanto na membrana quanto no núcleo. Este padrão de marcação já foi visto em outros trabalhos como: em câncer de ovário para HOP (Wang, Chao et al. 2010), cólon câncer para PrP^C localizado na membrana celular (Wang, Qian et al. 2012) e em câncer de mama para PrP^C nuclear (Cheng, Tao et al. 2014).

A localização de PrP^C nuclear é bem intrigante, muito se sabe a respeito da sua função na membrana como sinalizador de neuroproteção (Lopes, Hajj et al. 2005), proliferação (Lopes, Santos et al. 2014) e indutor de processos de migração/invasão (Santos, Lopes et al. 2015). Contudo, a sua função nuclear não é muito clara. Cheng e colaboradores mostraram que em amostras de pacientes com câncer de mama a maior parte de PrP^C encontrava-se no núcleo. Interessantemente, a análise da estrutura da proteína PrP^C no citoplasma e no núcleo mostrou-se um pouco diferente, o que sugeriu que, dependendo da

localização, PrP^C pode está atuando em diferentes funções (Cheng, Tao et al. 2014). Gabus e colaboradores ao analisar a expressão de PrP^C em células 293T de rim, observaram que a proteína era expressa tanto na membrana, quanto no citoplasma e núcleo (Gabus, Derrington et al. 2001). Apesar de termos detectado a presença de PrP^C no núcleo nas nossas amostras de CCR sua relevância neste contexto não foi explorada neste trabalho uma vez que nosso objetivo é a interação de PrP^C e HOP na membrana citoplasmática.

Como dito anteriormente, avaliando individualmente essas proteínas com os dados clínicos desses pacientes com CCR esporádicos, observamos que a expressão de HOP não apresentou correlação com sobrevida, metástase, estadiamento clínico ou linfonodo acometido, uma vez que a maioria dos casos presentes no TMA analisado apresentou fraca ou moderada expressão para HOP. Apesar de alguns trabalhos terem mostrado a importância da expressão de HOP na progressão tumoral por promover proliferação, invasão e/ou metástase (Walsh, Larkin et al. 2011, Fonseca, Romão et al. 2012, Tsai, Tsai et al. 2012), acreditamos que a sua colaboração individual no desenvolvimento do tumor CCR pode está relacionada com a sua secreção, como mostrado o trabalho de Wang e colaboradores (Wang, Chao et al. 2010)). O alto nível sérico de HOP detectado em pacientes com câncer de ovário mostrou que essa proteína quando secretada pode ser um bom candidato a biomarcador tumoral.

Já a proteína PrP^C apresentou moderada ou forte expressão para a maior parte dos casos avaliados no TMA, porém não tendo correlação positiva com sobrevida, metástase ou estadiamento clínico. Por outro lado, a presença de PrP^C mostrou correlação com metástase linfonodal, pois pacientes com maior número de linfonodos acometidos mostram alta expressão de PrP^C. Esse dado é bem interessante, uma vez que a análise de linfonodos na clínica é um parâmetro relevante no prognóstico do paciente com CCR. Em tumores gástrico, Zhou e colaboradores, viram a correlação positiva entre a expressão de PrP^C e a metástase linfonodal, mostrando que essa proteína pode ser fator prognóstico nesse tipo de tumor (Zhou, Shang et al. 2014).

Apesar de Antonacopoulou e colaboradores mostrarem que pacientes com CCR exibem maior expressão de PrP^C em tecidos tumorais do que em não neoplásicos (Antonacopoulou, Palli et al. 2010). Ao fazermos uma análise comparativa das características das amostras apresentadas no artigo com as

estudas em nosso trabalho, alguns parâmetros foram diferentes. Entre eles, podemos citar que em nosso trabalho foi avaliada a intensidade de marcação para PrP^C enquanto que no artigo foi realizada análise de porcentagem de células marcadas. Outro fator bastante relevante é o protocolo de imuno-histoquímica; marca, diluição e tempo de incubação do anticorpo foi diferente entre os trabalhos. Além disso, tipo e tempo de recuperação antigênica foram distintos. Assim, muitas variáveis podem ter contribuído para a diferença dos resultados entre os estudos.

Uma vez que nossos dados *in vitro* mostraram a importância do complexo PrP^C-HOP nos processos de migração/invasão, avaliamos 18 pacientes que expressavam alta ou baixa expressão de PrP^C e HOP. Nosso trabalho recente mostrou que altos níveis das proteínas PrP^C e HOP em glioblastomas estão correlacionados com proliferação e pior sobrevida dos pacientes e que o bloqueio da interação do complexo PrP^C-HOP nesses tumores pode interferir na progressão tumoral (Lopes, Santos et al. 2014). Contudo, nossos resultados mostraram que não há correlação significativa com os parâmetros clínicos avaliados e que aparentemente ter ou não a expressão do complexo PrP^C-HOP não auxilia na progressão tumoral.

Pensamos que as diferenças de expressão dessas proteínas poderiam estar entre tecidos neoplásicos e normais. Desta forma, avaliamos esses mesmos 18 casos, contudo agora selecionamos o corte inteiro, onde era possível observar área normal e área neoplásica. Nossos dados mostraram não haver diferenças significativas na intensidade e porcentagem de células marcadas para ambas as proteínas em áreas normais ou tumorais.

Tendo em mente os nossos resultados, sugerimos que talvez essas proteínas fossem importantes no início do processo tumoral, ou seja, nos estágios iniciais do desenvolvimento neoplásico. Assim, avaliamos biópsias de pacientes diagnosticados com FAP (Polipose abenomatosa familiar, doença hereditária autossômica dominante, ocasionada por uma mutação germinativa no gene APC, que representa 1% dos casos de CCR. Os pacientes com FAP apresentam ao longo da vida milhares de adenomas no cólon e reto e têm risco aumentado de desenvolver câncer por volta dos 35-40 anos (Kashfi, Golmohammadi et al. 2015). Esse modelo é interessante, uma vez que se pode analisar amostras em

diferentes graus de desenvolvimento tumoral, desde pólipo benigno até tumores malignos.

Nossos resultados mostraram que tanto a proteína HOP quanto PrP^C apresentaram baixa porcentagem e fraca intensidade de marcação em adenomas de baixo grau. Interessantemente, à medida que os pólipos evoluem para alto grau ou adenocarcinoma, a porcentagem e a intensidade de marcação para essas proteínas tornam-se fortes, exibindo 100% de células marcadas. Portanto, nossos dados, ainda que preliminares, sugerem que o complexo PrP^C-HOP pode ter uma importância no início da biologia dos CCR. Contudo, a casuística necessita ser aumentada para a comprovação da nossa hipótese inicial.

5.3- Potencial da vesícula extracelular no processo de migração de células câncer colorretais

A comunicação célula-célula é feita através de moléculas extracelulares como lipídeos, peptídeos, proteínas e nucleotídeos que se ligam a receptores e induzem a sinalização intracelular, alterando o estado fisiológico da célula receptora (Bobrie, Colombo et al. 2011). Nas últimas décadas, o estudo das vesículas extracelulares como um potencializadores da comunicação extracelular tem sido bastante explorado. Uma vez que esta contém inúmeras moléculas sinalizadoras, seu papel como mensageiros intercelulares é de grande interesse fisiológico como patológico (Bobrie, Colombo et al. 2011). As microvesículas secretadas pelas células tumorais contêm proteínas, lipídios, mRNA, e miRNAs e podem ser secretadas para células tumorais e não tumorais como estroma, endotelial, inflamatória, e células do sistema imunológico. Essa comunicação é extremamente relevante já que as microvesículas no microambiente tumoral têm o potencial de reprogramar e organizar o nicho pré-metastático (Martins, Dias et al. 2013). Trabalhos recentes na área oncológica mostraram que as vesículas podem ser encontradas em plasma sanguíneo, saliva, urina e fluido cérebro-espinhal podendo estar relacionadas com o desenvolvimento do câncer ou com a quimioresistência (Yu, Cao et al. 2015).

Pensando nesses dados avaliamos o perfil de expressão das proteínas HOP e PrP^C bem como a secreção de HOP em duas linhagens celulares de CCR. Nossos resultados mostraram perfis bastante diferentes. A linhagem celular WiDr

apresenta alta expressão de ambas proteínas, além de secretar quantidades elevadas de HOP para o meio extracelular. Mediante as diferenças de expressão e secreção de proteínas, avaliamos se o CM dessas linhagens celulares poderiam ter efeitos diferentes sobre o processo de migração. Interessantemente, a análise do perfil de secreção de vesículas extracelulares mostrou que a linhagem WiDr secreta aproximadamente duas vezes mais vesículas do que a linhagem HCT8. Por sua vez, o CM da linhagem celular WiDr apresentou um efeito indutor migratório maior que o da linhagem celular HCT8 quando utilizado como quimioatrativo para ambas as linhagens celulares. Esses dados são interessantes e consistentes com o maior número de vesículas presentes no MC de células WiDr.

Em relação aos perfis de secreção da proteína HOP, nas diferentes frações de ultracentrifugação e no sobrenadante das duas linhagens celulares, HOP mostrou-se mais concentrada na fração de 2 horas do que na fração de 16 horas pós-centrifugação ou no sobrenadante para ambas as linhagens. Interessantemente corroborando com esse dado, trabalho recente do nosso grupo mostrou que em astrócitos após ultracentrifugação do CM, a fração de 2 horas seria referente ao exossomos (Hajj, Arantes et al. 2013). Essas vesículas são formadas através do dobramento das membranas endossomais e possuem tamanho entre 20 a 100nm. Nesse mesmo estudo Hajj e colaboradores verificaram também que a proteína HOP é secretada através dos exossomos (Hajj, Arantes et al. 2013, Yu, Cao et al. 2015).

Nossos dados corroboram com a literatura no sentido que mostram um papel biológico das vesículas extracelulares no processo tumoral e seu microambiente. Dados da literatura já mostraram a importância das vesículas extracelulares no transporte de informações entre tecidos e órgãos tanto de forma autócrina, parácrina ou endócrina, indicando que as vesículas extracelulares podem de alguma forma auxiliar na modulação do microambiente tumoral durante a progressão do câncer (Martins, Dias et al. 2013). Dentre os vários tipos de vesículas extracelulares, uma população específica de vesículas são as formadas a partir do sistema endossomal os *Multivesicular Bodies* (MVBs), que ao fundirem com a membrana plasmática celular liberam os exossomos, uma classe bem definida de vesículas extracelulares que tem tamanho entre 30 a 100nm (Soung, Nguyen et al. 2015).

Em diversos tipos tumorais, as vesículas extracelulares estão envolvidas em diferentes processos como preparo do microambiente tumoral, adesão celular, proliferação, invasão, metástase, angiogênese (Janowska-Wieczorek, Wysoczynski et al. 2005, Qu, Qu et al. 2009, McCready, Sims et al. 2010, Koumangoye, Sakwe et al. 2011, Svensson, Kucharzewska et al. 2011, Taylor and Gercel-Taylor 2011). Uma vez que encontramos diferenças de conteúdo proteico nas diferentes frações de ultracentrifugações, avaliamos se as vesículas extracelulares presentes em cada fração, CM e sobrenadante das duas linhagens celulares de CCR poderiam ter efeito quimioatrativo no processo de migração. Interessantemente, nossos resultados mostraram que a linhagem celular HCT8 respondeu a indução de migração quando estimulada por CM, vesículas extracelulares e sobrenadante proveniente da WiDr. Os ensaios foram relativizados pelo mesmo número de vesículas ou pelo mesmo número de células o que mostra que de alguma forma o conteúdo das vesículas extracelulares pode ser importante no processo de migração.

