



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

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

*PEDRO HENRIQUE SCHUMANN LIMA*

Influência da PGE<sub>2</sub> e do TGF- $\beta$  em eventos relacionados a Transição Epitélio-Mesênquima em células de câncer colorretal

**Orientador:** Dr. José Andrés Morgado-Díaz

**Co-orientador:** Dr. Marcelo Neves Tanaka

**RIO DE JANEIRO**  
**2014**



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

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

*PEDRO HENRIQUE SCHUMANN LIMA*

Influência da PGE<sub>2</sub> e do TGF- $\beta$  em eventos relacionados a Transição Epitélio-Mesênquima em células de câncer colorretal

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Oncologia

**Orientador:** Prof. Dr. José Andrés Morgado-Díaz

**Co-orientador:** Dr. Marcelo Neves Tanaka

**RIO DE JANEIRO  
2014**

L732i

Lima, Pedro Henrique Schumann.

Influência da PGE<sub>2</sub> e do TGF-β em eventos relacionados a transição epitélio-mesênquima em células de câncer colorretal. / Pedro Henrique Schumann Lima. – Rio de Janeiro: INCA, 2014.

xvii.; 104f.; il.

Dissertação( Mestrado em Oncologia)- Pós-Graduação em Oncologia- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2014.

Orientador: José Andrés Morgado-Díaz.

Co-Orientador: Marcelo Neves Tanaka.

1. Neoplasias Colorretais. 2. PGE<sub>2</sub>. 3. TGF-β. 3. Câncer colorretal. 4. transição epitélio-mesênquima. 5. Proteínas Rho de ligação ao GTP. 6. Migração. I. Morgado-Díaz, José Andrés (Orient.). II. Tanaka, Marcelo Neves (Co-Orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.99435



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

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

**Pós-Graduação em Oncologia**

*PEDRO HENRIQUE SCHUMANN LIMA*

**INFLUÊNCIA DA PGE<sub>2</sub> E DO TGF- $\beta$  EM EVENTOS RELACIONADOS A  
TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA EM CÉLULAS DE CÂNCER  
COLORRETAL**

**Orientador:** Prof. Dr. José Andrés Morgado-Díaz

**Co-orientador:** Dr. Marcelo Neves Tanaka

**Aprovada em:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**EXAMINADORES:**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>:** Etel Rodrigues Pereira Gimba - Titular Interno

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>:** Renata Binato Gomes - Titular Interno

**Prof. Dr.:** Leonardo Rodrigues de Andrade - Titular Externo

**Prof. Dr.:** Miguel Ângelo Martins Moreira - Suplente Interno

**Prof. Dr.:** André Luiz Mencialha - Suplente Externo

**RIO DE JANEIRO**

2014

## DEDICATÓRIA

***A capacidade intrínseca e única que o conhecimento, formal e informal, possui de criar, modificar e renovar ideias e valores individuais e coletivos, indistintamente abrangente aos seres humanos***

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, por sua incomensurabilidade de ações diretas e indiretas que guiam e transformam os rumos dos indivíduos e das civilizações, Deste e de Outros lugares!
- A minha querida e amada mãe, por ter me gerado e por ser meu alicerce, meu apoio que sempre pude lançar mão nas situações mais difíceis. Te Amo!
- A minha avó Edith, por todo apoio financeiro, intelectual e moral, ao longo dessa minha extensa trajetória de formação pessoal e profissional. Você estará sempre no meu coração Vó!
- A minha família que, apesar de todos os obstáculos e mesmo na ausência de um consenso, nunca deixou de me apoiar e de estar ao meu lado em todos os momentos.
- A minha Princesinha, Ana Carolina Nobre, por ser minha verdadeira companheira, por me apoiar nas mais diversas circunstâncias, alegres ou não, por aturar meu mau humor e minhas crises ilógicas de nervosismo, sempre muito compreensiva (as vezes nem tanto, rs!) e por me lembrar sempre que podemos nos descontraír como crianças sem, necessariamente, sermos infantis perante as situações da vida (mesmo que eu custe a entender isso, né amor?! hehehe). Te amo muito!
- Ao Grupo de Bio Estrutural do INCa, novos e antigos membros: Lili, Pri Marcondes, Wallace, PD, Fleve, Rubem, Waldemir, Natália, Flavidal, Deiró, Dri, Pri Bastos, Sisi, Paty, Taline, Júlio, Magro, Jéssica, Jennifer, Andréia, Sarah..., nunca imaginaria encontrar pessoas tão particulares e ao mesmo tempo tão especiais como todos vocês! Não consigo nem numerar todos os momentos engraçados, felizes, tristes, difíceis que passamos juntos. Vocês são a família que adotei pra mim, independentemente de onde estejamos!
- Ao José Morgado e Marcelo Tanaka, especialmente, que além de grandes amigos, contribuíram diretamente para minha formação científica e de caráter, Obrigado!
- Aos meus grandes amigos e amigas, Gabriel, Tui, Joana e Talita pelos momentos de puro companheirismo e amizade que só pessoas privilegiadas podem vivenciar. Amo vocês, meus queridos e queridas!
- Ao grande “véio” amigo e parceiraço Bruno Pires. Minha memória falha nesse momento na tentativa de lembrar quantas situações engraçadas e inusitadas compartilhamos, quantas discussões científicas travamos, quantos embates acadêmicos desafiamos e quão importante foram os momentos em que nos demos força mutuamente. Você é um raro amigo que tive a felicidade de encontrar. Sucesso!
- A galera da UNIRIO. Foram tantas as dificuldades e tantos os momentos de alegria e ajuda que compartilhamos que é difícil esquecer as situações vivenciadas nessa instituição. Verdadeiro espaço de aprendizagem acadêmica, política e pessoal! E aos grandes veteranos e amigos que aí conheci: Matheus, Ricardo, Ivy, entre outros, que tornaram os dias na universidade mais leves e descontraídos, embora sempre com conselhos e opiniões edificantes para todos aqueles que estivessem dispostos a um bom papo. Além dos queridos calouros:

Régis, Henry, Trindade... e ao grande amigo Buzak, companheiro de Maraca em partidas memoráveis do Mais Querido do Brasil (as vezes nem tão memoráveis assim, mas o Basquete compensou, hehehehe).

