



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Mateus de Almeida Rainho

**Avaliação do fenótipo de célula-tronco tumoral e da dinâmica mitocondrial  
em células tumorais colorretais refratárias ao tratamento com  
5-Fluorouracil**

Rio de Janeiro

2023

Mateus de Almeida Rainho

**Avaliação do fenótipo de célula-tronco tumoral e da dinâmica mitocondrial em células tumorais colorretais refratárias ao tratamento com 5-Fluorouracil**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Alessandra Alves Thole

Coorientador: Prof. Dr. Andre Luiz Mencialha

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

R156 Rainho, Mateus de Almeida.  
Avaliação do fenótipo de célula-tronco tumoral e da dinâmica mitocondrial em células tumorais colorretais refratárias ao tratamento com 5-fluorouracil / Mateus de Almeida Rainho. - 2023.  
89 f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Alessandra Alves Thole.  
Coorientadora: Prof. Dr. Andre Luiz Mencialha.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Intestinos – Câncer – Teses. 2. Células-tronco – Teses. 3. Neoplasias colorretais – Teses. 4. Dinâmica mitocondrial. 5. Fluoruracila. I. Thole, Alessandra Alves. II. Mencialha, Andre Luiz. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.34-006:602.9

Bibliotecária: Diana Amado B. dos Santos CRB7/6171

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Mateus de Almeida Rainho

**Avaliação do fenótipo de célula-tronco tumoral e da dinâmica mitocondrial em células tumorais colorretais refratárias ao tratamento com 5-fluorouracil**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 14 de setembro de 2023.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Alessandra Alves Thole

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Andre Luiz Mencialha

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Erika Afonso Costa Cortez Marques

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz

Instituto Nacional do Câncer

---

Prof. Dr. Julio Cesar Madureira de Freitas Junior

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2023

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, a meus pais, à minha família, a meus amigos e a todos os professores e alunos que passaram na minha vida. *In memoriam*, às minhas tias Adelaide e Maria Isabel, que são o motivo deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por permitir que eu concluísse mais uma etapa da minha vida. Agradeço aos meus pais, que são minha base sólida, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim. Sem eles, eu não teria jamais alcançado os lugares onde cheguei. Agradeço também à minha família, fonte de suporte e torcida pelo meu sucesso. Estendo os agradecimentos aos meus amigos, que muito me apoiaram emocionalmente ao longo dessa trajetória.

Agradeço à minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Alessandra Thole, por quem possuo imenso afeto e admiração, por todo carinho comigo, pela calma, por sempre acreditar em mim e abraçar minhas ideias. Agradeço ao meu coorientador Prof. Andre Mencialha, por quem cultivo profunda inspiração, que nunca deixou de me apoiar, confiar em mim e continuamente me ajudar. Também às professoras Ana Carolina, Erika, Simone e Jemima por todo suporte na caminhada.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Pesquisa em Células-Tronco (DHE/IBRAG/UERJ) por toda a parceria ao longo desses anos. Agradeço aos alunos de Iniciação Científica que tanto me ajudaram, especialmente à Andreza que contribuiu muito para este trabalho. Também agradeço aos colegas de pós-graduação por todas as trocas, especialmente à Daniela que sempre me ajudou, tanto de forma profissional como pessoal.

De forma singular, agradeço à querida amiga Genilza que, além de colaborar trabalhando no projeto, sempre foi um porto seguro para mim, acreditando no meu potencial, apoiando-me incondicionalmente e trazendo leveza aos meus dias no laboratório (e fora dele).

Agradeço aos amigos do Departamento de Histologia e Embriologia pelos momentos de descontração e discussões científicas. Em especial, agradeço à Kíssila, Verônica, Ana Lucia e Cherley pelo carinho e pelas contribuições tanto no campo das ideias quanto experimentalmente.

Agradeço ao Laboratório de Biologia do Câncer (DBB/IBRAG/UERJ) por todo o ambiente acolhedor e por ser parte importante deste projeto. Agradeço ao Bruno, Juliana, Ísis, Mariana e, em especial, Priscyanne que tanto me ajudou de forma pessoal e nos experimentos.

Agradeço ao Francisco Vardiero, do Laboratório de Biologia da Célula Endotelial e da Angiogênese (DBCel/IBRAG/UERJ), pela preciosa ajuda na captura e edição das imagens de fluorescência.

Agradeço ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense pela utilização do microscópio eletrônico para aquisição das imagens deste trabalho, feitas por Alan Moraes, Ana Lucia e Cherley.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental (FCM/UERJ), ao Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes e à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela condução deste projeto.

Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.

*Friedrich Nietzsche*

## RESUMO

RAINHO, Mateus de Almeida. **Avaliação do fenótipo de célula-tronco tumoral e da dinâmica mitocondrial em células tumorais colorretais refratárias ao tratamento com 5-fluorouracil.** 2023. 89 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

O câncer colorretal (CCR) é a neoplasia maligna que acomete o intestino grosso, sendo o segundo tipo mais incidente e o terceiro tipo mais letal em todo o mundo. Embora as estratégias terapêuticas tenham avançado nos últimos anos, cerca de metade dos pacientes sofrem com recidivas, metástases e resistência aos tratamentos convencionais. O 5-fluorouracil (5-FU) é o quimioterápico mais empregado nos regimes terapêuticos para o CCR, entretanto, aproximadamente metade dos indivíduos com estágio metastático apresentam resistência a este fármaco. Nesse contexto, as células-tronco tumorais (CTT) são uma subpopulação celular tumoral, com capacidade de autorrenovação e diferenciação, que estão intimamente associadas à metástase e resistência aos tratamentos. Por sua vez, as mitocôndrias são organelas que exercem um papel fundamental no câncer, apresentando um dinamismo morfológico por meio dos processos de fusão e fissão mitocondriais, bem como da biogênese e da mitofagia. Sabe-se que alterações no equilíbrio dos processos da dinâmica mitocondrial possuem efeitos sobre as CTT e a resistência terapêutica. Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar o fenótipo de CTT e a dinâmica mitocondrial de células tumorais de CCR refratárias ao tratamento com 5-FU. Para isso, a linhagem tumoral colorretal HT-29 foi exposta ao 5-FU e as células refratárias foram analisadas quanto à (1) morfologia, por microscopia óptica e de fluorescência, (2) expressão de genes relacionados ao “fenótipo tronco” e à dinâmica mitocondrial, por RT-qPCR; (3) expressão de CD133 (marcador de CTT colorretal), por citometria de fluxo e imunocitoquímica; e (4) ultraestrutura, por microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados mostraram que as células refratárias exibem maior tamanho e complexidade celular, com mais vacuolizações, multinucleações e estruturas compatíveis com entose. Além disso, a expressão gênica e proteica de CD133 diminuiu na população de células refratárias. Contudo, estas células expressavam CD133 de forma muito mais intensa, também demonstrando maior tamanho e granulosidade. Quanto à dinâmica mitocondrial, os níveis de RNAm de *PINK1* (gene de mitofagia) encontraram-se mais elevados no grupo refratário ao tratamento. Os resultados da ultraestrutura mostraram o aumento de vacúolos, inclusões lipídicas, mitocôndrias danificadas e estruturas de autofagossomos nas células refratárias. Sendo assim, este trabalho mostrou que as células tumorais colorretais refratárias ao tratamento com 5-FU possuem menor fração de células CD133<sup>+</sup>, porém com uma alta expressão nas células que expressam esse marcador, bem como aumento de tamanho e granulosidade, além de apresentarem características que sugerem aumento do processo de mitofagia.

Palavras-chave: Câncer colorretal. Células-tronco tumorais. Quimiorresistência. Dinâmica mitocondrial. 5-fluorouracil.

## ABSTRACT

RAINHO, Mateus de Almeida. **Analysis of cancer stem cell phenotype and mitochondrial dynamics in refractory colorectal cancer cells to 5-fluorouracil treatment.** 2023. 89 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Colorectal cancer (CRC) is the malignant neoplasm that affects the large intestine, being the second most incident and the third most lethal type of cancer worldwide. Although therapeutic strategies have developed in recent years, almost half of patients suffer from relapses, metastases, and resistance to conventional treatments. 5-fluorouracil (5-FU) is the most widely used chemotherapeutic in CRC therapies, but around half of metastatic patients have resistance to this drug. In this context, cancer stem cells (CSCs) are a tumor subpopulation of cells, with self-renewal and differentiation capabilities, which are closely associated with metastasis and treatment resistance. In its turn, the mitochondria are organelles that play an important role in cancer, presenting a morphological dynamism through the processes of mitochondrial fusion and fission, as well as biogenesis and mitophagy. Changes in the balance of the processes of mitochondrial dynamics are known to have effects on CSCs and therapeutic resistance. Therefore, this work aimed to analyze the CTT phenotype and the mitochondrial dynamics of RCC tumor cells refractory to 5-FU treatment. For this purpose, the colorectal tumor cell line HT-29 was exposed to 5-FU and the refractory cells were analyzed for (1) morphology, by light and fluorescence microscopy, (2) expression of genes related to the “stem phenotype” and mitochondrial dynamics, by RT-qPCR; (3) expression of CD133 (colorectal CTT marker), by flow cytometry and immunocytochemistry; and (4) ultrastructure, by transmission electron microscopy. The results show that refractory cells exhibit greater cell size and complexity, with more vacuolation, multinucleation and structures compatible with entosis. Furthermore, CD133 gene and protein expression decreased in the refractory cell population. However, these cells expressed CD133 much more intensely, also demonstrating greater size and granularity. As for mitochondrial dynamics, levels of PINK1 mRNA (mitophagy gene) were found to be higher in the treatment-refractory group. Ultrastructure results showed increased vacuoles, lipid inclusions, damaged mitochondria and autophagosome structures in refractory cells. Therefore, this work showed that colorectal tumor cells refractory to treatment with 5-FU have a lower fraction of CD133<sup>+</sup> cells, but with high expression per positive cell, as well as increased size and granularity, in addition to presenting features that suggest an increase in the process of mitophagy.

Keywords: Colorectal cancer. Cancer stem cells. Chemoresistance. Mitochondrial dynamics. 5-fluorouracil.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema ilustrativo das marcas registradas ( <i>hallmarks</i> ) do câncer. ....	17
Figura 2 –	Ilustração das células de um microambiente tumoral e os diferentes microambientes existentes .....	19
Figura 3 –	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma, com ênfase para CCR .....	20
Figura 4 –	Esquema do processo adenoma-carcinoma colorretal .....	21
Figura 5 –	Estrutura molecular e metabolismo do 5-FU .....	23
Figura 6 –	Esquema representativo dos modelos de crescimento tumoral: modelo estocástico e modelo de CTT (hierárquico) .....	26
Figura 7 –	Esquema representativo do modelo de CTT clássico e do modelo de CTT atualizado .....	27
Figura 8 –	Esquemas das características de CTT .....	28
Figura 9 –	Ilustração da estrutura da mitocôndria e suas múltiplas funções .....	32
Figura 10 –	Ilustração esquemática da dinâmica mitocondrial .....	34
Figura 11 –	Representação dos eventos moleculares de fusão e fissão mitocondriais .....	36
Figura 12 –	Via de PINK1/Parkin da mitofagia .....	39
Figura 13 –	Esquema representativo da obtenção de células refratárias ao tratamento com 5-FU .....	42
Quadro 1 –	Número de células e de meio de cultura para plaqueamento em diferentes substratos de crescimento .....	43
Quadro 2 –	<i>Primers</i> utilizados no trabalho, com as respectivas sequências senso e antissenso.....	44
Figura 14 –	Fotomicrografias com contraste de fase nos tempos de D1 a D5 .....	53
Figura 15 –	Fotomicrografias de cortes semifinos corados com azul de toluidina ...	55
Figura 16 –	Fotomicrografias de coloração com Oil Red O para gotículas lipídicas	56
Figura 17 –	Gráficos ( <i>density plots</i> ) de tamanho (FSC-A) e complexidade (SSC-A)	57
Figura 18 –	Gráficos de barras de tamanho (FSC) e complexidade (SSC) .....	58
Figura 19 –	Gráficos de viabilidade celular para os tempos D2, D3, D4 e D5 .....	64

Figura 20 – Gráficos dos níveis de RNAm de fatores de pluripotência (SOX2, POU5F1 e NANOG) e de marcador de CTTC (PROM1) .....	60
Figura 21 – Gráficos de histograma da marcação para CD133 .....	61
Figura 22 – Gráficos de barra da expressão de CD133 e mediana de fluorescência	62
Figura 23 – Gráficos de tamanho (FSC) e complexidade (SSC) das células CD133+ .....	63
Figura 24 – Fotomicrografias de imunocitoquímica para marcação para CD133 .....	64
Figura 25 – Gráfico dos níveis de RNAm de dinâmica mitocondrial (DNM1L, MFN1 e MFN2), biogênese mitocondrial (PPARGC1A) e mitofagia (PINK1 e PRKN) .....	66
Figura 26 – Micrografias de fluorescência para marcação de mitocôndrias com MitoTracker™ Red CMXRos .....	67
Figura 27 – Gráfico de medianas de fluorescência de MitoTracker™ Red CMXRos .....	68
Figura 28 – Eletromicrografias de transmissão para análise da ultraestrutura celular e mitocondrial .....	70
Figura 29 – Resumo dos principais resultados do trabalho .....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluorouracil
ABC	<i>ATP-binding cassette</i> – conjunto de ligação ao ATP
ACTB	Beta-actina
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> – Albumina de soro bovino
CCR	Câncer colorretal
cDNA	<i>Complementary DNA</i> – DNA complementar
CTT	Célula-tronco tumoral
CTTC	Célula-tronco tumoral colorretal
D1	Dia 1
D2	Dia 2 (24h)
D3	Dia 3 (48h)
D4	Dia 4 (72h)
D5	Dia 5 (96h)
DAB	3,3-Diaminobenzidina tetrahidrocloro
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> – Meio de Eagle, modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAmt	DNA mitocondrial
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DRP1	<i>Dynammin-related protein 1</i> – proteína 1 relacionada à dinamina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIM	Espaço intermembranoso
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	<i>Forward Scatter</i> – Espalhamento frontal
LV	Leucovirina
MFN1	Mitofusina 1

MFN2	Mitofusina 2
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
NANOG	<i>Nanog homeobox</i> – Gene Nanog homeobox
OCT4	<i>Octamer-binding transcriptionfactor 4</i> – Fator de transcrição 4 ligante de octâmero
OPA1	<i>Optic atrophy 1</i> - Atrofia óptica 1
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> – Tampão fosfato salino
PE	Ficoeritrina
PGC-1a	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-<math>\gamma</math> coactivator</i> – Coativador de receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
PINK1	<i>PTEN-induced kinase 1</i> – Cinase induzida por PTEN 1
POU5F1	<i>POU class 5 homeobox 1</i> – Gene POU classe 5 homeobox 1
PPARGC1A	<i>PPARG coactivator 1 alpha</i> – Coativador 1 de PPARG alfa
PRKN	<i>Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase</i> – Proteína ubiquitina ligase Parkin RBR E3
PROM1	<i>Prominin 1</i> – Prominina 1
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
SFB	Soro fetal bovino
SOX2	<i>SRY-box transcription 14ator 2</i> – Fator de transcrição SRY-box 2
SSC	<i>Side Scatter</i> – Espalhamento lateral
WST-1	<i>Water Soluble Tetrazolium 1</i> – Tetrazólio 1 solúvel em água

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
>	Maior que
<	Menor que
α	Alfa
β	Beta
h	Hora(s)
°C	Graus Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico
nm	Nanômetros
cm	Centímetros
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
μL	Microlitro
mL	Mililitro
μg	Micrograma
nM	Nanomolar
μM	Micromolar
mM	Milimolar
bp	<i>Base pair</i> – par / pares de base
ΔG	Varição da energia livre de Gibbs
g	Força G (Força Centrífuga Relativa)
3D	Tridimensional
CO <sub>2</sub>	Molécula de dióxido de carbono
OsO <sub>4</sub>	Molécula de tetróxido de ósmio

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
1.1	<b>Câncer</b> .....	17
1.1.1	<u>Câncer colorretal (CCR)</u> .....	19
1.1.1.1	<u>5-Fluorouracil (5-FU) e a resistência em CCR</u> .....	22
1.2	<b>Células-tronco tumorais (CTT)</b> .....	25
1.2.1	<u>Células-tronco tumorais colorretais (CTTC)</u> .....	29
1.3	<b>Mitocôndria e a dinâmica mitocondrial</b> .....	31
1.3.1	<u>Fusão e fissão mitocondriais</u> .....	34
1.3.2	<u>Biogênese mitocondrial e mitofagia</u> .....	37
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	40
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	40
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	40
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	41
3.1	<b>Cultura de células</b> .....	41
3.2	<b>Obtenção das células tumorais refratárias ao tratamento com 5-FU</b> .....	42
3.3	<b>Análise da morfologia por microscopia óptica com contraste de fase</b> .....	43
3.4	<b>Viabilidade celular por WST-1</b> .....	43
3.5	<b>Elaboração de <i>primers</i></b> .....	44
3.6	<b>Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR)</b> ....	45
3.6.1	<u>Extração do RNA total</u> .....	45
3.6.2	<u>Quantificação do RNA</u> .....	46
3.6.3	<u>Síntese de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa</u> .....	46
3.6.4	<u>RT-qPCR</u> .....	47
3.7	<b>Citometria de fluxo</b> .....	47
3.8	<b>Imunocitoquímica</b> .....	48
3.9	<b>Coloração com Oil-Red O</b> .....	49
3.10	<b>Microscopia de fluorescência</b> .....	49
3.11	<b>Microscopia eletrônica de transmissão</b> .....	50
3.11.1	<u>Processamento inicial e cortes semifinos</u> .....	50

3.11.2	<u>Cortes ultrafinos, contrastação e observação no microscópio eletrônico</u> .....	50
3.12	<b>Análises estatísticas</b> .....	51
4	<b>RESULTADOS</b> .....	52
4.1	<b>Análise morfológica das células HT-29 e HT-29/5FUR</b> .....	52
4.1.1	<u>Análise da morfologia das células HT-29 e HT-29/5FUR em cultura</u> .....	52
4.1.2	<u>Análise da morfologia das células HT-29 e HT-29/5FUR em cortes semifinos</u> ....	54
4.1.3	<u>Análise da composição lipídica das células HT-29 e HT-29/5FUR em coloração com Oil Red O</u> .....	56
4.2	<b>Análise do tamanho (FSC) e complexidade (FSC) das células HT-29 e HT-29/5FUR</b> .....	57
4.3	<b>Análise da viabilidade celular dos grupos HT-29 e HT-29/5FUR em cultura</b>	58
4.4	<b>Análise da expressão de RNAm de genes de fatores de pluripotência (<i>SOX2</i>, <i>POU5F1</i> e <i>NANOG</i>) e de marcador de CTTC (<i>PROM1</i>) das células HT-29 e HT-29/5FUR</b> .....	59
4.5	<b>Análise da expressão de CD133, tamanho e complexidade das células HT-29 e HT-29/5FUR</b> .....	60
4.5.1	<u>Análise por citometria de fluxo</u> .....	60
4.5.2	<u>Análise por imunocitoquímica</u> .....	63
4.6	<b>Análise da expressão de RNAm de dinâmica mitocondrial (<i>DNM1L</i>, <i>MFN1</i> e <i>MFN2</i>), biogênese mitocondrial (<i>PPARGC1A</i>) e mitofagia (<i>PINK1</i> e <i>PRKN</i>) das células HT-29 e HT-29/5FUR</b> .....	65
4.7	<b>Análise das mitocôndrias das células HT-29 e HT-29/5FUR por microscopia de fluorescência</b> .....	66
4.8	<b>Análise do potencial de membrana mitocondrial das células HT-29 e HT-29/5FUR</b> .....	68
4.9	<b>Análise da ultraestrutura das células HT-29 e HT-29/5FUR</b> .....	69
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	71
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	79
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	80

## INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde global, sendo a segunda maior causa de mortalidade no mundo (WHO – World Health Organization). Nesse contexto, o câncer colorretal é a neoplasia maligna que acomete o intestino grosso e é responsável pela terceira maior incidência e segunda maior mortalidade dentre os cânceres (BRAY et al., 2018). Apesar do amplo desenvolvimento de técnicas e fármacos para o tratamento desse tipo de câncer, cerca de 50% dos pacientes sofrem com recidivas, metástases e resistência às terapias convencionais, impondo-se um importante obstáculo para o enfrentamento dessa doença (JEMAL et al., 2008; SAUNDERS; IVESON, 2006). Nesse cenário, o 5-fluorouracil se encontra como o quimioterápico mais utilizado para o tratamento de câncer colorretal. Ele é um análogo de pirimidina, da classe dos antimetabólitos, que resulta na inibição da síntese de DNA. Entretanto, aproximadamente metade dos pacientes com câncer colorretal metastático desenvolvem resistência a esse fármaco (VODENKOVA et al., 2020).

As células-tronco tumorais são uma subpopulação celular da massa tumoral, dotada das capacidades de autorrenovação e diferenciação e associada a metástases e resistência aos tratamentos (LYTLE; BARBER; REYA, 2018). Elas já foram descritas no câncer colorretal, podendo ser identificadas através de marcadores, como o CD133 (O'BRIEN et al., 2007). Recentemente, estudos mostraram que as mitocôndrias possuem um papel importante nas células-tronco tumorais colorretais.

As mitocôndrias são organelas envolvidas em diversos processos da célula eucarionte e são consideradas altamente dinâmicas. Sua morfologia pode se alterar entre estados tubulares e fragmentados, por meio dos processos de fusão e fissão mitocondriais, que compreendem a dinâmica mitocondrial. Envolvidos nesse fenômeno, encontram-se também a biogênese mitocondrial e a mitofagia, associados ao controle de qualidade dessas organelas. Desregulações nesses eventos já foram relacionadas a diversos tipos de patologias, incluindo o câncer (MAYCOTTE et al., 2017).

Dessa forma, o presente trabalho almeja investigar o fenótipo tronco tumoral e a dinâmica mitocondrial de células da linhagem tumoral colorretal refratárias ao tratamento com 5-fluorouracil.

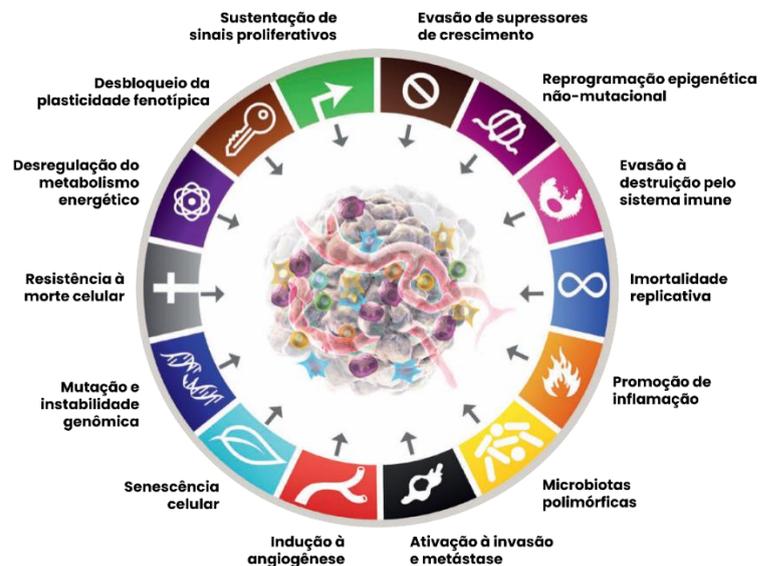
## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Câncer

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças que possuem como base o crescimento desordenado de células. Em sua grande maioria, detêm a capacidade de invadir tecidos e órgãos, causando metástase. Essa natureza de proliferação descontrolada é derivada do acúmulo de mutações genéticas nas células, em especial de oncogenes e genes supressores de tumor, ambos ligados a componentes do ciclo celular (INCA, 2020).

Além do simbólico crescimento desarranjado, foram decifradas outras propriedades compartilhadas em vários tipos de câncer, tendo sido cunhadas de marcas registradas (*hallmarks*) do câncer (Figura 1). Entre elas estão: resistência à morte celular, indução à angiogênese, sustentação de sinais de proliferação, imortalidade replicativa, promoção de inflamação e evasão do sistema imune (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Recentemente, foram incluídas novas características comuns, como: desbloqueio da plasticidade fenotípica, senescência celular, microbiotas polimórficas e reprogramação epigenética não-mutacional (HANAHAN, 2022).

Figura 1 - Esquema ilustrativo das marcas registradas (*hallmarks*) do câncer



Fonte: Adaptado de HANAHAN, 2022.

O câncer representa um grave problema de saúde pública mundial, sendo estimado que um em cada cinco indivíduos serão acometidos pela doença durante a sua vida (FERLAY et al., 2021; SUNG et al., 2021). O câncer é responsável pela segunda maior causa de morte em todo o mundo, tendo sido estimados pela Organização Mundial de Saúde (WHO – World Health Organization) 18.989.634 casos e 10.052.507 mortes para 2020.

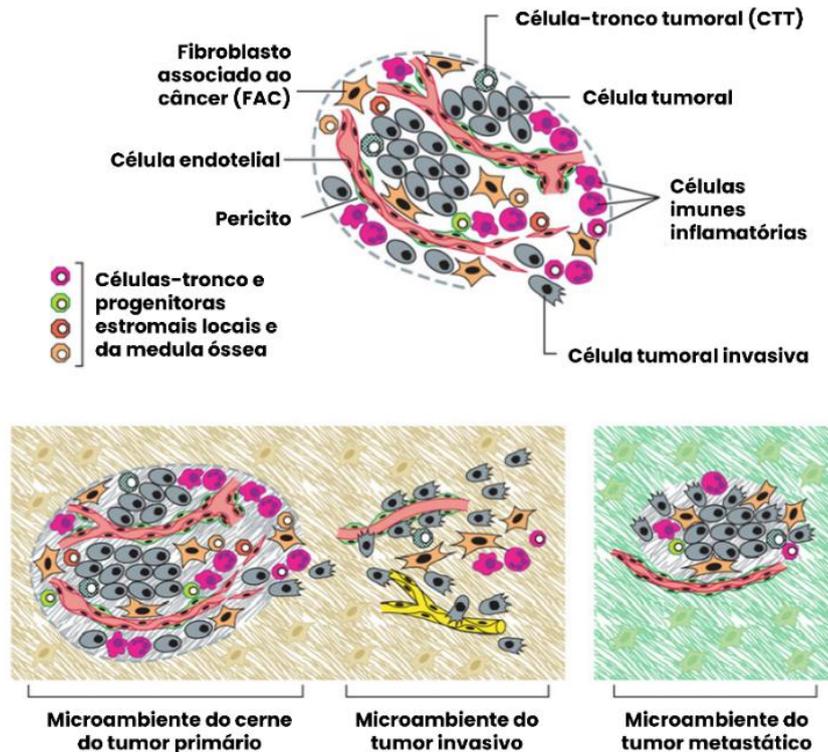
A etiologia do câncer é multifatorial, compreendendo desde fatores genéticos intrínsecos do indivíduo até o seu estilo de vida. Agentes externos contribuem para o seu aparecimento, podendo ser classificados como: carcinógenos físicos, tais como radiação ionizante e ultravioleta, químicos, tais como tabaco e álcool, e biológicos, tais como o HPV (papilomavírus humano) e a bactéria *Helicobacter pylori* (INCA, 2020).

A carcinogênese, processo de surgimento do câncer, ocorre geralmente de forma lenta e segue três etapas: iniciação, promoção e progressão. No estágio de iniciação, as células sofrem a ação de agentes cancerígenos sobre seu material genético, provocando mutações, principalmente em genes-alvo, como oncogenes e genes supressores tumorais, que se acumulam no seu genoma. No estágio de promoção, as células iniciadas têm sua capacidade proliferativa aumentada e promovem o crescimento de uma massa celular, gerando uma lesão benigna. Por fim, no estágio de progressão, as células alteradas possuem capacidade de invadir outros tecidos e causar metástase, caracterizando uma lesão maligna (INCA, 2020).

Os tumores sólidos são compostos por um microambiente tumoral que desempenha papel fundamental na progressão do câncer (Figura 2). Podem-se distinguir duas porções do microambiente tumoral: o microambiente químico e o microambiente celular. O microambiente químico compreende a pressão parcial de oxigênio ( $pO_2$ ), o pH e a concentração de pequenas moléculas, como óxido nítrico, e metabólitos, como glicose, glutamina e lactato. Por sua vez, o microambiente celular é formado pela vasta amplitude de células tumorais, pelas inúmeras células estromais, como células endoteliais, fibroblastos, chamados especialmente de fibroblastos associados ao câncer (FAC), pois possuem um perfil de proliferação e produção de matriz acentuadas e produção única de citocinas (JUNTTILA; DE SAUVAGE, 2013; PLAKS; KONG; WERB, 2015), e células-tronco mesenquimais. Também compõem essa parcela celular as células imunes, como macrófagos, neutrófilos, células progenitoras mieloides supressoras, entre outras que são responsáveis por promover uma inflamação crônica (CABARCAS; MATHEWS; FARRAR, 2011), e elementos da matriz extracelular (MEC) (SEMENZA, 2016). A interação celular entre as células tumorais e as demais células (estromais, imunes) e componentes do microambiente é primordial na

evolução da doença, sendo esses microambientes distintos nas diferentes fases da doença (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 2 - Ilustração das células de um microambiente tumoral e os diferentes microambientes existentes



Legenda: A imagem superior ilustra os principais tipos celulares presentes em um microambiente tumoral. As imagens inferiores mostram as diferentes composições dos tipos celulares e dos elementos extracelulares de acordo com a localização do tumor e estágio da doença.