Jiang e colaboradores mostraram que vias de *uptake* de exossomos podem ter aplicações terapêuticas na tumorigênese (Jiang, Li et al. 2015). Pensando em como a secreção de vesículas extracelulares, mais especificamente os exossomos, pode contribuir para os primeiros passos no desenvolvimento dos tumores CCR, modulamos a proteína VPS4, ATPase importante para formação do ESCRT-III, que permite a formação dos MVB (Hanson, Roth et al. 2008). A expressão do dominante negativo de VPS4 na linhagem celular WiDr promoveu o acúmulo dos MVB na região citoplasmática das células, o que ocasionou uma menor secreção de vesículas extracelulares e aparentemente um menor cargo proteico total secretado. Interessantemente, o bloqueio de VPS4-DN interferiu no processo de proliferação celular. Esses dados estão de acordo com a literatura uma vez que as proteínas relacionadas ao processo de formação de MVB e exossomos como TSG101 e a VPS4, já foram correlacionadas com a motilidade celular (Tu, Ortega-Cava et al. 2010, Tu, Ahmad et al. 2011).

Por outro lado, dados contraditórios a estes que acabam de ser descritos são encontrados na literatura. Em câncer de mama a regulação negativa da proteína VPS4 (isoforma B) foi correlacionada com o aumento da malignidade, ou seja, pacientes em estadiamento IV apresentavam níveis menores de mRNA VPS4-B quando comparados com os de estadiamento II ou III (Mattissek and Teis

2014). Além disso, o baixo nível de expressão de mRNA VPS4-B foram correlacionados com altos níveis de EGFR em tumores de mama de grau IV levando a um pior prognóstico (Lin, Li et al. 2012). Portanto, indicando que as proteínas envolvidas preliminarmente com formação de corpos multivesiculares e secreção de exossomos podem participar de outros processos celulares.

Entretanto, nossos resultados mostraram que a modulação na secreção de vesículas extracelulares poderia contribuir na redução do processo de metástase, uma vez que o bloqueio da secreção de vesículas extracelulares influenciou diretamente no processo de migração e também na redução do cargo proteico como foi visto para a proteína. Esses achados corroboram com a literatura, pois vesículas extracelulares contribuem para a comunicação intercelular, o que pode auxiliar na tumorigênese por meio do preparo do microambiente tumoral para formação de metástases (Peinado, Alečković et al. 2012, Mattissek and Teis 2014). Recentemente, um estudo mostrou haver correlação entre os níveis de vesículas extracelulares em pacientes com câncer e seu potencial como diagnóstico (Penfornis, Vallabhaneni et al. 2016).

A pesquisa nos últimos anos tem buscado entender como o controle do microambiente tumoral pode auxiliar na tumorigenese. A comunicação célula-célula, principalmente a interação entre células normais e tumorais por meio das vesículas extracelulares, pode auxiliar em novas abordagens terapêuticas e em diagnósticos personalizados (Penfornis, Vallabhaneni et al. 2016). Assim nossos resultados mostraram a importância da modulação de proteínas correlacionadas com a secreção de vesículas uma vez que, a interferência pode resultar na redução da comunicação da célula tumoral com o ambiente tumoral podendo ser uma boa estratégia no bloqueio da progressão tumoral.

6- Conclusões

- A linhagem celular de tumor CCR WiDr expressa mais PrP^C e HOP e secreta mais HOP quando comparada a linhagem HCT8.
- HOP estimula os processos de migração e invasão em ambas as linhagens celulares e este é dependente da interação com PrP^C, uma vez que o *knockdown* para PrP^C promoveu o bloqueio do processo de invasão estimulado por HOP e a proteína HOP deletada do sítio de ligação a PrP^C (230-245) não promover invasão.
- O complexo PrP^C-HOP pode ser considerado um novo alvo terapêutico uma vez que o bloqueio desta interação por meio do peptídeo HOP₍₂₃₀₋₂₄₅₎, que mimetiza o sítio de interação com PrP^C, ou com anticorpo anti-PrP^C inibe tanto o processo de migração e invasão estimulados com HOP;
- A indução da invasão celular pelo complexo PrP^C-HOP é dependente da ativação da via de ERK1/2.
- A expressão de HOP e PrP^C em tumores colorretais não apresenta uma correlação significativa com os principais fatores de prognóstico destes pacientes;
- Não há diferença entre a expressão de PrP^C e HOP entre as regiões neoplásica e não-neoplásicas dos CCR.
- Estudo preliminar mostra que há uma correlação positiva entre a expressão de HOP e PrP^C entre pólipos de baixo grau e alto grau indicando um possível papel nos estádios iniciais da doença.
- A linhagem celular WiDr expressa e secreta três vezes mais HOP e secreta 3 vezes mais vesículas extracelulares contendo HOP do que a linhagem celular HCT8
- O meio condicionado e as vesículas extracelulares derivados da linhagem celular WiDr tem maior potencial de promover migração quando comparado com o meio condicionado proveniente da linhagem celular HCT8.
- As vesículas extracelulares secretadas pela linhagem celular WiDr tem maior potencial indutor de migração do que as vesículas extracelulares provenientes das células HCT8;

- A modulação da proteína VPS4 na linhagem celular WiDr mostrou interferir na secreção e no cargo proteico particularmente de HOP das vesículas extracelulares secretadas, implicando na redução do processo de migração e proliferação
- A modulação da secreção de vesículas pode ser uma estratégia importante no estudo de tumores CCR.

Referências

- Agosta, F., M. Weiler and M. Filippi (2015). "Propagation of Pathology through Brain Networks in Neurodegenerative Diseases: From Molecules to Clinical Phenotypes." CNS Neurosci Ther **21**(10): 754-767.
- Alenquer, M. and M. J. Amorim (2015). "Exosome Biogenesis, Regulation, and Function in Viral Infection." Viruses **7**(9): 5066-5083.
- AmericanCancerSociety's (2014). "Estimate/2014 -American Cancer Society's estimates." <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003096-pdf.pdf>.
- Antonacopoulou, A. G., P. D. Grivas, L. Skarlas, M. Kalofonos, C. D. Scopa and H. P. Kalofonos (2008). "POLR2F, ATP6V0A1 and PRNP expression in colorectal cancer: new molecules with prognostic significance?" Anticancer Res **28**(2B): 1221-1227.
- Antonacopoulou, A. G., M. Palli, S. Marousi, F. I. Dimitrakopoulos, U. Kyriakopoulou, A. C. Tsamandas, C. D. Scopa, A. G. Papavassiliou and H. P. Kalofonos (2010). "Prion protein expression and the M129V polymorphism of the PRNP gene in patients with colorectal cancer." Mol Carcinog **49**(7): 693-699.
- Arantes, C., R. Nomizo, M. H. Lopes, G. N. Hajj, F. R. Lima and V. R. Martins (2009). "Prion protein and its ligand stress inducible protein 1 regulate astrocyte development." Glia **57**(13): 1439-1449.
- Arruda-Carvalho, M., B. Njaine, M. S. Silveira, R. Linden and L. B. Chiarini (2007). "Hop/STI1 modulates retinal proliferation and cell death independent of PrPC." Biochem Biophys Res Commun **361**(2): 474-480.
- Bae, G. Y., S. J. Choi, J. S. Lee, J. Jo, J. Lee, J. Kim and H. J. Cha (2013). "Loss of E-cadherin activates EGFR-MEK/ERK signaling, which promotes invasion via the ZEB1/MMP2 axis in non-small cell lung cancer." Oncotarget **4**(12): 2512-2522.
- Barbieri, G., S. Palumbo, K. Gabrusiewicz, A. Azzalin, N. Marchesi, A. Spedito, M. Biggiogera, E. Sbalchiero, G. Mazzini, C. Miracco, L. Pirtoli, B. Kaminska and S. Comincini (2011). "Silencing of cellular prion protein (PrPC) expression by DNA-antisense oligonucleotides induces autophagy-dependent cell death in glioma cells." Autophagy **7**(8): 840-853.
- Barbosa, L. A., L. Goto-Silva, P. A. Redondo, S. Oliveira, G. Montesano, W. De Souza and J. A. Morgado-Díaz (2003). "TPA-induced signal transduction: a link between PKC and EGFR signaling modulates the assembly of intercellular junctions in Caco-2 cells." Cell Tissue Res **312**(3): 319-331.
- Benson, A. B., 3rd (2007). "Epidemiology, disease progression, and economic burden of colorectal cancer." J Manag Care Pharm **13**(6 Suppl C): S5-18.
- Beraldo, F. H., I. N. Soares, D. F. Goncalves, J. Fan, A. A. Thomas, T. G. Santos, A. H. Mohammad, M. Roffé, M. D. Calder, S. Nikolova, G. N. Hajj, A. L.

Guimaraes, A. R. Massensini, I. Welch, D. H. Betts, R. Gros, M. Drangova, A. J. Watson, R. Bartha, V. F. Prado, V. R. Martins and M. A. Prado (2013). "Stress-inducible phosphoprotein 1 has unique cochaperone activity during development and regulates cellular response to ischemia via the prion protein." FASEB J **27**(9): 3594-3607.

Blatch, G. L., M. Lassle, B. R. Zetter and V. Kundra (1997). "Isolation of a mouse cDNA encoding mSTI1, a stress-inducible protein containing the TPR motif." Gene **194**(2): 277-282.

Bobrie, A., M. Colombo, G. Raposo and C. Théry (2011). "Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses." Traffic **12**(12): 1659-1668.

Brown, D. R. and A. Besinger (1998). "Prion protein expression and superoxide desmutase activity." Biochem J **334**(423-429).

Caetano, F. A., F. H. Beraldo, G. N. Hajj, A. L. Guimaraes, S. Jurgensen, A. P. Wasilewska-Sampaio, P. H. Hirata, I. Souza, C. F. Machado, D. Y. Wong, F. G. De Felice, S. T. Ferreira, V. F. Prado, R. J. Rylett, V. R. Martins and M. A. Prado (2011). "Amyloid-beta oligomers increase the localization of prion protein at the cell surface." J Neurochem **117**(3): 538-553.

Cancer, I. N. d. (2014) "Estimativa | 2014 Incidência de Câncer no Brasil."

Caughey, B., R. E. Race, D. Ernest, M. J. Buchmeier and B. Chesebro (1989). "Prion Protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma." J Virol **63**: 175-181.

Chahar, H. S., X. Bao and A. Casola (2015). "Exosomes and Their Role in the Life Cycle and Pathogenesis of RNA Viruses." Viruses **7**(6): 3204-3225.

Cheng, Y., L. Tao, J. Xu, Q. Li, J. Yu, Y. Jin, Q. Chen, Z. Xu, Q. Zou and X. Liu (2014). "CD44/cellular prion protein interact in multidrug resistant breast cancer cells and correlate with responses to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients." Mol Carcinog **53**(9): 686-697.

Chiarini, L. B., A. R. Freitas, S. M. Zanata, R. R. Brentani, V. R. Martins and R. Linden (2002). "Cellular prion protein transduces neuroprotective signals." EMBO J **21**(13): 3317-3326.

Chieng, C. K. and Y. H. Say (2015). "Cellular prion protein contributes to LS 174T colon cancer cell carcinogenesis by increasing invasiveness and resistance against doxorubicin-induced apoptosis." Tumour Biol.

Coitinho, A. S., M. O. Dietrich, A. Hoffmann, O. P. Dall'Igna, D. O. Souza, V. R. Martins, R. R. Brentani, I. Izquierdo and D. R. Lara (2002). "Decreased hyperlocomotion induced by MK-801, but not amphetamine and caffeine in mice lacking cellular prion protein (PrP(C))." Brain Res Mol Brain Res **107**(2): 190-194.

Coitinho, A. S., A. R. Freitas, M. H. Lopes, G. N. Hajj, R. Roesler, R. Walz, J. I. Rossato, M. Cammarota, I. Izquierdo, V. R. Martins and R. R. Brentani (2006).

"The interaction between prion protein and laminin modulates memory consolidation." Eur J Neurosci **24**(11): 3255-3264.

Colling, S. B., M. Khana, J. Collinge and J. G. Jefferys (1997). "Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice." Brain Res **755**(1): 28-35.

Collinge, J., M. A. Whittington, K. C. Sidle, C. J. Smith, M. S. Palmer, A. R. Clarke and J. G. Jefferys (1994). "Prion protein is necessary for normal synaptic function." Nature **370**(6487): 295-297.

Colombo, M., G. Raposo and C. Théry (2014). "Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles." Annu Rev Cell Dev Biol **30**: 255-289.