- Finalmente, a todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para que eu pudesse alcançar tudo que sou hoje. Obrigado a todos, sem distinção!

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

**RESUMO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Pedro Henrique Schumann Lima**

Diversos estudos mostram que a Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) possui um papel pró-tumoral em diferentes modelos experimentais. Por outro lado, o Fator de Crescimento Transformante-β1 (TGF-β1, *Transforming Growth Factor-β1*) é relatado como uma citocina capaz de exercer um papel dual no contexto tumorigênico, ora funcionando como agente supressor, ora como promotor tumoral. Além disso, foi demonstrado que estes agentes alteram a organização do citoesqueleto de actina aumentando o potencial migratório e invasivo. No entanto, o papel destes mediadores pró-inflamatórios nesse contexto foi analisado isoladamente e estudos mostrando os efeitos da associação entre eles, particularmente na transição epitélio-mesenquima (TEM) em câncer colorretal (CCR), não têm sido relatados. Assim, o objetivo do nosso estudo foi avaliar os efeitos desses agentes em eventos relacionados à aquisição da TEM e determinar quais efeitos são desencadeados pelo tratamento associado entre esses dois agentes. Inicialmente, utilizamos células derivadas de carcinoma de pulmão, A549, como controle positivo de alterações celulares relacionadas a TEM após o tratamento com TGF-β. Nossos resultados mostraram que esse agente foi capaz de: a) induzir alterações morfológicas; b) diminuir os níveis protéicos de E-caderina e aumentar os níveis das proteínas β-catenina e N-caderina; c) alterar a localização subcelular de todas essas proteínas e; d) aumentar a formação de fibras de estresse e o potencial migratório. Em seguida, analisamos os efeitos desses agentes de forma isolada e em associação usando células HT-29, derivadas de adenocarcinoma colorretal. Através da técnica de *imunoblotting*, observamos que o tratamento isolado com esses agentes diminuiu os níveis proteicos de E-caderina e aumentou os níveis protéicos de β-catenina, vimentina e N-caderina. Além disso, observamos os mesmos efeitos para os níveis de RNAm desses marcadores epiteliais e mesenquimais, bem como um aumento nos níveis de RNAm de *Snail* e *Twist*, como analisado por RT-qPCR. As análises por imunofluorescência mostraram que o tratamento isolado com os agentes alterou a localização subcelular dos marcadores epiteliais e mesenquimais, bem como causou alteração do citoesqueleto de actina, como visto usando faloidina-rodamina. Além disso, o tratamento com PGE<sub>2</sub> e TGF-β aumentou a atividade da GTPase RhoA, assim como induziu aumento do potencial migratório. A análise funcional da perda de adesão célula-célula e célula-substrato mostrou que o tratamento com PGE<sub>2</sub> aumentou a capacidade das células se manterem unidas umas as outras quando destacadas do substrato, enquanto que o tratamento com TGF-β induziu uma maior capacidade de desagregação celular. Observamos também que os tratamentos isolados com esses dois agentes aumentaram o tamanho dos contatos focais observados pela colocalização vinculina-actina, mas diminuíram essa colocalização na zona de retração e no *front* de migração. Além disso, verificamos que quando as células HT-29 eram tratadas em associação com os dois agentes os eventos acima mencionados foram significativamente inibidos. Em conclusão, nossos resultados mostram, de uma maneira geral, que o tratamento associado entre PGE<sub>2</sub> e TGF-β inibe os efeitos pró-tumorais exercidos por esses agentes quando presentes isoladamente e contribuem para um maior entendimento de como esses mediadores atuam no intrincado contexto inflamatório que permeia o microambiente tumoral.



**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

**INFLUENCE OF PGE<sub>2</sub> AND TGF- $\beta$  IN EVENTS RELATED EPITHELIAL  
MESENCHYMAL TRANSITION IN COLORECTAL CANCER CELLS**

**ABSTRACT**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Pedro Henrique Schumann Lima**

Studies have shown that Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) plays a pro-tumor role in different experimental models. On the other hand, the Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) has been reported as a cytokine that plays a dual role in the tumorigenesis context, may act as a tumor suppressor or tumor promoter. Moreover, it have been shown that these agents alter the actin cytoskeleton organization and increase the migratory and invasive potential. However, the role of these pro-inflammatory mediators in this context have been evaluated separately and studies showing the combined effects, particularly during epithelial-mesenchymal transition (EMT) development in colorectal cancer (CRC), have not been shown. Therefore, the aim of our study was to evaluate the effects of these agents in events related to EMT acquisition and determine which effects are triggered by the associated treatment of these two agents. First, we used A549 cells derived from lung carcinoma, as a positive control of cellular changes related to EMT, after treatment with TGF- $\beta$ . Our results showed that this agent was able to: a) induce morphological alterations; b) decrease protein levels of E-cadherin and increase protein levels of  $\beta$ -catenin and N-cadherin; c) alter the subcellular localization of these proteins; d) increase the formation of stress fibers and the migratory potential. Next, we analyzed the effects of these agents separately and associated using cells derived from colon adenocarcinoma, HT-29. We observed that treatment with these agents separately decreased the protein levels of E-cadherin and increased these levels of  $\beta$ -catenin, N-cadherin and vimentin. Moreover, we observed similar effects in mRNA levels of these epithelial and mesenchymal markers as well as increased levels of *Snail* and *Twist* mRNA, as seen by RT-qPCR. Immunofluorescence analysis showed that the isolated treatment with the agents altered subcellular localization of epithelial and mesenchymal markers as well as caused changes in the actin cytoskeleton organization as seen using rhodamine-phalloidin. Furthermore, treatment with PGE<sub>2</sub> and TGF- $\beta$  increased the RhoA GTPase activity and the migratory potential. Functional analysis of the loss of cell-cell adhesion and cell-substrate adhesion showed that treatment with PGE<sub>2</sub> increased the cell ability of remain attached to each other when detached from the substrate whereas TGF- $\beta$  treatment induced cell disaggregation. We also observed that isolated treatments with these two agents increased the size of focal contacts as observed by vinculin-actin colocalization, but this colocalization decreased in the retraction zone and in front of migration. Furthermore, we verified that the associated treatment with the two agents significantly inhibited the events above mentioned. In conclusion, our results show that the associated treatment of PGE<sub>2</sub> and TGF- $\beta$  inhibits the pro-tumor effects exerted by these agents when present separately and contribute to a better understanding of how these mediators act in the intricate inflammatory context that permeates the tumor microenvironment