Fonte: Adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2011.

### 1.1.1. Câncer colorretal (CCR)

O câncer colorretal (CCR) é a neoplasia maligna que acomete o intestino grosso, em suas porções de cólon e reto, possuindo a segunda maior mortalidade em câncer no mundo e a terceira maior incidência (BRAY et al., 2018). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2023), são esperados cerca de 45.630 novos casos no Brasil para cada ano do triênio 2023 – 2025, sendo 21.970 entre homens e 23.660 entre mulheres (Figura 3). O CCR é, em sua maioria, esporádico, sendo apenas 15-20% dos casos com histórico familiar e 5-10% de casos hereditários (KUIPERS et al., 2015). A taxa de sobrevivência a cinco anos em um

paciente com estágio I da doença é de mais de 90%, ao passo que em um paciente com estágio IV é em torno de 10% (VAN DER JEUGHT et al., 2018).

Figura 3 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma, com ênfase para CCR

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%		
Próstata	71.730	30,0%	Homens		Mama feminina	73.610	30,1%		
Cólon e reto	21.970	9,2%			Mulheres		Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%		
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%		
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%		
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%		
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%		
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%		
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%		
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%		

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Adaptado de INCA, 2023

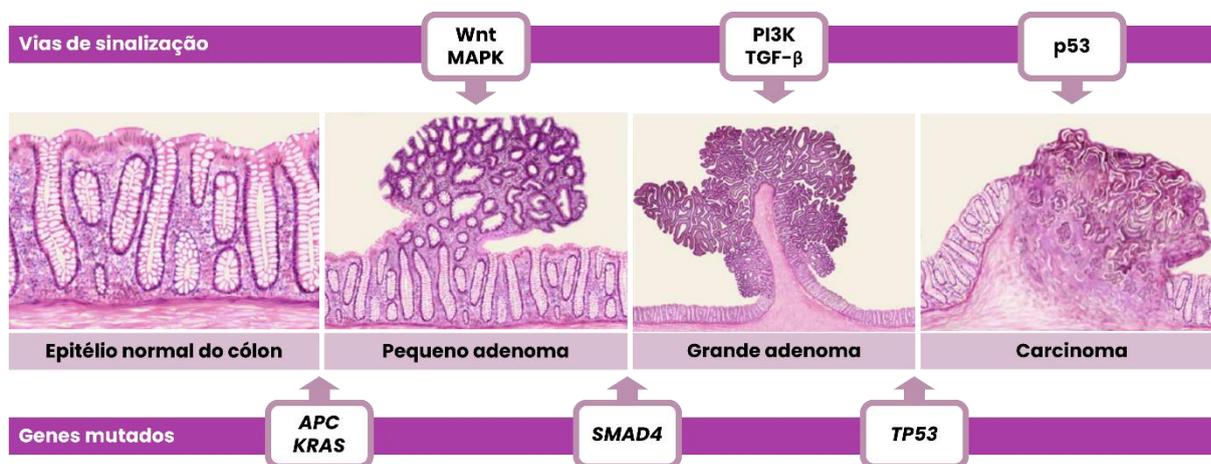
Os fatores de risco para o CCR incluem condições modificáveis e não modificáveis. Entre os fatores não modificáveis, estão a idade acima de 50 anos, doenças inflamatórias crônicas intestinais, como retocolite ulcerativa e doença de Chron, síndromes genéticas, como a polipose adenomatosa familiar e síndrome do câncer colorretal hereditário não poliposo. Já os fatores modificáveis compreendem a obesidade, o tabagismo, o consumo excessivo de álcool, o sedentarismo e dieta rica em carne vermelha (KEUM; GIOVANNUCCI, 2019; SNINSKY et al., 2022).

Apesar da idade avançada ser um fator importante para o surgimento do CCR, estudos recentes mostram um “rejuvenescimento” dessa doença, com uma incidência crescente em indivíduos com menos de 50 anos, estimando-se que correspondam 11% dos casos de cânceres de cólon e 23% dos cânceres de reto em 2030 (SPAANDER et al., 2023).

A carcinogênese colorretal segue um processo de alterações histológicas, genéticas e epigenéticas bem conhecido, chamado de progressão adenoma-carcinoma (Figura 4) (FEARON; VOGELSTEIN, 1990). No modelo clássico, o tumor maligno surge, inicialmente, de um pólip (crescimento anormal de células do epitélio da mucosa) por conta de mutações no gene *APC*. Há a progressão, então, para um pequeno adenoma (<1 cm de tamanho), de histologia tubular, associado a mutações em *KRAS*. O adenoma (tumor benigno) inicial se desenvolve, ao longo dos anos, em um adenoma avançado (>1 cm de tamanho), relacionado com mutações em *SMAD4*. Por fim, o adenoma avançado progride para um carcinoma (tumor

maligno) colorretal, geralmente por disfunção do gene *TP53*. As vias de sinalização de Wnt/ $\beta$ -catenina, MAPK, PI3K e TGF- $\beta$  estão diretamente vinculadas ao processo (KUIPERS et al., 2015). Apesar do modelo clássico refletir a maior parte dos casos de CCR, existem múltiplas vias para a carcinogênese colorretal (CROCKETT; NAGTEGAAL, 2019; KEUM; GIOVANNUCCI, 2019).

Figura 4 – Esquema do processo adenoma-carcinoma colorretal



Legenda: O epitélio normal do cólon sofre mutações nos genes *APC* e *KRAS*, tornando-se um tumor benigno de tamanho pequeno. Nesse estágio, estão atuando intensamente as vias de Wnt e MAPK. Mutações em *SMAD4* levam ao crescimento do adenoma, tornando ativas as vias de PI3K e TGF- $\beta$ . Por fim, mutações em *TP53* levarão ao carcinoma. Histologicamente, o processo inicia-se com a desorganização da morfologia normal das glândulas intestinais, que com a progressão das mutações estende-se para as demais camadas além da mucosa.

Fonte: Adaptado de VOGELSTEIN et al., 2013; KUIPERS et al., 2015.

O CCR é uma doença heterogênea, apresentando diversidades intertumoral (entre tumores) e intratumoral (dentro do próprio tumor) já descritas na literatura (SADANANDAM et al., 2013). Com base nisso, foi proposta uma classificação para o câncer colorretal segundo o perfil de expressão gênica, dividindo-o em quatro subtipos moleculares consensuais: subtipo 1 ou imune, subtipo 2 ou canônico, subtipo 3 ou metabólico e subtipo 4 ou mesenquimal, que se diferenciam quanto às características genéticas e epigenéticas, metabólicas, vias de sinalização e composição do microambiente tumoral (DIENSTMANN et al., 2017; FESSLER; MEDEMA, 2016; GUINNEY et al., 2015).

A localização e o grau de extensão do CCR podem ser determinados através do estadiamento TNM (Classificação de Tumores Malignos). O estágio localmente limitado (estágio I) representa o tumor que atinge até a camada muscular própria da parede do intestino grosso. O estágio localmente avançado (estágio II) caracteriza o tumor que avançou para além da camada muscular própria, podendo chegar à serosa, sem comprometer linfonodos

regionais. O estágio regional (estágio III) corresponde à neoplasia que já alcançou linfonodos regionais. Por fim, o estágio avançado (estágio IV) reflete a fase de maior disseminação do câncer, com presença de focos metastáticos distantes do tumor colorretal (PIÑEROS et al., 2019).

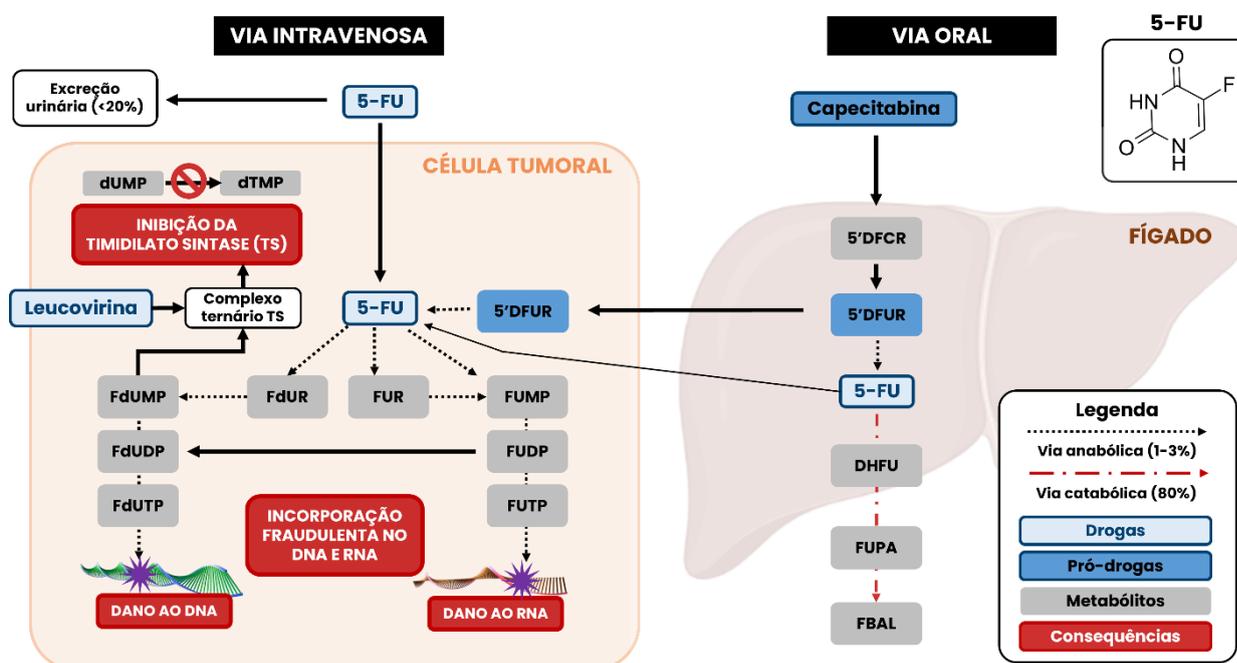
O rastreio e o diagnóstico do CCR são feitos, majoritariamente, através da colonoscopia, podendo ser acompanhada do teste de sangue oculto nas fezes e da tomografia computadorizada (GUPTA, 2022). Estabelecido o diagnóstico, o paciente pode seguir para um tratamento com cirurgia, quimioterapia e/ou radioterapia, a depender do estágio da doença, bem como de outros fatores como o perfil molecular. Para estágios iniciais com presença de tumor regionalizado, a estratégia terapêutica adotada é a ressecção cirúrgica do tumor. Porém, em casos de doença mais avançada, com comprometimento de linfonodos regionais ou metástase em diferentes órgãos, são adotadas intervenções quimioterápicas neoadjuvantes (pré-cirurgia) e/ou adjuvantes (pós-cirurgia), que consistem no uso de agentes citotóxicos. Os agentes quimioterápicos mais utilizados para o tratamento de CCR são 5-fluorouracil, capecitabina, oxaliplatina e irinotecan. Abordagens mais recentes como as terapias-alvo, que se baseiam no combate direcionado de moléculas específicas do tipo tumoral, e imunoterapia, que busca ativar o sistema imune do paciente contra o próprio tumor, têm sido também utilizadas em conjunto para o tratamento de câncer colorretal atualmente (BENSON et al., 2021, 2022; LABIANCA et al., 2013). Apesar da vasta frente de combate, aproximadamente 50% dos pacientes com CCR desenvolvem resistência às terapias convencionais e sofrem com recidivas e metástase, tornando-se um desafio importante no manejo da doença a ser combatido (JEMAL et al., 2008; SAUNDERS; IVESON, 2006).

#### 1.1.1.1. 5-Fluorouracil (5-FU) e a resistência em CCR

O 5-fluorouracil (5-FU) é o principal quimioterápico utilizado no tratamento de CCR desde a década de 1990 (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003). Ele consiste em um análogo da base pirimídica uracila contendo um átomo de flúor ligado ao 5º carbono de sua cadeia, sendo caracterizado como um agente antineoplásico da classe dos antimetabólitos. Seu mecanismo de ação primário é a inibição de uma enzima envolvida na biossíntese *de novo* de nucleotídeos, a timidilato-sintase, que realiza a conversão de dUMP (desoxi-uridina monofosfato) em dTMP (desoxi-timidina monofosfato), necessária para a síntese de DNA na

fase S do ciclo celular. Mecanismos alternativos são a incorporação fraudulenta dos metabólitos de 5-FU na síntese de DNA e RNA, inibindo a atuação das DNA polimerase e RNA polimerase, comprometendo a divisão celular (KUMAR et al., 2023; VODENKOVA et al., 2020). Apesar de ser um dos quimioterápicos mais seguros, o 5-FU pode induzir manifestações adversas como febre, fadiga, mucosite, diarreias, leucopenia e trombocitopenia. Os indivíduos com deficiência da enzima dihidropirimidina desidrogenase são desaconselhados a regimes que utilizam esse quimioterápico por conta de sua alta toxicidade para eles (LATCHMAN; GUASTELLA; TOFTHAGEN, 2014; ZHANG et al., 2018). A estrutura molecular e o metabolismo do 5-FU, bem como de sua pró-droga e droga coadjuvante estão ilustrados na figura 5.

Figura 5 – Estrutura molecular e metabolismo do 5-FU



Legenda: A figura evidencia a estrutura molecular do 5-fluorouracil (5-FU) (canto superior direito) e resume seu metabolismo, de sua pró-droga e droga coadjuvante (capecitabina e leucovorina, respectivamente), bem como suas consequências na célula tumoral. No lado esquerdo, está esquematizada a via anabólica do 5-FU, que leva aos efeitos citotóxicos por meio de sua conversão em metabólitos ativos. O lado direito esquematiza a via catabólica hepática do 5-FU. 5'DFCR: 5'desoxi-5-fluorocitidina; 5'DFUR: 5'desoxi-5-fluorouridina; 5-FU: 5-Fluorouracil; DHFU: dihidro-fluorouracil; dTMP - desoxi-timidina monofosfato; dUMP - desoxi-uridina monofosfato; FBAL:  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanina; FdUDP - fluorodesoxi-uridina difosfato; FdUMP - fluorodesoxi-uridina monofosfato; FdUR - fluorodesoxi-uridina; FdUTP - fluorodesoxi-uridina trifosfato; FUDP - fluoro-uridina difosfato; FUMP - fluoro-uridina monofosfato; FUPA: ácido  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -ureido-propionico; FUR - fluoro-uridina; FUTP - fluoro-uridina trifosfato; TS - timidilato-sintase.

Fonte: O autor, 2023.

A atuação do 5-FU é potencializada com a utilização em conjunto da leucovorina (LV), um ácido folínico sintético, e da capecitabina, uma pró-droga do 5-FU. Os regimes

quimioterápicos para CCR costumam associar o conjunto 5-FU/LV com outras drogas como a oxaliplatina, um agente alquilante que gera adutos de DNA, e o irinotecan, um inibidor de topoisomerase I (KUMAR et al., 2023). Atualmente, os regimes quimioterápicos consistem em 5-FU/LV para estágios iniciais de alto risco e em combinações de 5-FU/LV com oxaliplatina (FOLFOX), irinotecan (FOLFIRI) ou ambos (FOLFOXIRI) para estágios mais avançados, podendo associar com drogas de terapia alvo, como cetuximabe e bevacizumabe (BENSON et al., 2021, 2022; KUMAR et al., 2023). Apesar desses regimes contribuírem com o aumento da sobrevida, cerca de 40% dos pacientes com CCR, em estágios II e III, que receberam tratamento adjuvante com 5-FU após ressecção cirúrgica do tumor tiveram recidiva ou morreram dentro de oito anos. Além disso, quase metade dos pacientes com CCR metastático são resistentes às quimioterapias com 5-FU, levando a uma taxa de sobrevida em cinco anos de aproximadamente apenas 12% (VODENKOVA et al., 2020).

A resistência aos quimioterápicos é um dos maiores obstáculos a ser transposto a fim de um desfecho clínico efetivo dos pacientes com CCR. Alguns mecanismos que contribuem para esse fenômeno incluem modificações no metabolismo e na captação e extrusão das drogas, alterações no alvo do fármaco, aumento do reparo de dano ao DNA e resistência à apoptose (HOLOHAN et al., 2013; MANSOORI et al., 2017). Mais recentemente, um possível mecanismo alternativo de escape aos quimioterápicos proposto é o de entose, ou célula-na-célula, em que uma célula é responsável por engolfar outra similar a fim de se beneficiar em meio a um ambiente hostil (KIANFAR et al., 2022). Em relação ao 5-FU, são descritos como mecanismos de resistência em células tumorais o aumento nos níveis de expressão de timidilato-sintase, aumento na expressão de transportadores de membrana extrusores de droga, aumento da maquinaria de reparo de dano ao DNA e até mesmo aumento de autofagia e interações com o microambiente tumoral (BLONDY et al., 2020; SOUSA-SQUIAVINATO et al., 2022; VODENKOVA et al., 2020).

A quimiorresistência pode ser tanto inata, haja vista o ambiente celular instável e as alterações genéticas das células tumorais, quanto adquirida ao longo do processo terapêutico, sendo caracterizada como um fenômeno complexo que envolve fatores intrínsecos e extrínsecos (HAMMOND; SWAIKA; MODY, 2016; VODENKOVA et al., 2020). Os fatores extrínsecos compreendem o pH, a hipóxia e a própria interação celular com os componentes do microambiente tumoral, como células estromais e elementos de matriz extracelular (JUNTILA; DE SAUVAGE, 2013). Por sua vez, os fatores intrínsecos estão inseridos no contexto da heterogeneidade intratumoral, em que diferentes células tumorais irão carregar diferentes mutações, possuir expressões gênicas diferentes a depender da regulação

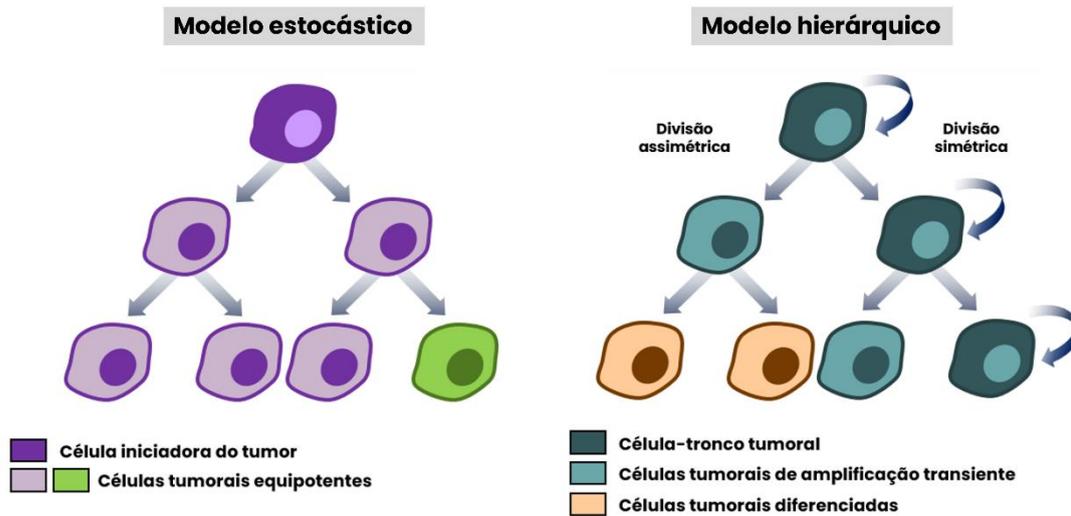
epigenética em curso, bem como padrões distintos de metabolismo e ciclo celular (MANSOORI et al., 2017). Nesse cenário, surge o conceito de um modelo hierárquico da população de células tumorais, no qual as células-tronco tumorais, que ocupam o topo da cadeia hierárquica, desempenham um importante papel na quimiorresistência (GUPTA et al., 2019; KRESO; DICK, 2014).

## 1.2 Células-tronco tumorais (CTT)

As células-tronco tumorais (CTT) são definidas como uma subpopulação de células cancerosas, correspondendo a 0,1-10% da massa tumoral, que detém capacidade de autorrenovação e diferenciação em diferentes progênes, promovendo a heterogeneidade e garantindo a manutenção do tumor. Algumas características são também atribuídas às CTT, como a maior capacidade de invasão e metástase, a resistência às terapias convencionais e a recidiva, o que torna estas células clinicamente relevantes (BATLLE; CLEVERS, 2017; EUN; HAM; KIM, 2017; LYTLE; BARBER; REYA, 2018).

O modelo das células-tronco tumorais, ou modelo hierárquico, se contrapõe ao modelo estocástico no que tange ao surgimento e crescimento tumoral (Figura 6). No modelo estocástico, assume-se que qualquer célula do tumor é capaz de iniciá-lo e mantê-lo e que as inúmeras alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem ao longo do tempo, de forma aleatória, são responsáveis por gerar clones mais agressivos que vão levar à progressão da doença e a metástases. Já no modelo hierárquico, é postulado que apenas uma subpopulação celular específica, denominada de células-tronco tumorais, é capaz de iniciar e manter o crescimento tumoral, dar origem a uma progênie com capacidade proliferativa transiente que levará a células diferenciadas, e responsável por ocasionar as metástases (NGUYEN, 2012).

Figura 6 - Esquema representativo dos modelos de crescimento tumoral: modelo estocástico e modelo de CTT (hierárquico)

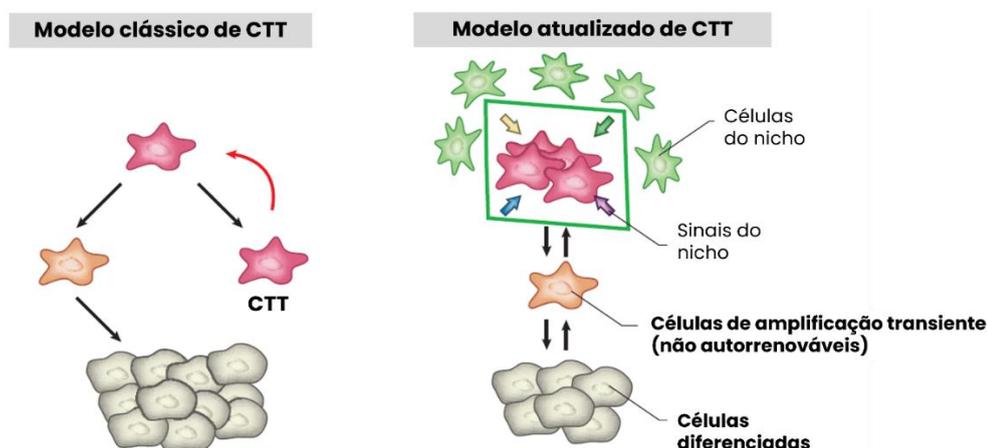


Legenda: No modelo estocástico (esquerda), uma célula qualquer (roxa) inicia a formação do tumor, dando origem a células tumorais com a mesma capacidade de proliferação e manutenção tumoral (lilás e verde). Já no modelo hierárquico (direita), as células-tronco tumorais (verde escuras) são as responsáveis por iniciar um tumor e mantê-lo, através da geração de células de amplificação transiente (verde claro) que se proliferam até formar células tumorais diferenciadas (bege).

Fonte: O autor, 2023.

A origem das CTT é amplamente discutida. Na fase de iniciação da carcinogênese, sugere-se que as CTT possam surgir pelo acúmulo de mutações genéticas tanto em células-tronco saudáveis, como em células progenitoras ou diferenciadas. Já nas fases de promoção e progressão, acreditava-se inicialmente que as CTT só seriam capazes de surgir por meio de divisões simétricas (processo de autorrenovação). Novas evidências, entretanto, propõem um mecanismo dinâmico, em que células tumorais diferenciadas e células de amplificação transiente (não-CTT) podem sofrer reprogramação e se tornarem CTT (Figura 7), um processo em que o microambiente tumoral exerce papel fundamental (BATLLE; CLEVERS, 2017; EUN; HAM; KIM, 2017; PLAKS; KONG; WERB, 2015; WALCHER et al., 2020).

Figura 7 - Esquema representativo do modelo de CTT clássico e do modelo de CTT atualizado



Legenda: No modelo clássico de célula-tronco tumoral (CTT) (esquerda), uma CTT (vermelho) só pode ser originada por meio da autorrenovação, sendo ela responsável por originar células de amplificação transitória (laranja) e estas, de gerar células tumorais diferenciadas (cinza). No modelo atualizado de CTT (direita), células tumorais diferenciadas (cinza) e células de amplificação transitória (laranja), podem sofrer reprogramação e se tornarem CTT (vermelho), sendo este fenótipo mantido por sinais do nicho de CTT.

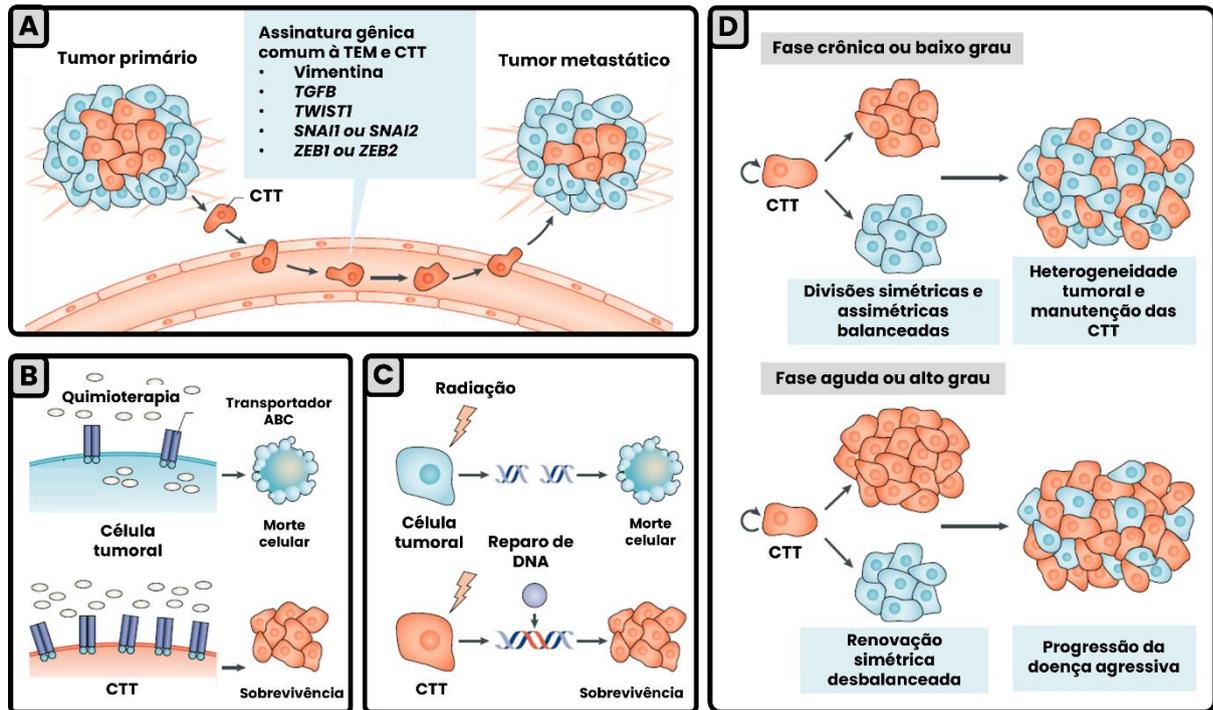
Fonte: Adaptado de BATLLE; CLEVERS, 2017.

Nos anos 1800, foi evocada a primeira ideia sobre a existência de células com capacidade tronco em tumores. Julius Cohnheim (1839-1894), um patologista aluno de Rudolph Virchow, definiu que tumores seriam “neoplasias atípicas de tecido baseadas em resquícios embrionários” (COHNHEIM, 1882; MAEHLE, 2011). Entretanto, as primeiras CTT foram descritas apenas em 1994, primeiramente, em uma neoplasia hematológica, a leucemia mieloide aguda. Lapidot *et al.* (1994) demonstraram que células leucêmicas  $CD34^+$  e  $CD38^-$  possuíam características de células-tronco hematopoiéticas, sendo posteriormente isoladas por Bonnet e Dick (1997). Já em tumores sólidos, as CTT foram inicialmente identificadas em câncer de mama. Al-Hajj *et al.* (2003) detectaram uma subpopulação de células  $CD44^+/CD24^-/Lin^-$  capaz de iniciar a formação de novos tumores. Nos anos seguintes, as CTT foram sendo descritas em diversos outros tipos de câncer, como: cérebro, ovário, próstata, pâncreas, fígado, pele, pulmão e colorretal (EUN; HAM; KIM, 2017).