Costa-Silva, B. (2011). "Relevância Funcional Das Proteínas Prion Celular e STI1/HOP em Tumores de Cólon, Pâncreas e Melanomas

" Tese (Doutorado)- Fundação Antônio Prudente: 104.

De Smedt, L., S. Palmans and X. Sagaert (2015). "Tumour budding in colorectal cancer: what do we know and what can we do?" Virchows Arch.

de Wit, M., C. R. Jimenez, B. Carvalho, J. A. Belien, P. M. Delis-van Diemen, S. Mongera, S. R. Piersma, M. Vikas, S. Navani, F. Pontén, G. A. Meijer and R. J. Fijneman (2012). "Cell surface proteomics identifies glucose transporter type 1 and prion protein as candidate biomarkers for colorectal adenoma-to-carcinoma progression." Gut **61**(6): 855-864.

Diamandis, E. P. (2004). "Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool: opportunities and potential limitations." Mol Cell Proteomics **3**(4): 367-378.

Ellis, V., M. Daniels, R. Misra and D. R. Brown (2002). "Plasminogen activation is stimulated by prion protein and regulated in a copper-dependent manner." Biochemistry **41**(22): 6891-6896.

Entschladen, F., T. L. Drell, K. Lang, K. Masur, D. Palm, P. Bastian, B. Niggemann and K. S. Zaenker (2005). "Analysis methods of human cell migration." Exp Cell Res **307**(2): 418-426.

Erlich, R. B., S. A. Kahn, F. R. Lima, A. G. Muras, R. A. Martins, R. Linden, L. B. Chiarini, V. R. Martins and V. Moura Neto (2007). "STI1 promotes glioma proliferation through MAPK and PI3K pathways." Glia **55**(16): 1690-1698.

Eustace, B. K. and D. G. Jay (2004). "Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90." Cell Cycle **3**(9): 1098-1100.

Fearnhead, N. S., M. P. Britton and W. F. Bodmer (2001). "The ABC of APC." Hum Mol Genet **10**(7): 721-733.

Fodde, R., R. Smits and H. Clevers (2001). "APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer." Nat Rev Cancer **1**(1): 55-67.

Fonseca, A. C., L. Romão, R. F. Amaral, S. Assad Kahn, D. Lobo, S. Martins, J. Marcondes de Souza, V. Moura-Neto and F. R. Lima (2012). "Microglial stress inducible protein 1 promotes proliferation and migration in human glioblastoma cells." Neuroscience **200**: 130-141.

Fournier, J. G., F. Escaig-Haye and T. Billette De Villemeur (1998). "Distribution and submicroscopic immunogold localization of cellular prion protein (PrPC) in extracerebral tissues." Cell Tissue Res **292**: 77-84.

Fuchs, S. Y., A. V. Ougolkov, V. S. Spiegelman and T. Minamoto (2005). "Oncogenic beta-catenin signaling networks in colorectal cancer." Cell Cycle **4**(11): 1522-1539.

Gabus, C., E. Derrington, P. Leblanc, J. Chnaiderman, D. Dormont, W. Swietnicki, M. Morillas, W. K. Surewicz, D. Marc, P. Nandi and J. L. Darlix (2001). "The prion protein has RNA binding and chaperoning properties characteristic of nucleocapsid protein NCP7 of HIV-1." J Biol Chem **276**(22): 19301-19309.

Ganapathy, V., P. V. Moghe and C. M. Roth (2015). "Targeting tumor metastases: Drug delivery mechanisms and technologies." J Control Release **219**: 215-223.

Garcia-Anguita, A., A. Kakourou and K. K. Tsilidis (2015). "Biomarkers of Inflammation and Immune Function and Risk of Colorectal Cancer." Curr Colorectal Cancer Rep **11**(5): 250-258.

Gloushankova, N. A. (2008). "Changes in regulation of cell-cell adhesion during tumor transformation." Biochemistry (Mosc) **73**(7): 742-750.

Graner, E., A. F. Mercadante, S. M. Zanata, O. V. Forlenza, A. L. Cabral, S. S. Veiga, M. A. Juliano, R. Roesler, R. Walz, A. Minetti, I. Izquierdo, V. R. Martins and R. R. Brentani (2000). "Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis." Brain Res Mol Brain Res **76**(1): 85-92.

Graner, E., A. F. Mercadante, S. M. Zanata, V. R. Martins, D. G. Jay and R. R. Brentani (2000). "Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein." FEBS Lett **482**(3): 257-260.

Hajj, G. N. (2013). The unconventional secretion of stress-inducible protein 1 by a heterogeneous population of extracellular vesicles *Cell. Mol. Life Sci.*

Hajj, G. N., C. P. Arantes, M. V. Dias, M. Roffé, B. Costa-Silva, M. H. Lopes, I. Porto-Carreiro, T. Rabachini, F. R. Lima, F. H. Beraldo, M. A. Prado, M. M. Prado, R. Linden and V. R. Martins (2013). "The unconventional secretion of stress-inducible protein 1 by a heterogeneous population of extracellular vesicles." Cell Mol Life Sci **70**(17): 3211-3227.

Hajj, G. N., M. H. Lopes, A. F. Mercadante, S. S. Veiga, R. B. da Silveira, T. G. Santos, K. C. Ribeiro, M. A. Juliano, S. G. Jacchieri, S. M. Zanata and V. R.

Martins (2007). "Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins." J Cell Sci **120**(Pt 11): 1915-1926.

Hanson, P. I., R. Roth, Y. Lin and J. E. Heuser (2008). "Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments." J Cell Biol **180**(2): 389-402.

Horiuchi, M., N. Yamazaki, T. Ikeda, N. Ishiguro and M. Shinagawa (1995). "A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neural tissues of sheep." J Gen Virol **76**(2583-2587).

Huang, L., A. M. Xu and W. Liu (2015). "Transglutaminase 2 in cancer." Am J Cancer Res **5**(9): 2756-2776.

HUNTER, N. (1997). "PrP genetics in sheep and the implications for scrapie and BSE." Trends in Microbiology **5**(8): 331-334

INCA (2014) "Estimativa | 2014 Incidência de Câncer no Brasil ".

Janowska-Wieczorek, A., M. Wysoczynski, J. Kijowski, L. Marquez-Curtis, B. Machalinski, J. Ratajczak and M. Z. Ratajczak (2005). "Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer." Int J Cancer **113**(5): 752-760.

Jeanes, A., C. J. Gottardi and A. S. Yap (2008). "Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression?" Oncogene **27**(55): 6920-6929.

Jiang, H., Z. Li, X. Li and J. Xia (2015). "Intercellular transfer of messenger RNAs in multiorgan tumorigenesis by tumor cell-derived exosomes." Mol Med Rep **11**(6): 4657-4663.

Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." J Clin Invest **119**(6): 1420-1428.

Kashfi, S. M., M. Golmohammadi, F. Behboudi Farahbakhsh, E. Nazemalhosseini Mojarad, P. Azimzadeh, M. Norouzinia, M. Montazer Haghighi, Z. Akbari, B. Damavand, M. Molaei, F. Anaraki, H. Asadzadeh Aghdaei and M. R. Zali (2015). "Novel Missense Mutation at Codon 2774 (C.8321 G>A) p.S2774N of APC Gene in a Denovo Case of Familial Adenomatous Polyposis." Arch Iran Med **18**(7): 446-449.

Keerthikumar, S., D. Chisanga, D. Ariyaratne, H. Al Saffar, S. Anand, K. Zhao, M. Samuel, M. Pathan, M. Jois, N. Chilamkurti, L. Gangoda and S. Mathivanan (2015). "ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo." J Mol Biol.

Kim, S., H. Cho, E. J. Nam, S. W. Kim, Y. T. Kim, Y. W. Park, B. W. Kim and J. H. Kim (2010). "Autoantibodies against stress-induced phosphoprotein-1 as a novel biomarker candidate for ovarian cancer." Genes Chromosomes Cancer **49**(7): 585-595.

Kitisin, K. and L. Mishra (2006). "Molecular biology of colorectal cancer: new targets." Semin Oncol. **334-23**: 1.

- Konsavage, W. M. and G. S. Yochum (2014). "The myc 3' wnt-responsive element suppresses colonic tumorigenesis." Mol Cell Biol **34**(9): 1659-1669.
- Koumangoye, R. B., A. M. Sakwe, J. S. Goodwin, T. Patel and J. Ochieng (2011). "Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes which subsequently mediate cellular adhesion and spreading." PLoS One **6**(9): e24234.
- Kubota, H., S. Yamamoto, E. Itoh, Y. Abe, A. Nakamura, Y. Izumi, H. Okada, M. Iida, H. Nanjo, H. Itoh and Y. Yamamoto (2010). "Increased expression of co-chaperone HOP with HSP90 and HSC70 and complex formation in human colonic carcinoma." Cell Stress Chaperones **15**(6): 1003-1011.
- Kubota, H., S. Yamamoto and E. Itoh (2010). "Increased expression of co-chaperone Hop with HSP90 and HSP70 and complex formation in human colonic carcinoma." Cell Stress Chaperones **15**: 1003-1011.
- Lassle, M., G. L. Blatch, V. Kundra, T. Takatori and B. R. Zetter (1997). "Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases." J Biol Chem **272**(3): 1876-1884.
- Li, C., W. Xin and M. S. Sy (2010). "Binding of pro-prion to filamin A: by design or an unfortunate blunder." Oncogene **29**(39): 5329-5345.
- Li, C., S. Yu, F. Nakamura, O. T. Pentikäinen, N. Singh, S. Yin, W. Xin and M. S. Sy (2010). "Pro-prion binds filamin A, facilitating its interaction with integrin beta1, and contributes to melanomagenesis." J Biol Chem **285**(39): 30328-30339.
- Li, Q. Q., Y. P. Sun, C. P. Ruan, X. Y. Xu, J. H. Ge, J. He, Z. D. Xu, Q. Wang and W. C. Gao (2011). "Cellular prion protein promotes glucose uptake through the Fyn-HIF-2 α -Glut1 pathway to support colorectal cancer cell survival." Cancer Sci **102**(2): 400-406.
- Liao, Y. C., N. T. Chen, Y. P. Shih, Y. Dong and S. H. Lo (2009). "Up-regulation of C-terminal tensin-like molecule promotes the tumorigenicity of colon cancer through beta-catenin." Cancer Res **69**(11): 4563-4566.
- Liberali, P., P. Rämö and L. Pelkmans (2008). "Protein kinases: starting a molecular systems view of endocytosis." Annu Rev Cell Dev Biol **24**: 501-523.
- Lin, B. R., Y. L. Lin, H. S. Lai, P. H. Lee, K. J. Chang and J. T. Liang (2015). "Overall Survival of Stage III Colon Cancer with Only One Lymph Node Metastasis Is Independently Predicted by Preoperative Carcinoembryonic Antigen Level and Lymph Node Sampling Status." PLoS One **10**(9): e0137053.
- Lin, H. H., X. Li, J. L. Chen, X. Sun, F. N. Cooper, Y. R. Chen, W. Zhang, Y. Chung, A. Li, C. T. Cheng, L. Yang, X. Deng, X. Liu, Y. Yen, D. L. Johnson, H. M. Shih, A. Yang and D. K. Ann (2012). "Identification of an AAA ATPase VPS4B-dependent pathway that modulates epidermal growth factor receptor abundance and signaling during hypoxia." Mol Cell Biol **32**(6): 1124-1138.

Linden, R., V. R. Martins, M. A. Prado, M. Cammarota, I. Izquierdo and R. R. Brentani (2008). "Physiology of the prion protein." Physiol Rev **88**: 673-728.

Lintoiu-Ursut, B., A. Tulin and S. Constantinoiu (2015). "Recurrence after hepatic resection in colorectal cancer liver metastasis -Review article." J Med Life **8 Spec Issue**: 12-14.

Longshaw, V. M., H. W. Dirr, G. L. Blatch and M. Lassle (2000). "The in vitro phosphorylation of the co-chaperone mSTI1 by cell cycle kinases substantiates a predicted casein kinase II-p34cdc2-NLS (CcN) motif." Biol Chem **381**(11): 1133-1138.