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	<b>Página</b>
Figura 1.1- Sequência adenoma-carcinoma.....	3
Figura 1.2 - Síntese e mecanismo de ação de PGE <sub>2</sub> .....	5
Figura 1.3 - Sinalização canônica e não-canônica de TGF-β.....	7
Figura 1.4- Estrutura e organização das criptas intestinais.....	9
Figura 1.5- Polaridade celular e tipos de transporte.....	10
Figura 1.6- Complexo juncional apical.....	12
Figura 1.7- Redistribuição e perda de E-caderina do contato célula-célula.....	14
Figura 1.8- Dinâmica do citoesqueleto de actina durante a migração e adesão celular.....	17
Figura 1.9- Composição molecular das adesões focais.....	18
Figura 1.10- Dinâmica e localização das GTPases Rho.....	22
Figura 1.9- Processo da TEM.....	23
Figura 5.1- Análise morfológica de células A549 após 24h de tratamento com TGF-β.....	35
Figura 5.2- Análise da expressão e localização subcelular de marcadores epiteliais em células A549 após 24 h de tratamento com TGF-β.....	37
Figura 5.3- Análise da expressão e localização subcelular de marcadores mesenquimais em células A549 após 24 h de tratamento com TGF-β.....	39
Figura 5.4- Análise da distribuição e organização do citoesqueleto de actina em células A549 após 24h de tratamento com TGF-β.....	40
Figura 5.5- Análise da migração e proliferação em células A549 tratadas com TGF-β após 24h .....	41
Figura 5.6- Análise da expressão protéica de marcadores epiteliais e mesenquimal em células HT-29 após 24h e 48h de tratamento com PGE <sub>2</sub> e TGF-β.....	43
Figura 5.7- Análise da expressão do RNAm de marcadores epitelial e mesenquimais e dos fatores de transcrição em células HT-29 após tratamento com PGE <sub>2</sub> e TGF-β por 24h.....	45
Figura 5.8- Análise da localização subcelular do marcador epitelial E-caderina em células HT-29 após 24h de tratamento com PGE <sub>2</sub> e TGF-β.....	47
Figura 5.9- Análise da localização subcelular da proteína β-catenina em células HT-29 após 24h de tratamento com PGE <sub>2</sub> e TGF-β.....	48
Figura 5.10- Localização subcelular do marcador mesenquimal vimentina	

em células HT-29 após 24h de tratamento com PGE <sub>2</sub> e TGF-β.....	49
Figura 5.11- Análise da organização do citoesqueleto de actina em células HT-29 após 24h de tratamento com PGE <sub>2</sub> e TGF-β.....	50
Figura 5.12- Análise da atividade da proteína RhoA em células HT-29 após o tratamento com PGE <sub>2</sub> e TGF-β.....	52
Figura 5.13- Análise da migração e proliferação celular na linhagem HT-29 após o tratamento com PGE <sub>2</sub> e TGF-β durante 24h.....	54
Figura 5.14- Análise da capacidade de adesão célula-célula e célula-substrato na linhagem HT-29 após o tratamento com PGE <sub>2</sub> e TGF-β durante 24h.....	55
Figura 5.15- Análise da distribuição e quantificação da formação de adesões focais identificados pela co-localização entre vinculina e actina em células HT-29 após tratamento com PGE <sub>2</sub> e TGF-β durante 24h.....	57

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
Tabela 1.1- Estimativas, para o ano 2014, de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária no Brasil.....	1
Tabela 4.1- Sequências e temperaturas de <i>melting</i> dos iniciadores desenhados para a amplificação dos genes analisados, mostrando a sequência senso e a anti senso de cada um deles.....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADF - *actin depolymerizing factor*  
FA – adesões focais  
APC – *adenomatous poliposis coli*  
aPKC- proteína quinase C atípica  
ATP - Trifosfato de adenosina  
CCR – câncer colorretal  
CJA - complexo juncional apical  
c-MYC - Avian myelocytomatosis vírus oncogene cellular homolog  
COX-2 - Ciclooxygenase 2  
DAINEs - drogas antiinflamatórias não esteroidais  
EP - receptores de prostaglandina do tipo E  
Erk - *extracellular signal-regulated kinase*  
EGF - fator de crescimento epidermal  
EGFR – Receptor do fator de crescimento epidermal  
FAK – quinase de adesão focal  
FAP – polipose adenomatosa familiar  
FIs - Filamentos intermediários  
Fzd – *frizzled*  
GAP – proteínas ativadoras de GTPases  
GDI – inibidores de dissociação de nucleotídeo guanina  
GDP – difosfato de guanosina  
GEF – fator de troca de nucleotídeo de guanina  
GSK-3 $\beta$ - glycogen synthase kinase 3  
GTP – trifosfato de guanosina  
HNPCC – câncer colorretal hereditário sem polipose  
IBD - doenças inflamatórias intestinais  
Ig - imunoglobulina  
IL – interleucina  
JA - Junções aderentes  
JAM - moléculas de adesão juncional  
JNK - *Jun N-terminal kinase*  
JT - Junções Tight  
KRAS – *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

LAP - *Latency Associated Protein*  
LEF - *Lymphoid enhancer factor*  
MAGUK- *Membrane Associated Guanylate Kinase*  
MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno  
MEC - matriz extracelular  
MMP – metaloproteinase de matriz  
MMR- reparo de incompatibilidade  
MTs - microtúbulos  
NAG - *nonsteroidal antiinflammatory drug-activated gene*  
NFkB – *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*  
PAR - proteínas de partição  
PGE<sub>2</sub>- prostaglandina E 2  
PGG<sub>2</sub> - prostaglandina G 2  
PGH<sub>2</sub> - prostaglandina H<sub>2</sub>  
PI3K - fosfatidilinositol 3 quinase  
PKC - proteína quinase C  
SMA $\alpha$  - Actina de músculo liso  $\alpha$   
TEM - transição epitélio-mesenquima  
TME - transição mesenquima-epitélio  
TGF- $\beta$  - Fator de crescimento transformante beta  
TCF - *T cell factor*  
VEGFR-1 - *Vascular endothelial growth factor receptor-1*  
ZO- Zônulas ocludentes