Além das características básicas que definem as CTT, são conferidas à elas outros atributos como quimiorresistência, radiorresistência, protagonismo na progressão da doença e promoção de metástase (Figura 8). A quimiorresistência é geralmente evidenciada pela presença de transportadores do tipo *ATP-binding cassette* (ABC), que promovem o efluxo das drogas quimioterápicas de dentro da célula. A radiorresistência está, usualmente, aliada a um bom desempenho da maquinaria de reparo de dano ao DNA. A progressão da doença pode estar relacionada ao desbalanço das divisões simétrica e assimétrica, e a promoção de

metástase vinculada a uma assinatura gênica semelhante à de células que sofrem transição epitélio-mesênquima (TEM) (LYTLE; BARBER; REYA, 2018).

Figura 8 - Esquemas das características de CTT



Legenda: A - Promoção de metástase: As CTT (laranja) metastáticas possuem a mesma assinatura gênica de células que sofrem TEM. B - Resistência à quimioterapia: As CTT apresentam transportadores ABC na membrana, permitindo o efluxo de quimioterápicos, enquanto as células tumorais diferenciadas (azul) morrem. C - Resistência à radioterapia: As CTT possuem uma maquinaria de reparo de DNA eficiente, sobrevivendo aos efeitos da radiação, ao contrário das células tumorais diferenciadas. D - Progressão e agressividade da doença: Na fase crônica da doença, as CTT sofrem divisões simétricas e assimétricas de forma balanceada, mantendo a heterogeneidade tumoral e a população de CTT. Na fase aguda, as CTT sofrem muitas divisões simétricas, aumentando sua proporção em relação às células tumorais diferenciadas, tornando a doença mais agressiva.

Fonte: Adaptado de LYTLE; BARBER; REYA, 2018.

Geralmente, a identificação das CTT é realizada por meio de biomarcadores, de superfície ou intracelulares, ou de ensaios funcionais que constata a capacidade de iniciar novos tumores. Os ensaios funcionais que podem ser utilizados para detecção de CTT são o ensaio de formação de colônias ou esferoides (*in vitro*), a formação de tumores em xenotransplantes (*in vivo*) e o rastreamento de linhagem (*in vivo*) (BECK; BLANPAIN, 2013). Os biomarcadores mais comuns para tumores sólidos são: CD24, CD34, CD44, CD166, ALDH1 e CD133 (DA SILVA-DIZ et al., 2018; MEDEMA, 2013).

Assim como as células-tronco fisiológicas, as CTT residem em nichos, que são definidos como microambientes especializados que regulam o destino das células-tronco por prover informações via contato célula-célula, célula-matriz ou fatores solúveis. Do ponto de

vista celular, participam deste nicho os FAC, as células-tronco mesenquimais, as células imunes inflamatórias, como os macrófagos associados ao tumor, os neutrófilos associados ao tumor e as células progenitoras mieloides supressoras, as células endoteliais e as células tumorais não-CTT. No aspecto químico e estrutural, temos a interação com a matriz extracelular, o nicho hipóxico e o nicho perivascular. Os nichos podem variar de acordo com a localização das células e o estágio da doença (CABARCAS; MATHEWS; FARRAR, 2011; PLAKS; KONG; WERB, 2015).

Embora sejam classificadas como uma subpopulação específica de células da massa tumoral, as CTT são heterogêneas e possuem plasticidade. De acordo com os estímulos recebidos, elas são capazes de sofrer transições fenotípicas. É descrito na literatura que CTT positivas para diferentes marcadores e vias de sinalização podem coexistir no mesmo tumor, indicando que há uma diversidade de CTT. Isso se deve, possivelmente, pela instabilidade genômica e regulação epigenética que resultam na expressão de padrões fenotípicos divergentes. (EUN; HAM; KIM, 2017).

### 1.2.1 Células-tronco tumorais colorretais (CTTC)

As CTT colorretais (CTTC) foram originalmente descritas por O'Brien *et al.* (2007) em um experimento que mostrou que uma subpopulação de células tumorais colorretais CD133+ era capaz de promover o crescimento de tumor por xenotransplante em camundongos imunodeficientes. As primeiras evidências de quimiorresistência das CTT colorretais também foram obtidas de células CD133+, que não responderam ao tratamento com 5-FU e oxaliplatina (HIRATA *et al.*, 2019; TODARO *et al.*, 2007).

As CTTC costumam se originar de um acúmulo de mutações em células-tronco intestinais ou células intestinais diferenciadas alto o suficiente para causar a transformação maligna (BEN-ZE'EV; BASU; HAASE, 2016; ZHOU *et al.*, 2018) e assim como as demais CTT, também são heterogêneas (GAO *et al.*, 2013). As vias mais conhecidas por regular essa fração celular são Wnt/ $\beta$ -catenina, TGF- $\beta$ , Notch e Hedgehog (ZEUNER *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2018). Entre os principais marcadores das CTT colorretais estão CD133, CD44, CD24, EpCAM, ALDH1 e LGR5 (TSUNEDOMI *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2018).

O CD133, também conhecido como Prominina-1, é uma glicoproteína transmembrana que contém 865 aminoácidos e peso molecular de 120 kDa. Sua cadeia polipeptídica consiste

em um domínio N-terminal extracelular, cinco domínios transmembranares e um domínio C-terminal citoplasmático contendo 59 aminoácidos, com nove sítios de N-glicosilação distribuídos nas duas alças extracelulares, que estabilizam a estrutura terciária final da proteína. Essa glicoproteína é um produto do gene *PROM1*, localizado no cromossomo 4 (4p15.33) em humanos e possui diferentes variantes, cuja expressão é regida por cinco promotores alternativos, sendo alguns passíveis de regulação por metilação (GLUMAC; LEBEAU, 2018; LI, 2013a). O CD133 é normalmente expresso por células hematopoiéticas, células endoteliais e células neuroepiteliais, porém sua função fisiológica ainda não está clara. Por ser encontrado, preferencialmente, em microvilosidades e protruções da membrana plasmática e possuir uma afinidade por colesteróis, sugere-se que haja um envolvimento com a organização de membrana (GLUMAC; LEBEAU, 2018; IROLLO; PIROZZI, 2013).

No câncer, o CD133 já foi utilizado para identificar CTT de diversos tipos de tumores sólidos, como glioblastoma, câncer de próstata, câncer de pulmão, câncer de ovário, carcinoma hepatocelular e CCR. Em muitos estudos, as CTT CD133+ demonstraram possuir a capacidade de autorrenovação e de restabelecimento de uma massa tumoral histologicamente semelhante após transplante em camundongos imunodeficientes (GLUMAC; LEBEAU, 2018). Essas células foram também associadas às quimio e radiorresistências, à metástase e à angiogênese (HATANO et al., 2017; JAHANAFROOZ et al., 2020; LI, 2013).

Entretanto, seu uso como marcador para identificação e isolamento das CTT é controverso. Alguns motivos levam a isso, como: (1) um conjunto de estudos mostraram que células CD133+ foram incapazes de regenerar a morfologia original do tumor em xenotransplante, sugerindo que ele seja expresso também por células diferenciadas, (2) alguns estudos mostraram que células CD133- ou com baixa expressão possuem habilidade de iniciar a formação de novos tumores, sugerindo que o CD133 não seja um marcador exclusivo de CTT (GLUMAC; LEBEAU, 2018; IROLLO; PIROZZI, 2013). Apesar da necessidade de mais estudos acerca de sua acurácia como marcador, o CD133 continua sendo relevante em estudos de CTT em CCR (ABDOU HASSAN; MUQRESH; OMAR, 2022).

Em relação ao CCR, diversos estudos demonstraram que as células CD133+ possuem características como capacidade de iniciar tumores, autorrenovação, proliferação, invasão e diferenciação, bem como de resistência à quimioterapia e radioterapia (REN, 2013; ZHOU et al., 2018). Ricci-Vitiani *et al* (2007) demonstraram que a população de células tumorais colorretais CD133+, correspondentes à 2,5% do total de células, foi capaz de reproduzir o tumor original em camundongos imunodeficientes em modelo de xenotransplante em série, enquanto as células CD133- não conseguiram tal feito. Seus estudos *in vitro* também

evidenciaram que as células CD133+ cresceram exponencialmente, por mais de um ano, como esferoides indiferenciados. Além disso, a abundância relativa da expressão de CD133 pode ser uma forma de detecção mais apropriada. Liao *et al* (2010) selecionaram células CD133+ da linhagem tumoral colorretal SW620 e as separou em três diferentes categorias: CD133 *high* (alta expressão), CD133 *mid* (média expressão) e CD133 *low* (baixa expressão). O subgrupo CD133 *high* exibiu uma maior taxa de crescimento em relação aos dois outros grupos, apesar do grupo CD133 *low* continuar com sua capacidade tumorigênica. Muitos estudos clínicos recentes sugerem que a expressão de CD133 possui um valor prognóstico significativo para a predição da sobrevida do paciente com CCR (CHEN *et al.*, 2013; FANG *et al.*, 2017; HORST *et al.*, 2009).

Estudos recentes mostram que a mitocôndria é uma organela que exerce um importante papel nas CTTC (COLAK *et al.*, 2014; SONG; JEONG; HAN, 2015), o que as torna um importante alvo de estudos nessa temática.

### 1.3 Mitocôndria e a dinâmica mitocondrial

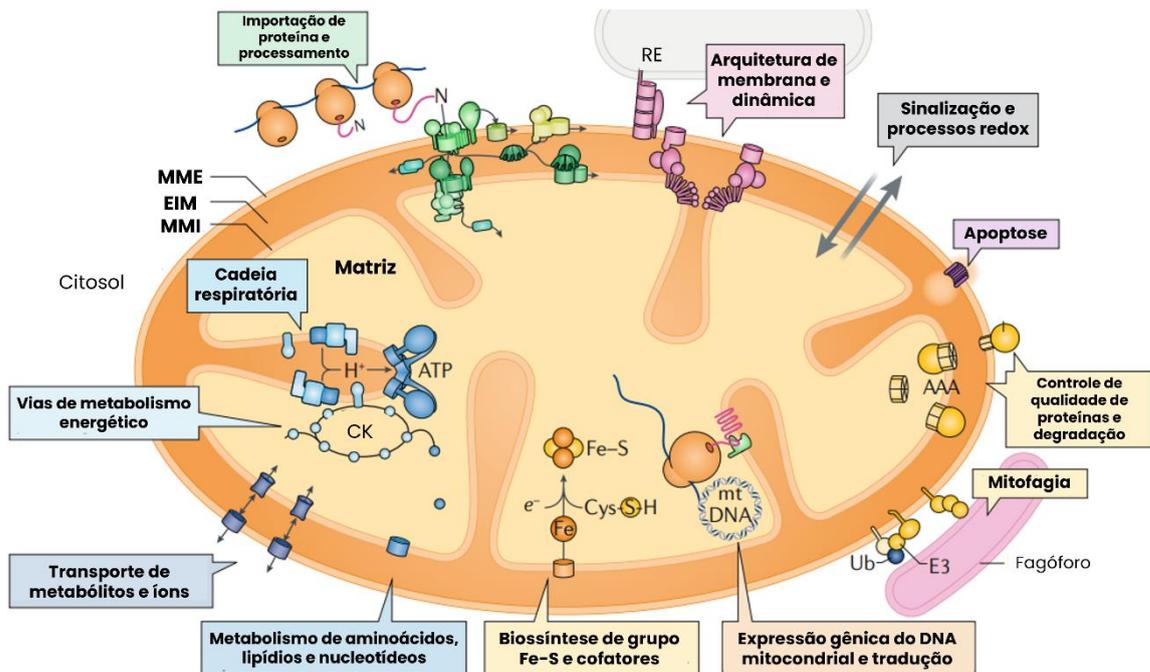
A mitocôndria é uma organela essencial para a vida das células eucarióticas, sendo chamada de “casa de força” ou “poço de energia” da célula, tendo em vista sua íntima associação com a bioenergética, produzindo a maior parte de energia requerida em forma de ATP (REICHERT; NEUPERT, 2004). Seu nome foi cunhado por Carl Benda (1898) pela combinação das palavras gregas “*mitos*” (filamento) e “*chondrion*” (grão, partícula). A teoria endossimbiótica postula que as mitocôndrias surgiram de  $\alpha$ -proteobactérias incorporadas em ancestrais de células eucarióticas, estabelecendo uma relação mutualística (LANE; MARTIN, 2010).

Sua organização ultraestrutural foi revelada na década de 1950, por meio da microscopia eletrônica de transmissão (PALADE, 1953). Ela é composta por um revestimento de dupla membrana: a membrana mitocondrial externa (MME), que fica em contato com o citosol, e a membrana mitocondrial interna (MMI), devidamente interpostas por um espaço chamado de espaço intermembranoso (EIM). A MMI possui inúmeras invaginações que formam as cristas mitocondriais que, por sua vez, delimitam um compartimento interno chamado de matriz mitocondrial. Na matriz mitocondrial, encontramos imersos seus ribossomos próprios e o DNA mitocondrial (DNAMt), seu genoma circular que codifica

apenas 13 proteínas nos seres humanos (*Homo sapiens*), sendo sua maioria proteínas da cadeia respiratória, que se encontram inseridas na MMI (NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012; PFANNER; WARSCHEID; WIEDEMANN, 2019).

Apesar de sua intensa relação com o metabolismo energético celular, a mitocôndria atua direta ou indiretamente em diversas outras funções igualmente importantes, tais como: proliferação, transporte de íons e metabólitos, metabolismo de aminoácidos, lipídios e nucleotídeos, sinalização celular retrógrada e processos redox, controle de qualidade de proteínas e apoptose (PFANNER; WARSCHEID; WIEDEMANN, 2019) (Figura 9).

Figura 9 – Ilustração da estrutura da mitocôndria e suas múltiplas funções



Legenda: A figura evidencia a estrutura da mitocôndria e suas variadas funções. A mitocôndria é composta pela membrana mitocondrial externa (MME), espaço intermembranoso (EIM), membrana mitocondrial interna (MMI) e matriz mitocondrial, onde está imerso o DNA mitocondrial (DNAm) e seus ribossomos. Dentre as funções dessa organela, estão importação de proteínas citosólicas e processamento, organização da arquitetura de membrana e sua dinâmica, sinalização e processos redox, apoptose, controle de qualidade de proteínas e degradação, mitofagia, expressão gênica do DNAm e tradução, biossíntese de grupos Fe-S (ferro-enxofre) e cofatores, metabolismo de aminoácidos, lipídios e nucleotídeos, transporte de metabólitos e íons, vias de metabolismo energético, como o ciclo de Krebs (CK) e fosforilação oxidativa por meio da cadeia respiratória. CK: ciclo de Krebs, DNAm: DNA mitocondrial, EIM: espaço intermembranoso, Fe-S: ferro-enxofre, MME: membrana mitocondrial externa, MMI: membrana mitocondrial interna, RE: retículo endoplasmático, Ub: ubiquitina.

Fonte: Adaptado de PFANNER; WARSCHEID; WIEDEMANN, 2019.

Por muito tempo, as mitocôndrias eram vistas como organelas estáticas, solitárias e com morfologia única. Contudo, na década de 1980, com o avanço da microscopia para a observação de células vivas, foi-se capaz de perceber que as mitocôndrias são altamente

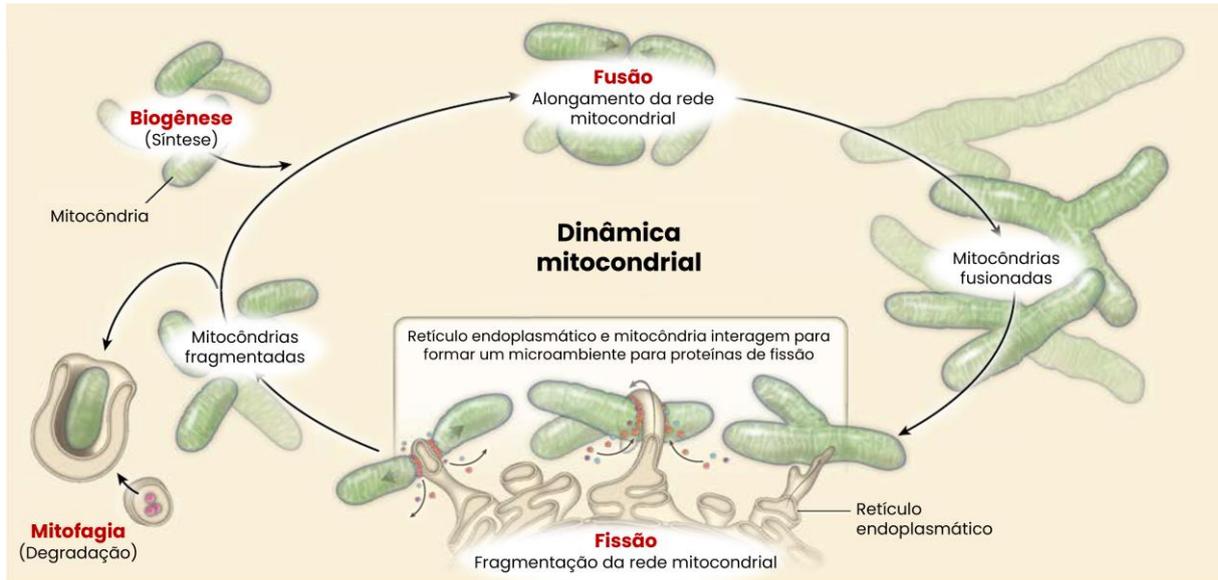
dinâmicas, capazes de formar extensas redes mitocondriais interconectadas e se deslocar dentro das células por meio do citoesqueleto em diversos seres eucarióticos, adquirindo diferentes padrões morfológicos e de distribuição dentro da célula para cada espécie ou tipo celular (BEREITER-HAHN, 1990; WESTERMANN, 2010).

A dinâmica mitocondrial é um conjunto de processos antagônicos que ocorrem de maneira balanceada na célula, obedecendo as condições fisiológicas. Ela compreende a biogênese mitocondrial, a fusão e fissão mitocondriais e a mitofagia (Figura 10). O ciclo de vida da mitocôndria se inicia com a biogênese mitocondrial, que corresponde à síntese dessas novas organelas por meio de divisão e crescimento de mitocôndrias pré-existentes, e se encerra com a mitofagia, que caracteriza a degradação das mitocôndrias excedentes ou danificadas por meio de autofagia, estabelecendo-se o *turnover*<sup>1</sup> mitocondrial. Entre esses processos, encontram-se a fusão e fissão mitocondriais, que atuam regulando diretamente a morfologia da mitocôndria. A fusão mitocondrial promove a união de duas mitocôndrias independentes em uma única organela, gerando estruturas longas, tubulares e interconectadas que podem formar grandes redes. Em geral, esse processo ocorre quando há um aumento na demanda de produção de ATP, possibilitando também uma troca no conteúdo de matriz, sendo bem visualizado em células metabolicamente ativas. Por sua vez, a fissão mitocondrial acarreta na fragmentação de uma única mitocôndria em duas, formando estruturas fragmentadas, menores e mais esféricas. Esse processo costuma ocorrer quando há a necessidade de distribuição dessas organelas e de *clearance* (em português, remoção) de partes danificadas com envio para mitofagia, sendo característicos de células mais quiescentes ou em divisão celular (ARCHER, 2013; GIACOMELLO et al., 2020; WESTERMANN, 2010).

---

<sup>1</sup> Renovação

Figura 10 – Ilustração esquemática da dinâmica mitocondrial



Legenda: A imagem mostra o ciclo de vida da mitocôndria. O ciclo se inicia com a biogênese mitocondrial, em que são sintetizadas novas organelas e finalizada com o processo de mitofagia, que leva a mitocôndria à degradação. Entre esses processos, estão a fusão mitocondrial, que promove o alongamento da rede mitocondrial e à formação de perfis mitocondriais tubulares interconectados, e a fissão mitocondrial, que leva à fragmentação da rede mitocondrial, gerando perfis mitocondriais mais esféricos e fragmentados.

Fonte: Adaptado de ARCHER, 2013.

Diversas síndromes monogênicas, como a atrofia óptica e a microcefalia congênita, são ocasionadas pela mutação em genes de mediadores da dinâmica mitocondrial. Entretanto, outras doenças podem exibir anormalidades adquiridas nesse processo mitocondrial, como a doença de Parkinson, a hipertensão arterial pulmonar e o câncer (ARCHER, 2013). Em câncer, a dinâmica mitocondrial tem um grande impacto sobre o suporte da proliferação e a resistência a diferentes tipos de estresse. Porém, os processos de fissão e fusão, bem como da biogênese e mitofagia, possuem efeitos muito variados a depender do estágio da doença e da origem tecidual do tumor (MAYCOTTE et al., 2017).

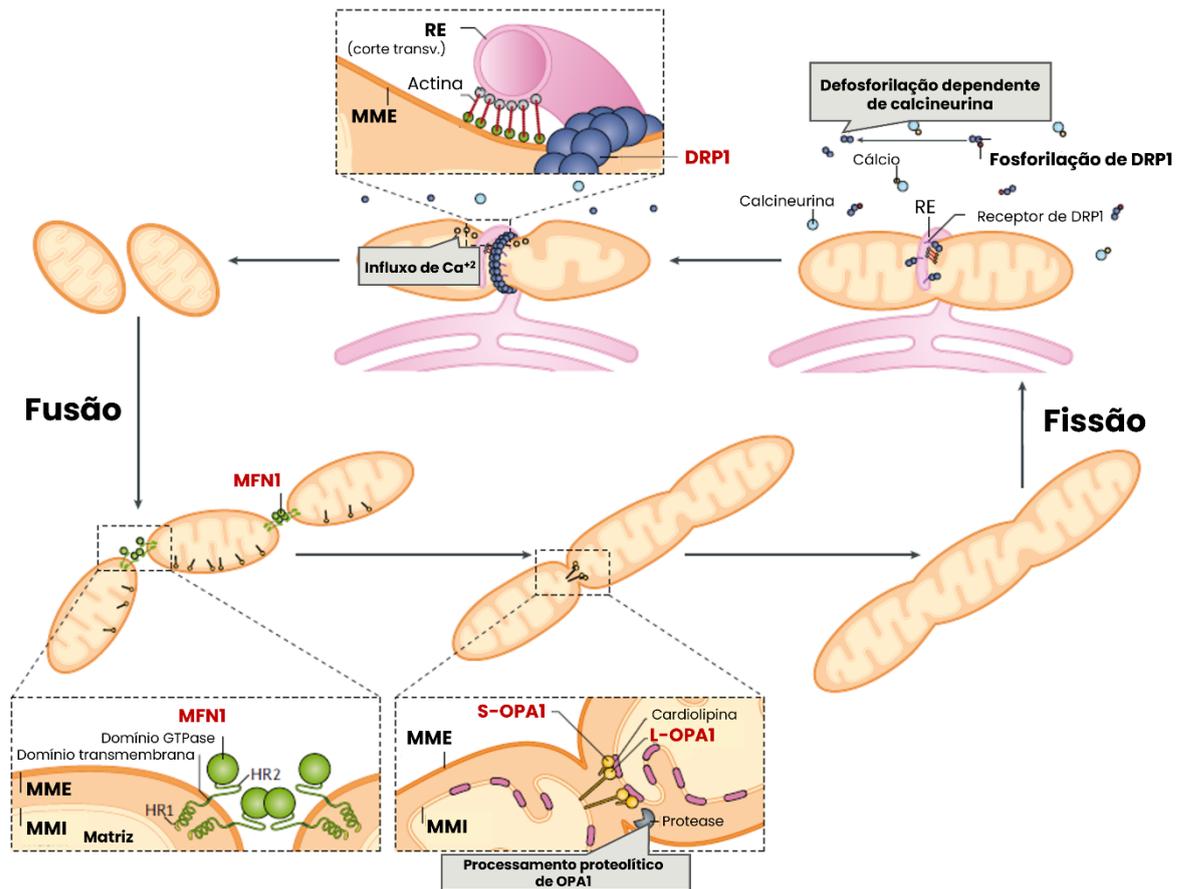
### 1.3.1 Fusão e fissão mitocondriais

Os processos de fusão e fissão mitocondriais em células de mamíferos são reguladas por proteínas GTPase da família das dinaminas (LIESA; PALACÍN; ZORZANO, 2009). A fusão mitocondrial é mediada pelas mitofusinas 1 e 2 (MFN1 e MFN2), que se encontram inseridas na MME, e pela *optic atrophy 1* (OPA1) que está localizada na MMI. Para a fusão

da MME, é necessária a atuação das proteínas MFN1 e MFN2. Elas são responsáveis por formar hetero ou homodímeros que, por meio da hidrólise do GTP, unem as membranas externas de duas mitocôndrias adjacentes. Apesar de possuírem alta homologia estrutural, MFN1 e MFN2 parecem possuir papéis distintos. A MFN1 está diretamente ligada à fusão da MME de mitocôndrias, enquanto a MFN2 age na interação entre elas ou na justaposição das mitocôndrias com outras organelas, como o retículo endoplasmático. Por sua vez, a fusão da MMI depende da proteína OPA1, que também possui papel importante na manutenção da estrutura das cristas mitocondriais. A OPA1 possui duas formas: a forma longa, conhecida como L-OPA1, e a forma curta, conhecida como S-OPA1. O balanço entre elas é mediado por um processamento proteolítico de enzimas, como OMA1. Para que haja a fusão da MMI, a L-OPA deve estabelecer uma interação heterotípica *trans* com uma cardiolipina, um fosfolípido característico da MMI, levando à união das membranas internas. A forma S-OPA1 demonstrou aumentar a capacidade de fusão do complexo L-OPA1-cardiolipina (GIACOMELLO et al., 2020; LIESA; PALACÍN; ZORZANO, 2009; SESSIONS; KASHATUS, 2021; WESTERMANN, 2010).

A fissão mitocondrial é conduzida, primariamente, pela *dynamin-related protein 1* (DRP1) e ocorre em regiões de contato com o retículo endoplasmático. A DRP1 é uma proteína citosólica que se transloca para a mitocôndria quando ativada, ligando-se a receptores presentes na MME, como *mitochondrial fission factor* (MFF), *mitochondrial dynamics protein of 49 kDa* (MID49), *mitochondrial dynamics protein of 51 kDa* (MID51) e *mitochondrial fission 1 protein* (FIS1). Após a ligação aos receptores, a DRP1 se oligomeriza, formando uma estrutura helicoidal ao redor da mitocôndria, levando à sua constrição. A etapa final de cisão depende do recrutamento da proteína *dynamin 2* (DNM2), enfim gerando duas mitocôndrias independentes. A translocação de DRP1 vai depender da fosforilação em resíduos de serina (Ser). Quando DRP1 é fosforilada na Ser637, como por exemplo por PKA e CaMK1 $\alpha$ , ela não pode exercer seu papel e fica retida no citoplasma. Porém, com a defosforilação da Ser637 por meio da calcineurina, a DRP1 pode se translocar para a mitocôndria e executar sua função. A fosforilação em Ser616 também garante a ativação da DRP1, podendo ser promovida pela ação de CDK1/ciclina B, CDK5/ciclina B e ERK1/2 (CHEN; CHAN, 2017; GIACOMELLO et al., 2020; LIESA; PALACÍN; ZORZANO, 2009; SESSIONS; KASHATUS, 2021; WESTERMANN, 2010). Os mecanismos moleculares dos processos de fusão e fissão estão ilustrados na Figura 11.

Figura 11 – Representação dos eventos moleculares de fusão e fissão mitocondriais



Legenda: A ilustração traz um esquema dos processos moleculares envolvendo os processos de fusão e fissão. A fissão mitocondrial necessita da interação da mitocôndria com o retículo endoplasmático liso. Por meio da ativação da proteína DRP1, esta se oligomeriza ao redor da mitocôndria culminando em sua constricção, produzindo duas organelas independentes. Já o processo de fusão depende da atuação da proteína MFN1, que forma homodímeros e leva à fusão da MME, e da proteína OPA1, que leva à fusão das MMI em interação com o fosfolípido cardiolipina, promovendo o surgimento de uma única organela. DRP1: *dynamín-related protein 1*; L-OPA1: *long- optic atrophy 1*; MFN1: mitofusina 1; MME: membrana mitocondrial externa; MMI: membrana mitocondrial interna; RE: retículo endoplasmático; S-OPA1: *short-optic atrophy 1*.

Fonte: Adaptado de GIACOMELLO et al., 2020.

No câncer, a fissão e a fusão podem adquirir caráter pró-tumorigênico ou anti-tumorigênico dependendo do tipo de câncer e da progressão da doença. Na sua grande maioria, a fissão mitocondrial foi associada a um papel favorável à evolução do tumor, tendo a inibição de DRP1 como um fator promotor de redução da taxa de crescimento celular e aumento de apoptose em estudos em câncer de mama, cólon, pulmão, pâncreas, fígado e melanoma (CHEN; CHAN, 2017; MAYCOTTE et al., 2017). A fissão também tem importante participação no processo de migração e invasão. Zhao *et al.* (2013) demonstraram que carcinomas de mama invasivos e metastáticos exibiam maiores níveis de DRP1 e menor expressão de MFN1 em comparação com tumores de mama não metastáticos. Já em CCR, Jiensinue *et al.* (2018) demonstraram que a promoção da fissão mitocondrial por uma droga

antineoplásica adjuvante foi responsável pela redução da viabilidade celular de células de linhagem tumoral colorretal por indução de apoptose. Em consonância com esse trabalho, Zhang *et al.* (2022) evidenciaram que uma proteína remodeladora de cromatina promove, por meio da ativação de um eixo de sinalização, o desenvolvimento de CCR por inibição da fissão mitocondrial.