Lopes, M. H., G. N. Hajj, A. G. Muras, G. L. Mancini, R. M. Castro, K. C. Ribeiro, R. R. Brentani, R. Linden and V. R. Martins (2005). "Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways." J Neurosci **25**(49): 11330-11339.

Lopes, M. H., T. G. Santos, B. R. Rodrigues, N. Queiroz-Hazarbassanov, I. W. Cunha, A. P. Wasilewska-Sampaio, B. Costa-Silva, F. A. Marchi, L. F. Bleggi-Torres, P. I. Sanematsu, S. H. Suzuki, S. M. Oba-Shinjo, S. K. Marie, E. Toulmin, A. F. Hill and V. R. Martins (2014). "Disruption of prion protein-HOP engagement impairs glioblastoma growth and cognitive decline and improves overall survival." Oncogene.

Mandelblatt, J., H. Andrews, R. Kao, R. Wallace and J. Kerner (1996). "The late-stage diagnosis of colorectal cancer: demographic and socioeconomic factors." Am J Public Health **86**(12): 1794-1797.

Mannavola, F., M. Tucci, C. Felici, S. Stucci and F. Silvestris (2016). "miRNAs in melanoma: a defined role in tumor progression and metastasis." Expert Rev Clin Immunol **12**(1): 79-89.

Manson, J., J. D. West, V. Thomson and J. Hope (1992). "The prion protein gene: role in mouse embryogenesis?" Development **115**(117-122).

Martins, V. R., M. S. Dias and P. Hainaut (2013). "Tumor-cell-derived microvesicles as carriers of molecular information in cancer." Curr Opin Oncol **25**(1): 66-75.

Martins, V. R., E. Graner, J. Garcia-Abreu, S. J. de Souza, A. F. Mercadante, S. S. Veiga, S. M. Zanata, V. M. Neto and R. R. Brentani (1997). "Complementary hydropathy identifies a cellular prion protein receptor." Nat Med **3**(12): 1376-1382.

Mathivanan, S., J. W. Lim, B. J. Tauro, H. Ji, R. L. Moritz and R. J. Simpson (2010). "Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature." Mol Cell Proteomics **9**(2): 197-208.

Mattissek, C. and D. Teis (2014). "The role of the endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) in tumorigenesis." Mol Membr Biol **31**(4): 111-119.

Mays, C. E., J. van der Merwe, C. Kim, T. Haldiman, D. McKenzie, J. G. Safar and D. Westaway (2015). "Prion Infectivity Plateaus and Conversion to Symptomatic Disease Originate from Falling Precursor Levels and Increased Levels of Oligomeric PrP^{Sc} Species." J Virol **89**(24): 12418-12426.

McCready, J., J. D. Sims, D. Chan and D. G. Jay (2010). "Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation." BMC Cancer **10**: 294.

McEwan, J. F., M. L. Windsor and S. D. Cullis-Hill (2009). "Antibodies to prion protein inhibit human colon cancer cell growth." Tumour Biol **30**(3): 141-147.

Meggio, F., A. Negro, S. Sarno, M. Ruzzene, A. Bertoli, M. C. Sorgato and L. A. Pinna (2000). "Bovine prion protein as a modulator of protein kinase CK2." Biochem J **352 Pt 1**: 191-196.

Mehrpour, M. and P. Codogno (2010). "Prion protein: From physiology to cancer biology." Cancer Lett **290**(1): 1-23.

Meslin, F., A. Hamaï, P. Gao, A. Jalil, N. Cahuzac, S. Chouaib and M. Mehrpour (2007). "Silencing of prion protein sensitizes breast adriamycin-resistant carcinoma cells to TRAIL-mediated cell death." Cancer Res **67**(22): 10910-10919.

Michor, F., Y. Iwasa, C. Lengauer and M. A. Nowak (2005). "Dynamics of colorectal cancer." Semin Cancer Biol **15**(6): 484-493.

Mouradov, D., E. Domingo, P. Gibbs, R. N. Jorissen, S. Li, P. Y. Soo, L. Lipton, J. Desai, H. E. Danielsen, D. Oukrif, M. Novelli, C. Yau, C. C. Holmes, I. T. Jones, S. McLaughlin, P. Molloy, N. J. Hawkins, R. Ward, R. Midgely, D. Kerr, I. P. Tomlinson and O. M. Sieber (2013). "Survival in stage II/III colorectal cancer is independently predicted by chromosomal and microsatellite instability, but not by specific driver mutations." Am J Gastroenterol **108**(11): 1785-1793.

Murray, G. I., C. M. Telfer and W. T. Melvin (2006). Markers for colorectal cancer. United States Patent Application Publication. United States. **US 2006/0188883 A1**: 1-20.

Nickel, W. and C. Rabouille (2009). "Mechanisms of regulated unconventional protein secretion." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(2): 148-155.

Pan Y , Zhao L , Liang J , Liu J , Shi Y , Liu N , Zhang G , Jin H , J. Gao, X. H. , Wang J , Liu Z and D. Fan Cellular prion protein promotes invasion and metastasis of gastric cancer.

Pan, Y., L. Zhao, J. Liang, J. Liu, Y. Shi, N. Liu, G. Zhang, H. Jin, J. Gao, H. Xie, J. Wang, Z. Liu and D. Fan (2006). "Cellular prion protein promotes invasion and metastasis of gastric cancer." FASEB J **20**(11): 1886-1888.

Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay and P. Pisani (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J. Clin. **55**: 74-108.

Pavlou, M. P. and E. P. Diamandis (2010). "The cancer cell secretome: a good source for discovering biomarkers?" J Proteomics **73**(10): 1896-1906.

Peinado, H., M. Alečković, S. Lavotshkin, I. Matei, B. Costa-Silva, G. Moreno-Bueno, M. Hergueta-Redondo, C. Williams, G. García-Santos, C. Ghajar, A. Nitadori-Hoshino, C. Hoffman, K. Badal, B. A. Garcia, M. K. Callahan, J. Yuan, V. R. Martins, J. Skog, R. N. Kaplan, M. S. Brady, J. D. Wolchok, P. B. Chapman, Y. Kang, J. Bromberg and D. Lyden (2012). "Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET." Nat Med **18**(6): 883-891.

Penforis, P., K. C. Vallabhaneni, J. Whitt and R. Pochampally (2016). "Extracellular vesicles as carriers of microRNA, proteins and lipids in tumor microenvironment." Int J Cancer **138**(1): 14-21.

Peters, U., S. Bien and N. Zubair (2015). "Genetic architecture of colorectal cancer." Gut **64**(10): 1623-1636.

Prusiner, S. B. (1991). "Molecular biology of prion diseases." Science **252**: 1515-1522.

Qu, J. L., X. J. Qu, M. F. Zhao, Y. E. Teng, Y. Zhang, K. Z. Hou, Y. H. Jiang, X. H. Yang and Y. P. Liu (2009). "Gastric cancer exosomes promote tumour cell proliferation through PI3K/Akt and MAPK/ERK activation." Dig Liver Dis **41**(12): 875-880.

Radovanovic, I., N. Braun, O. T. Giger, K. Mertz, G. Miele, M. Prinz, B. Navarro and A. Aguzzi (2005). "Truncated prion protein and Doppel are myelinotoxic in the absence of oligodendrocytic PrPC." J Neurosci **25**(19): 4879-4888.

Resenberger, U. K., A. Harmeier, A. C. Woerner, J. L. Goodman, V. Müller, R. Krishnan, R. M. Vabulas, H. A. Kretzschmar, S. Lindquist, F. U. Hartl, G. Multhaup, K. F. Winklhofer and J. Tatzelt (2011). "The cellular prion protein mediates neurotoxic signalling of β -sheet-rich conformers independent of prion replication." EMBO J **30**(10): 2057-2070.

Ribeiro, M. F., H. Zhu, R. W. Millard and G. C. Fan (2013). "Exosomes Function in Pro- and Anti-Angiogenesis." Curr Angiogenesis **2**(1): 54-59.

Rodríguez-Rigueiro, T., M. Valladares-Ayerbes, M. Haz-Conde, L. A. Aparicio and A. Figueroa (2011). "Hakai reduces cell-substratum adhesion and increases epithelial cell invasion." BMC Cancer **11**: 474.

Roesler, R., R. Walz, J. Quevedo, F. de-Paris, S. M. Zanata, E. Graner, I. Izquierdo, V. R. Martins and R. R. Brentani (1999). "Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C)." Brain Res Mol Brain Res **71**(2): 349-353.

Rowley, P. T. (2005). "Inherited susceptibility to colorectal cancer." Annu Rev Med **56**: 539-554.

Ruckova, E., P. Muller, R. Nenutil and B. Vojtesek (2012). "Alterations of the Hsp70/Hsp90 chaperone and the HOP/CHIP co-chaperone system in cancer." Cell Mol Biol Lett **17**(3): 446-458.

Sancho, E., E. Batlle and H. Clevers (2004). "Signaling pathways in intestinal development and cancer." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 695-723.

Santos, T. G., M. H. Lopes and V. R. Martins (2015). "Targeting prion protein interactions in cancer." Prion **9**(3): 165-173.

Santos, T. G., I. R. Silva, B. Costa-Silva, A. P. Lepique, V. R. Martins and M. H. Lopes (2011). "Enhanced neural progenitor/stem cells self-renewal via the interaction of stress-inducible protein 1 with the prion protein." Stem Cells **29**(7): 1126-1136.

Santuccione, A., V. Sytnyk, I. Leshchyns'ka and M. Schachner (2005). "Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth." J Cell Biol **169**(2): 341-354.

Scheufler, C., A. Brinker, G. Bourenkov, S. Pegoraro, L. Moroder, H. Bartunik, F. U. Hartl and I. Moarefi (2000). "Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine." Cell **101**(2): 199-210.

Shimada, K., T. Ishikawa, F. Nakamura, D. Shimizu, T. Chishima, Y. Ichikawa, T. Sasaki, I. Endo, Y. Nagashima and Y. Goshima (2014). "Collapsin response mediator protein 2 is involved in regulating breast cancer progression." Breast Cancer **21**(6): 715-723.

Shmerling, D., I. Hegyi, M. Fischer, T. Blattler, S. Brandner, J. Gotz, T. Rulicke, E. Flechsig, A. Cozzio, C. von Mering, C. Hangartner, A. Aguzzi and C. Weissmann (1998). "Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions." Cell **93**(2): 203-214.

Smalheiser, N. R. (2007). "Exosomal transfer of proteins and RNAs at synapses in the nervous system." Biol Direct **2**: 35.

Snow, A. K., T. M. Tuohy, N. R. Sargent, L. J. Smith, R. W. Burt and D. W. Neklason (2014). "APC promoter 1B deletion in seven American families with familial adenomatous polyposis." Clin Genet.

Song, Y. and D. C. Masison (2005). "Independent regulation of HSP70 and HSP90 chaperones by HSP70/HSP90-organizing protein STI1 (HOP1)." J Biol Chem **280**: 34178-34185.

Soung, Y. H., T. Nguyen, H. Cao, J. Lee and J. Chung (2015). "Emerging roles of exosomes in cancer invasion and metastasis." BMB Rep.

Svensson, K. J., P. Kucharzewska, H. C. Christianson, S. Sköld, T. Löfstedt, M. C. Johansson, M. Mörgelin, J. Bengzon, W. Ruf and M. Belting (2011). "Hypoxia triggers a proangiogenic pathway involving cancer cell microvesicles and PAR-2-

mediated heparin-binding EGF signaling in endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(32): 13147-13152.

Sy, M. S., C. Li, S. Yu and W. Xin (2010). "The fatal attraction between pro-prion and filamin A: prion as a marker in human cancers." Biomark Med **4**(3): 453-464.

Taylor, D. D., S. Atay, D. S. Metzinger and C. Gercel-Taylor (2010). "Characterization of humoral responses of ovarian cancer patients: antibody subclasses and antigenic components." Gynecol Oncol **116**(2): 213-221.

Taylor, D. D. and C. Gercel-Taylor (2011). "Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments." Semin Immunopathol **33**(5): 441-454.

Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." Nat Rev Cancer **2**(6): 442-454.