<b>SUMÁRIO</b>	<b>Página</b>
<b>Resumo</b> .....	viii
<b>Abstract</b> .....	ix
<b>Lista de ilustrações</b> .....	x
<b>Lista de tabelas</b> .....	xii
<b>Lista de abreviaturas e siglas</b> .....	xiii
<b>Sumário</b> .....	xv
<b>1 Introdução</b> .....	1
1.1 Câncer colorretal.....	1
1.1.1 Câncer colorretal: incidência e fatores de risco.....	1
1.1.2 Progressão do CCR.....	2
1.1.3 Papel da PGE <sub>2</sub> e do TGF- $\beta$ na progressão do CCR.....	4
1.2 Epitélio Intestinal.....	8
1.2.1 Epitélio intestinal: arquitetura e polaridade celular.....	8
1.2.2 Complexo Juncional Apical.....	11
1.3 Citoesqueleto de actina.....	15
1.3.1 Citoesqueleto de actina: estrutura e função.....	15
1.3.2 Adesão Focal.....	17
1.3.3 GTPases Rho.....	20
1.4 Transição Epitélio-Mesênquima.....	23
<b>2. Justificativa</b> .....	24
<b>3. Objetivo</b> .....	25
3.1 Objetivo geral.....	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
<b>4. Material e Métodos</b> .....	26
4.1 Anticorpos e reagentes.....	26
4.2 Cultura de células.....	26
4.3 Tratamento com TGF- $\beta$ 1 e PGE <sub>2</sub> .....	27
4.4 Obtenção de lisado protéico total.....	27
4.5 SDS-PAGE, <i>Western blotting</i> e análise densitométrica.....	27
4.6 Microscopia de Imunofluorescência.....	28
4.6.1 Protocolo de fixação com paraformaldeído.....	28
4.6.2 Protocolo de fixação com metanol.....	29
4.7 Detecção dos filamentos de actina.....	29
4.8 Análise Morfométrica.....	29

4.9	Análise da morfologia celular.....	30
4.10	Ensaio de desagregação e destacamento.....	30
4.11	Ensaio de Proliferação Celular.....	30
4.12	Ensaio de Migração Celular.....	31
4.13	Ensaio de Atividade de RhoA.....	31
4.14	RT-qPCR.....	31
4.14.1	Extração do RNA e Síntese de DNA Complementar.....	31
4.14.2	PCR em Tempo Real.....	32
4.15	Análise Estatística.....	34
5.	<b>Resultados</b> .....	35
5.1	Análise de mudanças no perfil de expressão e localização subcelular de marcadores epiteliais e mesenquimal em células A549 tratadas com TGF- $\beta$ .....	35
5.1.1	TGF- $\beta$ promove alteração do fenótipo celular na linhagem de carcinoma de pulmão A549.....	35
5.1.2	TGF- $\beta$ altera o perfil de expressão e a localização subcelular de marcadores epiteliais e mesenquimais em células A549.....	36
5.2	Avaliação da organização do citoesqueleto de actina e da migração em células A549 tratadas com TGF- $\beta$ .....	41
5.3	Avaliação da expressão e distribuição subcelular de marcadores epiteliais e mesenquimais e da organização do citoesqueleto de actina em células HT-29 tratadas com PGE <sub>2</sub> e TGF- $\beta$ .....	43
5.3.1	O tratamento isolado com PGE <sub>2</sub> e TGF- $\beta$ altera os níveis de expressão protéica e de RNAm dos marcadores epiteliais e mesenquimais, mas não quando esses agentes são administrados em associação.....	43
5.3.2	O tratamento isolado com PGE <sub>2</sub> e TGF- $\beta$ altera a localização subcelular de marcadores epiteliais e mesenquimal, mas não quando esses agentes são administrados de forma associada.....	46
5.3.3	O tratamento isolado com PGE <sub>2</sub> e TGF- $\beta$ altera a localização subcelular de vimentina, bem como a organização do citoesqueleto de actina, mas quando esses agentes são administrados de forma associada ocorre uma aparente reversão destes efeitos em células HT-29.....	50
5.4	Avaliação da atividade de RhoA, migração, capacidade de adesão célula-célula e célula-substrato e formação de adesões focais em células HT-29 tratadas com PGE <sub>2</sub> e TGF- $\beta$ .....	52
5.4.1	O tratamento isolado com PGE <sub>2</sub> e TGF- $\beta$ aumenta a atividade da GTPase	



RhoA, mas a associação entre esses agentes não altera essa atividade em células HT-29.....	52
5.4.2 O tratamento isolado de PGE <sub>2</sub> e TGF-β assim como a associação entre os dois agentes aumenta a capacidade migratória de células HT-29.....	53
5.4.3 O tratamento isolado com PGE <sub>2</sub> e TGF-β altera a capacidade de desagregação e destacamento celular, mas a associação desses agentes aparentemente inibe esses efeitos em células HT-29.....	56
5.4.4 O tratamento isolado com PGE <sub>2</sub> e TGF-β aumenta a formação de adesões focais e diminui a co-localização vinculina-actina, mas não quando esses agentes são administrados de forma associada em células HT-29.....	57
<b>6. Discussão.....</b>	<b>60</b>
<b>7. Conclusão.....</b>	<b>70</b>
<b>8. Referências.....</b>	<b>72</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer Colorretal (CCR)

### 1.1.1 Câncer Colorretal: incidência e fatores de risco

No mundo todo, são esperados mais de 14 milhões de novos casos de câncer, sendo que os tumores de cólon e reto respondem pela terceira maior taxa de prevalência entre homens e a segunda maior taxa de mortalidade entre as mulheres, excluindo os casos de pele não-melanoma (Globocan, 2012).

No Brasil, dados do Instituto Nacional de Câncer, apontam para ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer, com mais de 32 mil novos casos correspondentes ao câncer colorretal (CCR), sendo o quarto mais incidente no país, e o terceiro e o segundo mais incidente, respectivamente, entre homens e mulheres, excluindo os casos de tumores de pele não-melanoma (INCa, 2013) (**Tabela 1.1**).