Em relação às CTT, os efeitos dos processos de fissão e fusão também são bem heterogêneos entre os diferentes tipos de tumores. Em geral, a manutenção do estado tronco e da resistência aos quimioterápicos parecem estar apoiados na fosforilação oxidativa e mitofagia, que são impulsionados pela fusão e fissão mitocondriais, respectivamente (SESSIONS; KASHATUS, 2021). Diferentes estudos com câncer de ovário exibiram o favorecimento da quimiorresistência em CTT tanto pelo aumento de redes mitocondriais tubulares interconectadas por meio da fusão (KONG et al., 2015), quanto pela suprarregulação da mitofagia por meio da fissão mitocondrial (ZAMPIERI et al., 2020).

### 1.3.2 Biogênese mitocondrial e mitofagia

A homeostase mitocondrial é preservada por uma regulação fina entre dois processos: a biogênese mitocondrial, que gera novas mitocôndrias, e a mitofagia, que elimina mitocôndrias danificadas. Dentre as inúmeras moléculas envolvidas nesses processos, destacam-se o *peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator* (PGC-1 $\alpha$ ), o principal regulador da biogênese mitocondrial, e o complexo *PTEN-induced kinase 1* (PINK1)/Parkin, que sinaliza mitocôndrias disfuncionais para encaminhamento à autofagia (POPOV, 2020; YOO; JUNG, 2018).

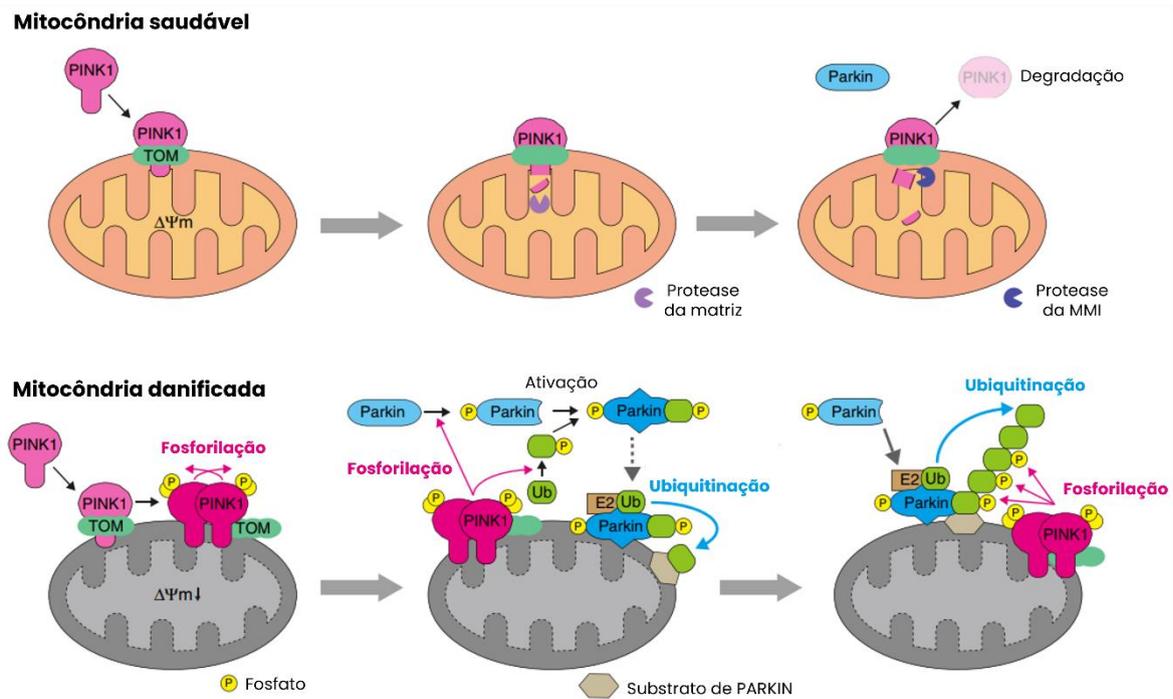
A biogênese mitocondrial é o processo de crescimento e divisão de mitocôndrias pré-existentes. Ela requer síntese e importação coordenadas de milhares de proteínas codificadas pelo genoma nuclear, bem como da replicação do DNAm. Essa biogênese é estimulada por fatores de estresse do meio como restrição de nutrientes, baixas temperaturas, estresse oxidativo, divisão celular, autorrenovação e diferenciação (JORNAYVAZ; SHULMAN, 2010). Em mamíferos, a biogênese mitocondrial é regida pelo PGC-1 $\alpha$ , um cofator de regulação transcricional, responsável por ativar diferentes fatores transcricionais, como *nuclear respiratory factors 1 e 2* (NRF1 e NRF2). Estes, por sua vez, contribuem para a expressão de importantes enzimas mitocondriais e para a expressão de *mitochondrial*

*transcription factor A* (TFAM), que conduz a transcrição e a replicação do DNAm. No câncer, LeBleu *et al.* (2014) demonstraram que a biogênese mitocondrial foi aliada ao caráter invasivo e metastático por meio da ativação de PGC-1 $\alpha$ . Em CCR, Liu *et al.* (2020) exibiram que a captação mitocondrial de cálcio promoveu a biogênese mitocondrial por inibição da fosforilação de TFAM, promovendo o crescimento tumoral *in vivo* e *in vitro*.

A mitofagia é um tipo de macroautofagia seletiva que compreende a remoção por degradação de mitocôndrias danificadas. Há formação de uma membrana, o fagóforo, que envolve uma mitocôndria disfuncional gerando uma vesícula de dupla membrana, o autofagossomo. Posteriormente, esse autofagossomo é direcionado à fusão com lisossomos que vão levar a digestão dos componentes mitocondriais. O reconhecimento da mitocôndria pelo autofagossomo em formação ocorre por meio de mediadores que interagem com a *microtubule-associated protein light-chain 3* (LC3), dentre eles está a via do complexo PINK1/Parkin (YOO; JUNG, 2018).

A via de mitofagia por PINK1/Parkin é composta por PINK1, uma proteína serina-treonina quinase mitocondrial, e Parkin, uma E3-ubiquitina ligase citosólica. Sob condições normais, PINK1 é sintetizada e enviada para a mitocôndria onde é alvo de enzimas proteolíticas na matriz e na MMI, tendo sua forma clivada translocada para o citosol e direcionada para degradação proteossomal. Em contrapartida, quando há um dano mitocondrial que induz sua despolarização de membrana, a clivagem de PINK1 é reduzida, culminando em seu acúmulo na MME. Aglomerada, ela se autofosforila e se ativa, fosforilando moléculas de ubiquitina que recrutam Parkin. Já na MME, Parkin é ativada por fosforilação por PINK1 e promove a poliubiquitinação de diversos substratos, cujo destino será a degradação por proteossomas. Entre esses substratos estão as MFN1 e MFN2, levando à fissão mitocondrial acoplada à mitofagia. As cadeias de poliubiquitina fosforilada acabam servindo de base para uma cascata de eventos moleculares que termina na formação do autofagossomo (Figura 12) (EIYAMA; OKAMOTO, 2015; NGUYEN; PADMAN; LAZAROU, 2016; YOO; JUNG, 2018).

Figura 12 – Via de PINK1/Parkin da mitofagia



Legenda: A ilustração evidencia a via de PINK1/Parkin da mitofagia. Acima, vemos o exemplo de uma mitocôndria saudável, em que PINK1 é translocada para membrana mitocondrial externa e degradada por enzimas proteolíticas da matriz e da MMI, sendo levada para a degradação. Abaixo, temos o exemplo de uma mitocôndria danificada, com seu potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ) diminuído em que PINK1 se estabiliza, se agrega e se autofosforila, ativando-se. Com isso, ela fosforila moléculas de ubiquitina que recrutam moléculas de Parkin, também fosforiladas por PINK1. Dessa forma, Parkin fica ativado e promove a poliubiquitinação de diversos substratos, levando-os à degradação proteossomal.  $\Delta\Psi_m$ : potencial de membrana mitocondrial; E2: enzima conjugadora; MMI: membrana mitocondrial interna; PINK1: *PTEN-induced kinase 1*; TOM: *Translocase of the outer membrane*; Ub: ubiquitina.

Fonte: Adaptado de EIYAMA; OKAMOTO, 2015.

Em CCR, Yan *et al.* (2017) observaram que CTTC CD44+/CD133+ de uma linhagem celular colorretal eram mais resistentes ao tratamento com um quimioterápico e possuíam uma alta expressão de proteínas relacionadas à mitofagia. Também nesse viés, Takeda *et al.* (2019) demonstraram que a mitofagia estava aumentada na população de CTTC em comparação às não-CTTC e que a supressão de proteínas associadas à formação do autofagossomo levou à diminuição da população de CTTC CD44+/CD133+.

Com isso, haja vista que a importante relação da mitocôndria com o CCR e, em especial com as CTTC (RAINHO *et al.*, 2023), ainda não é bem explorada na literatura, são necessários maiores estudos acerca da temática a fim de alcançar melhores benefícios clínicos, seja no diagnóstico ou na terapia.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Estudar o fenótipo de células-tronco tumorais e a dinâmica mitocondrial em células de linhagem tumoral de câncer colorretal refratárias ao tratamento com 5-fluorouracil.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Obter as células tumorais refratárias ao tratamento com 5-fluorouracil da linhagem HT-29;
- b) Comparar as células tumorais refratárias ao tratamento com 5-fluorouracil da linhagem HT-29 com as células não tratadas quanto à:
  - morfologia das células nos diferentes dias, por microscopia óptica com contraste de fase;
  - viabilidade celular, por ensaio com WST-1;
  - expressão de RNA mensageiro (RNAm) de genes de marcador de células-tronco tumorais (*PROM1*), fatores de pluripotência (*SOX2*, *POU5F1*, *NANOG*), dinâmica mitocondrial (*DNM1L*, *MFN1*, *MFN2*), biogênese mitocondrial (*PPARGC1A*) e mitofagia (*PINK1*, *PRKN*), por RT-qPCR;
  - expressão de CD133, o potencial de membrana mitocondrial e a viabilidade celular, por citometria de fluxo;
  - expressão de CD133, por imunocitoquímica indireta;
  - presença de gotículas lipídicas com coloração de Oil Red O, por microscopia óptica de campo claro;
  - morfologia da rede mitocondrial, por microscopia de fluorescência;
  - ultraestrutura celular e das mitocôndrias, por microscopia eletrônica de transmissão.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Cultura de células

O presente trabalho foi realizado com a linhagem celular HT-29 (HTB-38, ATCC), obtida de um tumor primário de adenocarcinoma colorretal, e cedida pelo Prof. João Ramos Costa Andrade – Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – Faculdade de Ciências Médias – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. A linhagem possui morfologia epitelial, é aderente e considerada moderadamente diferenciada. As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) *high glucose* (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab), 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina e 0,006 mg/mL de anfotericina B, mantidas à temperatura de 37°C e à atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>.

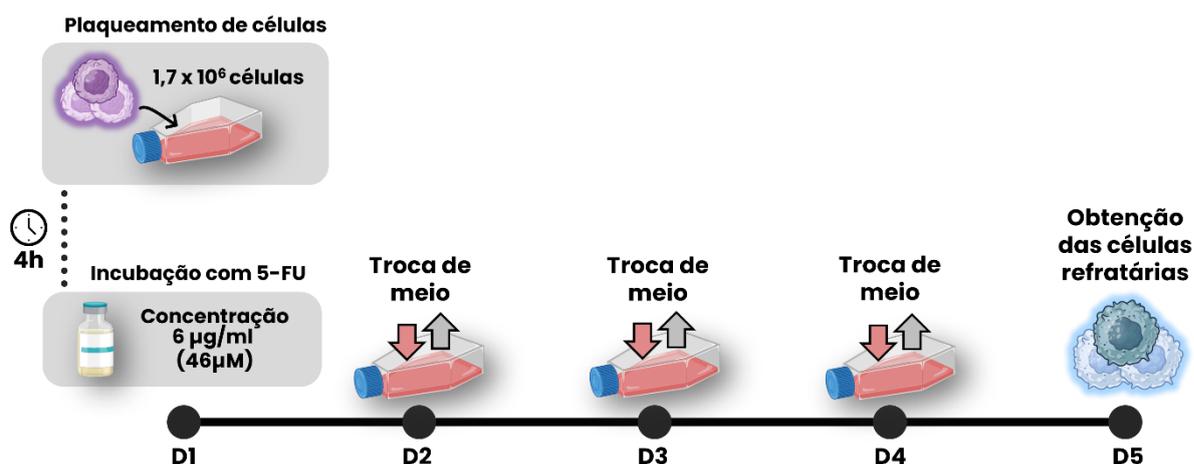
Para manutenção das células em cultura, a passagem era realizada quando o tapete celular atingia uma confluência de cerca de 80%, com o uso de tripsina/EDTA 0,25% e eram plaqueadas na densidade de  $2 \times 10^6$  células em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> para expansão. O meio de cultura era trocado a cada dois ou três dias. Para realização dos experimentos, eram utilizadas garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> e placas de 6, 24 e 96 poços.

O congelamento das células para criopreservação foi realizado utilizando-se um meio de congelamento composto por 90% SFB e 10% dimetilsulfóxido (DMSO) mediante um resfriamento gradativo. Os criotubos com células em meio de congelamento eram incubados por 10 a 15 minutos em isopor com gelo e posteriormente transferidos para o *freezer* à temperatura de -80°C, por um período mínimo de 24 h e máximo de 1 mês. Por último, os criotubos eram passados para o botijão criogênico contendo nitrogênio líquido. Para o descongelamento das células, os criotubos eram retirados do botijão criogênico e rapidamente incubados à 37°C. Com o total descongelamento, a suspensão de células era passada para a garrafa de cultura com DMEM suplementado com 20 % SFB. No dia seguinte, era feita a troca do meio de cultura com a suplementação convencional mencionada anteriormente, para remoção do DMSO residual.

### 3.2 Obtenção das células tumorais refratárias ao tratamento com 5-FU

O protocolo de obtenção das células refratárias ao tratamento com 5-FU foi adaptado de KOTLARZ et al., 2019. (Figura 13). No primeiro dia, as células da linhagem HT-29 foram plaqueadas na densidade de  $1,7 \times 10^6$  em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> com 12 mL de meio de cultura. Após 4 horas, para garantir a adesão das células à garrafa, foi adicionado o quimioterápico 5-Fluorouracil (Sigma-Aldrich – F6627-5G) a uma concentração de 6 µg/mL (46 µM). As garrafas do grupo controle receberam apenas o veículo DMSO. Após 24 h de incubação, o meio de cultura foi trocado por meio sem 5-FU pelos próximos 3 dias. No quinto dia em cultura, as células refratárias ao tratamento foram coletadas com o uso de tripsina/EDTA 0,25%. O grupo controle recebeu a sigla de HT-29 e o grupo refratário de HT-29/5FUR.

Figura 13 – Esquema representativo da obtenção de células refratárias ao tratamento com 5-FU



Legenda: Desenho experimental da obtenção das células refratárias ao tratamento com 5-FU. D1: Dia 1, D2: Dia 2 (24h), D3: Dia 3 (48h), D4: Dia 4 (72h), D5: Dia 5 (96h).

Fonte: O autor, 2023.

Quando os ensaios requeriam outros tipos de substrato para crescimento, as células foram plaqueadas em número e quantidade de meio de cultura diferentes, conforme explicitado no Quadro 1.

Quadro 1 – Número de células e de meio de cultura para plaqueamento em diferentes substratos de crescimento

Substrato de cultura	Número de células	Quantidade de meio
Placas multipoços	6 poços	2,2 x 10 <sup>5</sup> / poço
	24 poços	4,3 x 10 <sup>4</sup> / poço
	96 poços	7,5 x 10 <sup>3</sup> / poço
Garrafas	25 cm <sup>2</sup>	5,6 x 10 <sup>5</sup>
	75 cm <sup>2</sup>	1,7 x 10 <sup>6</sup>

Fonte: O autor, 2023.

### 3.3 Análise da morfologia por microscopia óptica com contraste de fase

Com o objetivo de analisar a morfologia das células HT-29 e HT-29/5FUR durante os cinco dias em cultura, foram capturadas imagens utilizando-se uma câmera acoplada a um microscópio óptico invertido com contraste de fase (DIGILAB DI-100INV). Para a aquisição das imagens, foi utilizado o aumento de 100x.

### 3.4 Viabilidade celular por WST-1

Com a finalidade de comparar a viabilidade celular das células HT-29 e HT-29/5FUR durante os cinco dias de cultivo, foi utilizado o ensaio com o reagente *Water Soluble Tetrazolium 1* (WST-1, do português, tetrazólio solúvel em água). A análise com WST-1 é um ensaio colorimétrico baseado na conversão de sais de tetrazolina solúveis em água, de coloração vermelho claro, em sais de formazan, de coloração vermelho escuro, por meio da atividade de enzimas desidrogenases. Dessa forma, o número de sais de formazan formados são diretamente proporcionais à viabilidade das células em cultivo.

As células foram plaqueadas em D1 em placas de 96 poços, com quantidade de células e de meio especificadas no Quadro 1 do item 3.2, e a viabilidade foi avaliada nos tempos D2, D3, D4 e D5 em triplicatas. Nesses respectivos dias, foram adicionados 2 µL de WST-1 (Roche) e 8 µL de meio de cultura em cada poço. As células permaneceram incubadas com o reagente à 37°C por 1 h. Após esse tempo, as placas foram lidas em um espectrofotômetro (Polaris) utilizando o comprimento de onda de 450 nm com a referência de 630 nm. A porcentagem de células viáveis foi determinada pela razão da absorbância obtida das culturas

de células de ambos os grupos em relação às culturas de células HT-29 sem tratamento ou adição de DMSO.

### 3.5 Elaboração de primers

As sequências de bases dos genes analisados foram obtidas por meio da base de dados *Ensembl*. As sequências de *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) foram determinadas a partir do alinhamento de éxons da variante codificante do gene alvo, cuidando para que a região escolhida se localizasse em dois éxons diferentes, interpostos por íntrons suficientemente grandes. As sequências selecionadas foram obtidas pela ferramenta Primer3web (disponível online através do endereço eletrônico: <https://primer3.ut.ee/>), tendo determinados parâmetros alinhados, tais como: tamanho do primer (18-24 bp), produto da PCR de 70-150 bp, temperatura do *primer* ou TM (Temperatura de *Melt*) entre 55°C e 60°C, temperatura para formação de *hairpin* menor do que 35°C e o  $\Delta G > -10$  para a formação de homodímero e heterodímero (BUSTIN, 2000). Os *primers* também foram avaliados quanto à especificidade de pareamento à sequência de interesse, por meio do algoritmo BLAST (disponível online através do endereço eletrônico <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os *primers* utilizados e suas sequências, foram listados no Quadro 2.

Quadro 2 – *Primers* utilizados no trabalho, com as respectivas sequências senso e antissenso.

<b>Genes-alvo</b>	<b>Primer senso (5'-3')</b>	<b>Primer antissenso (5'-3')</b>
<b>Gene housekeeping</b>		
<i>ACTB*</i>	GAGCGCGGCTACAGCTT	TCCTTAATGTCACGCACGATTT
<b>Fatores de pluripotência</b>		
<i>SOX2</i>	ATGGGTTCGGTGGTCAAGTC	ACATGTGAAGTCTGCTGGGG
<i>POU5F1</i>	AAACGACCATCTGCCGCTTTGA	AGGTTGCCTCTCACTCGGTTCT
<i>NANOG</i>	TGTGTTCTCTCCACCCAGC	CTTCTGCGTCACACCATTGC
<b>Marcador de CTTC</b>		
<i>PROM1</i>	CCGCGTGATTTCCAGGAAGA	ATAAACAGCAGCCCCAGGAC
<b>Fissão mitocondrial</b>		
<i>DNM1L</i>	TGGAAGCAGAAGAATGGGGT	TCAAATTGACAACGTTGGGTGA
<b>Fusão mitocondrial</b>		
<i>MFN1</i>	GCAGTGGGAAGAGCTCTGTT	CACGTACAAGACAGCCAGCT
<i>MFN2</i>	CAGAACTGGACCCCGTTACC	TTGATCACGGTGCTCTTCCC
<b>Biogênese mitocondrial</b>		
<i>PPARGCIA</i>	GGACTCAAGTGGTGCAGTGA	GCGCATCAAATGAGGGCAAT

<b>Mitofagia</b>		
<i>PINK1</i>	AACATCTCGGCAGGTTTCCTC	GATGATGTTGGGGTGAGGGG
<i>PRKN</i>	GTCAGGTTCAACTCCAGCCA	TTTCTCCACGGTCTCTGCAC

Legenda: *Primers* utilizados no presente trabalho. *ACTB*: beta-actina, *SOX2*: *SRY-box transcription factor 2*, *POU5F1*: *POU class 5 homeobox 1*, *NANOG*: *Nanog homeobox*, *PROM1*: *Prominin 1*, *DNM1L*: *Dynamin 1 like*, *MFN1*: *Mitofusin 1*, *MFN2*: *Mitofusin 2*, *PPARGC1A*: *PPARG coactivator 1 alpha*, *PINK1*: *PTEN induced kinase 1*, *PRKN*: *parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase*. \*Primer não elaborado pelo autor

Fonte: O autor, 2023.

### 3.6 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

A fim de mensurar os níveis da expressão de RNA mensageiro de genes relacionados à pluripotência (*SOX2*, *NANOG*, *POU5F1*), marcadores de CTTC (*PROM1*), dinâmica mitocondrial (*DNM1L*, *MFN1*, *MFN2*), biogênese mitocondrial (*PPARGC1A*) e mitofagia (*PINK1*, *PRKN*), foi utilizada a técnica de RT-qPCR.

Para a técnica, as células da linhagem HT-29 foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, plaqueadas a uma densidade de 5,6 x 10<sup>5</sup> células em D1.

#### 3.6.1 Extração do RNA total

As garrafas dos grupos HT-29 e HT-29/5FUR foram lavadas duas vezes com *Phosphate-Buffered Saline* (PBS, em português, tampão fosfato-salino) estéril e lisadas com 500 µL TRIzol® (Invitrogen) em D5. Após homogeneização, a solução foi transferida para um microtubo de 1,5 mL, onde foi adicionado 100 µL de clorofórmio. Após nova homogeneização e incubação por 5 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, seguido de adição de 250 µL de isopropanol. As amostras foram levadas ao congelador, à temperatura de -20°C, onde permaneceram *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi lavado com 500 µL de etanol 80% em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1%. As amostras seguiram para centrifugação a 12000 g

por 5 minutos a 4°C, seguido do descarte do sobrenadante e o precipitado de RNA reconstituído em 10 a 20 µL de água DEPC.

### 3.6.2 Quantificação do RNA

As amostras de RNA foram quantificadas por espectrofotometria em 260 nm, utilizando-se o aparelho Nanovue (GE Healthcare). Foram utilizados 5 µL de água DEPC (0,1%) para o controle do “branco” e 2 µL de cada amostra. A qualidade da extração foi estimada por meio das razões entre as absorvâncias a 260/280 nm e 260/230 nm, verificando-se a contaminação por proteínas e compostos orgânicos, respectivamente.

### 3.6.3 Síntese de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa

Após a quantificação, as amostras de RNA foram tratadas com DNase para eliminação de resquícios de moléculas de DNA indevidamente obtidas na etapa de extração de RNA, tendo sido feita com auxílio da *DNase amplification grade I* (Invitrogen). Aproximadamente 2 µg de RNA total foi incubado com 1U de DNase e 1x de Tampão DNase 10x em um volume total de 9 µL, durante 15 minutos à 25°C. A reação foi inativada adicionando-se 1 µL de EDTA 25 mM e incubando a 65 °C por 10 minutos.

Para a devida amplificação por PCR, os RNAs extraídos foram convertidos em *complementary DNA* (cDNA, em português, DNA complementar) por meio do *SCRIPT cDNA syntesis kit* (Promega). Foram adicionados, à reação do RNA tratado com DNase, 4 µL de Tampão 5X First-Strand, 1 µL de OligodT (500 µg/mL), 1 µL *deoxynucleotide triphosphates* (dNTP, em português, desoxirribonucleotídeos trifosfato) Mix (10 mM) e 1 µL de Script Enzima RT. A síntese de cDNA foi conduzida incubando-se as reações durante 50 minutos à 42°C com subsequente inativação da enzima a 70°C por 15 minutos, utilizando-se um termociclador.

### 3.6.4 RT-qPCR

Os cDNAs foram submetidos ao RT-qPCR a fim de avaliar as alterações nos níveis de RNAm dos genes estudados. Para isso, as amostras de cDNA foram diluídas cerca de 5 vezes e utilizadas para amplificação utilizando *Rotor Gene PCR Master Mix* (Qiagen). As PCRs foram realizadas com volumes finais de 10  $\mu$ L, contendo 0,5  $\mu$ M de cada primer e foram conduzidas no termociclador *Rotor-Gene 6000* (Qiagen). A análise dos dados foi realizada por meio do programa *Rotor-Gene 6000 Series Software* (Qiagen). Os níveis de expressão dos RNAm dos genes avaliados foram normalizados pelos níveis de beta-actina (gene *ACTB*). Todas as reações foram realizadas em triplicata e as quantificações foram estabelecidas através do cálculo de DDCT (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001)

### 3.7 **Citometria de fluxo**

A fim de avaliar a viabilidade celular, a expressão de CD133, marcador de superfície de CTTC, e o potencial de membrana mitocondrial foi utilizada a técnica de citometria de fluxo.

As células dos grupos HT-29 e HT-29/5FUR em D5 foram recolhidas e centrifugadas a 360 g por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o depósito de células foi reconstituído em 1 mL de PBS 1x para contagem de células na câmara de Neubauer. Cerca de  $1 \times 10^5$  células foram transferidas para microtubos 1,5 mL.

A expressão de CD133 foi detectada com a utilização de um anticorpo anti-CD133 conjugado à ficoeritrina (PE) (Abcam). As células, já com a quantidade ajustada, sofreram adição de 20  $\mu$ L de PBS 1x e 1  $\mu$ L de anticorpo. Após incubação por 30 minutos à 4°C, as amostras seguiram para marcação com Anexina V conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC).

O potencial de membrana mitocondrial foi mensurado com a utilização de MitoTracker™ Red CMXRos (Invitrogen). O MitoTracker™ Red CMXRos é uma sonda que se associa a mitocôndrias polarizadas, com carga negativa. Por ser dependente do potencial de membrana mitocondrial, essa sonda pode ser utilizada para determinar a perda ou ganho de funcionalidade mitocondrial (MONTEIRO et al., 2020). As células, com a devida quantidade

ajustada, foram incubadas com 100  $\mu$ L de MitoTracker™ Red CMXRos a 200 nM diluído em PBS 1x. Após incubação por 15 minutos à 37°C, as amostras prosseguiram para marcação com Anexina V conjugada com FITC.

A viabilidade celular foi determinada pela detecção da exposição da fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática por meio da marcação com Anexina V conjugada com FITC (Invitrogen). Após a marcação com anticorpo anti-CD133 ou MitoTracker™ Red CMXRos, as amostras foram centrifugadas a 402 g por 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100  $\mu$ L de *Annexin-binding buffer* 1x (Tampão de ligação de Anexina 1x) (Invitrogen) e 5  $\mu$ L de Anexina V. Após 15 minutos de incubação, protegidas da luz e à temperatura ambiente, as amostras eram avolumadas para 300  $\mu$ L a fim de serem analisadas pelo citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences).

A Anexina V-FITC foi detectada no canal FL1, a marcação com CD133-PE foi detectada no canal FL2 e o MitoTracker™ Red CMXRos foi detectado no canal FL3.

### 3.8 Imunocitoquímica

A fim de observar a expressão e distribuição de CD133 nos dois grupos experimentais, foi realizada a técnica de imunocitoquímica indireta com peroxidase. As células foram plaqueadas em triplicatas em placas de 24 poços sobre uma lamínula de vidro, seguindo-se o mesmo protocolo para obtenção das células refratárias ao tratamento com 5-FU discriminado no item 3.2. As células foram lavadas com PBS 1x, fixadas com paraformaldeído 4% por 1 hora à temperatura ambiente e lavadas novamente, 3 vezes, com PBS 1x. A seguir, foram incubadas com peróxido de hidrogênio 3% por 5 minutos e, novamente, lavadas 3 vezes com PBS 1x. Posteriormente, as células foram incubadas com a solução de bloqueio PBS/*Bovine Serum Albumin* (BSA, em português, albumina de soro bovino) 3% por 30 minutos, seguidas de 3 lavagens com PBS 1x por 5 minutos. As amostras foram, então, incubadas com o anticorpo primário anti-CD133 (E-11) (Santa Cruz, sc-365537, #C0421) em solução de PBS/BSA 1% por 2 horas. Após 3 lavagens com PBS 1x por 5 minutos, as amostras foram incubadas com a solução contendo o anticorpo secundário (EnVision™ FLEX+ Mouse (Linker) SM804) por 10 minutos. Foram feitas mais 3 lavagens com PBS 1x por 5 minutos e incubadas com a solução de estreptavidina (EnVision™ FLEX+ Mouse (Linker) SM804) por 10 minutos. Depois de 3 lavagens com PBS 1x por 5 minutos, foi adicionado o revelador 3,3-

diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB) por 3 minutos. O revelador foi retirado por uma lavagem de 2 minutos com água destilada e foi corado com hematoxilina por 10 segundos. Após lavagem com água destilada, as lâminas foram montadas com resina acrílica e levadas para observação ao microscópio óptico.