Tobler, I., S. E. Gaus, T. Deboer, P. Achermann, M. Fischer, T. Rulicke, M. Moser, B. Oesch, P. A. McBride and J. C. Manson (1996). "Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein." Nature **380**(6575): 639-642.

Tominaga, N., Y. Yoshioka and T. Ochiya (2015). "A novel platform for cancer therapy using extracellular vesicles." Adv Drug Deliv Rev **95**: 50-55.

Tsai, C. L., C. N. Tsai, C. Y. Lin, H. W. Chen, Y. S. Lee, A. Chao, T. H. Wang, H. S. Wang and C. H. Lai (2012). "Secreted stress-induced phosphoprotein 1 activates the ALK2-SMAD signaling pathways and promotes cell proliferation of ovarian cancer cells." Cell Rep **2**(2): 283-293.

Tu, C., G. Ahmad, B. Mohapatra, S. Bhattacharyya, C. F. Ortega-Cava, B. M. Chung, K. U. Wagner, S. M. Raja, M. Naramura, V. Band and H. Band (2011). "ESCRT proteins: Double-edged regulators of cellular signaling." Bioarchitecture **1**(1): 45-48.

Tu, C., C. F. Ortega-Cava, P. Winograd, M. J. Stanton, A. L. Reddi, I. Dodge, R. Arya, M. Dimri, R. J. Clubb, M. Naramura, K. U. Wagner, V. Band and H. Band (2010). "Endosomal-sorting complexes required for transport (ESCRT) pathway-dependent endosomal traffic regulates the localization of active Src at focal adhesions." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(37): 16107-16112.

Van den Brandt, P. A. and R. A. Goldbohm (2006). "Nutrition in the prevention of gastrointestinal cancer." Best Pract Res Clin Gastroenterol **20**(3): 589-603.

Walsh, N., A. Larkin, N. Swan, K. Conlon, P. Dowling, R. McDermott and M. Clynes (2011). "RNAi knockdown of Hop (Hsp70/Hsp90 organising protein) decreases invasion via MMP-2 down regulation." Cancer Lett **306**(2): 180-189.

Walsh, N., N. O'Donovan, S. Kennedy, M. Henry, P. Meleady, M. Clynes and P. Dowling (2009). "Identification of pancreatic cancer invasion-related proteins by proteomic analysis." Proteome Sci **7**: 3.

Wang, H., Y. Ye, S. Y. Pan, G. Y. Zhu, Y. W. Li, D. W. Fong and Z. L. Yu (2011). "Proteomic identification of proteins involved in the anticancer activities of oridonin in HepG2 cells." Phytomedicine **18**(2-3): 163-169.

Wang, J. H., J. P. Du, Y. H. Zhang, X. J. Zhao, R. Y. Fan, Z. H. Wang, Z. T. Wu and Y. Han (2011). "Dynamic changes and surveillance function of prion protein expression in gastric cancer drug resistance." World J Gastroenterol **17**(35): 3986-3993.

Wang, Q., J. Qian, F. Wang and Z. Ma (2012). "Cellular prion protein accelerates colorectal cancer metastasis via the Fyn-SP1-SATB1 axis." Oncol Rep **28**(6): 2029-2034.

Wang, T. H., A. Chao and C. L. Tsai (2010). "Stress-induced phosphoprotein 1 as a secreted biomarker for human ovarian cancer promotes cancer cell proliferation." Mol Cell Proteomics **9**: 1873-1884.

Wang, T. H., A. Chao, C. L. Tsai, C. L. Chang, S. H. Chen, Y. S. Lee, J. K. Chen, Y. J. Lin, P. Y. Chang, C. J. Wang, A. S. Chao, S. D. Chang, T. C. Chang, C. H. Lai and H. S. Wang (2010). "Stress-induced phosphoprotein 1 as a secreted biomarker for human ovarian cancer promotes cancer cell proliferation." Mol Cell Proteomics **9**(9): 1873-1884.

WU, C. C., H. C. Chen and S. J. Chen (2008). "Identification of collapsin response mediator protein-2 as a potential marker of colorectal carcinoma by comparative analysis of cancer cell secretome approach." J Proteome Res **8**: 316-332.

Yehiely, F., P. Bamborough and M. Da Costa (1997). "Identification of candidate proteins binding to prion protein." Neurobiol Dis **3**: 339-355.

Yoshida, K., S. Kanaoka, T. Takai, T. Uezato, N. Miura, M. Kajimura and A. Hishida (2005). "EGF rapidly translocates tight junction proteins from the cytoplasm to the cell-cell contact via protein kinase C activation in TMK-1 gastric cancer cells." Exp Cell Res **309**(2): 397-409.

Yu, G., L. Jiang, Y. Xu, H. Guo, H. Liu, Y. Zhang, H. Yang, C. Yuan and J. Ma (2012). "Silencing prion protein in MDA-MB-435 breast cancer cells leads to pleiotropic cellular responses to cytotoxic stimuli." PLoS One **7**(11): e48146.

Yu, S., H. Cao, B. Shen and J. Feng (2015). "Tumor-derived exosomes in cancer progression and treatment failure." Oncotarget **6**(35): 37151-37168.

Zanata, S. M., M. H. Lopes, A. F. Mercadante, G. N. Hajj, L. B. Chiarini, R. Nomizo, A. R. Freitas, A. L. Cabral, K. S. Lee, M. A. Juliano, E. de Oliveira, S. G. Jachieri, A. Burlingame, L. Huang, R. Linden, R. R. Brentani and V. R. Martins (2002). "Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection." EMBO J **21**(13): 3307-3316.

Zhou, L., Y. Shang, C. Liu, J. Li, H. Hu, C. Liang, Y. Han, W. Zhang, J. Liang and K. Wu (2014). "Overexpression of PrPc, combined with MGr1-Ag/37LRP, is predictive of poor prognosis in gastric cancer." Int J Cancer **135**(10): 2329-2337.

Anexos

Anexo I Artigo Intitulado: *“Prion protein binding to HOP modulates the migration and invasion of colorectal cancer cells”*.

Prion protein binding to HOP modulates the migration and invasion of colorectal cancer cells

Tonielli Cristina Sousa de Lacerda^{1,2}, Bruno Costa-Silva^{1,3}, Fernanda Salgueiredo Giudice¹, Marcos Vinícios Salles Dias¹, Bianca Luise Teixeira¹, Vilma Regina Martins^{1,2}.

1-International Research Center, A.C. Camargo Cancer Center

Rua Taguá, 440 – Liberdade, São Paulo 01508-010, SP, Brazil (T.C.S.L., B.C.S., F.S.G., M.V.S.D., B.L.T, V.R.M.).

2-University of São Paulo (USP), Chemistry Institute - Department of Biochemistry

Av. Prof. Lineu Prestes, 748 - Cidade Universitária, São Paulo 05508-000, SP, Brazil (T.C.S.L., V.R.M.).

3-Children's Cancer and Blood Foundation Laboratories, Departments of Pediatrics, and Cell and Developmental Biology, Drukier Institute for Children's Health, Meyer Cancer Center, Weill Cornell Medical College, New York, New York 10021, USA (B.C.S).

Research Format: Original Article

Running Title: PrP^C-HOP complex and colorectal cancer

Correspondence:

Dr. Vilma Regina Martins

International Research Center – A.C. Camargo Cancer Center

Rua Taguá 440, São Paulo 01508-010, SP, Brazil.

Phone/Fax: 55 11 2189-2935

e-mail: vmartins@cipe.accamargo.org.br

Funding: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2009/14027-2 and 2011/18718-0) and National Institute for Science and Technology in Oncogenomics (INCITO)

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the most frequently diagnosed malignancies. The generation of conventional treatments has improved, but approximately 50% of patients with CRC who undergo potentially curative surgery ultimately relapse and die, usually as a consequence of metastatic disease. Our previous findings showed that engagement of the cellular prion protein (PrP^C) to its ligand HSP70/90 heat shock organizing protein (HOP) induces proliferation of glioblastomas. In addition, PrP^C has been described as an important modulator of colorectal tumor growth. Here, we investigated the biological relevance of the PrP^C-HOP interaction in CRC. We demonstrate that HOP induced the migration and invasion of CRC cell lines in a PrP^C-dependent manner and that phosphorylation of the ERK1/2 pathway is a downstream mediator of these effects. Additionally, we show that a HOP peptide with the ability to bind PrP^C and abolish the PrP^C-HOP interaction inhibited the migration and invasion of CRC cells. Together, these data indicate that the disruption of the PrP^C-HOP complex could be a potential therapeutic target for modulating the migratory and invasive cellular characteristics that lead to metastatic CRC.

Key words: prion protein; HOP protein; colorectal cancer; invasion; migration.

Introduction

Metastasis is responsible for over 90% of all cancer-related deaths. The metastatic cascade is a multistep process involving migration, invasion, and spreading of cancer cells from the primary tumor site to distant organs.[1] The activation of signaling pathways controlling cytoskeletal dynamics, cell-matrix adhesion turnover, chemotaxis, extravasation, and intravasation is critical for successful metastasis [1,2].

Colorectal cancer (CRC) is one of the most commonly diagnosed cancers worldwide. Although the life expectancy of patients with CRC is considered to be high, with an overall five-year survival rate of 64.9%, approximately 50% of patients develop synchronous or metachronous liver metastases [3]. Consequently, the 5-year survival rate of patients with metastatic CRC is less than 10% [4]. Thus, an understanding of the biological mechanisms underlying CRC cell migration, invasion, and dissemination is highly relevant towards the development of new effective treatment strategies.

Recent studies have shown that cellular prion protein (PrP^C), a glycoprotein highly expressed and conserved throughout vertebrates, plays an important role in tumor biology [5-12]. PrP^C has been described as an important player in the metastasis of colon cancer [9], redox-regulation in prostate cancer [12], and invasion and metastasis of gastric tumors [6]. In CRC, the presence of PrP^C has been related to improved glucose uptake and regulation of glycolytic rates through modulation of GLUT1 [13], as well as increased epithelial mesenchymal transition and metastatic potential [9]. Furthermore, tumor xenograft studies in mice showed that tumor volume was significantly reduced when antibodies against PrP^C were administered in combination with chemotherapy treatment compared to chemotherapy alone [14]

PrP^C was also reported to be highly expressed in metastatic gastric cancer compared to non-metastatic tumors [6]. Additionally, PrP^C is implicated as a potential modulator of cancer progression and a negative prognostic factor in glioblastoma, gastric, and colon cancers [5,15,16]. In fact, some studies suggest that rather than merely being associated with tumorigenesis through expression alone, PrP^C-organized protein complexes may actually promote biological effects that drive malignancy. For example, an interaction between PrP^C and CD44 at the plasma membrane was required for cell migration, invasion, and proliferation of breast cancer cells [17]. PrP^C can also interact with other molecules on the cell surface, such as the laminin receptor which regulates cell adhesion and migration [18].

Among several other ligands for PrP^C, our group identified an interaction between PrP^C and the co-chaperone stress-inducible protein 1 (STI1), also known as HSP70/HSP90 organizing protein (HOP) [19]. HOP was initially described in yeast due to its role organizing and modulating the activity of macromolecular complexes such as heat shock protein 70 (HSP70) and HSP90 [20,21]. HOP is predominantly localized in the cytoplasm, but its presence in the nucleus has also been described [22]. Furthermore, HOP can be secreted in a soluble form or can be found associated with extracellular vesicles [23-26].

In addition to its role as a co-chaperone, HOP has also been reported to trigger cellular signals promoting tumor proliferation, invasion, and/or metastasis [26-28]. Moreover, increased expression of HOP in CRC was associated with poor survival of patients [29,30]. High levels of HOP were also detected in other tumors including pancreatic, ovarian, and hepatocellular carcinoma [31-34].

The biological relevance of PrP^C and HOP individually has been described in several tumor types, but the potential importance of their interaction in CRC is still

unknown. The PrP^C-HOP interaction is necessary for modulating the self-renewal and proliferation of neural stem cells and progenitors [35]. Recently, we showed that the PrP^C-HOP complex affects glioblastoma proliferation *in vitro* and *in vivo* through the ERK1/2 pathway, and was associated with a high tumor proliferation rate compared to non-tumor tissue or gliomas grade I-III and poor patient survival. Preclinical studies demonstrated that the impairment of PrP^C-HOP engagement by a HOP peptide that mimics the PrP^C binding site (HOP₂₃₀₋₂₄₅) resulted in decreased proliferation of glioblastoma cells *in vivo* and *in vitro* and a subsequent increase in animal survival, suggesting that this interaction could be exploited as a potential therapeutic target [5].