**Tabela 1.1:** Estimativas, para o ano 2014, de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária no Brasil.

Localização Primária	Casos Novos	%		Localização Primária	Casos Novos	%	
Próstata	68.800	22,8%		Mama feminina	57.120	20,8%	
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%		Cólon e Reto	17.530	6,4%	
Cólon e Reto	15.070	5,0%		Colo do útero	15.500	5,7%	
Estômago	12.870	4,3%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%	
Cavidade Oral	11.280	3,7%		Glândula Tireoide	8.050	2,9%	
Esôfago	8.010	2,6%		Estômago	7.520	2,7%	
Laringe	6.870	2,3%		Corpo do útero	5.900	2,2%	
Bexiga	6.750	2,2%		Ovário	5.680	2,1%	
Leucemias	5.050	1,7%		Linfoma não-Hodgkin	4.850	1,8%	
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%		Leucemias	4.320	1,6%	
Linfoma não-Hodgkin	4.940	1,6%		Sistema Nervoso Central	4.130	1,5%	
Pele Melanoma	2.960	1,0%		Cavidade Oral	4.010	1,5%	
Linfoma de Hodgkin	1.300	0,4%		Pele Melanoma	2.930	1,1%	
Glândula Tireoide	1.150	0,4%		Esôfago	2.770	1,0%	
<b>Todas as Neoplasias sem pele*</b>	<b>203.930</b>		Bexiga	2.190	0,8%		
Todas as Neoplasias	302.350		Linfoma de Hodgkin	880	0,3%		
			Laringe	770	0,3%		
			<b>Todas as Neoplasias sem pele*</b>	<b>190.520</b>			
			Todas as Neoplasias	274.230			

Fonte: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância.

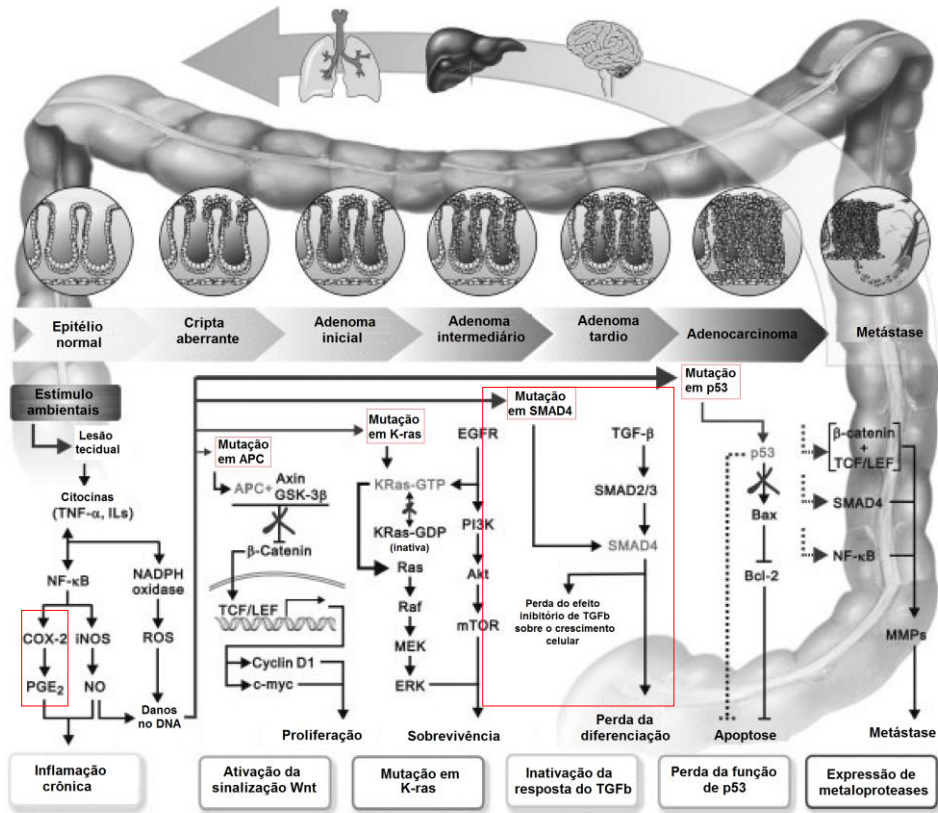
Alguns fatores de risco para esse tipo de câncer podem ser destacados como: a alimentação rica em gorduras insaturadas, o alto consumo de carnes vermelhas, o baixo consumo de cálcio, o sedentarismo e a obesidade (INCa, 2013).

Adicionalmente, duas formas herdáveis dessa doença, a polipose adenomatosa familiar (FAP) e o câncer colorretal não-poliposo hereditário (HNPCC), representam síndromes genéticas que podem resultar na formação de tumores de cólon e reto (Hutchison et al., 2013). A ocorrência da forma esporádica do CCR, desencadeada principalmente pelas doenças inflamatórias intestinais (IBD, do *inglês intestinal bowel disease*), também representa um fator importante para o início da doença, já que responde pela maior parte desse tipo de câncer - 75% dos casos, enquanto as formas familiares e hereditária correspondem a cerca de 25% desses tumores (Centelles, 2012).

As síndromes hereditárias possuem alta capacidade de serem transmitidas ao longo das gerações, uma vez que mutações em genes de reparo do DNA (*MMR*, do inglês *DNA mismatch repair*), geram sequências com instabilidade em regiões de microsátélites, sendo mais comuns as alterações em *MLH1*, *MSH2* e *MSH6* na síndrome de Lynch, outra denominação para HNPCC. Por outro lado, mutações germinativas do gene de Adenomatose Polipose Coli (*APC*, do inglês *Adenomatous Poliposis Coli*), podem desencadear na FAP (Hutchison et al., 2013).

### 1.1.2 Progressão do CCR

No CCR, a sucessão das etapas que culminam na conversão de um epitélio intestinal normal, passando por um estágio displásico hiperproliferativo (benigno), até a ocorrência de transformações em um tecido tumoral (maligno) é denominada sequência adenoma-carcinoma (Hill, 1978; Fearon & Volgenstein, 1990). Durante a progressão desta sequência ocorre o acúmulo de mutações genéticas subletais em diversos genes promotores e supressores tumorais, como o da Ciclooxigenase-2 (*COX-2*) em estágios mais precoces e de *K-ras*, *Smad4* e *p53* em etapas mais tardias da progressão, que podem acarretar inicialmente na formação de criptas aberrantes no epitélio intestinal normal, ocasionando a formação de adenomas que, posteriormente, progridem para adenocarcinomas e adquirem capacidade de gerarem metástase no organismo (**Figura 1.1**).