### 3.9 Coloração com Oil-Red O

Com o intuito de analisar a presença de gotículas lipídicas nas células dos grupos HT-29 e HT-29/5FUR foi utilizada a coloração com Oil-Red O para visualização em microscópio óptico. Inicialmente, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços sobre uma lamínula de vidro em triplicatas, seguindo-se o protocolo para obtenção dos grupos HT-29 e HT-29/5FUR explicitado no item 3.2. As células foram lavadas com PBS 1x e fixadas com paraformaldeído 4% por 1 hora à temperatura ambiente. Após a remoção do fixador, a monocamada foi lavada com água deionizada e coberta com o corante Oil Red O por 5 minutos. Passado esse tempo, o corante foi retirado e a monocamada foi lavada com água deionizada até não haver precipitado visível. Por fim, as lâminas foram montadas com resina acrílica e levadas para observação à microscópio óptico.

### 3.10 Microscopia de fluorescência

Com a finalidade de avaliar a organização da rede mitocondrial, foi utilizada a técnica de microscopia de fluorescência. Para tal, as células foram inicialmente plaqueadas em triplicatas em placas de 24 poços sobre uma lamínula de vidro, seguindo-se o protocolo para obtenção dos grupos HT-29 e HT-29/5FUR descrito no item 3.2. No D5, o meio foi retirado e foi adicionado meio de cultura com MitoTracker™ Red CMXRos à 200 nM. A placa foi coberta por papel alumínio e incubada à 37°C por 15 minutos. Passado esse tempo, o meio com a sonda foi retirado e as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas com PBS 1x e as lamínulas foram retiradas das placas para montagem em lâmina com o meio de montagem Fluoromount-G™ com DAPI (Invitrogen). Até o dia da captura das imagens, as lâminas foram

armazenadas à -20°C. As imagens foram tiradas utilizando o microscópio EVOS® FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific).

### 3.11 Microscopia eletrônica de transmissão

#### 3.11.1 Processamento inicial e cortes semifinos

A fim de analisar a ultraestrutura celular e mitocondrial foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de transmissão. As amostras obtidas no D5 dos grupos HT-29 e HT-29/5FUR foram fixadas utilizando a solução fixadora Karnovsky (4% de paraformaldeído e 0,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2)) por, no mínimo, 48 horas. Após esse período, as amostras foram lavadas duas vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) por 10 minutos. Em seguida, as células sofreram pós-fixação com tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 1% por 1 hora, seguida de duas lavagens em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) por 6 minutos. A seguir, as amostras foram desidratadas utilizando-se concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90, 2x 100%) por 15 minutos cada. Após a desidratação, as amostras seguiram para a etapa de infiltração em gradientes de resina epon (Poly/Bed(r) 812, Ted Pella Inc, Redding, Califórnia, EUA): epon-acetona 1:2 *overnight* à 4°C, epon-acetona 1:1 por 2 horas e epon-acetona 1:2 por 2 horas, seguida de infiltração em epon puro *overnight* à 4°C. Em seguida, as amostras foram incluídas em epon e levados à polimerização na estufa à 60°C por 48 horas. Os blocos obtidos foram cortados em secções semifinas por um ultramicrotomo (Leica EM UC7), de 1 µm de espessura, e corados com azul de toluidina a fim de serem observados em microscópio óptico no aumento de 1000x.

#### 3.11.2 Cortes ultrafinos, contrastação e observação no microscópio eletrônico

Os mesmos blocos foram cortados em secções ultrafinas, de 70 nm de espessura, utilizando-se um ultramicrotomo (Leica EM UC7) e contrastadas com acetato de uranila 5% durante 1 hora e citrato de chumbo 1% por 5 minutos. A aquisição das imagens de

ultraestrutura foi realizada pelo Microscópio Eletrônico de Transmissão JEM-1011 (JEOL), capturadas com a câmera 830.J46W44 (Gatan®), do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense – Rio de Janeiro, RJ.

### 3.12 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa *GraphPad Prism* 8.0 (*GraphPad Software* Inc., Califórnia, EUA), sendo expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de três a oito experimentos independentes. A detecção de *outliers* foi realizada por meio do teste de Grubbs. A fim de avaliar se os dados seguiam uma distribuição normal, foi utilizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Quando os dados não passaram pelo teste de normalidade, as análises comparativas entre os dois grupos experimentais foram realizadas com o teste não-paramétrico Mann Whitney, exceto para o teste de viabilidade celular, em que foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn. Para os dados que passaram pelo teste de normalidade, as análises foram realizadas com o teste t de Student. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos adotando-se o valor de  $p < 0,05$ .

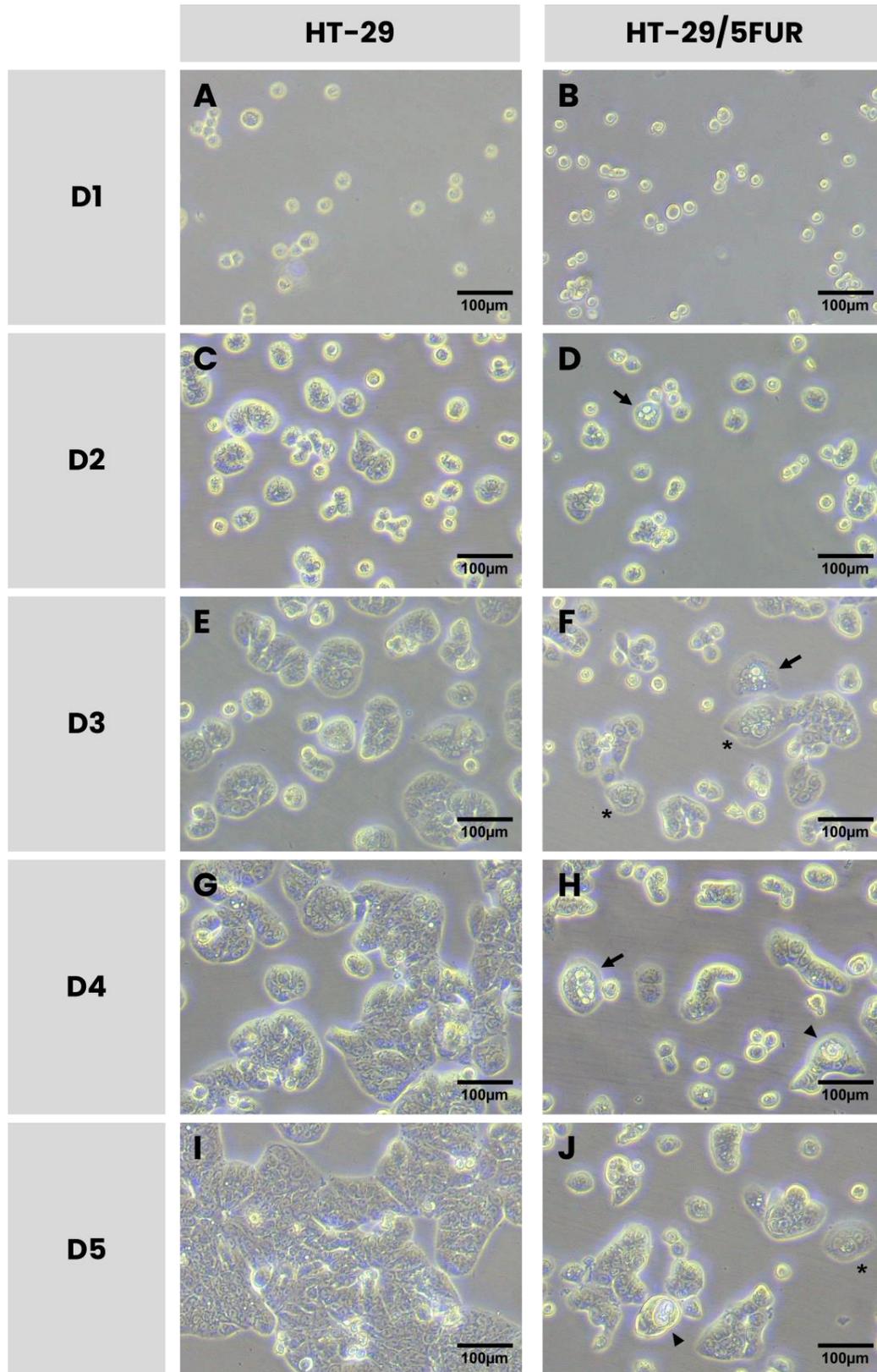
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise morfológica das células HT-29 e HT-29/5FUR

#### 4.1.1 Análise da morfologia das células HT-29 e HT-29/5FUR em cultura

A fim de avaliar a morfologia das células dos grupos HT-29 e HT-29/5FUR durante o período do protocolo de obtenção das células refratárias (item 3.2), as culturas foram submetidas à observação por microscópio óptico invertido com contraste de fase nos cinco dias (D1 a D5). Os resultados mostraram que a confluência do grupo HT-29 era maior em relação ao grupo HT-29/5FUR, com a formação de ilhas de células típicas da linhagem celular em questão. O grupo HT-29/5FUR apresentava células mais esparsas e isoladas, podendo formar alguns cordões celulares. O tamanho das células no grupo HT-29/5-FUR era maior em comparação com o grupo HT-29, especialmente nos dias finais do protocolo, apresentando também células multinucleadas, muita vacuolização e estruturas compatíveis com o processo de entose (Figura 14).

Figura 14 – Fotomicrografias com contraste de fase nos tempos de D1 a D5

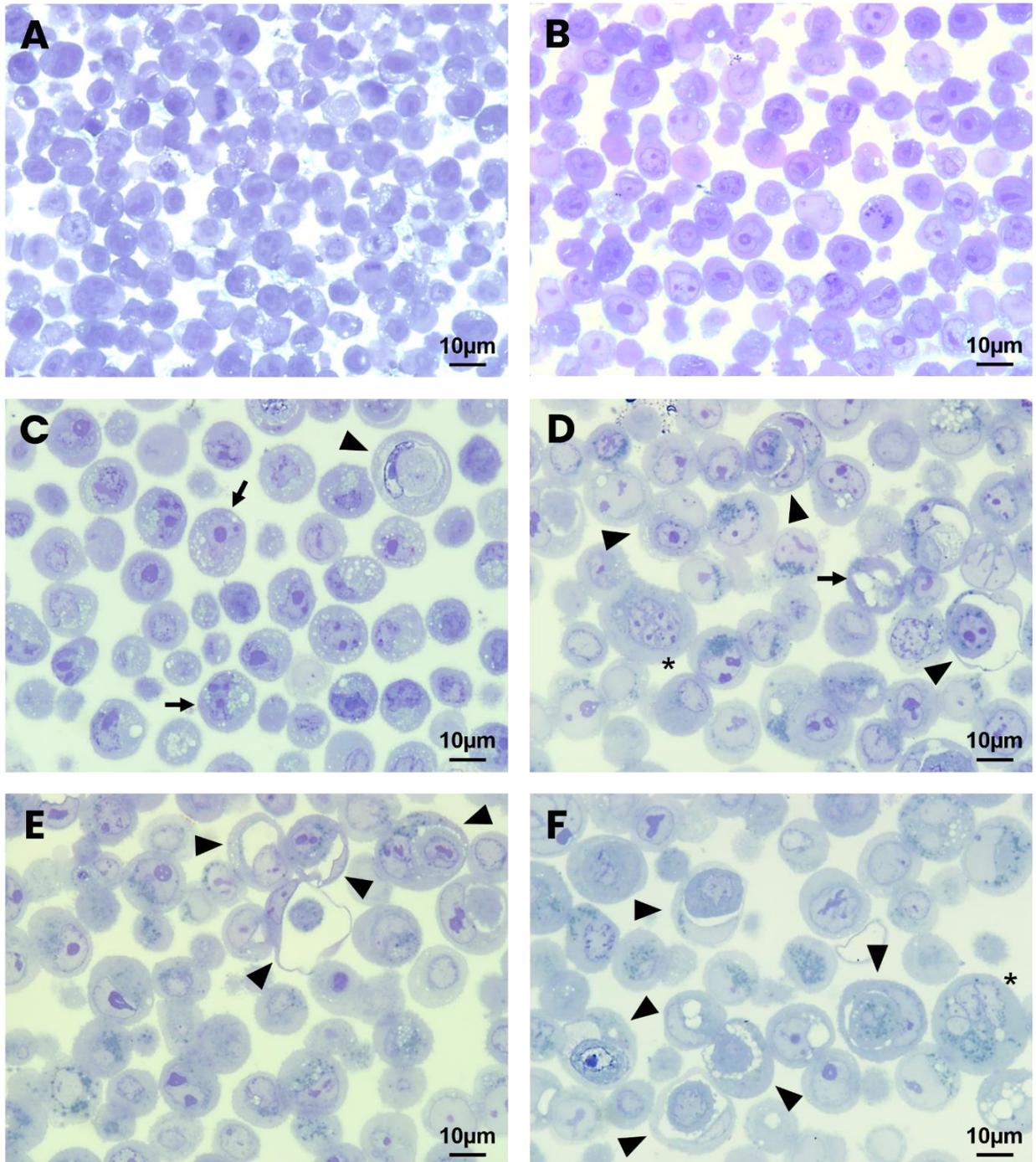


Legenda: Fotomicrografias representativas com contraste de fase das culturas HT-29 e HT-29/5FUR nos cinco dias do protocolo (A – J). Asterisco: Estruturas multinucleadas. Seta: Vacuolizações. Ponta de seta: Estruturas compatíveis com entose. Objetiva de 10x. Barra de calibração de 100µm.  
 Fonte: O autor, 2023.

#### 4.1.2 Análise da morfologia das células HT-29 e HT-29/5FUR em cortes semifinos

A fim de avaliar a morfologia das células dos grupos HT-29 e HT-29/5FUR em D5, foram feitos cortes semifinos corados com azul de toluidina, sendo esses observados ao microscópio óptico em objetiva de 100x. As células do grupo HT-29 exibiram menor tamanho, menor vacuolização e um menor número de grânulos (Figura 15 - A,B). Já as células do grupo HT-29/5FUR possuíam maior tamanho, maior vacuolização e maior número de grânulos. Nesse grupo, foram também observadas células multinucleadas e numerosas estruturas compatíveis com entose (Figura 15 - C-F).

Figura 15 – Fotomicrografias de cortes semifinos corados com azul de toluidina

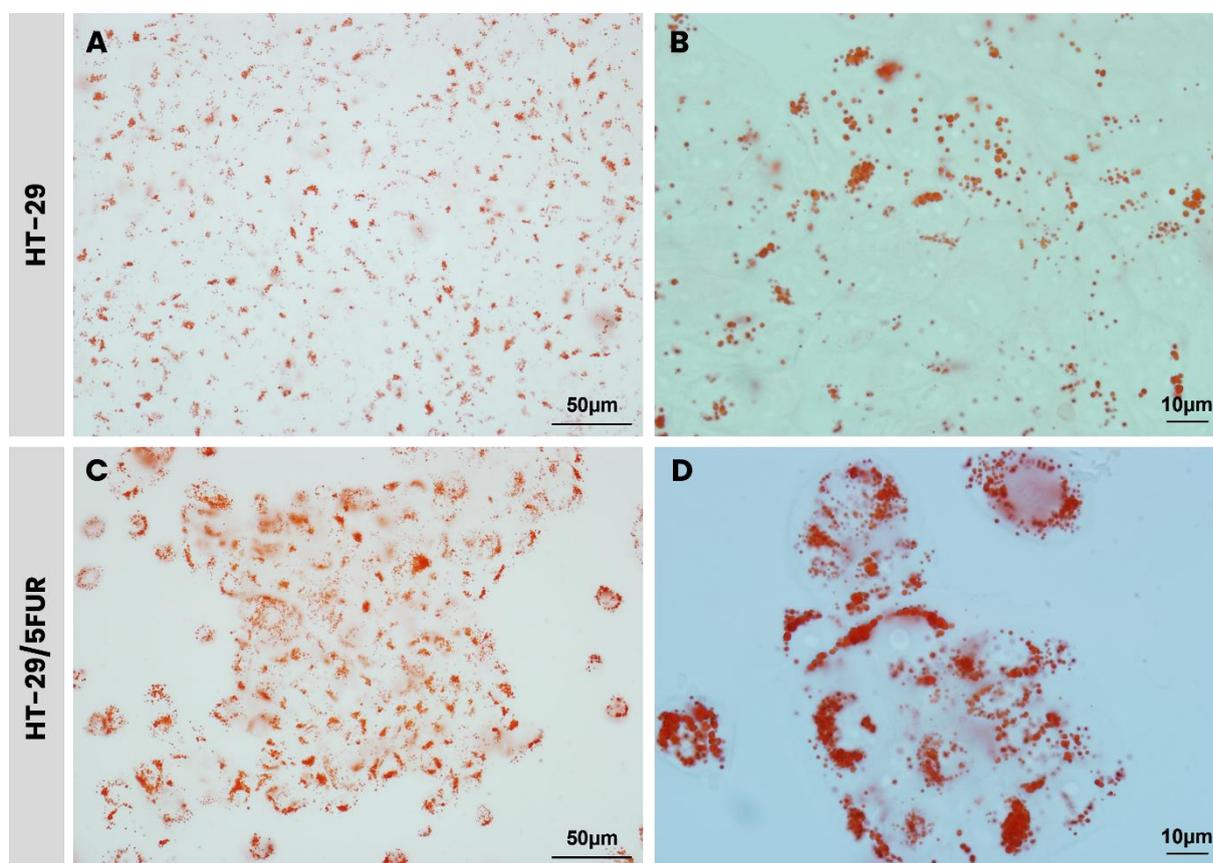


Legenda: Fotomicrografias representativas de cortes semifinos corados com azul de toluidina das células dos grupos HT-29 (A, B) e HT-29/5FUR (C-E) no D5. Asterisco: Estruturas multinucleadas. Seta: Vacuolizações. Ponta de seta: Estruturas compatíveis com entose. Objetiva de 100x. Barra de calibração de 10µm.  
Fonte: O autor, 2023.

#### 4.1.3 Análise da composição lipídica das células HT-29 e HT-29/5FUR em coloração com Oil Red O

A fim de analisar a presença de gotículas lipídicas intracelulares nas células HT-29 e HT-29/5FUR, foi realizada a coloração com o corante Oil Red O para observação em microscópio óptico. Ambos os grupos exibiram a presença de gotículas lipídicas (Figura 16), mas o grupo HT-29/5FUR aparentou ter um maior número de gotículas no citoplasma de suas células.

Figura 16 – Fotomicrografias de coloração com Oil Red O para gotículas lipídicas



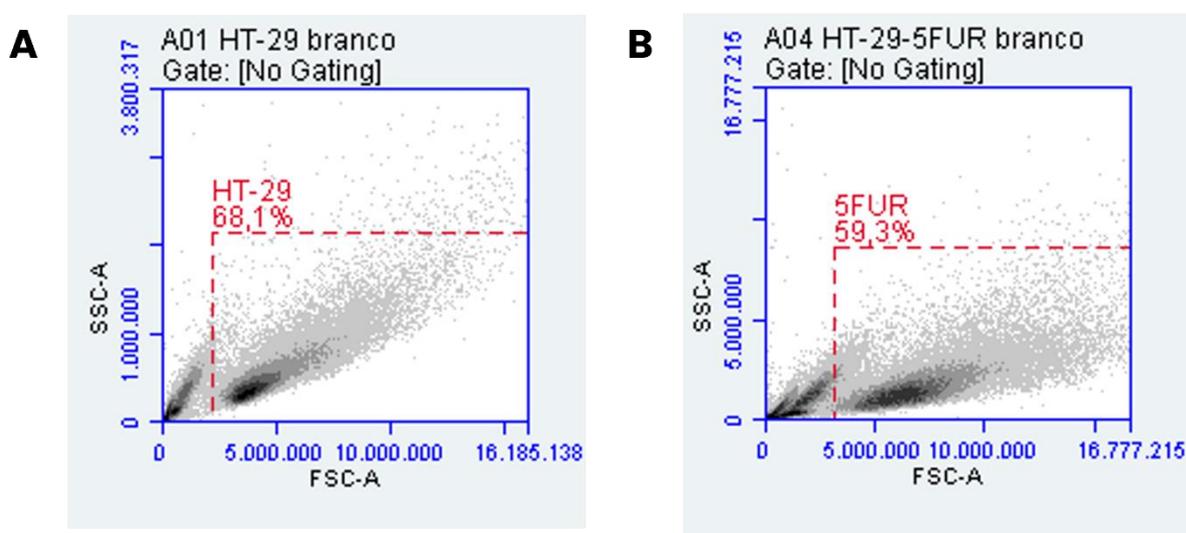
Legenda: Fotomicrografias representativas de coloração com Oil Red O para gotículas lipídicas dos grupos HT-29 (A, B) e HT-29/5FUR (C, D) no D5. Objetivas de 40x (A, C) e 100x (B, D). Barras de calibração de 50µm (A, C) e 10µm (B, D).

Fonte: O autor, 2023.

#### 4.2 Análise do tamanho (FSC) e complexidade (SSC) das células HT-29 e HT-29/5FUR

A fim de analisar o tamanho das células e a sua complexidade/granulosidade nos grupos HT-29 e HT-29/5FUR, foi utilizada a citometria de fluxo. A Figura 17 indica amostras representativas em gráficos de tamanho celular, FSC (*Forward Scatter*, do português, ângulo de dispersão frontal), por complexidade SSC (*Side Scatter*, do português, ângulo de dispersão lateral), do grupo HT-29 (Figura 17A) e do grupo HT-29/5FUR (Figura 17B), no formato de *density plot* em que foi delimitada a população celular a ser analisada.

Figura 17 – Gráficos (*density plots*) de tamanho (FSC-A) e complexidade (SSC-A)

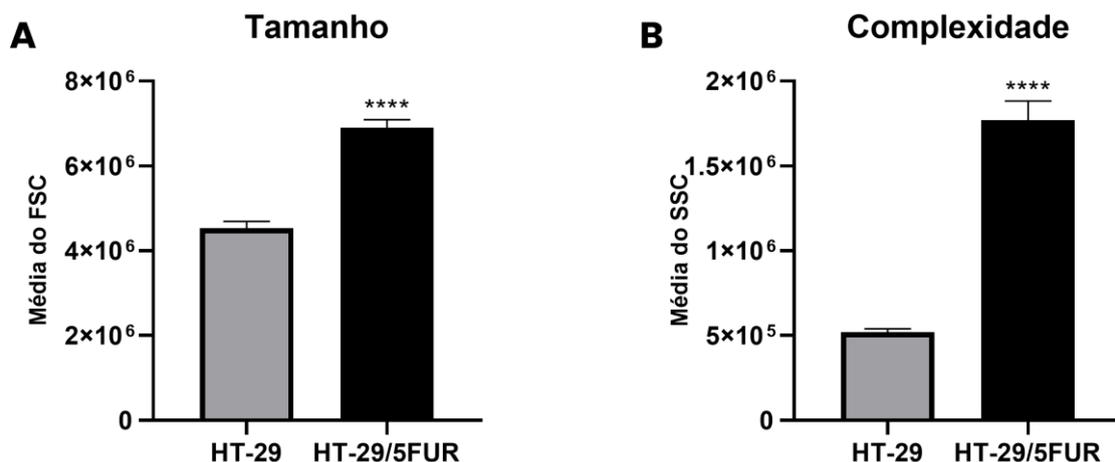


Legenda: Gráfico de *density plot* de tamanho (FSC-A) por complexidade (SSC-A) dos grupos HT-29 (A) e HT-29/5FUR (B), mostrando a delimitação da população celular a ser estudada.

Fonte: O autor, 2023.

De forma estatística, o grupo HT-29/5FUR exibiu uma maior média de FSC em comparação ao grupo HT-29, indicando um maior tamanho celular (HT-29:  $4,53 \times 10^6 \pm 1,64 \times 10^5$  e HT-29/5FUR:  $6,9 \times 10^6 \pm 1,92 \times 10^5$ , n=6) (Figura 18A). Quanto à complexidade, as células do grupo HT-29/5FUR também exibiram uma maior média de SSC em relação ao grupo HT-29 (HT-29:  $5,18 \times 10^5 \pm 2,03 \times 10^4$  e HT-29/5FUR:  $1,77 \times 10^6 \pm 1,13 \times 10^5$ , n=6) (Figura 18B).

Figura 18 – Gráficos de barras de tamanho (FSC) e complexidade (SSC)



Legenda: As barras representam as médias de pelo menos cinco experimentos individuais da média de FSC, correspondendo ao tamanho (A), e da média de SSC, correspondendo à complexidade (B) das células HT-29 e HT-29/5FUR. \*\*\*\*  $p < 0,0001$

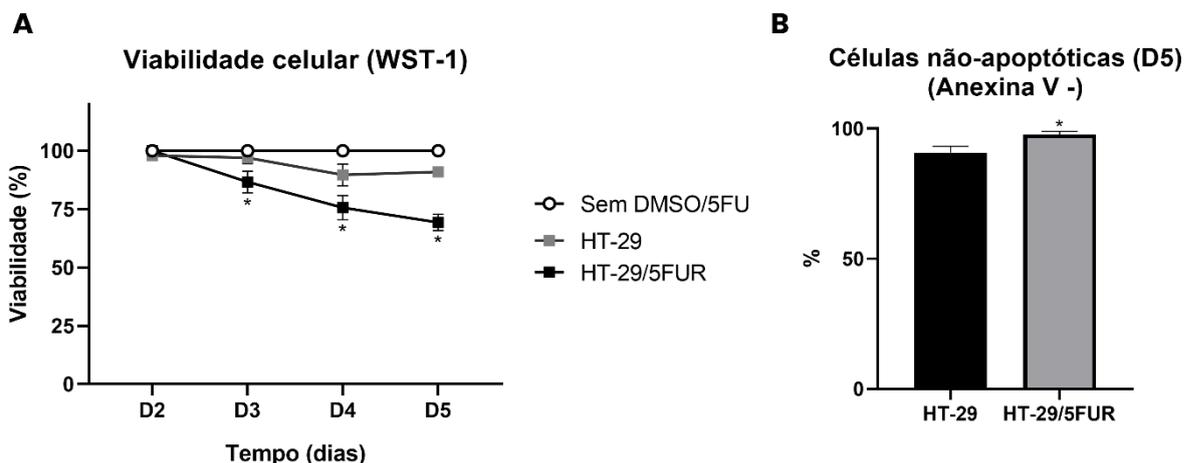
Fonte: O autor, 2023.

#### 4.3 Análise da viabilidade celular dos grupos HT-29 e HT-29/5FUR em cultura

Com a finalidade de quantificar a viabilidade celular dos grupos HT-29 e HT-29/5FUR durante o período do protocolo de obtenção das células refratárias (item 3.2), foi realizado o ensaio de WST-1 nos tempos de D2 a D5 (24h, 48h, 72h e 96h) e a citometria de fluxo com marcação para Anexina V em D5. Os resultados para o ensaio de viabilidade celular por WST-1 são mostrados por meio da porcentagem da razão da absorbância em relação ao grupo sem tratamento com 5-FU ou adição do seu veículo DMSO (Figura 19A). Dessa forma, o grupo HT-29/5FUR exibiu uma queda significativa na viabilidade celular se comparado com o grupo que não recebeu o tratamento com o fármaco ou o veículo a partir de D3. Os demais grupos não exibiram diferenças estatísticas entre si.

Em relação à citometria de fluxo, o número de células não-apoptóticas (Anexina V -) exibiu uma média superior a 90% em ambos os grupos. Ainda, de forma significativa, o grupo HT-29/5FUR demonstrou possuir mais células não-apoptóticas do que o grupo HT-29 em D5 (HT-29:  $90,82 \pm 2,39$  e HT-29/5FUR:  $97,68 \pm 1,3$ ,  $n=5$ ) (Figura 19B).