In this study, we aimed to investigate the role of the PrP^C-HOP complex during the migration and invasion of CRC cells. We addressed that by blocking this complex using a competitive Hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide, anti-PrP^C antibodies or by knocking down PrP^C and evaluate the PrP^C-dependent migration and invasion of CRC cells.

Materials and Methods

Cell lines and culture conditions

Two colorectal adenocarcinoma cell lines, WiDr and HCT8, were purchased from American Type Culture Collection (ATCC[®], Manassas, VA, USA), and routinely maintained in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Carlsbad, CA, USA) and RPMI medium (Gibco, Carlsbad, CA, USA), respectively. Each medium was supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Carlsbad, CA, USA) and 40µg/ml garamycin (Hipolabor Farmacêutica, Belo Horizonte, MG, Brazil). The

cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Immunoblot analyses

Tumor cells were lysed with cell lysis buffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.2% sodium deoxicolate, 0.5% Triton X-100) supplemented with a cocktail of protease inhibitors (Roche, Indianapolis, IN). Protein extracts were resolved on a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Freiburg im Breisgau, Germany). Membranes were blocked (5% skin milk in TBS-T, 1 hour, room temperature) and incubated with PrP^C (1:500, clone 3F4, Covance, Princeton, NJ, EUA), HOP (0.5 ng/μL, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA), Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (1:1000, Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA) and p44/42 MAPK (Erk1/2) (1:1000, Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA) primary antibodies at 4°C overnight. Membranes were then incubated with appropriate secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (1:3000, 1 hour, room temperature - Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) and developed using ECL Western Blot analysis system (Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Tubulin (1:10000, clone B-5-1-2, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as a loading control. Protein levels were quantified using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA) normalized by tubulin levels.

Flow cytometric analysis

Cell cultures were detached with 1x trypsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), washed twice with PBS (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), and suspended in 10% FBS (Gibco, Carlsbad, CA, USA) for 1 h at 37°C in a humidified

atmosphere containing 5% CO₂. Cells were washed twice with PBS (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), blocked with 5% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in PBS (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) for 1 hour at room temperature, and incubated with primary anti-PrP^C antibody (1:100, clone 3F4, Covance, Princeton, NJ, EUA) followed by secondary anti-mouse IgG (H+L) conjugated to Alexa-488 or Alexa-405 antibody (1:200; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) for 40 min each at 4°C. Cells labeled with only secondary antibody served as isotype controls. FACS analyses were performed with FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

In vitro migration and invasion assays

Cell migration and invasion were investigated by Boyden chamber assay (cat.#3422, Corning Costar, Tewksbury, MA, USA). A total of 5×10^4 cells were seeded on the top of Boyden chambers with a non-coated (migration assay) or a matrigel[®]-coated polycarbonate membrane (invasion assay – matrigel[®]: 200 µg/ml, BD Matrigel Matrix High Concentration, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Recombinant HOP (0.5, 2, 5 and 10 µM - purified as described previously) [19,39,44], mutant HOP_{Δ230-245} (5µM - deletion mutant for amino acids 230–245) or FBS (10%, Gibco, Carlsbad, CA, USA) were added into the bottom of the chamber as a chemoattractant.

In some migration and invasion assays, the cells were pre-treated during 2 hours with HOP₂₃₀₋₂₄₅ peptide (5µM, ELGNDAYKKKDFDTAL, GenScript, Piscataway, NJ, USA), HOP₆₁₋₇₆ peptide (5µM, GCKTVDLKPDWGKGYS, GenScript, Piscataway, NJ, USA), anti-PrP^C antibody (13 ng/ml) [19], non-immune control IgG (13 ng/ml)

[19], MAPK (ERK1/2) inhibitor (U0126, 10 μ M, Calbiochem, San Diego, CA, USA) or DMSO (0.1%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

After incubation for 24 hours, cells on the lower surface of the membrane were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:500, BioChemica, Billingham, Stockton-on-Tees, UK). Cells on the upper chamber were mechanically removed with cotton swabs. The images of cells that migrated or invaded were captured with a 20x objective (Nikon TE2000-U fluorescence microscope, Tokyo, Japan) and were analyzed with ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

RNA interference

Infection was performed using the lentiviral shRNA SmartChoice system (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). 1x10⁴ cells were plated in complete medium in a 96-well plate and infected with sh07-011101-01, sh07-011101-02, sh07-011101-03 sequences (shRNA-PrP^C) and a non-target sequence s0700500001 (shRNA NT), both at MOI 20. After 72 hours of infection, cells were selected with Puromycin (1 μ g/ml, Gibco, Grand Island, NY, USA) for 7 days.

Immunofluorescence

WiDr shRNA-PrP^C-3 and WiDr shRNA-NT (2x10⁴) cells were plated in coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature and washed with PBS (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Cells were blocked with 5% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in PBS (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) for 1 hour at room temperature, and incubated with anti-PrP^C (1:100, clone 3F4, Covance, Princeton, NJ, EUA) followed

by anti-mouse IgG (H+L) conjugated to Alexa-488 (1:200; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI - BioChemica, Billingham, Stockton-on-Tees, UK) for 1 hour at room temperature. Coverslips were mounted using Fluor-Save reagent (Calbiochem, San Diego, CA, USA) and all fluorescent images were acquired on a Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Cambridge, Cambridgeshire, UK).

ELISA

HCT8 and WiDr cells (around 70% of confluence) were starved during 48 hours. The medium from each cell line (conditioned medium - CM) was collected on ice, pre-cleared by centrifugation (300 × g for 10 min, 2,000 × g for 10 min, and 10,000 × g for 30 min) and concentrated 100-fold in an Amicon concentrator (Millipore, Tullagreen, Carrigtwohill, County Cork, Ireland). The CM was immobilized for 12 hours at 4°C polystyrene 96-well plate High Binding Elisa Plate (cat.# 3590, Corning Costar, Tewksbury, MA, USA), blocked with 5% skin milk in PBS (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), and incubated with primary anti-HOP antibody (1:300, 0.5 ng/μL, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) followed by secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (anti-rabbit, 1:2000, Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). The reactions were developed using 0.4M Na₂HPO₄, 0.4M citric acid, 0.045% hydrogen peroxide, and 1 mg/mL ortho phenyl diamino, pH 5.3. The enzymatic reaction was stopped by the addition of 50 μl of 4 M sulfuric acid. The absorbance (490 nm) was measured using a Bio-Rad microplate reader. The concentration of secreted HOP was determined using a standard curve of recombinant HOP (range of 23.4 to 1500 pM).

Statistical analysis

All the experiments were carried out for at least three times and presented with representative data. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test was used for multiple comparisons. Individual comparisons between two groups were performed with Student's t test. All data was analyzed using GraphPad Prism Software software (La Jolla, CA, USA) and shown as means $\pm$ SD. $P < 0.05$ was considered significant statistically.

Results

Evaluation of HOP and PrP^C levels in CRC cells

To investigate the role of the PrP^C-HOP interaction in CRC, we first evaluated the expression levels of PrP^C and HOP in two well-known CRC cell lines, WiDr and HCT8 (Fig. 1). Both cell lines exhibited PrP^C and HOP proteins expression, but WiDr cells expressed higher levels of PrP^C compared to HCT8 cells when analyzed by Western Blot (Fig. 1A) or flow cytometry (Fig. 1B and 1C respectively). WiDr cells also presented higher HOP expression (Fig. 1D). Secretion of HOP was also evaluated in conditioned medium of this two cell lines and WiDR showed higher levels of extracellular HOP when compared to HCT8 cells (Figs. 1D and 1E respectively).

HOP mediates tumor migration and invasion in a PrPC-dependent manner in CRC cells

The role of the PrP^C-HOP complex in the invasion of CRC cells was initially explored using Boyden chambers coated with matrigel[®]. We performed a dose-

response assay to determine the ability of WiDr and HCT8 cells to invade matrigel® in response to chemoattraction mediated by recombinant HOP. Treatment with HOP induced invasion of both WiDr and HCT8 cells and the maximum effect was achieved at a concentration of 5 µM of HOP (Fig. 1F and 1G respectively).

To confirm the participation of the PrP^C-HOP complex in the invasion process we generated stable PrP^C-knockdown WiDr cells by lentiviral-mediated short hairpin RNA (shRNA-PrP^C). A non-target, shRNA (shRNA-NT) was used to infect cells as a control. After infection with three different shRNA-PrP^C sequences and selection with Puromycin, we isolated three cell lines exhibiting a 95% reduction in PrP^C levels, as confirmed by Western Blot (Fig. 2A), immunofluorescence (Fig. 2B) and flow cytometry (Fig. 2C).

PrP^C-knockdown did not affect serum-stimulated invasion (Fig. 2D). However, PrP^C-depletion with shRNA-PrP^C significantly impaired HOP-induced invasion (Fig. 2D). Conversely, in cells infected with non-target shRNA any effect was observed in HOP- or serum-stimulated invasion (Fig. 2D).

Migration and invasion experiments were further conducted in WiDr and HCT8 cells. Both cells showed improved migration as well invasion when 5µM of recombinant HOP was used as chemoattractant (Fig. 3). Interestingly, HCT8 cells, which express lower levels of PrP^C on their surface, migrated to a greater extent than WiDr cells after recombinant HOP stimulation (Fig. 3A and 3C). A less robust difference between both cells was observed in invasion experiments (Fig. 3B and 3D). These differences were also observed when fetal bovine serum (FBS) was used as an attractant, and indeed, they reflect the higher intrinsic migration and invasion potential of HCT8 cells compared to WiDr cells (Supplementary Fig. 1A and 1B).

HOP230–245 peptide abrogates CRC migration and invasion mediated by HOP

We previously demonstrated that amino acids 230-245 of HOP are required for PrP^C binding, and a HOP peptide mimicking this domain (HOP₂₃₀₋₂₄₅) could block the PrP^C-HOP interaction [19]. In agreement with that, our present data shown that migration (Fig. 3A) and invasion (Fig. 3B) of WiDr and HCT8 cells mediated by PrP^C-HOP engagement were impaired when cells were treated with the HOP₂₃₀₋₂₄₅ peptide, but not with a control peptide (HOP₆₁₋₇₃). Additionally, cells failed to migrate and invade when recombinant HOP lacking the PrP^C binding site (HOP_{Δ230-245}) was used as chemoattractant (Fig. 3).

To further confirm whether HOP-induced migration and invasion were indeed PrP^C-dependent, we also blocked PrP^C by using a specific anti-PrP^C monoclonal antibody. The anti-PrP^C antibody significantly inhibited HOP-induced cell migration and invasion compared to non-immune IgG (Fig. 3C and 3D).

PrPC-HOP engagement activates ERK1/2 signaling in CRC cells

To address the activation of intracellular signaling triggered by PrP^C-HOP interaction, CRC cells were treated with recombinant HOP and then submitted to immunoblotting to evaluate ERK1/2 activation. We found that ERK1/2 phosphorylation was markedly induced in HOP-treated uninfected or control cells, but was unaffected in HOP-treated PrP^C-knockdown cells (Fig. 4A and 4B). Furthermore, cells stimulated with recombinant HOP and treated with an ERK1/2 inhibitor (U0126) showed an 80% reduction in their invasive potential compared to cells that were not treated with the inhibitor, indicating that the ERK1/2 pathway is involved in HOP-mediated invasion of CRC cells (Fig. 4C).

Discussion

In this study, we show that HOP induced the migration and invasion of CRC cell lines in a PrP^C-dependent manner and that phosphorylation of the ERK1/2 pathway is a downstream mediator of these effects.