**Figura 1.1: Sequência adenoma-carcinoma.** Modelo esquemático mostrando a progressão do câncer colorretal, desde o epitélio normal até o estágio de carcinoma e metástase. Note a importância de diferentes genes promotores e supressores tumorais envolvidos em cada estágio, com destaque (em vermelho) para as vias de sinalização canônica de TGF- $\beta$  e a via de COX-2. Modificado de Pan et al., 2011.

Tanto a forma hereditária, quanto a forma esporádica do CCR seguem as etapas da sequência adenoma-carcinoma, onde a presença de promotores e de alterações genéticas ativam diversos oncogenes e inibem a expressão de genes supressores tumorais, contribuindo para eventos relacionados ao processo de inflamação crônica, migração, invasão e metástase.

### 1.1.3 Papel da PGE<sub>2</sub> e do TGF-β na progressão do CCR

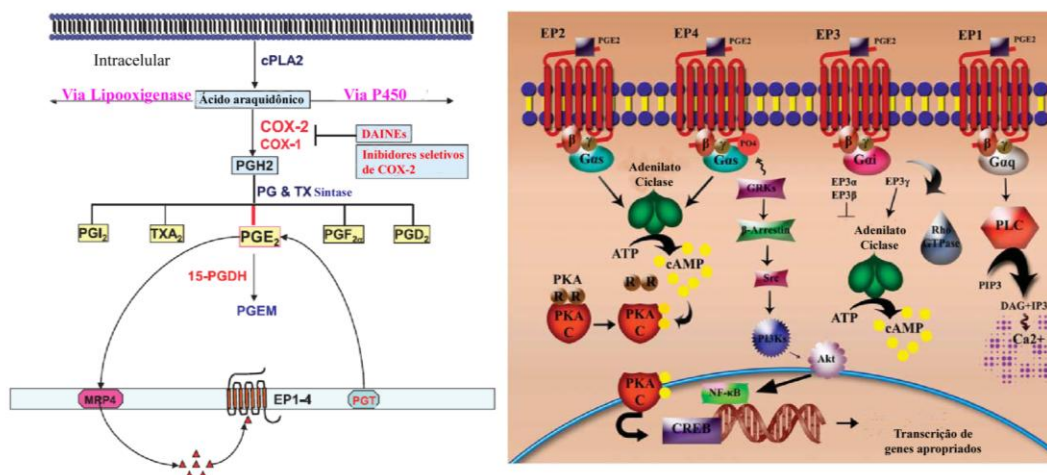
A inflamação representa uma defesa do organismo gerada a partir da resposta imune contra agressões físicas externas ou internas que levam ao desequilíbrio homeostático dos sistemas teciduais. Quando a inflamação é rápida e efetiva contra o agente agressor, ela é denominada resposta inflamatória fisiológica ou aguda. No entanto, quando a resposta é persistente, algumas vezes ineficaz na eliminação do elemento injuriante, resulta no prolongamento e exacerbação de eventos que caracterizam a inflamação, e conseqüentemente na perda de função celular do tecido acometido. Essa inflamação é denominada patológica ou crônica (Medzhitov, 2008). A resposta inflamatória crônica representa uma das principais causas da tumorigênese e da evolução de diversos tipos de tumores, incluindo os de origem epitelial.

Em pacientes que apresentam um quadro de inflamação crônica no intestino, determinado pelas IBD, como a retocolite ulcerativa e a doença de Crohn, o acúmulo de mutações subletais nesse órgão pode ocasionar no aparecimento de pólipos intestinais precursores de lesões displásicas que ocasionalmente levam a um desfecho neoplásico se a alteração não é detectada precocemente (Sandouk et al., 2013).

Frente a esse contexto, pode ser destacado o papel de COX-2, enzima que gera como produto a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), e do fator de crescimento transformante-β (TGF-β, do inglês *Transforming Growth Factor-β*).

A enzima COX-2 possui atividade de peroxidase reduzindo a prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) em prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) gerando uma série de outros prostanóides, incluindo a PGE<sub>2</sub>. PGE<sub>2</sub> pertence à classe dos prostanóides derivados das longas cadeias do ácido araquidônico presentes na membrana plasmática das células animais. A atuação de PGE<sub>2</sub> para o desencadeamento de sua sinalização se dá a partir da interação dessa molécula com seus receptores específicos do tipo-E de prostaglandinas (EP, do inglês *E-type*

prostaglandin receptors), sendo estes divididos em EP-1, EP-2, EP-3 e EP-4 (Wang & DuBois, 2013), como mostrado na **figura 1.2**.