Figura 19 – Gráficos de viabilidade celular para os tempos D2, D3, D4 e D5

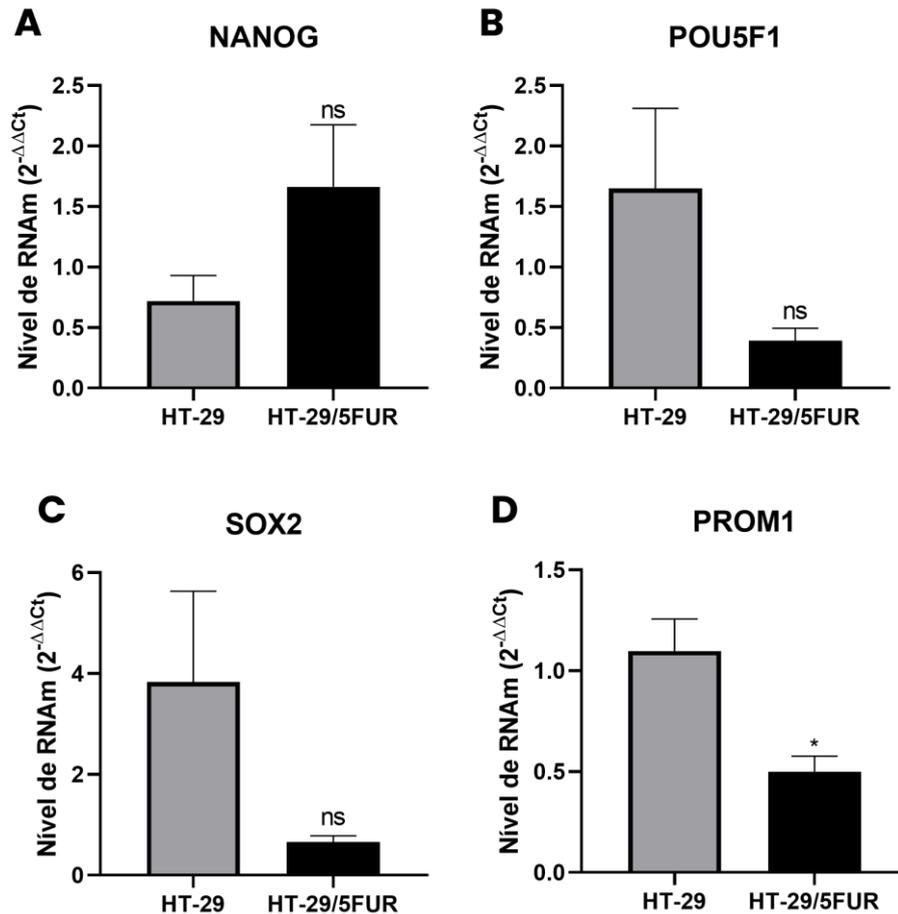


Legenda: A – O gráfico de linhas representa a média de três experimentos individuais com relação à viabilidade celular através do ensaio de WST-1. As porcentagens foram calculadas utilizando como referência o grupo sem adição do fármaco (5-FU) ou de seu veículo (DMSO). O asterisco (\*) representa diferença significativa entre o grupo HT-29/5FU e o grupo “Sem DMSO/5FU”. B - As barras representam as médias de cinco experimentos individuais do número de eventos que não foram marcados com a Anexina V por citometria de fluxo. \*p<0,05  
Fonte: O autor, 2023.

#### 4.4 Análise da expressão de RNAm de genes de fatores de pluripotência (*SOX2*, *POU5F1* e *NANOG*) e de marcador de CTTC (*PROM1*) das células HT-29 e HT-29/5FU

A fim de avaliar se as células refratárias ao tratamento com 5-FU apresentavam alteração nos níveis de expressão de RNAm de genes de fatores de pluripotência (*SOX2*, *POU5F1* e *NANOG*) e de marcador de CTTC (*PROM1*), foi realizada a técnica de RT-qPCR. Os níveis de *SOX2* (HT-29:  $3,832 \pm 1,798$  e HT-29/5FU:  $0,6550 \pm 0,1292$ , n=5), *POU5F1* (HT-29:  $1,648 \pm 0,6627$  e HT-29/5FU:  $0,3900 \pm 0,1050$ , n=5) e *NANOG* (HT-29:  $0,7200 \pm 0,2101$  e HT-29/5FU:  $1,663 \pm 0,5117$ , n=4) não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos. Os níveis de *PROM1* (HT-29:  $1,098 \pm 0,1589$  e HT-29/5FU:  $0,4983 \pm 0,07867$ , n=8) se apresentaram diminuídos no grupo HT-29/5FU em comparação ao grupo HT-29 (Figura 20).

Figura 20 – Gráficos dos níveis de RNAm de fatores de pluripotência (*SOX2*, *POU5F1* e *NANOG*) e de marcador de CTTC (*PROM1*)



Legenda: As barras representam as médias de pelo menos três experimentos individuais dos níveis relativos de RNAm de *NANOG* (A), *POU5F1* (B), *SOX2* (C) e *PROM1* (D) dos grupos HT-29 e HT-29/5FUR. *ACTNB* foi usado como gene de referência. \* $p < 0,05$ ; ns: não houve significância estatística.

Fonte: O autor, 2023.

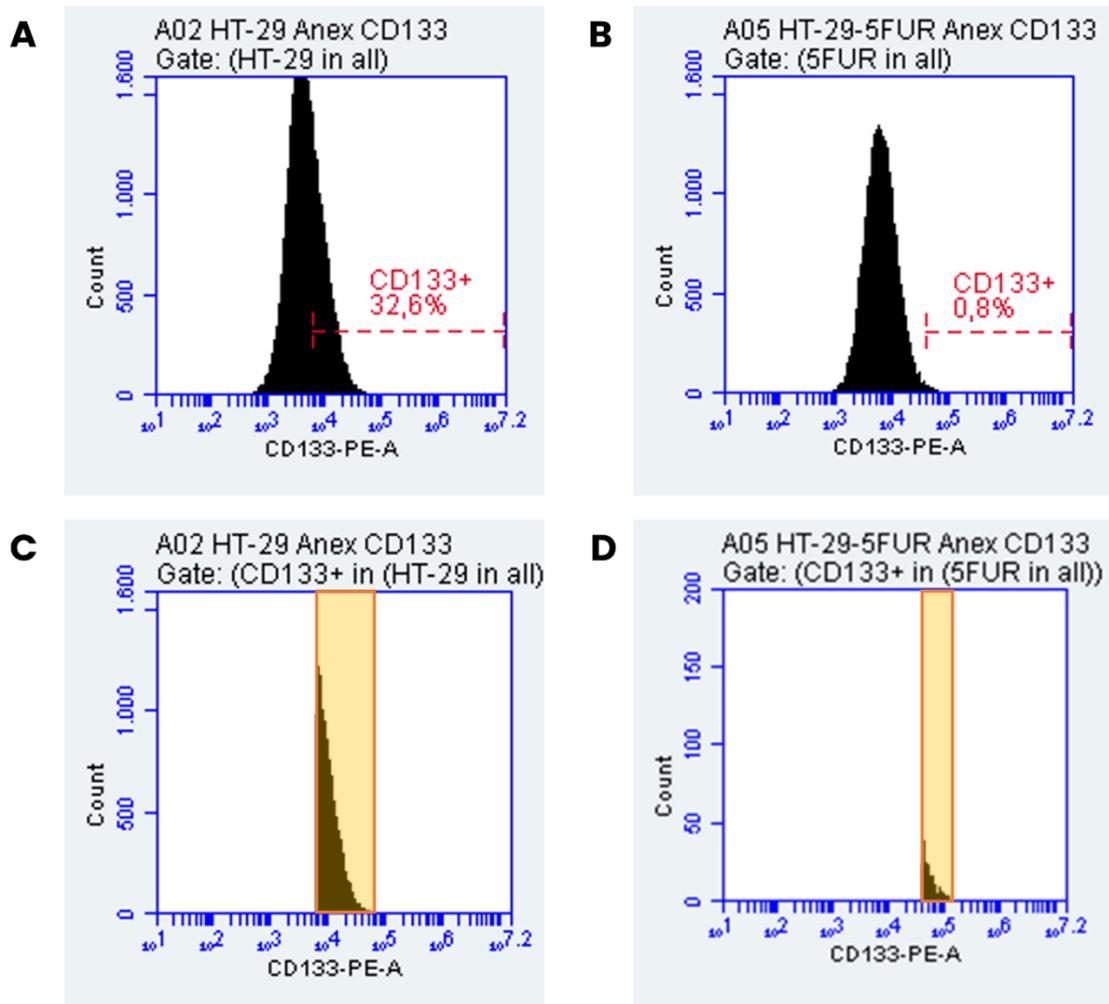
#### 4.5 Análise da expressão de CD133, tamanho e complexidade das células HT-29 e HT-29/5FUR

##### 4.5.1 Análise por citometria de fluxo

A fim de quantificar a expressão de CD133 nos grupos HT-29 e HT-29/5FUR, foi utilizada a citometria de fluxo. A população celular analisada foi delimitada como ilustra a Figura 17 (item 5.2). Utilizando-se os *gates* (delimitações) “HT-29” e “5FUR” para os grupos

HT-29 e HT-29/5FUR, respectivamente, foi analisada a expressão de CD133. A Figura 21 mostra o gráfico no formato de histograma para a marcação positiva de CD133, em que as células CD133+ estão delimitadas pelo traçador vermelho “CD133+”.

Figura 21 – Gráficos de histograma da marcação para CD133

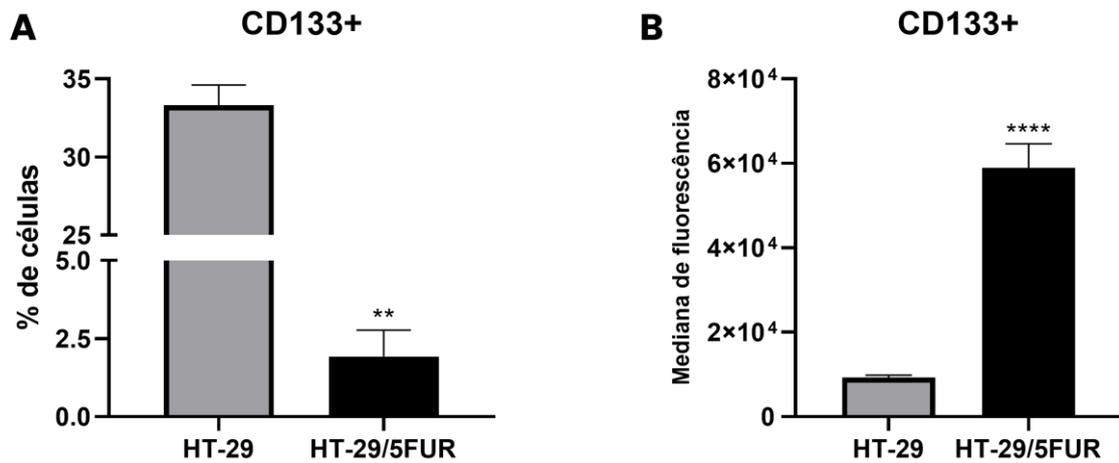


Legenda: Gráficos de histograma indicando a porcentagem de células positivas para a expressão de CD133 dos grupos HT-29 (A) e HT-29/5FUR (B). Os gráficos C e D ressaltam o intervalo de intensidade de fluorescência para as células CD133+ dos grupos HT-29 e HT-29/5FUR, respectivamente. O eixo das abscissas corresponde à intensidade de fluorescência e o eixo das ordenadas corresponde à contagem de eventos.

Fonte: O autor, 2023.

Estatisticamente, o grupo HT-29/5FUR apresentou uma diminuição significativa do número de células CD133+ em comparação ao grupo HT-29 (HT-29:  $33,32 \pm 1,297$  e HT-29/5FUR:  $1,92 \pm 0,854$ ,  $n=5$ ). Entretanto, o grupo HT-29/5FUR demonstrou ter uma elevação considerável, estatisticamente significativa, da mediana de fluorescência das células que expressam CD133 em relação ao grupo HT-29 (HT-29:  $9257 \pm 585,5$  e HT-29/5FUR:  $58949 \pm 5710$ ,  $n=6$ ) (Figura 22).

Figura 22 – Gráficos de barra da expressão de CD133 e mediana de fluorescência

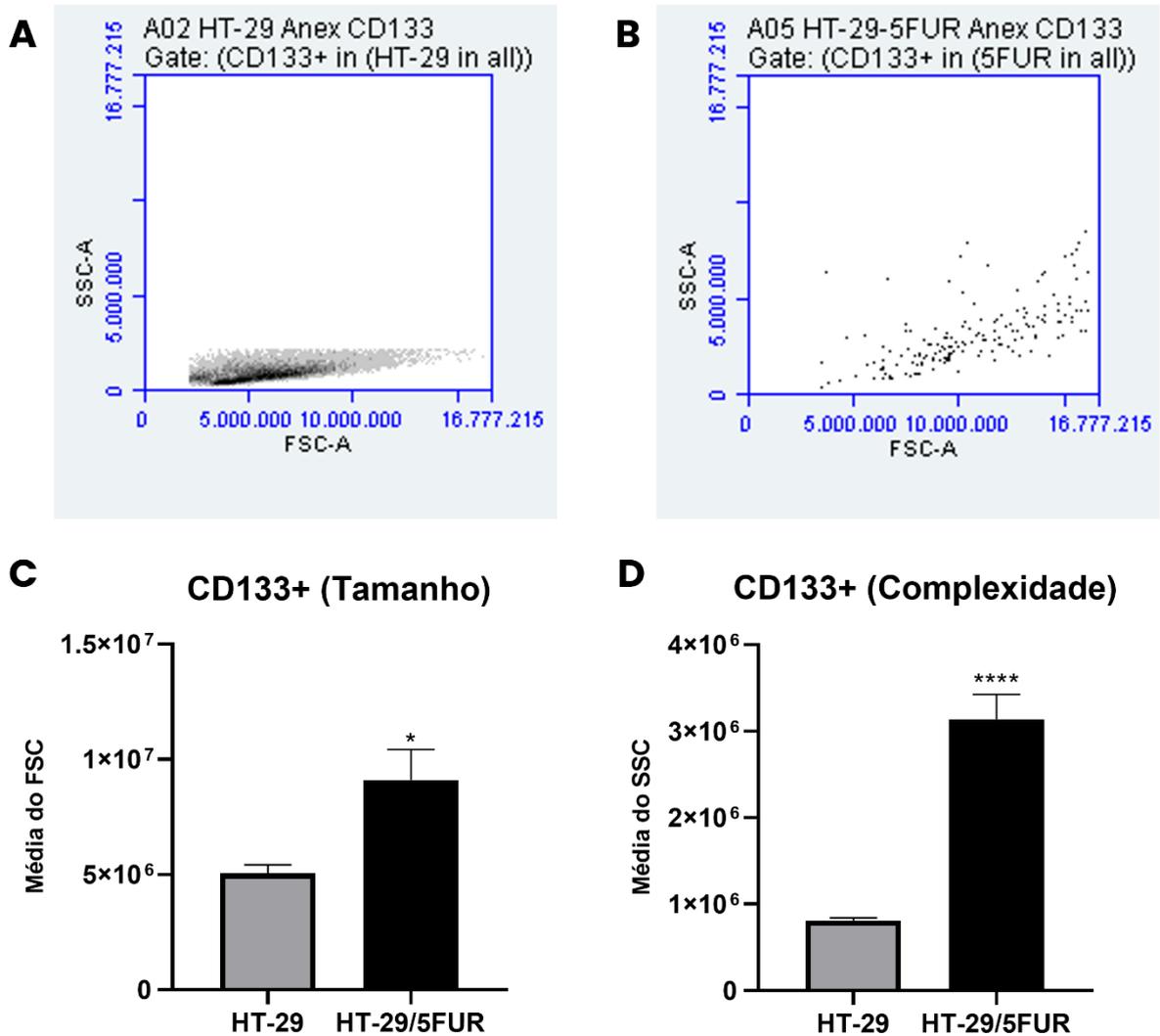


Legenda: As barras representam as médias de pelo menos cinco experimentos individuais da porcentagem de células positivas para a expressão de CD133 (A) e da mediana de fluorescência para células positivas para a expressão de CD133 (B). \*\* p<0,01; \*\*\*\* p<0,0001

Fonte: O autor, 2023.

A fim de analisar o tamanho e a complexidade das células CD133+, foi realizado um *backgating* com a delimitação “CD133+” para os grupos HT-29 (Figura 23A) e HT-29/5FUR (Figura 23B). Quanto ao tamanho, as células HT-29/5FUR apresentaram uma média de FSC significativamente superior ao grupo HT-29 (HT-29:  $5,05 \times 10^6 \pm 3,67 \times 10^5$  e HT-29/5FUR:  $9,10 \times 10^6 \pm 1,32 \times 10^6$ , n=6) (Figura 23C). Quanto à complexidade interna, as células HT-29/5FUR também exibiram uma média de SSC significativamente maior comparada ao grupo HT-29 (HT-29:  $8,1 \times 10^5 \pm 3 \times 10^4$  e HT-29/5FUR:  $3,14 \times 10^6 \pm 2,86 \times 10^5$ , n=6) (Figura 23D).

Figura 23 - Gráficos de tamanho (FSC) e complexidade (SSC) das células CD133+



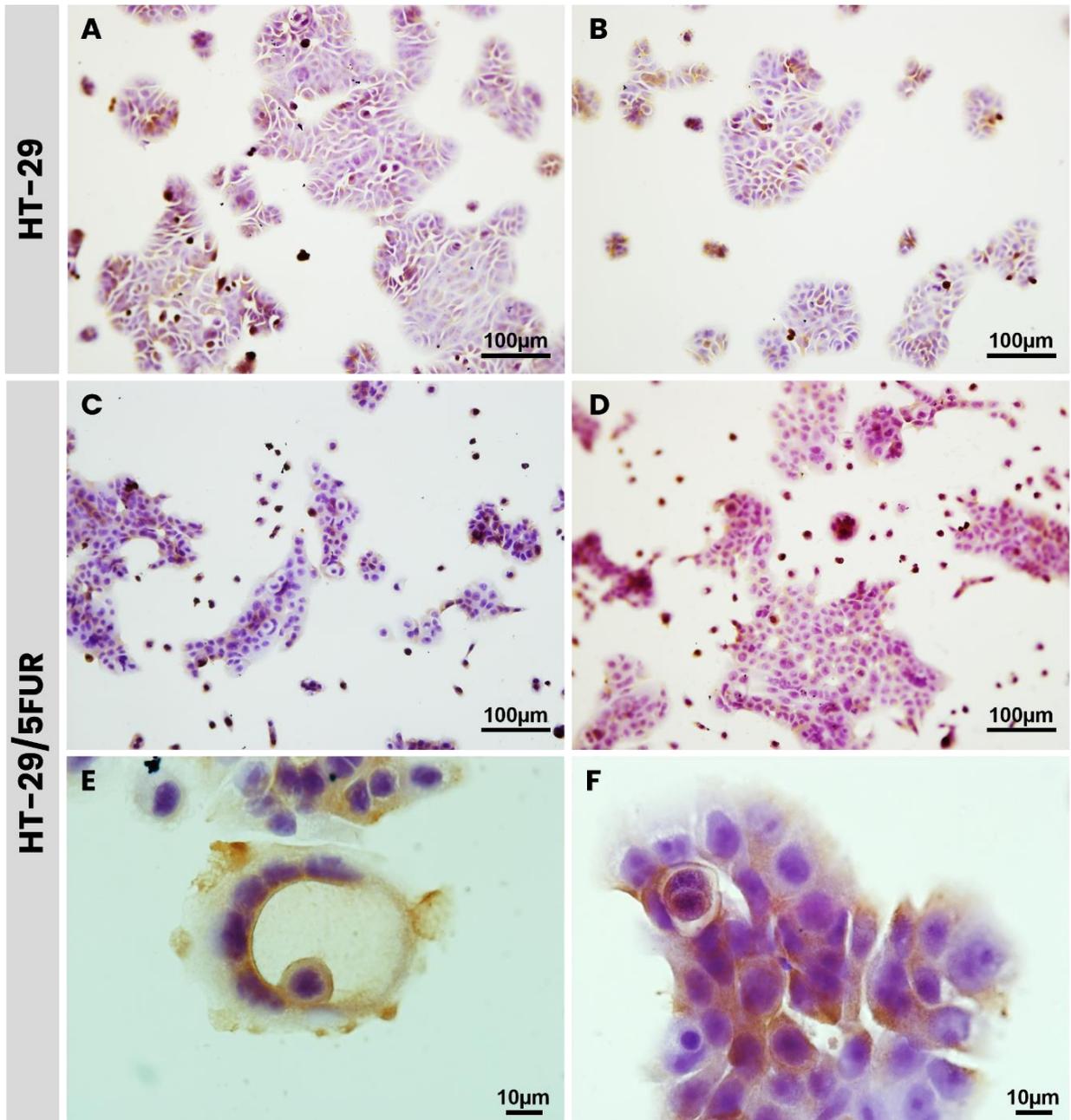
Legenda: Os gráficos A e B, em formato de *density* plot, mostram o tamanho (eixo das abscissas) e a granulosidade (eixo das ordenadas) dos grupos HT-29 e HT-29/5FUR, respectivamente. Os gráficos C e D, em formato de barras, representam as médias de pelo menos cinco experimentos individuais da média de FSC, correspondendo ao tamanho (C), e da média de SSC, correspondendo à complexidade (D), respectivamente. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$   
Fonte: O autor, 2023.

#### 4.5.2 Análise por imunocitoquímica

A fim de observar a expressão de CD133 nos grupos HT-29 e HT-29/5FUR, foi utilizada a imunocitoquímica indireta com peroxidase. A Figura 24 ilustra imagens representativas dos grupos HT-29 e HT-29/5FUR para marcação para CD133. As fotomicrografias mostram uma tendência de maior marcação positiva para o grupo HT-29 e

mais distribuída em relação ao grupo refratário. Entretanto, as marcações no grupo HT-29/5FUR demonstram estar mais evidentes em células maiores, estruturas de entose e células multinucleadas.

Figura 24 – Fotomicrografias de imunocitoquímica para marcação para CD133



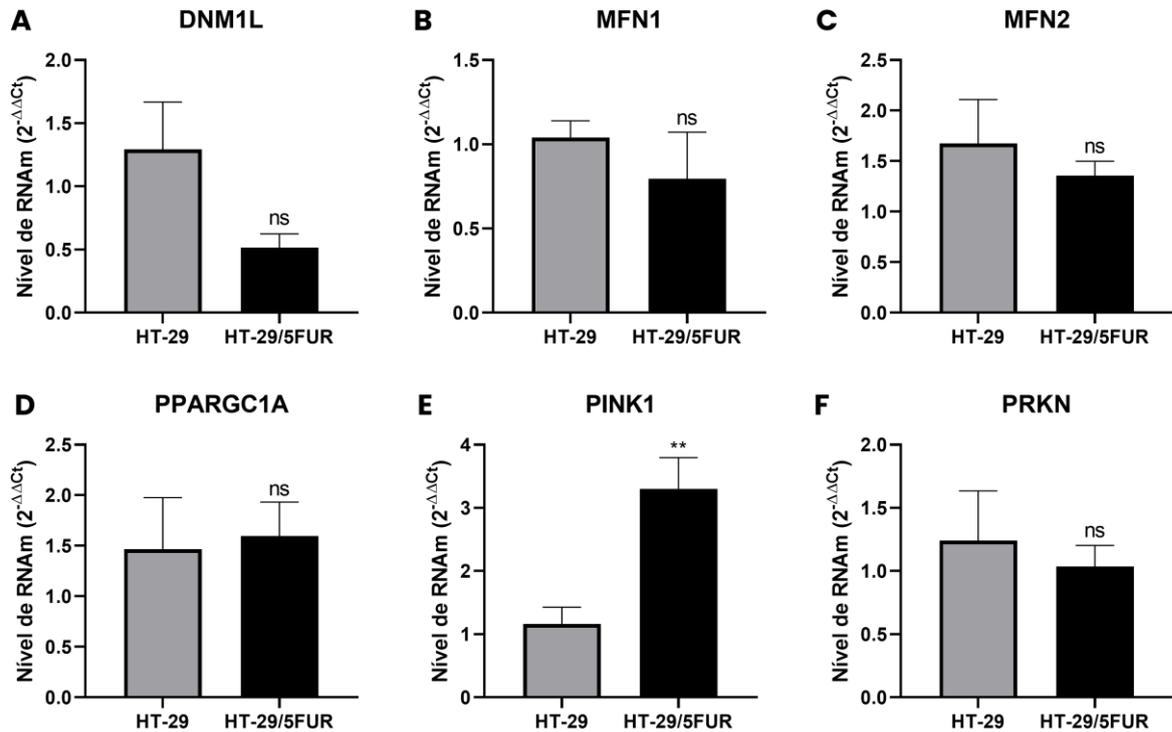
Legenda: Fotomicrografias representativas de imunocitoquímica para marcação de CD133 dos grupos HT-29 (A, B) e HT-29/5FUR (C-F) no D5. Objetivas de 20x (A-D) e 100x (E, F). Barras de calibração de 100µm (A-D) e 10µm (E, F).

Fonte: O autor, 2023.

#### 4.6 Análise da expressão de RNAm de dinâmica mitocondrial (*DNM1L*, *MFN1* e *MFN2*), biogênese mitocondrial (*PPARGC1A*) e mitofagia (*PINK1* e *PRKN*) das células HT-29 e HT-29/5FUR

Com a finalidade de analisar se as células HT-29 refratárias ao tratamento com 5-FU apresentavam alteração nos níveis de expressão de RNAm de dinâmica mitocondrial (*DNM1L*, *MFN1* e *MFN2*), biogênese mitocondrial (*PPARGC1A*) e mitofagia (*PINK1* e *PRKN*) foi realizada a técnica de RT-qPCR (Figura 25). Quanto à dinâmica mitocondrial, os níveis de *DNM1L* (HT-29:  $1,293 \pm 0,3736$  e HT-29/5FUR:  $0,5160 \pm 0,1089$ , n=6), *MFN1* (HT-29:  $1,040 \pm 0,09975$  e HT-29/5FUR:  $0,7957 \pm 0,2768$ , n=8) e *MFN2* (HT-29:  $1,673 \pm 0,4370$  e HT-29/5FUR:  $1,358 \pm 0,1401$ , n=6) não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos. Quanto à biogênese mitocondrial, os níveis de *PPARGC1A* (HT-29:  $1,467 \pm 0,5085$  e HT-29/5FUR:  $1,596 \pm 0,3370$ , n=6) também não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos. Em relação aos genes de mitofagia, os níveis de *PINK1* (HT-29:  $1,162 \pm 0,2651$  e HT-29/5FUR:  $3,300 \pm 0,4950$ , n=6) se mostraram significativamente maiores nas células HT-29/5FUR em comparação às células HT-29, enquanto *PRKN* (HT-29:  $1,240 \pm 0,3946$  e HT-29/5FUR:  $1,035 \pm 0,1672$ , n=5) não apresentou diferença nos níveis de RNAm entre os grupos.

Figura 25 – Gráfico dos níveis de RNAm de dinâmica mitocondrial (*DNM1L*, *MFN1* e *MFN2*), biogênese mitocondrial (*PPARGC1A*) e mitofagia (*PINK1* e *PRKN*)

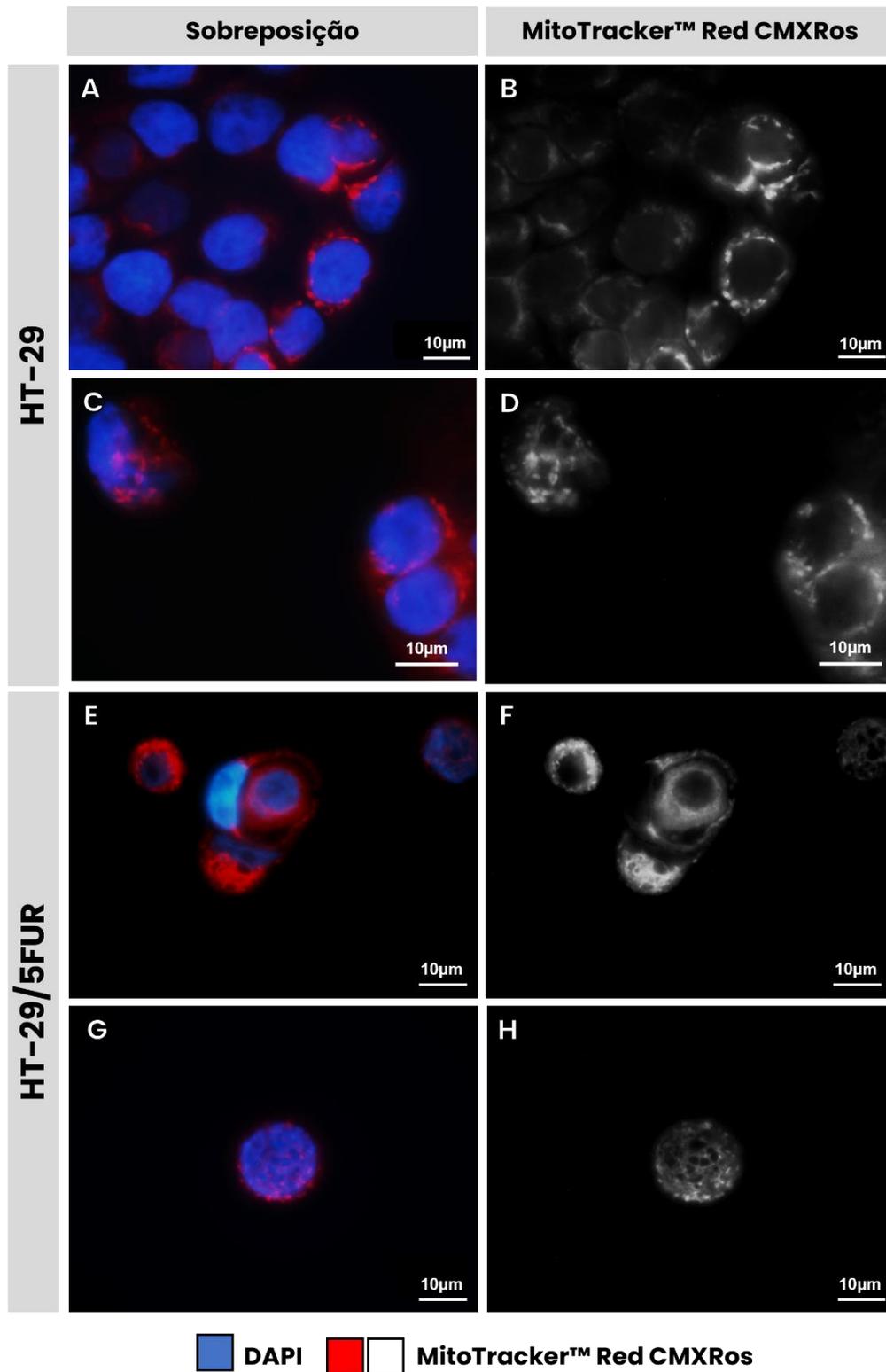


Legenda: As barras representam as médias de pelo menos cinco experimentos individuais dos níveis relativos de RNAm de *DNM1L* (A), *MFN1* (B), *MFN2* (C), *PPARGC1A* (D), *PINK1* (E) e *PRKN* (F) dos grupos HT-29 e HT-29/5FUR. *ACTNB* foi usado como gene de referência. \*\* $p < 0,01$ ; ns: não houve significância estatística.  
Fonte: O autor, 2023.