It has been shown that PrP^C or HOP expressions contribute to aggressiveness of many tumor systems [5-10, 26-32]. The presence of PrP^C or HOP in CRC has been previously described and it was confirmed in the present work. Some studies have demonstrated that either PrP^C [36] or HOP [37] levels were significantly higher in CRC tumor samples compared to non-tumor counterparts. High levels of PrP^C [36] and HOP [37] were also correlated with poor prognosis of CRC patients.

Furthermore, it was described that HOP could be secreted by HT-1080 fibrosarcoma cells together with other chaperones such as HSP-90, and the extracellular complexes formed between these proteins interact with the matrix metalloproteinase-2 (MMP2) promoting tumor invasiveness [38]. Interestingly, in this study we have identified that CRC cells also secrete HOP to the extracellular space suggesting that a possible interaction with cells expressing PrP^C could occur. It is well known that the interaction between secreted HOP and PrP^C triggers a large number of trophic effects in the nervous system [39] and in human glioblastomas [5]. Nevertheless, the role of PrP^C-HOP complex has never been addressed in CRC.

Among the hallmarks of tumor progression, migration and invasion are the most important events responsible for the high rates of morbimortality [40,41]. In this way, it is essential to understand the molecular mechanisms of migration and invasion aiming to improve the therapeutic outcomes. Additionally it is well known that migration and invasion are complimentary events since the first is a precondition to the last process [42].

We observed that CRC cells treated with HOP showed an enhancement of their migration/invasion potential. Moreover, we showed that this effect was dependent of PrP^C-HOP interaction because PrP^C-depletion with shRNA-PrP^C markedly diminished HOP-induced invasion. These data indicate that the PrP^C-HOP complex plays an important role in the invasion of CRC cells, suggesting that one way to control the aggressive behavior of CRC cells is blocking the interaction between PrP^C and HOP.

For this purpose, we used the HOP₂₃₀₋₂₄₅ peptide, which competes with full-length HOP for PrP^C binding [5,19]. We found that HOP₂₃₀₋₂₄₅ peptide was able to impair migration and invasion of CRC cells mediated by PrP^C-HOP engagement. To confirm this result, we also used a specific anti-PrP^C antibody, which significantly inhibited HOP-induced cell migration and invasion. Taken together, these results suggest that the interaction between PrP^C and HOP is required for the migration and invasion of CRC cells *in vitro* and these effects can be abolished for the HOP₂₃₀₋₂₄₅ peptide or anti-PrP^C antibodies.

As described previously, PrP^C was shown to activate ERK1/2 signaling in different cell lines [43]. HOP is secreted by astrocytes and GBM cells and its interaction with PrP^C induces cell proliferation through ERK1/2 and PI3K signaling pathways [27,44]. Additionally ERK1/2 signaling mediated by PrP^C has been associated with gastric cancer invasion.⁶ It was also described that in endometrial cells, the activation of ERK1/2 and PI3K/AKT pathways triggers cell migration [45].

In order to evaluate the possible participation of ERK1/2 signaling triggered by PrP^C-HOP engagement in CRC cells, we measured phosphorylated ERK1/2 levels in PrP^C-knockdown and control WiDr cells. Our result showed that ERK1/2 activation was significantly induced in HOP-treated cells, but was unaffected in HOP-treated

PrP^C-knockdown cells. Additionally invasion assays performed in the presence of ERK1/2 inhibitor (U0126) demonstrated that ERK1/2 pathway is involved in HOP-mediated invasion in CRC cells.

Taken together, our results show for the first time that the PrP^C-HOP complex is important for the invasion and migration of CRC cells, with potential implications for this complex as a therapeutic target. Furthermore, we demonstrated the effectiveness of the HOP₂₃₀₋₂₄₅ peptide in blocking PrP^C-HOP complex formation, suggesting that this peptide could be a tool for interfering with the PrP^C-HOP-dependent migration and invasion of CRC cells, which are processes associated to metastatic CRC.

Figure legends

Figure 1 - PrP^C and HOP expression in human CRC cell lines. **(A)** PrP^C expression (37-25KDa) was evaluated by Western Blot in HCT8 and WiDr cells. Tubulin (50kDa), was used as a loading control. PrP^C levels were quantified using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA) normalized by tubulin levels and expressed as relative to HCT8 (upper panel). **(B,C)** PrP^C expression was evaluated by flow cytometry in WiDr and HCT8 cells respectively. Gray curves represent cells incubated with secondary antibody only. PrP^C levels were analyzed by flow cytometry using FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). **(D)** Western Blot analysis of HOP expression (66kDa). HOP levels were quantified using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA), normalized by tubulin levels and expressed as relative to HCT8 (upper panel). **(E)** Quantification of HOP secretion in conditioned medium (CM) performed by ELISA. *Data represent the average of at least three independent experiments $\pm$ standard error [*p <0.05 by student T-test]. **(F,G)** Dose-response curve of HOP-mediated migration. WiDr **(F)** and HCT8 **(G)** cells (5×10^4) starved for 6 hours were plated on the top of boyden chambers. Recombinant HOP (0.5, 2, 5 and 10 μ M), was used as chemo attractant. Images of the cells that migrated were captured and analyzed with ImageJ software. *Data represent the average of at least four independent experiments $\pm$ standard error [*p <0.05 by ANOVA with Tukey's Multiple Comparison Test].

Figure 2 - PrP^C-knockdown impairs HOP-induced invasion of WiDr cells. **(A)** Western Blot analysis for PrP^C expression in WiDr cells infected with non-target shRNA (shRNA-NT) or three distinct shRNA-PrP^C specific sequences. Relative PrP^C levels were quantified using ImageJ software and normalized by tubulin loading

(upper panel). **(B)** Immunofluorescence analysis of PrP^C expression in shRNA-PrP^C and shRNA-NT cells. Fluorescent images were acquired on a Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Cambridge, Cambridgeshire, UK). Calibration bar = 25µm **(C)** Flow cytometry of PrP^C-knockdown (shRNA-PrP^C) and control (shRNA-NT, wild type or IgG) WiDr cells. Black line represent unstained cells incubated secondary antibody only. Color lines denote the expression of PrP^C incubated with anti-PrP^C 3F4 followed by anti-mouse IgG conjugated to Alexa-405. **(D)** HOP-mediated invasion in PrP^C-knockdown and control cells. Control or PrP^C-knockdown cells were plated on the top of boyden chambers containing matrigel[®]; HOP (5µM) or 10% fetal bovine serum (FBS) were added into the bottom of the chamber and cells incubated for 24 hours. Cell invasion was quantified. Data represent the average of at least four independent experiments ± standard error [*p <0.05 by One Way ANOVA with Tukey's Multiple Comparison Test].

Figure 3 - The HOP-PrP^C -dependent cell migration and invasion are impaired by HOP₂₃₀₋₂₄₅ peptide and anti-PrP^C antibodies. Cells were starved for 6 hours and then treated in suspension for 2 hours with: **(A)** HOP₂₃₀₋₂₄₅ peptide and control peptide (HOP₆₁₋₇₆), **(B)** anti-PrP^C antibody (13 ng/ml) or non-immune control IgG (13 ng/ml). Invasion and migration experiments were performed in boyden chambers respectively coated or not with matrigel[®]. Recombinant HOP or its deletion mutant HOP_{Δ230-245} were used as chemoattractants. Data represent the average of at least four independent experiments ± standard error [*p <0.05 by One Way ANOVA with Tukey's Multiple Comparison Test].

Figure 4 - The PrP^C-HOP complex promotes invasion via ERK1/2 phosphorylation. **(A)** Representative Western Blot image ERK1/2 activation in cells treated with 10% FBS or recombinant HOP (5μM) for 15 minutes. The relative values of ERK1/2 activation were represented by the ratio of phospho-ERK and total ERK1/2. **(B)** pERK1/2 levels were normalized by total ERK1/2 and tubulin loading and relative values represent the ratio of each treatment to that from starved cells. Blots are representative of five independent experiments and data show the average ± standard error [*p <0.05 by One Way ANOVA with Tukey's Multiple Comparison Test]. **(C)** Invasion assays were performed in the presence or absence of recombinant HOP and an ERK1/2 inhibitor (U0126 10 μM) or vehicle (DMSO 0.1%). Recombinant HOP (5μM) was used as chemoattractant. Data represent the average of at least four independent experiments ± standard error [*p <0.05 by One Way ANOVA with Tukey's Multiple Comparison Test].

Supplementary Figure 1: (A) Migration and **(B)** Invasion assays in WiDr and HCT8 cell lines. Cells were incubated on the top of boyden chambers coated with matrigel[®]; Serum-free DMEM or 10% FBS were used as chemoattractants. Data represent the average of at least four independent experiments ± standard error. [*p <0.05 by Student's t-test].

Reference

1. Bravo-Cordero JJ, Hodgson L, Condeelis J. (2012) Directed cell invasion and migration during metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 24:277-83. doi: 10.1016/j.ceb.2011.12.004
2. Friedl P, Alexander S. (2011) Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* 147:992-1009. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.016.
3. Siegel R, Desantis C, Jemal A. (2014) Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 64:104-17. doi: 10.3322/caac.21220.
4. Boyle P, Ferlay J. (2005) Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 16:481-8. doi: 10.1093/annonc/mdi098
5. Lopes MH, Santos TG, Rodrigues BR, Queiroz-Hazarbassanov N, Cunha IW, Wasilewska-Sampaio AP, et al. (2014) Disruption of prion protein-HOP engagement impairs glioblastoma growth and cognitive decline and improves overall survival. *Oncogene* 34:3305-14. doi: 10.1038/onc.2014.261.
6. Pan Y, Zhao L, Liang JP. (2006) Cellular prion protein promotes invasion and metastasis of gastric cancer. *FASEB* 20:1886-8. doi: 10.1096/fj.06-6138fje
7. Meslin F, Hamaï A, Gao P, Jalil A, Cahuzac N, Chouaib S, et al. (2007) Silencing of prion protein sensitizes breast adriamycin-resistant carcinoma cells to TRAIL-mediated cell death. *Cancer Res* 67:10910-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0512
8. Kikuchi Y, Takeya T, Yamazaki T, Takekida K, Nakamura N, Matsuda H, et al. (2002) G1-dependent prion protein expression in human glioblastoma cell line T98G. *Biol Pharm Bull* 25:728-33. doi.org/10.1248/bpb.25.728
9. Wang Q, Qian J, Wang F, Ma Z. (2012) Cellular prion protein accelerates colorectal cancer metastasis via the Fyn-SP1-SATB1 axis. *Oncol Rep* 28:2029-34. doi: 10.3892/or.2012.2025.
10. Li C, Yu S, Nakamura F, Yin S, Xu J, Petrolla AA, et al. (2009) Binding of pro-prion to filamin A disrupts cytoskeleton and correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *J Clin Invest* 119:2725-36. doi: 10.1172/JCI39542.
11. Sy MS, Li C, Yu S, Xin W. (2010) The fatal attraction between pro-prion and filamin A: prion as a marker in human cancers. *Biomark Med* 4:453-64. doi: 10.2217/bmm.10.14.