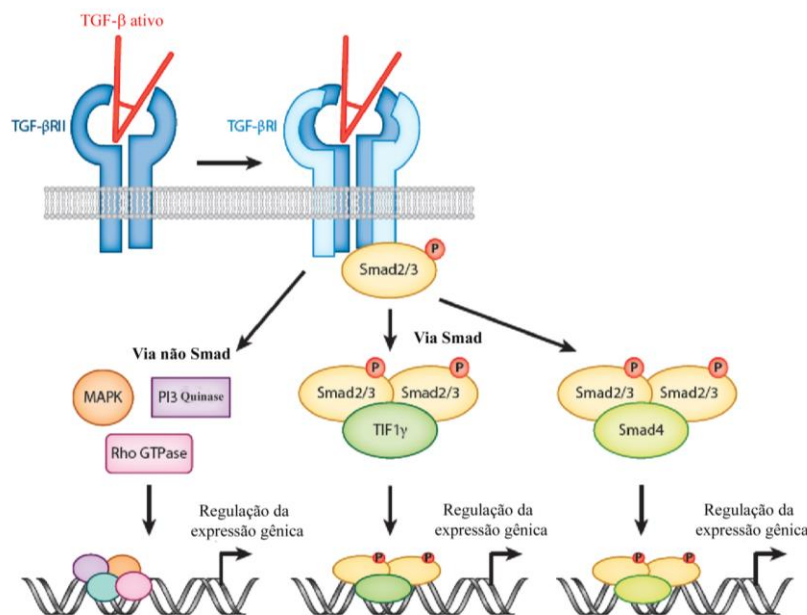


**Figura 1.2:** Síntese e mecanismo de ação de PGE<sub>2</sub>. A prostaglandina E<sub>2</sub> é produzida a partir da atuação de COX-2 sobre o ácido araquidônico (AA). Essa enzima, então, converte o AA em prostaglandina H<sub>2</sub> reduzida (PGH<sub>2</sub>). O prostanóide é gerado pela ação de uma PGE sintase específica. Observe que PGE<sub>2</sub> é capaz de interagir com receptores EP acoplados a proteína G. Note que as DAINs são capazes de inibir a ação das COX -1 e -2 e, conseqüentemente, a produção de PGE<sub>2</sub> o que impede a ocorrência de eventos relacionados a progressão tumoral, como invasão e metástase. Adaptado de Wang & DuBois, 2013; Adaptado de Sreeramkumar et al., 2012

Dependendo do tipo de receptor EP ativado por PGE<sub>2</sub>, a resposta fisiológica e patológica desencadeada ocorre de forma distinta, podendo levar a efeitos pró-tumorais que contribuem para a evolução da doença, especialmente do CCR. Estudos realizados por Tanaka et al. (2008), mostraram que em células de adenocarcinoma colorretal Caco-2, PGE<sub>2</sub> foi capaz de atuar via receptor EP1 e EP2 através da atividade da proteína quinase C (PKC, do inglês *protein kinase C*) e claudina-1 levando a desmontagem do complexo juncional apical (CJA), contribuindo para eventos relacionados a um fenótipo tumoral mais agressivo. Um dos receptores mais bem descritos na literatura e que se encontra relacionado a eventos invasivos e metastáticos durante a progressão de diversos tumores é o do tipo EP4. Durante a transição da sequência adenoma-carcinoma, os níveis desse receptor se encontram elevados no epitélio intestinal, promovendo a expansão do tumor através de

múltiplas vias de sinalização, como as desencadeadas pela fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K, do inglês *phosphoinositide-3-kinase*) e pela quinase regulatória de sinalização extracelular (Erk, do inglês *extracellular signal-regulated kinase*) (Yokoyama et al., 2013). Muitas drogas estudadas atualmente vêm sendo utilizadas como alvo sobre os receptores EP, os chamados antagonistas EP, ou sobre a enzima COX-2, denominadas drogas antiinflamatórias não esteroidais (DAINEs), que obtiveram bons resultados em modelos animais e clínicos (Watanabe et al., 2000; Jin et al., 2011). No entanto, os efeitos colaterais detectados pelo uso dessas drogas no trato gastrointestinal e no sistema circulatório (Fanelli et al., 2013) tornaram controversos o uso desses medicamentos (Chia et al., 2012) justificando a busca por novas moléculas com diferentes alvos de atuação sobre a via de PGE<sub>2</sub>.

Da mesma forma, uma das principais citocinas secretadas no microambiente inflamatório e que possui papel central em eventos fisiológicos e patológicos é o TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  faz parte de uma superfamília de fatores de crescimento e os seus três ligantes mais bem descritos são: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3. Essas moléculas são liberadas como substâncias solúveis e se encontram na forma inativa (pró-TGF- $\beta$ ) associada a uma proteína denominada LAP (do inglês, *Latency Associated Protein*) que se liga ao domínio de interação do ligante de TGF- $\beta$  impedindo que haja o reconhecimento do receptor e dimerização do mesmo (Ehrlich et al., 2012). A ativação desse ligante se dá pela clivagem da proteína LAP, o que torna possível a interação entre TGF- $\beta$  e o seu receptor. Esse mediador inflamatório pode ativar duas vias de sinalização distintas, canônica e não canônica, que atuam paralelamente podendo apresentar interligação entre seus componentes. A via canônica, ou via das proteínas dependentes de receptores Smads (R-Smads), é desencadeada a partir da formação de um complexo heterodimérico de proteínas Smads, que são translocadas ao núcleo e ativam genes relacionados a embriogênese, a resposta imune e ao reparo tecidual (Ikushima & Miyazono, 2012), assim como processos relacionados a progressão tumoral, como a transição epitélio-mesenquima (TEM), migração e metástase (Jeveldaud et al., 2012). A **figura 1.3** ilustra essas vias.



**Figura 1.3: Sinalização canônica e não-canônica de TGF-β.** Observe as diferentes vias de sinalização desencadeadas por TGF-β: uma dependente da formação de um complexo das proteínas Smads (via canônica) e uma independente desse complexo (via não canônica), sendo nesta última ativados genes relacionados à expressão e atividade das GTPases Rho e a modulação do citoesqueleto de actina. Adaptado de Travis & Sheppard, 2013.

A via das proteínas não Smads, via não canônica, é ativada a partir de proteínas sinalizadoras classicamente descritas por estarem envolvidas no crescimento e viabilidade celular, e remodelamento do citoesqueleto de actina (Zhang, 2009). Algumas proteínas clássicas como a proteína quinase ativadora mitógena (MAPK, do inglês *mitogen-activated protein kinase*), PI3K e RhoA, possuem sua "cascata" de sinalização deflagrada por TGF-β, e exercem efeitos bastante conhecidos no desenvolvimento do câncer, incluindo o CCR (Horbelt et al., 2012).

Tanto PGE<sub>2</sub> quanto TGF-β tem sido bastante explorados no contexto da carcinogênese e dos eventos que acompanham as etapas da progressão tumoral, inclusive em tumores colorretais (Young et al., 2013; Roy & Majumdar, 2012). No entanto, TGF-β vem alcançando maior destaque na progressão dessa doença, uma vez que exerce um efeito dual, não só em sua gênese, como também nas mais diversas etapas que constituem a “cascata



metastática” e nos eventos relacionados à aquisição de um fenótipo mesenquimal das células tumorais (Mele et al., 2013).

A ocorrência de alterações ao nível da expressão gênica e proteica de PGE<sub>2</sub> e TGF-β correspondem a importantes fatores predisponentes para o surgimento de pólipos intestinais que podem resultar na perda de polaridade e arquitetura celular, ocasionando o desenvolvimento de tumores nesse órgão e na ocorrência de metástases.