#### 4.7 Análise das mitocôndrias das células HT-29 e HT-29/5FUR por microscopia de fluorescência

A fim de observar a organização das mitocôndrias e a presença de mitocôndrias com potencial de membrana, foi utilizada a microscopia de fluorescência com marcação utilizando a sonda MitoTracker™ Red CMXRos. A Figura 26 ilustra micrografias representativas dos grupos HT-29 e HT-29/5FUR, em que a marcação em vermelho representa as mitocôndrias (MitoTracker™ Red CMXRos) e a marcação em azul representa o núcleo (DAPI). As micrografias em preto e branco realçam a marcação para as mitocôndrias com a sonda fluorescente.

Figura 26 – Micrografias de fluorescência para marcação de mitocôndrias com MitoTracker™ Red CMXRos



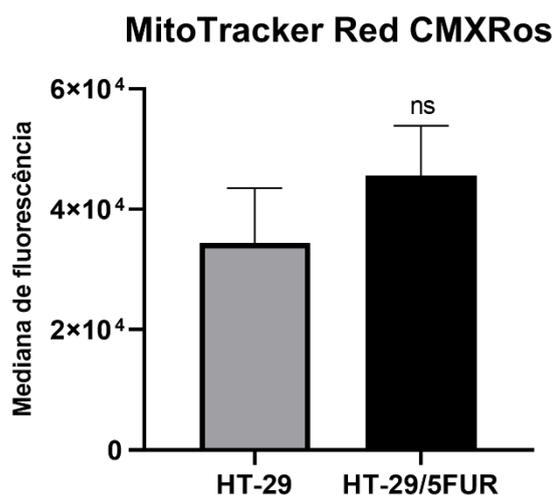
Legenda: Micrografias representativas de microscopia de fluorescência dos grupos HT-29 (A-D) e HT-29/5FUR (E-H) no D5. Azul: DAPI. Vermelho e branco: MitoTracker™ Red CMXRos. Objetiva de 100x. Barra de calibração de 10 µm.  
 Fonte: O autor, 2023.

As fotomicrografias representativas mostram a presença de mitocôndrias com potencial de membrana mitocondrial preservado em ambos os grupos HT-29 e HT-29/5FUR. Quanto à morfologia mitocondrial, não foi possível observar uma diferença entre os padrões tubulares e fragmentados.

#### 4.8 Análise do potencial de membrana mitocondrial das células HT-29 e HT-29/5FUR

A fim de analisar a quantidade de mitocôndrias com potencial de membrana mitocondrial nos grupos HT-29 e HT-29/5FUR, foi realizada a citometria de fluxo com a sonda MitoTracker™ Red CMXRos. Os resultados mostram que não houve diferença significativa na mediana de fluorescência em ambos os grupos incubados com a sonda (HT-29:  $34449 \pm 9058$  e HT-29/5FUR:  $45643 \pm 8215$ ,  $n=5$ ) (Figura 27).

Figura 27 – Gráfico de medianas de fluorescência de MitoTracker™ Red CMXRos

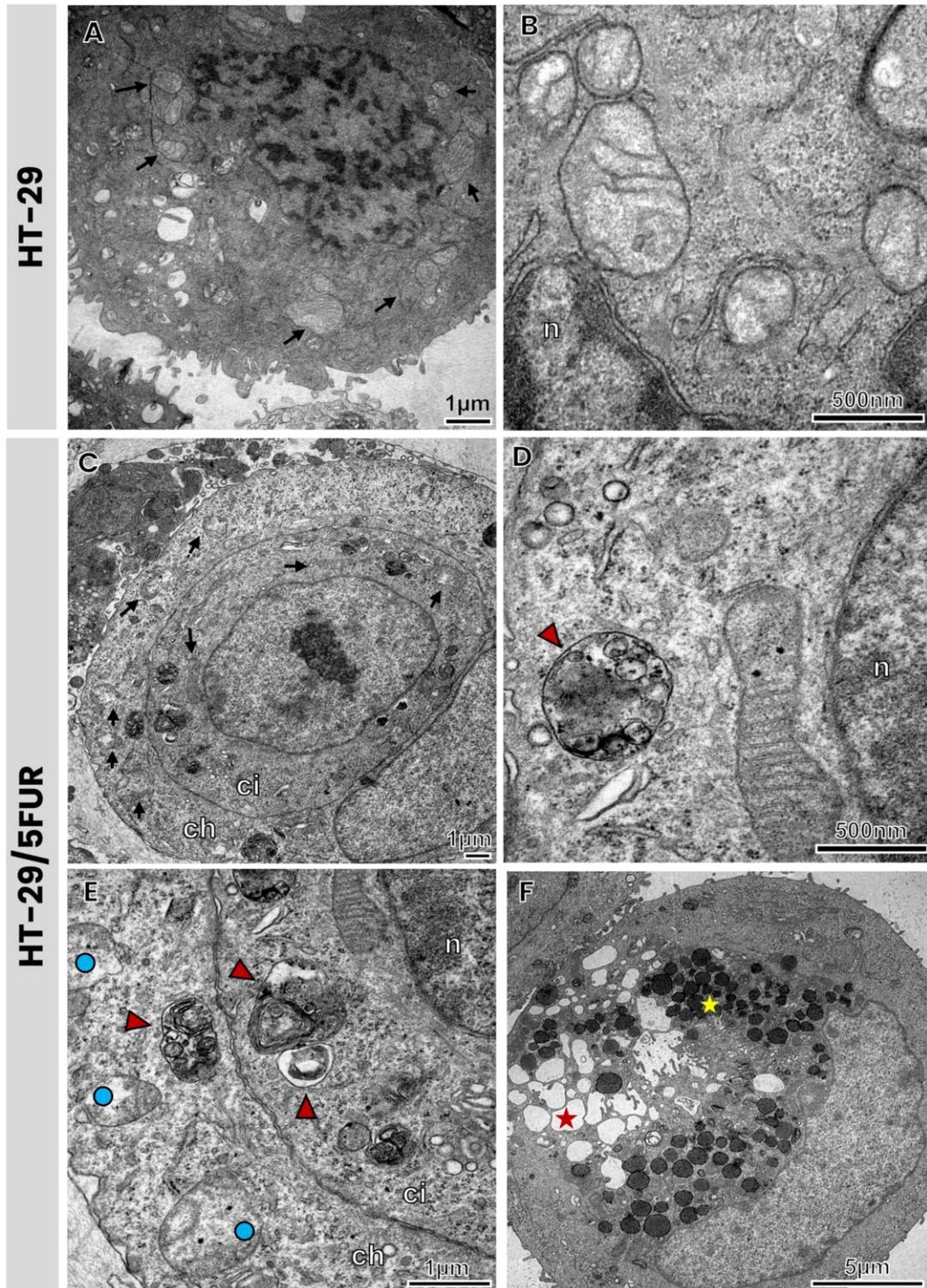


Legenda: As barras representam as médias de cinco experimentos individuais da mediana de fluorescência da sonda MitoTracker™ Red CMXRos nos grupos HT-29 e HT-29/5FUR. ns: não houve significância estatística. Fonte: O autor, 2023.

#### 4.9 Análise da ultraestrutura das células HT-29 e HT-29/5FUR

Com a finalidade de avaliar a ultraestrutura das células dos grupos HT-29 e HT-29/5FUR, em especial de suas mitocôndrias, foi empregada a técnica de microscopia eletrônica de transmissão. A Figura 28 expõe eletromicrografias de transmissão representativas dos grupos HT-29 e HT-29/5FUR. É possível observar mais mitocôndrias danificadas, com heterogeneidade de matriz mitocondrial, e estruturas compatíveis com autofagossomos, possuindo conteúdo intravesicular de aspecto multilamelar, no grupo HT-29/5FUR. Além disso, vê-se nesse grupo um número maior de vacúolos e corpúsculos lipídicos se comparados ao grupo controle (Figura 28F). Na Figura 28C, observa-se uma estrutura equivalente à entose, com a célula internalizada ao centro exibindo nucléolo proeminente, e a célula hospedeira perifericamente, rodeando integralmente a outra célula, exibindo núcleo alongado em forma de crescente. Na Figura 28E, é possível observar estruturas de autofagossomos em ambas as células interna e hospedeira, com a presença de diversas mitocôndrias danificadas na célula hospedeira.

Figura 28 – Eletromicrografias de transmissão para análise da ultraestrutura celular e mitocondrial



Legenda: Eletromicrografias de transmissão representativas dos grupos HT-29 (A,B) e HT-29/5FUR (C-F) no D5. n: núcleo. ci: célula interna. ch: célula hospedeira. Setas: Mitocôndrias. Círculos azuis: Mitocôndrias danificadas. Pontas de seta: Autofagossomos. Estrela amarela: Corpúsculos lipídicos. Estrela vermelha: Vacúolos. Aumentos de 4000x (F), 5000x (C), 8000x (A), 15000x (E) e 30000x (B, D). Barras de calibração de 1µm (A,C,E), 5µm (F) e 500nm (B,D).

Fonte: O autor, 2023.

## 5 DISCUSSÃO

A linhagem celular HT-29 (HTB-38, ATCC) foi obtida de um tumor primário de CCR de uma mulher caucasiana, de 44 anos, com padrão histopatológico de adenocarcinoma, sendo considerada uma célula moderadamente diferenciada, apresentando microvilosidades na membrana plasmática (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2023). Ela tem sido usada por diversos estudos ao longo dos anos para o entendimento da resistência às drogas e a investigação sobre o fenótipo tronco tumoral (AKHDAR et al., 2009; EL KHOURY et al., 2016; KHOLODENKO et al., 2021), configurando-se como um modelo adequado para o presente trabalho.

O 5-FU é a droga mais difundida nos regimes de tratamento quimioterápico do CCR e a resistência à sua ação continua sendo um dos obstáculos para o prognóstico favorável dos pacientes, em especial os de estágios avançados (AZWAR et al., 2021; BLONDY et al., 2020). Kotlarz *et al.* (2019) estabeleceram um protocolo para a obtenção de células da linhagem HT-29 refratárias ao tratamento com 5-FU. Uma única administração de 6 µg/mL de 5-FU por 24h nas células da linhagem a uma densidade de  $2,27 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> promove uma citorredução, seguida de recuperação por três dias com trocas de meio, promovendo a manutenção das células realmente refratárias. A baixa densidade de células aliada à dosagem do 5-FU três vezes maior que a dose plasmática clinicamente relevante (2 µg/mL) (DALLAS et al., 2009) garante que todas as células sejam igualmente expostas ao fármaco, bem como que restem apenas as células intrinsecamente resistentes a ele.

A análise morfológica dos grupos HT-29 e HT-29/5FUR por microscópio óptico com contraste de fase demonstrou que a confluência do grupo controle foi maior em relação ao grupo refratário, confirmando o papel antineoplásico do 5-FU. Ademais, o grupo HT-29/5FUR exibiu, em geral, um tamanho celular maior e muitas estruturas multinucleadas, corroborado pelo resultado da citometria quanto ao aumento na média dos parâmetros FSC e SSC. Na literatura, já foi descrita a existência de células multinucleadas, nomeadas de células cancerosas gigantes poliploides, em diversos tipos de câncer, como ovário, próstata e mama (BAI et al., 2022; LIU et al., 2020a; MITTAL et al., 2017). Apesar de os mecanismos de sua origem ainda não serem claros, sabe-se que elas estão relacionadas à resistência às terapias, metástases e recidivas e associadas a um fenótipo de CTT (ZHOU et al., 2022), estando em consonância com nossos resultados observados no grupo refratário ao tratamento com 5-FU.

Além disso, foram observadas diversas vacuolizações/granulações intracelulares nas células de ambos os grupos, com maior proeminência nas células HT-29/5FUR, tanto nas fotomicrografias com contraste de fase e nas secções semifinas com azul de toluidina quanto nas eletromicrografias de transmissão. A coloração com Oil Red O permitiu evidenciar que grande parte dessas estruturas possuíam natureza lipídica, o que condiz com a presença de corpúsculos lipídicos presentes na descrição da linhagem celular (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2023). As eletromicrografias de transmissão também mostram corpos elétron-densos e osmiofílicos, compatíveis com estruturas de caráter lipídico. Os corpúsculos lipídicos são organelas celulares constituídas por um denso centro hidrofóbico composto por lipídios neutros revestido por uma monocamada de fosfolipídios. Eles servem de reserva energética para a célula cancerosa, bem como a manutenção da homeostase da membrana, equilíbrio redox e autofagia, influenciando em diversos *hallmarks* do câncer (CRUZ et al., 2020; PETAN, 2020). Na literatura, é sabido que a maior presença de corpúsculos lipídicos está associada à resistência às terapias, explicando o maior número de gotículas lipídicas observadas no grupo HT-29/5FUR (CRUZ et al., 2020). Em CCR, é também descrita a associação dos corpúsculos lipídicos com o fenótipo tronco tumoral, com correlação direta à expressão de CD133 e a ativação da via de Wnt (TIRINATO et al., 2015). Mais recentemente, viu-se que a presença de corpúsculos lipídicos em células cancerosas gigantes poliploides é uma estratégia de sobrevivência frente à um estresse induzido por um quimioterápico (KOSTECKA; PIENTA; AMEND, 2021), podendo explicar parte dos nossos achados.

Ainda quanto à análise morfológica das células, o grupo HT-29/5FUR apresentou, tanto nas fotomicrografias com contraste de fase como em cortes semifinos corados com azul de toluidina, inúmeras estruturas de uma célula dentro de outra célula, compatíveis com o processo denominado entose. Entose é um tipo de estrutura “célula-na-célula” em que uma célula epitelial ativamente invade outra célula semelhante – uma invasão homotípica. A célula que foi invadida, chamada de célula hospedeira, forma um vacúolo ao redor da célula invasora, provocando uma deformação do citoplasma e do núcleo da primeira, adquirindo um aspecto reniforme, crescente. A célula invasora pode se manter viva dentro da célula hospedeira por um tempo, podendo se dividir (0,8-9%), escapar dessa estrutura (12-18%) ou seguir para uma morte celular mediada por mecanismos autofágicos da célula hospedeira. Vários gatilhos foram descritos para desencadear o processo de entose como: o despreendimento da matriz extracelular, a expressão de E-caderina, a depleção de glicose e aminoácidos, radiação ultravioleta, a própria mitose e a presença de alguns ligantes, como

ácido lisofosfatídico e *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) (KIANFAR et al., 2022; KRISHNA; OVERHOLTZER, 2016; MLYNARCZUK-BIALY et al., 2020). A entose foi descrita em diversos tipos de câncer e, apesar de seu papel na tumorigênese e progressão tumoral ainda não estar totalmente elucidado, sua presença está geralmente relacionada com um pior prognóstico (FAIS; OVERHOLTZER, 2018; MLYNARCZUK-BIALY et al., 2020).

No contexto de CCR, Gottwald *et al.* (2020) observaram que um maior número de estruturas “célula-na-célula” em amostras teciduais de carcinoma retal é um fator prognóstico ruim para a sobrevida global. Por sua vez, Bozkurt *et al.* (2021) elucidaram que uma maior quantidade de entoses nas regiões invasivas presentes em tumores colorretais possui uma forte correlação com desfechos clínicos desfavoráveis. Em relação à resistência aos quimioterápicos, alguns estudos em câncer de próstata e de mama mostraram o papel da entose na proteção e sobrevivência aos quimioterápicos (LIU et al., 2019; TONNESSEN-MURRAY et al., 2019). Desse modo, alinhados com a literatura, os resultados do trabalho sugerem que as estruturas entóticas visualizadas no grupo HT-29/5FUR conferem sobrevivência às células refratárias ao tratamento com 5-FU e podem estar associadas a uma maior malignidade. Os dados da citometria de fluxo em relação ao aumento das médias de FSC e SSC no grupo HT-29/5FUR em relação ao grupo HT-29, configurando um aumento do tamanho celular e da complexidade interna, pode ser explicado pelo alto número de processos de entose, em que ambas as células invasora e hospedeira serão lidas como um único evento.

Quanto à viabilidade celular, nossos resultados mostraram que o grupo HT-29/5FUR mostrou uma diferença significativa com as células que não receberam 5-FU nem seu veículo (DMSO) a partir de D3. Dessa forma, sugere-se que o 5-FU age sobre a viabilidade das células HT-29 a longo prazo, mesmo com um tratamento de apenas 24h. Na literatura, estudos com CCR mostram que células resistentes ao tratamento com 5-FU exibem uma redução do ciclo celular, como aumento do período G1/S, a fim de evitar a incorporação da fluoropirimidina no DNA e prover tempo suficiente para um possível reparo, bem como entrada em G0 com um fenótipo quiescente, que se atrela à propriedades de CTT (GUO et al., 2008; TOUIL et al., 2014). Seguindo esse raciocínio, o decréscimo da viabilidade no grupo HT-29/5FUR no ensaio de WST-1 em relação às células sem tratamento algum pode indicar que houve uma redução do ciclo celular, culminando em uma diminuição na proliferação e, conseqüentemente, no número de células viáveis. A observação do fenômeno compatível com entoses, nas fotomicrografias, também pode explicar a diminuição na razão de células viáveis,

em que determinadas células realizavam um *clearance*<sup>2</sup> de suas vizinhas. Ensaio de ciclo celular e proliferação por citometria de fluxo podem sedimentar melhor esses achados. Quanto à análise por citometria de fluxo utilizando marcação com Anexina V no D5, ambos os grupos HT-29 e HT-29/5FUR demonstraram ter uma média acima de 90% de células não-apoptóticas. Inclusive, o grupo HT-29/5FUR demonstrou uma média ligeiramente superior ao grupo HT-29. Dessa forma, isso demonstra que apesar da citorredução induzida pela utilização do fármaco em D1, as trocas de meio nos três dias subsequentes foram eficazes em manter a maioria das células refratárias viáveis, sem entrar em estado de apoptose.

No contexto do fenótipo tronco, os fatores de transcrição Oct4 (*Octamer-binding transcription factor 4*), Sox2 e NANOG são conhecidos por participarem ativamente da embriogênese na manutenção do potencial pluripotente das células-tronco (SWAIN et al., 2020; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Não obstante, observou-se que sua participação excedia processos fisiológicos, envolvendo-se em processos patológicos como o câncer, no processo de carcinogênese, em especial na subpopulação de CTT. A atuação desses fatores de transcrição também está associada à resistência à quimioterápicos (YANG et al., 2020). Em um estudo com câncer retal, You, Guo e Huang (2018) analisaram amostras de tecidos tumorais e não-tumorais adjacentes ao tumor de 153 pacientes e observaram que a amostra tumoral expressava mais Oct4, Sox2 e NANOG do que a amostra de tecido saudável. Em CCR de forma abrangente, a expressão desses fatores de pluripotência se mostrou diretamente relacionada à manutenção de CTTC e a fatores prognósticos adversos (VOUTSADAKIS, 2018). Tratando-se de linhagens tumorais de CCR, Shi *et al.* (2012) demonstraram que diversas linhagens, incluindo HT-29, mostraram uma alta expressão relativa de RNAm de Oct4, Sox2 e NANOG comparada aos níveis encontrados em amostras de tecidos epiteliais de cólon humanos saudáveis. Entretanto, esse trabalho também mostrou que um tratamento de 5 dias com 5-FU em diferentes doses (0 a 20 $\mu$ M) na linhagem metastática SW620 foi responsável por diminuir consideravelmente os níveis de RNAm dos fatores transcricionais mencionados anteriormente em comparação com o controle. Por sua vez, Salerno *et al.* (2022) observaram que a expressão de transcritos de *POU5F1* e *NANOG* em células HT-29 tratadas com 10 mM de 5FU por 48h é diferente dependendo do modelo de cultura. Em monocamada, as células HT-29 tratadas com 5-FU exibiram uma diminuição da expressão dos referidos genes, enquanto as células HT-29 cultivadas em um arcabouço de matriz decelularizado

---

<sup>2</sup> Depuração, remoção

derivado de paciente e tratadas com o fármaco exibiram um aumento nos níveis de RNAm dos mesmos genes quando comparados ao controle.

Os resultados do presente trabalho mostraram que não houve alteração estatisticamente significativa dos níveis de RNAm dos genes dos fatores de transcrição para Oct4 (*POU5F1*), Sox2 (*SOX2*) e NANOG (*NANOG*) entre os grupos HT-29 e HT-29/5FU, demonstrando que uma administração alta (46 $\mu$ M) e pontual (por 24h) do quimioterápico 5-FU não foi suficiente para interferir na expressão do gene desses fatores nas células refratárias, sugerindo não ter um papel essencial na resistência intrínseca das células. Porém, a dose do quimioterápico, o tempo de tratamento, bem como a linhagem celular e o microambiente na qual ela está sendo cultivada são importantes fatores que podem afetar a expressão dos fatores de pluripotência. Uma investigação da expressão proteica dos fatores Oct4, Sox2 e NANOG também seria importante para elucidar o seu papel na resistência de tratamento a curto prazo. Além disso, a utilização de ensaios funcionais, como ensaio de formação de colônia, seriam apropriados para analisar a correlação das células refratárias ao tratamento com 5-FU e o fenótipo tronco tumoral.

O CD133 é uma glicoproteína de membrana que serve como biomarcador para diferentes tipos de células-tronco e já foi descrito como marcador de CTT em uma ampla gama de tipos de câncer (GLUMAC; LEBEAU, 2018). No CCR, ele é um dos principais marcadores para a população de CTTC (ZHOU et al., 2018), possuindo valor prognóstico relevante para a predição da sobrevida dos paciente (CHEN et al., 2013; FANG et al., 2017; HORST et al., 2009). Paschall *et al.* (2016) observaram que a população celular de duas linhagens colorretais induzidas à resistência à 5-FU (2  $\mu$ g/mL) eram enriquecidas em células CD133+, com análise por citometria de fluxo, bem como amostras teciduais de tumores de pacientes com CCR tratados com 5-FU, analisados por imunohistoquímica, possuíam maior marcação para CD133 em comparação com amostras tumorais de pacientes com CCR não submetidos à quimioterapia. Alinhado com o estudo anterior, Peng *et al.* (2020) identificaram que células CD133+/CD44+ das linhagens HT-29 e HCT-116 possuíam maiores características de CTTC, como potencial tumorigênico *in vivo*, formação de esferoides, capacidades de invasão e migração, bem como uma quimiorresistência maior ao tratamento com 5-FU em doses clinicamente relevantes quando comparadas às células CD133-/CD44-. Por outro lado, Hongo *et al.* (2012) notaram que células CD133+ de uma linhagem tumoral colorretal possuíam maior sensibilidade ao tratamento com 5-FU (2  $\mu$ M a 10  $\mu$ M), com menor taxa de proliferação e maior taxa de apoptose, se comparadas às células que não expressavam CD133.

Em consonância com os achados do último estudo, nossos resultados da expressão de RNAm do gene do CD133 (*PROM1*), por RT-qPCR, e da expressão proteica de CD133, por citometria de fluxo, mostraram uma diminuição significativa nas células do grupo HT-29/5FUR em relação ao grupo HT-29, sugerindo que a expressão desse marcador em células refratárias pode se alterar conforme a dose administrada de 5-FU e a própria linhagem celular estudada, não representando um marcador adequado para identificar uma subpopulação resistente. Por sua vez, a mediana de fluorescência da marcação para CD133, por citometria de fluxo, estava significativamente aumentada no grupo HT-29/5FUR em comparação com as células do grupo controle, indicando que as poucas células CD133+ presentes superexpressavam esse marcador. Em conformidade com esses resultados, estudos na literatura mostram que a superexpressão de CD133 promove a resistência em células de glioma à doxorubicina<sup>3</sup> e de câncer gástrico ao 5-FU (ANGELASTRO; LAMÉ, 2010; ZHU et al., 2014). Dessa forma, sugere-se que a intensidade da expressão de CD133 seja mais relevante para a caracterização de células com fenótipo tronco tumoral associado à resistência ao 5-FU. A análise das células CD133+ por citometria de fluxo evidenciou que o grupo HT-29/5FUR possui maior tamanho celular e complexidade interna/granulosidade em comparação com as células do grupo controle. Com isso, pode-se supor que as células HT-29/5FUR CD133+ sejam células multinucleadas, como as células cancerosas gigantes poliploides, ou mesmo estejam envolvidas no processo de entose, como mostram as figuras representativas de imunocitoquímica, já que a célula invasora está dentro da célula hospedeira e elas seriam lidas como um único evento na citometria. Análises por imunofluorescência e imunocitoquímica ultraestrutural podem ser estratégias apropriadas para confirmar essa hipótese.

A dinâmica mitocondrial é um fenômeno biológico que costuma estar desbalanceado em patologias, incluindo o câncer (MAYCOTTE et al., 2017). Estudos em CCR demonstraram que a fissão mitocondrial pode ter um papel pró ou anti-tumoral. (JIEENSINUE et al., 2018; PADDER et al., 2021; ZHANG et al., 2022). Huang *et al.* (2018) observaram que células de linhagens colorretais exibiam um aumento na fosforilação de ativação na S616 da proteína DRP1 após tratamento com agentes quimioterápicos, incluindo a capecitabina (10µM), uma pró-droga do 5-FU, tendo um papel importante na quimiorresistência. Nossos resultados dos níveis de RNAm dos genes *DNM1L* (fissão mitocondrial), *MFN1* e *MFN2* (fusão mitocondrial) não mostraram diferença significativa entre os grupos HT-29 e HT-29/5FUR. Entretanto, sabe-se que existem diversos pontos de

---

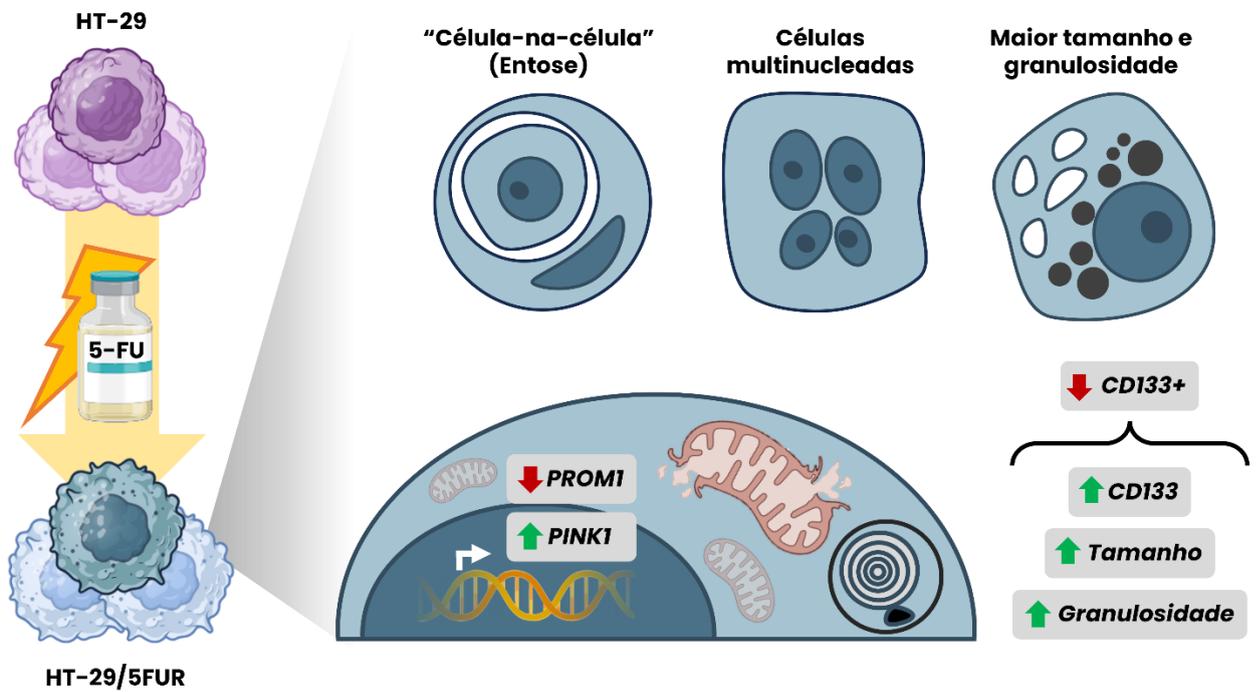
<sup>3</sup> Agente antineoplásico da classe de antraciclinas

modificações pós-transcricionais e pós-traducionais que podem afetar o efeito final na dinâmica mitocondrial, sugerindo que uma análise da expressão proteica das proteínas, bem como do balanço da expressão das formas fosforiladas de ativação e inibição de DRP1 seria necessária para compreender melhor o papel da dinâmica mitocondrial no estabelecimento das células refratárias. Nossos achados nas micrografias de fluorescência e nas eletromicrografias de transmissão representativas não mostram diferenças significativas dos perfis mitocondriais entre os dois grupos experimentais. Para uma resposta mais contundente, é necessária uma avaliação mais minuciosa da organização mitocondrial das nossas células, sugerindo-se a técnica de fluorescência com visualização por microscópio confocal, para observação dessas organelas em um único plano focal, e quantificação do número de mitocôndrias alongadas e fragmentadas nas eletromicrografias de transmissão por meio de análises morfométricas da razão do eixo maior pelo eixo menor.