12. Sauer H, Dagdanova A, Hescheler J, Wartenberg M. (1999) Redox-regulation of intrinsic prion expression in multicellular prostate tumor spheroids. *Free Radic Biol Med* 27:1276-83. doi:10.1016/S0891-5849(99)00164-1
13. Li QQ, Sun YP, Ruan CP, Xu XY, Ge JH, He J, et al. (2011) Cellular prion protein promotes glucose uptake through the Fyn-HIF-2 α -Glut1 pathway to support colorectal cancer cell survival. *Cancer Sci* 102:400-6. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01811.x.
14. McEwan JF, Windsor ML, Cullis-Hill SD. (2009) Antibodies to prion protein inhibit human colon cancer cell growth. *Tumour Biol* 30:141-7. doi: 10.1159/000225243.
15. Zhou L, Shang Y, Liu C, Li J, Hu H, Liang C, et al. (2014) Overexpression of PrPc, combined with MGr1-Ag/37LRP, is predictive of poor prognosis in gastric cancer. *Int J Cancer* **135**:2329-37. doi: 10.1002/ijc.28883.
16. Chieng CK, Say YH. (2015) Cellular prion protein contributes to LS 174T colon cancer cell carcinogenesis by increasing invasiveness and resistance against doxorubicin-induced apoptosis. *Tumour Biol; e-pub ahead of print 17 May 2015; doi: 10.1007/s13277-015-3530-z*.
17. Cheng Y, Tao L, Xu J, Li Q, Yu J, Jin Y, et al. (2014) CD44/cellular prion protein interact in multidrug resistant breast cancer cells and correlate with responses to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Mol Carcinog* 53:686-97. doi: 10.1002/mc.22021.
18. Muras AG, Hajj GN, Ribeiro KB, Nomizo R, Nonogaki S, Chammas R, et al. (2009) Prion protein ablation increases cellular aggregation and embolization contributing to mechanisms of metastasis. *Int J Cancer* 125:1523-31. doi: 10.1002/ijc.24425.
19. Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GN, Chiarini LB, Nomizo R, et al. (2002) Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J*. 21:3307-16. DOI 10.1093/emboj/cdf325.
20. Song Y, Masison DC. (2005) Independent regulation of HSP70 and HSP90 chaperones by HSP70/HSP90-organizing protein STI1 (HOP1). *J Biol Chem* 280:34178-85. doi: 10.1074/jbc.M505420200.
21. Lassle M, Blatch GL, Kundra V, Takatori T, Zetter BR. (1997) Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in

vitro phosphorylation by different kinases. *J Biol Chem* 272:1876-84. doi: 10.1074/jbc.272.3.1876

22. Soares IN, Caetano FA, Pinder J, Rodrigues BR, Beraldo FH, Ostapchenko VG, et al. (2013) Regulation of stress-inducible phosphoprotein 1 nuclear retention by protein inhibitor of activated STAT PIAS1. *Mol Cell Proteomics* 12:3253-70. doi: 10.1074/mcp.M113.031005.

23. Hajj GN, Arantes CP, Dias MV, Roffé M, Costa-Silva B, Lopes MH, et al. (2013) The unconventional secretion of stress-inducible protein 1 by a heterogeneous population of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 70:3211-27. doi: 10.1007/s00018-013-1328-y.

24. Lima FR, Arantes CP, Muras AG, Nomizo R, Brentani RR, Martins VR. (2007) Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. *J Neurochem* 103:2164-76. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04904.x

25. Eustace BK, Jay DG. (2004) Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. *Cell Cycle* 3:1098-100. doi: 10.4161/cc.3.9.1088

26. Tsai CL, Tsai CN, Lin CY, Chen HW, Lee YS, Chao A, et al. (2012) Secreted stress-induced phosphoprotein 1 activates the ALK2-SMAD signaling pathways and promotes cell proliferation of ovarian cancer cells. *Cell Rep* 2:283-93. doi: 10.1016/j.celrep.2012.07.002.

27. Erlich RB, Kahn SA, Lima FR, Muras AG, Martins RA, Linden R, et al. (2007) STI1 promotes glioma proliferation through MAPK and PI3K pathways. *Glia* 55:1690-8. doi: 10.1002/glia.20579

28. Fonseca AC, Romão L, Amaral RF, Assad Kahn S, Lobo D, Martins S, et al. (2012) Microglial stress inducible protein 1 promotes proliferation and migration in human glioblastoma cells. *Neuroscience* 200:130-41. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.10.025.

29. Ruckova E, Muller P, Nenutil R, Vojtesek B. (2012) Alterations of the Hsp70/Hsp90 chaperone and the HOP/CHIP co-chaperone system in cancer. *Cell Mol Biol Lett* 17:446-58. doi: 10.2478/s11658-012-0021-8.

30. Kubota H, Yamamoto S, Itoh E, Abe Y, Nakamura A, Izumi Y, et al. (2010) Increased expression of co-chaperone HOP with HSP90 and HSC70 and complex formation in human colonic carcinoma. *Cell Stress Chaperones* 15:1003-11. doi: 10.1007/s12192-010-0211-0.

31. Walsh N, O'Donovan N, Kennedy S, Henry M, Meleady P, Clynes M, et al. (2009) Identification of pancreatic cancer invasion-related proteins by proteomic analysis. *Proteome Sci* 7:3. doi: 10.1186/1477-5956-7-3.
32. Walsh N, Larkin A, Swan N, Conlon K, Dowling P, McDermott R, et al. (2011) RNAi knockdown of Hop (Hsp70/Hsp90 organising protein) decreases invasion via MMP-2 down regulation. *Cancer Lett* 306:180-9. doi: 10.1016/j.canlet.2011.03.004.
33. Wang TH, Chao A, Tsai CL, Chang CL, Chen SH, Lee YS, et al. (2010) Stress-induced phosphoprotein 1 as a secreted biomarker for human ovarian cancer promotes cancer cell proliferation. *Mol Cell Proteomics* 9:1873-84. doi: 10.1074/mcp.M110.000802.
34. Wang H, Ye Y, Pan SY, Zhu GY, Li YW, Fong DW, et al. (2011) Proteomic identification of proteins involved in the anticancer activities of oridonin in HepG2 cells. *Phytomedicine* 18:163-9. doi: 10.1016/j.phymed.2010.06.011.
35. Santos TG, Silva IR, Costa-Silva B, Lepique AP, Martins VR, Lopes MH. (2011) Enhanced neural progenitor/stem cells self-renewal via the interaction of stress-inducible protein 1 with the prion protein. *Stem Cells* 29:1126-36. doi: 10.1002/stem.664.
36. Antonacopoulou AG, Grivas PD, Skarlas L, Kalofonos M, Scopa CD, Kalofonos HP. (2008) POLR2F, ATP6V0A1 and PRNP expression in colorectal cancer: new molecules with prognostic significance? *Anticancer Res* 28:1221-7. doi:10.1186/1471-2350-12-156
37. Murray GI, Telfer CM, Melvin WT, inventors Markers for colorectal cancer. United States Patent Application Publication 2006; <http://www.freepatentsonline.com/20060188883.pdf>.
38. Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, Yimlamai D, Unger C, Zehetmeier C, et al. (2004) Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness. *Nat Cell Biol* 6:507-14. doi:10.1038/ncb1131
39. Arantes C, Nomizo R, Lopes MH, Hajj GN, Lima FR, Martins VR. (2009) Prion protein and its ligand stress inducible protein 1 regulate astrocyte development. *Glia* 57:1439-49. doi: 10.1002/glia.20861.
40. Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

41. Christofori G. (2006) New signals from the invasive front. *Nature* 441:444-50. doi:10.1038/nature04872
42. Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschläger M, et al. (2013) In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat Res* 752:10-24. doi: 10.1016/j.mrrev.2012.08.001
43. Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR. (2008) Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* 88:673-728. doi: 10.1152/physrev.00007.2007.
44. Lopes MH, Hajj GN, Muras AG, Mancini GL, Castro RM, Ribeiro KC, et al. (2005) Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J Neurosci* 25:11330-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2313-05.2005
45. Gentilini D, Busacca M, Di Francesco S, Vignali M, Viganò P, Di Blasio AM. (2007) PI3K/Akt and ERK1/2 signalling pathways are involved in endometrial cell migration induced by 17beta-estradiol and growth factors. *Mol Hum Reprod* 13:317-22. doi: 10.1093/molehr/gam001

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

A)

Migration

B)

Invasion

■ WiDr □ HCT8

Supplementary Figure

Sumula Curricular

Dados Pessoais

TONIELLI CRISTINA SOUSA DE LACERDA

Solteira, 32 anos, CPF 056.668.107.23

CEP 01304-000 - Consolação – São Paulo – SP

Fone: (11) 982647594

e-mail: nielly_lacerda@hotmail.com

<http://lattes.cnpq.br/9596264568699389>

Formação Acadêmica

✓ **Pós-Graduação:** Ciências Bioquímicas

Universidade de São Paulo- SP

Período: 2010 a 2015

✓ **Graduação:** Bacharelado em Bioquímica

Universidade Federal de Viçosa- MG

Período: 2006 a 2010

Formação Complementar

- ✓ **Professora-Tutora no programa de tutoria na Universidade Federal de Viçosa (UFV)-MG**

Disciplina de bioquímica básica e metabolismo

Período: 2006 a 2010

- ✓ **Munitora no programa de munitoria da Universidade Federal de Viçosa- (UFV)-MG**

Disciplinas: Bioquímica básica e metabolismo

Período: 2007 a 2010

- ✓ **Curso de verão 2010- Biologia Molecular Estrutural. (Carga horária: 424h).**

Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

Período: 2009 - 2009

- ✓ **Orientação Psicopedagógica p Trabalho de tutores. (Carga horária: 3h).**

Universidade Federal de Viçosa, UFV, Brasil.

Período: 2008 - 2008

- ✓ **Biotecnologia aplicada a saúde. (Carga horária: 70h).**

Fundação Oswaldo Cruz.

Período: 2008 - 2008

- ✓ **Proteômica e Peptidômica Ferramentas Moleculares. (Carga horária: 8h).**

Universidade Federal de Viçosa, UFV, Brasil.

Ocupação

- ✓ **Bolsista de Doutorado, pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**

Período: 01/12/2011 a 31/11/2015

Publicação

- ✓ **Artigo submetido na revista Clinical & Experimental Metastasis em Novembro de 2015.**

Artigo Intitulado: *"Prion protein binding to HOP modulates the migration and invasion of colorectal cancer cells".*

Autores: • **Tonielli C. S. de Lacerda**, Bruno Costa-Silva, Fernanda S. Giudice, Marcos V. S. Dias, Bianca L. Teixeira, Vilma R. Martins

- ✓ **Artigo a ser submetido:** *Regulation of extracellular vesicles by Rab27b in glioblastoma.*

Autores: • Bruna R. Rodrigues, Fernanda S. Giudice, Antuani R. Baptistella, Marcos S. Dias, **Tonielli C. S. de Lacerda**, Martin Roffé, Rafael M. Rocha, Paulo I. Sanematsu, Sérgio, H. Suzuki, Vilma R. Martins.

- ✓ **Artigo a ser submetido:** *The role of small GTPase Rab7 in the secretion of extracellular microvesicles by head and neck squamous cells carcinoma.*

Autores: • Fernanda S. Giudice, Bruna R. Rodrigues, **Tonielli Cristina S. Lacerda**, Marcos V. S. Dias, Antuani R. Baptistella, Luiz P. Kowalski, and Vilma R. Martins

Principais Apresentações

- ✓ AACR- American Association for Cancer Research- Philadelphia Pennsylvania. The control of migration and invasion processes in colorectal adenocarcinoma is modulated by prion protein and its ligand STI1/HOP. 18 a 22 Abril 2015.
- ✓ Brazil-Canada Workshop II on advances in the Science of Prion and Prion-like milsfolding diseases- The expression of Prion protein and its ligand HOP are associated with invasion in colon tumors. 16 a 19 novembro 2014.
- ✓ International Fall School-System Biology in Cancer Discovery- AC Camargo Cancer Center and Faculdade de Medicina-UNESP. 22 a 29 de Abril 2014
- ✓ AACR- American Association for Cancer Research-San Diego California. Prion protein and its ligand STI1/HOP modulate migration and invasion of cell lines derived from colorectal tumors. 5 a 9 de Abril 2014.
- ✓ Next Frontiers to Cure Cancer- Integrating Science and Patient Care. The expression of Prion protein and its ligand HOP are associated with migration in colon tumors. 2013. (Congresso).
- ✓ 10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology. Prpc and hop expression and secretion in colon and rectum tumors are associated with invasion. 2012. (Congresso).

- ✓ VII SEU- Simpósio de Extensão Universitária. Desempenho do Programa de Tutoria em Bioquímica em 2009. 2009. (Simpósio).

- ✓ VII SEU- Simpósio de Extensão Universitária. Desempenho do programa de tutoria em bioquímica em 2009-i. 2009. (Simpósio).

- ✓ XIX SIC- Simpósio de Iniciação científica. Purificação e caracterização parciais de amilases de sementes de *Phalaris canariensis* (L). 2009. (Simpósio).

- ✓ XXIV Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology. 2008. (Congresso).

- ✓ XVIII Simpósio de Iniciação Científica-SIC. 2008. (Congresso).

- ✓ Workshop Biowork VIII about Molecular Markers. 2006. (Congresso).