Com relação à biogênese mitocondrial e mitofagia, nossos dados não exibiram diferença significativa entre os grupos HT-29 e HT-29/5FUR na expressão de RNAm dos genes *PPARGC1A*, que codifica a proteína PGC-1 $\alpha$  envolvida na biogênese mitocondrial, e *PRKN*, que codifica a proteína Parkin envolvida em uma das vias de mitofagia. Entretanto, a expressão de transcritos do gene *PINK1*, responsável por codificar a proteína PINK1 relacionada à via de mitofagia, estava significativamente aumentada no grupo HT-29/5FUR em relação às células HT-29. Haja vista que PINK1 é uma proteína mais recrutada pela mitocôndria quando há despolarização de membrana mitocondrial (EIYAMA; OKAMOTO, 2015), sugere-se que o grupo HT-29/5FUR tenha mais mitocôndrias danificadas em relação ao controle. Corroborando essa hipótese, as eletromicrografias de transmissão exibem mitocôndrias com aspecto danificado, como perda de continuidade da dupla membrana e matriz mitocondrial heterogênea. Além disso, foram observadas muitas estruturas compatíveis com autofagossomos de processo de mitofagia, contendo uma membrana limitante externamente e um conteúdo interno com aspecto de bainha de mielina ou cebola, conforme descrito na literatura (CHAKRABORTY et al., 2020). Em conformidade com nossos achados, estudos com CCR demonstraram que uma maior expressão de proteínas relacionadas à mitofagia estavam associadas a células com fenótipo tronco tumoral e resistentes a quimioterápicos, como a doxorrubicina (TAKEDA et al., 2019; YAN et al., 2017). De todo modo, uma avaliação da expressão proteica de PINK1 e Parkin, tanto molecular como morfológica, bem como de outras proteínas envolvidas no processo de mitofagia é necessária para embasar melhor essa correlação. Quanto à análise da quantidade mitocondrial com potencial de membrana íntegro por citometria de fluxo, nossos dados demonstraram não haver

diferença significativa entre os grupos HT-29 e HT-29/5FUR. Em CCR, Denise *et al.* (2015) mostraram que células HT-29 resistentes ao tratamento prolongado com 5-FU (20  $\mu$ M) eram aditas da fosforilação oxidativa, indicando maior potencial de membrana mitocondrial, e expressavam mais CD133 em modelos 3D *in vitro*. Com isso, pode-se dizer que o método de cultivo celular, bem como a dose e o tempo de exposição ao fármaco podem influenciar a análise da funcionalidade mitocondrial. Além disso, visando afirmar a existência de uma proporção maior ou menor de mitocôndrias disfuncionais em relação a mitocôndrias competentes em nossos resultados, faz-se necessária uma comarcação com uma sonda que abarque todos os perfis mitocondriais, como o MitoTracker™ Green.

Figura 29 – Resumo dos principais resultados do trabalho



Legenda: A figura esquematiza os principais resultados obtidos no trabalho. As células HT-29/5FUR exibiram maior frequência de estruturas “célula-na-célula”, compatíveis com entose, maior número de células multinucleadas, maior tamanho celular e granulosidade, maior expressão de RNAm de PINK1 e menor de PROM1 e menor expressão de CD133. Entretanto, as células CD133+ expressavam maior quantidade do marcador, maior tamanho e maior granulosidade. As células HT-29/5FUR também exibiram mitocôndrias danificadas e estruturas de autofagossomos.

Fonte: O autor, 2023.

## CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho concluem que as células da linhagem tumoral de câncer colorretal HT-29 refratárias ao tratamento com 5-FU exibem um maior tamanho celular, bem como uma maior granulidade, com aumento de vacúolos e corpúsculos lipídicos. Além disso, apresentam mais estruturas multinucleadas e de “célula-na-célula”, compatíveis com o processo de entose. As células refratárias se apresentam em menor número em relação às não tratadas, mas com células não-apoptóticas em quantidade superior em D5. O tratamento com 5-FU não alterou a expressão de RNAm de fatores de pluripotência das células HT-29/5FUR. A expressão gênica e proteica de CD133 é diminuída nas células refratárias, mas suas células positivas superexpressam esse marcador, além de possuírem maior tamanho celular e complexidade. As células HT-29/5FUR não exibem uma alteração na dinâmica mitocondrial, tanto molecularmente quanto morfológicamente, exceto para a via da mitofagia, em que a expressão de RNAm de *PINK1* é superior e são encontradas mitocôndrias danificadas e estruturas de autofagossomos.

## REFERÊNCIAS

ABDOU HASSAN, W.; MUQRESH, M. A.; OMAR, M. The Potential Role of CD44 and CD133 in Colorectal Stem Cell Cancer. **Cureus**, 20 out. 2022.

AKHDAR, H. *et al.* Involvement of Nrf2 activation in resistance to 5-fluorouracil in human colon cancer HT-29 cells. **European Journal of Cancer**, v. 45, n. 12, p. 2219–2227, ago. 2009.

AL-HAJJ, M. *et al.* Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 7, p. 3983–3988, 2003.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **ATCC: The Global Bioresource Center**. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/htb-38#detailed-product-information>. Acesso em: 2 jul. 2023

ANGELASTRO, J. M.; LAMÉ, M. W. Overexpression of CD133 Promotes Drug Resistance in C6 Glioma Cells. **Molecular Cancer Research**, v. 8, n. 8, p. 1105–1115, 1 ago. 2010.

ARCHER, S. L. Mitochondrial Dynamics — Mitochondrial Fission and Fusion in Human Diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 23, p. 2236–2251, 5 dez. 2013.

AZWAR, S. *et al.* Recent Updates on Mechanisms of Resistance to 5-Fluorouracil and Reversal Strategies in Colon Cancer Treatment. **Biology**, v. 10, n. 9, p. 854, 31 ago. 2021.

BAI, S. *et al.* Targeting Therapeutic Resistance and Multinucleate Giant Cells in CCNE1-Amplified HR-Proficient Ovarian Cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 21, n. 9, p. 1473–1484, 6 set. 2022.

BATLLE, E.; CLEVERS, H. Cancer stem cells revisited. **Nature Medicine**, v. 23, n. 10, p. 1124–1134, 2017.

BECK, B.; BLANPAIN, C. Unravelling cancer stem cell potential. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 10, p. 727–738, 24 out. 2013.

BENDA, Carl. Ueber die spermatogenese der vertebraten und höherer evertebraten, II. Theil: Die histiogenese der spermien. **Arch. Anat. Physiol**, v. 73, p. 393-398, 1898.

BENSON, A. B. *et al.* Colon Cancer, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 19, n. 3, p. 329–359, mar. 2021.

BENSON, A. B. *et al.* Rectal Cancer, Version 2.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 20, n. 10, p. 1139–1167, out. 2022.

BEN-ZE'EV, A.; BASU, S.; HAASE, G. Wnt signaling in cancer stem cells and colon cancer metastasis. **F1000Research**, v. 5, n. 0, p. 1–10, 2016.

BEREITER-HAHN, J. Behavior of Mitochondria in the Living Cell. Em: [s.l: s.n.]. p. 1–63.  
BLONDY, S. et al. 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes. **Cancer Science**, v. 111, n. 9, p. 3142–3154, 2020.

BONNET, D.; DICK, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nature Medicine**, v. 3, n. 7, p. 730–737, jul. 1997.

BOZKURT, E. *et al.* TRAIL signaling promotes entosis in colorectal cancer. **Journal of Cell Biology**, v. 220, n. 11, 1 nov. 2021.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BUSTIN, S. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 169–193, 1 out. 2000.

CABARCAS, S. M.; MATHEWS, L. A.; FARRAR, W. L. The cancer stem cell niche—there goes the neighborhood? **International Journal of Cancer**, v. 129, n. 10, p. 2315–2327, 2011.

CHAKRABORTY, J. *et al.* Investigating mitochondrial autophagy by routine transmission electron microscopy: Seeing is believing? **Pharmacological Research**, v. 160, p. 105097, out. 2020.

CHEN, H.; CHAN, D. C. Mitochondrial Dynamics in Regulating the Unique Phenotypes of Cancer and Stem Cells. **Cell Metabolism**, v. 26, n. 1, p. 39–48, jul. 2017.

CHEN, S. *et al.* CD133 Expression and the Prognosis of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e56380, 11 fev. 2013.

COHNHEIM, Julius. **Vorlesungen über allgemeine Pathologie: ein Handbuch für Aertze und Studirende**. A. Hirschwald, 1882.

COLAK, S. *et al.* Decreased mitochondrial priming determines chemoresistance of colon cancer stem cells. **Cell Death & Differentiation**, v. 21, n. 7, p. 1170–1177, 28 jul. 2014.

CROCKETT, S. D.; NAGTEGAAL, I. D. Terminology, Molecular Features, Epidemiology, and Management of Serrated Colorectal Neoplasia. **Gastroenterology**, v. 157, n. 4, p. 949–966.e4, 2019.

CRUZ, A. L. S. *et al.* Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 2, p. 105, 6 fev. 2020.

DA SILVA-DIZ, V. *et al.* Cancer cell plasticity: Impact on tumor progression and therapy response. **Seminars in Cancer Biology**, v. 53, p. 48–58, 2018.

DALLAS, N. A. *et al.* Chemoresistant Colorectal Cancer Cells, the Cancer Stem Cell Phenotype, and Increased Sensitivity to Insulin-like Growth Factor-I Receptor Inhibition. **Cancer Research**, v. 69, n. 5, p. 1951–1957, 1 mar. 2009.

DENISE, C. *et al.* 5-Fluorouracil resistant colon cancer cells are addicted to OXPHOS to survive and enhance stem-like traits. **Oncotarget**, v. 6, n. 39, p. 41706–41721, 8 dez. 2015.

DIENSTMANN, R. *et al.* Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 2, p. 79–92, 2017.

EIYAMA, A.; OKAMOTO, K. PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 33, p. 95–101, abr. 2015.

EL KHOURY, F. *et al.* Acquisition of anticancer drug resistance is partially associated with cancer stemness in human colon cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 49, n. 6, p. 2558–2568, dez. 2016.

EUN, K.; HAM, S. W.; KIM, H. Cancer stem cell heterogeneity: Origin and new perspectives on CSC targeting. **BMB Reports**, v. 50, n. 3, p. 117–125, 2017.

FAIS, S.; OVERHOLTZER, M. Cell-in-cell phenomena in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 12, p. 758–766, 12 dez. 2018.

FANG, C. *et al.* Prognostic value of CD133 + CD54 + CD44 + circulating tumor cells in colorectal cancer with liver metastasis. **Cancer Medicine**, v. 6, n. 12, p. 2850–2857, dez. 2017.

FERLAY, J. *et al.* Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International Journal of Cancer**, v. 149, n. 4, p. 778–789, 15 ago. 2021.

FESSLER, E.; MEDEMA, J. P. Colorectal Cancer Subtypes: Developmental Origin and Microenvironmental Regulation. **Trends in Cancer**, v. 2, n. 9, p. 505–518, 2016.

GAO, W. *et al.* Isolation and phenotypic characterization of colorectal cancer stem cells with organ-specific metastatic potential. **Gastroenterology**, v. 145, n. 3, 2013.

GIACOMELLO, M. *et al.* The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 4, p. 204–224, 18 abr. 2020.

GLUMAC, P. M.; LEBEAU, A. M. The role of CD133 in cancer: a concise review. **Clinical and Translational Medicine**, v. 7, n. 1, 9 dez. 2018.

GOTTWALD, D. *et al.* Role of tumor cell senescence in non-professional phagocytosis and cell-in-cell structure formation. **BMC Molecular and Cell Biology**, v. 21, n. 1, p. 79, 7 dez. 2020.

GUINNEY, J. *et al.* The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. **Nature Medicine**, v. 21, n. 11, p. 1350–1356, 2015.

GUO, X. *et al.* Cell cycle perturbation and acquired 5-fluorouracil chemoresistance. **Anticancer research**, v. 28, n. 1A, p. 9–14, 2008.

GUPTA, R. *et al.* Colon cancer stem cells: Potential target for the treatment of colorectal cancer. **Cancer Biology and Therapy**, v. 20, n. 8, p. 1068–1082, 2019.

GUPTA, S. Screening for Colorectal Cancer. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 36, n. 3, p. 393–414, jun. 2022.

HAMMOND, W. A.; SWAIKA, A.; MODY, K. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 8, n. 1, p. 57–84, 18 jan. 2016.

HANAHAN, D. **Hallmarks of Cancer: New Dimensions**. **Cancer Discovery**American Association for Cancer Research Inc., , 1 jan. 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HATANO, Y. *et al.* Multifaceted interpretation of colon cancer stem cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, 2017.

HIRATA, A. *et al.* Heterogeneity of colon cancer stem cells. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1139, p. 115–126, 2019.

HOLOHAN, C. *et al.* Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 10, p. 714–726, 24 out. 2013.

HONGO, K. *et al.* CD133(–) Cells, Derived From a Single Human Colon Cancer Cell Line, Are More Resistant to 5-Fluorouracil (FU) Than CD133(+) Cells, Dependent on the  $\beta$ 1-Integrin Signaling. **Journal of Surgical Research**, v. 175, n. 2, p. 278–288, jun. 2012.

HORST, D. *et al.* Prognostic Significance of the Cancer Stem Cell Markers CD133, CD44, and CD166 in Colorectal Cancer. **Cancer Investigation**, v. 27, n. 8, p. 844–850, jan. 2009.

HUANG, C.-Y. *et al.* HMGB1 promotes ERK-mediated mitochondrial Drp1 phosphorylation for chemoresistance through RAGE in colorectal cancer. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 10, p. 1004, 26 set. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). **ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer**. – Rio de Janeiro: Inca, 2020. 128 p.

IROLLO, E.; PIROZZI, G. CD133: to be or not to be, is this the real question? **American journal of translational research**, v. 5, n. 6, p. 563–81, 25 set. 2013.

JAHANAFROOZ, Z. *et al.* Colon cancer therapy by focusing on colon cancer stem cells and their tumor microenvironment. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 5, p. 4153–4166, 2020.

JEMAL, A. *et al.* Cancer Statistics, 2008. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 58, n. 2, p. 71–96, 2008.

JIEENSINUE, S. *et al.* Tanshinone IIA reduces SW837 colorectal cancer cell viability via the promotion of mitochondrial fission by activating JNK-Mff signaling pathways. **BMC Cell Biology**, v. 19, n. 1, p. 21, 25 dez. 2018.

JORNAYVAZ, F. R.; SHULMAN, G. I. Regulation of mitochondrial biogenesis. **Essays in Biochemistry**, v. 47, p. 69–84, 2010.

JUNTTILA, M. R.; DE SAUVAGE, F. J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 346–354, 2013.

KEUM, N. N.; GIOVANNUCCI, E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 12, p. 713–732, 2019.

KHOLODENKO, I. V. *et al.* Analysis of the Correlation between CD133 Expression on Human Colorectal Adenocarcinoma Cells HT-29 and Their Resistance to Chemotherapeutic Drugs. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 171, n. 1, p. 156–163, 31 maio 2021.

KIANFAR, M. *et al.* Cell Death by Entosis: Triggers, Molecular Mechanisms and Clinical Significance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 4985, 30 abr. 2022.

KONG, B. *et al.* Mitochondrial dynamics regulating chemoresistance in gynecological cancers. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1350, n. 1, p. 1–16, set. 2015.

KOSTECKA, L. G.; PIENTA, K. J.; AMEND, S. R. Lipid droplet evolution gives insight into polyan euploid cancer cell lipid droplet functions. **Medical Oncology**, v. 38, n. 11, p. 133, 28 nov. 2021.

KOTLARZ, A. *et al.* Imatinib inhibits the regrowth of human colon cancer cells after treatment with 5-FU and cooperates with vitamin D analogue PRI-2191 in the downregulation of expression of stemness-related genes in 5-FU refractory cells. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 189, n. February, p. 48–62, 2019a.

KOTLARZ, A. *et al.* Imatinib inhibits the regrowth of human colon cancer cells after treatment with 5-FU and cooperates with vitamin D analogue PRI-2191 in the downregulation of expression of stemness-related genes in 5-FU refractory cells. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 189, p. 48–62, 1 maio 2019b.

KRESO, A.; DICK, J. E. Evolution of the cancer stem cell model. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 3, p. 275–291, 2014.

KRISHNA, S.; OVERHOLTZER, M. Mechanisms and consequences of entosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 11–12, p. 2379–2386, 5 jun. 2016.

KUIPERS, E. J. *et al.* Colorectal cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 1–25, 2015.

KUMAR, A. *et al.* Current and emerging therapeutic approaches for colorectal cancer: A comprehensive review. **World Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 15, n. 4, p. 495–519, 27 abr. 2023.

LABIANCA, R. *et al.* Early colon cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 24, n. SUPPL.6, p. vi64–vi72, 2013.

LANE, N.; MARTIN, W. The energetics of genome complexity. **Nature**, v. 467, n. 7318, p. 929–934, 20 out. 2010.

LAPIDOT, T. *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. **Nature**, v. 367, n. 6464, p. 645–648, 1994.

LATCHMAN, J.; GUASTELLA, A.; TOFTHAGEN, C. 5-Fluorouracil Toxicity and Dihydropyrimidine Dehydrogenase Enzyme: Implications for Practice. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 18, n. 5, p. 581–585, 1 out. 2014.

LEBLEU, V. S. *et al.* PGC-1 $\alpha$  mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. **Nature Cell Biology**, v. 16, n. 10, p. 992–1003, 21 out. 2014.

LI, Z. CD133: A stem cell biomarker and beyond. **Experimental Hematology and Oncology**, v. 2, n. 1, p. 1, 2013.

LIAO, Y. *et al.* Quantitative Analyses of CD133 Expression Facilitate Researches on Tumor Stem Cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 5, p. 738–742, 2010.

LIESA, M.; PALACÍN, M.; ZORZANO, A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 3, p. 799–845, 2009.

LIU, J. *et al.* Induction of entosis in prostate cancer cells by nintedanib and its therapeutic implications. **Oncology Letters**, 21 jan. 2019.

LIU, K. *et al.* Different p53 genotypes regulating different phosphorylation sites and subcellular location of CDC25C associated with the formation of polyploid giant cancer cells. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 39, n. 1, p. 83, 11 dez. 2020a.

LIU, Y. *et al.* MCU-induced mitochondrial calcium uptake promotes mitochondrial biogenesis and colorectal cancer growth. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 59, 5 maio 2020b.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330–338, maio 2003.

LYTLE, N. K.; BARBER, A. G.; REYA, T. Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 11, p. 669–680, 2018.

MAEHLE, A.-H. Ambiguous cells: the emergence of the stem cell concept in the nineteenth and twentieth centuries. **Notes and Records of the Royal Society**, v. 65, n. 4, p. 359–378, 20 dez. 2011.

MANSOORI, B. *et al.* The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 7, n. 3, p. 339–348, 25 set. 2017.

MAYCOTTE, P. *et al.* Mitochondrial dynamics and cancer. **Tumor Biology**, v. 39, n. 5, p. 101042831769839, 4 maio 2017.

MEDEMA, J. P. Cancer stem cells: The challenges ahead. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 4, p. 338–344, 2 abr. 2013.

MITTAL, K. *et al.* Multinucleated polyploidy drives resistance to Docetaxel chemotherapy in prostate cancer. **British Journal of Cancer**, v. 116, n. 9, p. 1186–1194, 23 abr. 2017.

MLYNARCZUK-BIALY, I. *et al.* Entosis: From Cell Biology to Clinical Cancer Pathology. **Cancers**, v. 12, n. 9, p. 2481, 1 set. 2020.

MONTEIRO, L. DE B. *et al.* Using flow cytometry for mitochondrial assays. **MethodsX**, v. 7, 2020.

NGUYEN, T. N.; PADMAN, B. S.; LAZAROU, M. Deciphering the Molecular Signals of PINK1/Parkin Mitophagy. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 10, p. 733–744, out. 2016.

NUNNARI, J.; SUOMALAINEN, A. Mitochondria: In Sickness and in Health. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1145–1159, mar. 2012.

O'BRIEN, C. A. *et al.* A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. **Nature**, v. 445, n. 7123, p. 106–110, 2007.

PADDER, R. A. *et al.* DRP1 Promotes BRAFV600E-Driven Tumor Progression and Metabolic Reprogramming in Colorectal Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 2 mar. 2021.

PALADE, G. E. AN ELECTRON MICROSCOPE STUDY OF THE MITOCHONDRIAL STRUCTURE. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 1, n. 4, p. 188–211, 26 jul. 1953.

PASCHALL, A. V. *et al.* CD133+CD24<sup>lo</sup> defines a 5-Fluorouracil-resistant colon cancer stem cell-like phenotype. **Oncotarget**, v. 7, n. 48, p. 78698–78712, 29 nov. 2016.

PENG, L. *et al.* Identification of a subpopulation of long-term tumor-initiating cells in colon cancer. **Bioscience Reports**, v. 40, n. 8, 28 ago. 2020.

PETAN, T. Lipid Droplets in Cancer. *Em: [s.l: s.n.]*. p. 53–86.

PFANNER, N.; WARSCHEID, B.; WIEDEMANN, N. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 5, p. 267–284, 9 maio 2019.

PIÑEROS, M. *et al.* Essential TNM: a registry tool to reduce gaps in cancer staging information. **The Lancet Oncology**, v. 20, n. 2, p. e103–e111, fev. 2019.

PLAKS, V.; KONG, N.; WERB, Z. The cancer stem cell niche: How essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? **Cell Stem Cell**, v. 16, n. 3, p. 225–238, 2015.

POPOV, L. Mitochondrial biogenesis: An update. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 9, p. 4892–4899, 12 maio 2020.

RAINHO, M. DE A. *et al.* Mitochondria in colorectal cancer stem cells - a target in drug resistance. **Cancer Drug Resistance**, v. 6, n. 2, p. 273–283, 2023.

REICHERT, A. S.; NEUPERT, W. Mitochondriomics or what makes us breathe. **Trends in Genetics**, v. 20, n. 11, p. 555–562, nov. 2004.

REN, F. CD133: A cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 17, p. 2603, 2013.

RICCI-VITIANI, L. *et al.* Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. **Nature**, v. 445, n. 7123, p. 111–115, 19 jan. 2007.

SADANANDAM, A. *et al.* A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. **Nature Medicine**, v. 19, n. 5, p. 619–625, 2013.

SALERNO, S. *et al.* 5-fluorouracil treatment of patient-derived scaffolds from colorectal cancer reveal clinically critical information. **Journal of Translational Medicine**, v. 20, n. 1, p. 209, 13 dez. 2022.

SAUNDERS, M.; IVESON, T. Management of advanced colorectal cancer: State of the art. **British Journal of Cancer**, v. 95, n. 2, p. 131–138, 2006.

SEMENZA, G. L. The hypoxic tumor microenvironment: A driving force for breast cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 3, p. 382–391, 2016.

SESSIONS, D. T.; KASHATUS, D. F. Mitochondrial dynamics in cancer stem cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 8, p. 3803–3816, 13 abr. 2021.

SHI, Z. *et al.* Induced pluripotent stem cell-related genes influence biological behavior and 5-fluorouracil sensitivity of colorectal cancer cells. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 13, n. 1, p. 11–19, 4 jan. 2012.

SNINSKY, J. A. *et al.* Risk Factors for Colorectal Polyps and Cancer. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v. 32, n. 2, p. 195–213, abr. 2022.

SONG, I.-S.; JEONG, Y. J.; HAN, J. Mitochondrial metabolism in cancer stem cells: a therapeutic target for colon cancer. **BMB Reports**, v. 48, n. 10, p. 539–540, 31 out. 2015.

SOUSA-SQUIAVINATO, A. C. M. *et al.* Long-term resistance to 5-fluorouracil promotes epithelial–mesenchymal transition, apoptosis evasion, autophagy, and reduced proliferation rate in colon cancer cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 933, p. 175253, out. 2022.

SPAANDER, Manon CW *et al.* Young-onset colorectal cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 9, n. 1, p. 21, 2023.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 maio 2021.

SWAIN, N. *et al.* SOX2, OCT4 and NANOG: The core embryonic stem cell pluripotency regulators in oral carcinogenesis. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 24, n. 2, p. 368, 2020.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–676, ago. 2006.

TAKEDA, M. *et al.* Disruption of Endolysosomal RAB5/7 Efficiently Eliminates Colorectal Cancer Stem Cells. **Cancer Research**, v. 79, n. 7, p. 1426–1437, 1 abr. 2019.

TIRINATO, L. *et al.* Lipid Droplets: A New Player in Colorectal Cancer Stem Cells Unveiled by Spectroscopic Imaging. **Stem Cells**, v. 33, n. 1, p. 35–44, 1 jan. 2015.

TODARO, M. *et al.* Colon Cancer Stem Cells Dictate Tumor Growth and Resist Cell Death by Production of Interleukin-4. **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 4, p. 389–402, 2007.

TONNESSEN-MURRAY, C. A. *et al.* Chemotherapy-induced senescent cancer cells engulf other cells to enhance their survival. **Journal of Cell Biology**, v. 218, n. 11, p. 3827–3844, 4 nov. 2019.

TOUIL, Y. *et al.* Colon Cancer Cells Escape 5FU Chemotherapy-Induced Cell Death by Entering Stemness and Quiescence Associated with the c-Yes/YAP Axis. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 4, p. 837–846, 15 fev. 2014.

TSUNEDOMI, R. *et al.* Clinical implications of cancer stem cells in digestive cancers: acquisition of stemness and prognostic impact. **Surgery Today**, v. 50, n. 12, p. 1560–1577, 5 dez. 2020.

VAN DER JEUGHT, K. *et al.* Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 34, p. 3834–3848, 2018.

VODENKOVA, S. *et al.* 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 206, p. 107447, fev. 2020.

VOUTSADAKIS, I. A. The pluripotency network in colorectal cancer pathogenesis and prognosis: an update. **Biomarkers in Medicine**, v. 12, n. 6, p. 653–665, jun. 2018.

WALCHER, L. *et al.* Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 7 ago. 2020.

WESTERMANN, B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 12, p. 872–884, 23 dez. 2010.

YAN, C. *et al.* Doxorubicin-induced mitophagy contributes to drug resistance in cancer stem cells from HCT8 human colorectal cancer cells. **Cancer Letters**, v. 388, p. 34–42, mar. 2017.

YANG, L. *et al.* Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 8, 7 fev. 2020.

YOO, S.-M.; JUNG, Y.-K. A Molecular Approach to Mitophagy and Mitochondrial Dynamics. **Molecules and cells**, v. 41, n. 1, p. 18–26, 31 jan. 2018.

YOU, L.; GUO, X.; HUANG, Y. Correlation of Cancer Stem-Cell Markers OCT4, SOX2, and NANOG with Clinicopathological Features and Prognosis in Operative Patients with Rectal Cancer. **Yonsei Medical Journal**, v. 59, n. 1, p. 35, 2018.

ZAMPIERI, L. X. *et al.* Mitochondria Participate in Chemoresistance to Cisplatin in Human Ovarian Cancer Cells. **Molecular Cancer Research**, v. 18, n. 9, p. 1379–1391, 1 set. 2020.

ZEUNER, A. *et al.* Colorectal cancer stem cells: From the crypt to the clinic. **Cell Stem Cell**, v. 15, n. 6, p. 692–705, 2014.

ZHANG, B. *et al.* The chromatin remodeler CHD6 promotes colorectal cancer development by regulating TMEM65-mediated mitochondrial dynamics via EGF and Wnt signaling. **Cell Discovery**, v. 8, n. 1, p. 130, 6 dez. 2022.

ZHANG, L. *et al.* Oral fluoropyrimidine *versus* intravenous 5-fluorouracil for the treatment of advanced gastric and colorectal cancer: Meta-analysis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 33, n. 1, p. 209–225, jan. 2018.

ZHAO, J. *et al.* Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. **Oncogene**, v. 32, n. 40, p. 4814–4824, 5 out. 2013.

ZHOU, X. *et al.* Polyploid giant cancer cells and cancer progression. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 5 out. 2022.

ZHOU, Y. *et al.* Cancer stem cells in progression of colorectal cancer. **Oncotarget**, v. 9, n. 70, p. 33403–33415, 2018.

ZHU, Y. *et al.* Overexpression of CD133 enhances chemoresistance to 5-fluorouracil by activating the PI3K/Akt/p70S6K pathway in gastric cancer cells. **Oncology Reports**, v. 32, n. 6, p. 2437–2444, dez. 2014.