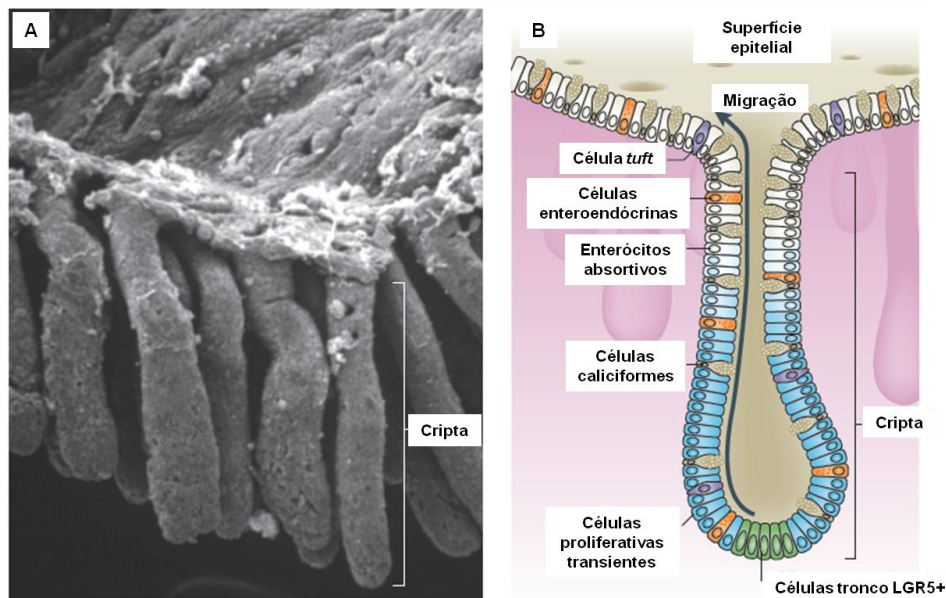
Apesar da existência de estudos envolvendo esses dois agentes inflamatórios na modulação de mecanismos relacionados à progressão tumoral, a presença mútua desses mediadores inflamatórios na regulação de aspectos mecânicos e fenotípicos é pouco compreendida, principalmente em modelos de CCR.

## **1.2 Epitélio Intestinal**

### 1.2.1 Epitélio intestinal: arquitetura e polaridade celular

O intestino humano é dividido em duas porções que apresentam papéis estruturais e funcionais bastante distintos no organismo: a) a porção delgada, que mede aproximadamente 6 metros de comprimento, e divide-se anatomicamente em duodeno, jejuno e íleo, possuindo importante papel na digestão e absorção de nutrientes; e b) a porção grossa, que mede aproximadamente 1,5 metros de comprimento, e é dividida em ceco, cólon ascendente, cólon transverso e cólon descendente, tendo importante papel na reabsorção de eletrólitos, vitaminas e água em sua porção final. Na terminação distal do intestino grosso, inicia-se o reto, que possui cerca de 15 cm de comprimento e atravessa, dorsalmente, os músculos perineais, para tornar-se extraperitoneal (Robbins & Cotran, 2010). Essa importante função reabsortiva do cólon intestinal é resultante da presença de um epitélio cilíndrico simples e de células caliciformes, responsáveis pela liberação de uma glicoproteína viscosa denominada mucina, bem como de sua mucosa composta por diversas criptas tubulares. Na base dessas criptas, são encontradas as células de Paneth, responsáveis pela defesa imune inata do organismo, combatendo infecções por microorganismos, principalmente bactérias, e as células amplificadoras transitórias, responsáveis pela renovação constante do epitélio intestinal submetido a injúrias pela passagem do quilo alimentar e do atrito provocado pelas fezes. Estas células tronco regenerativas possuem a

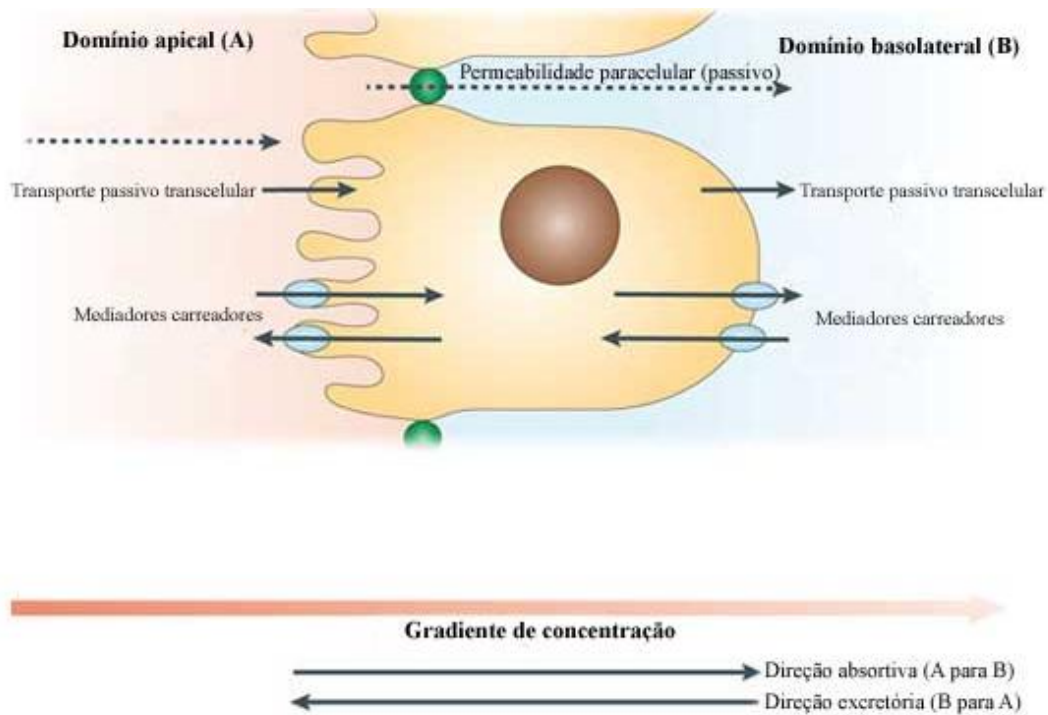
notável capacidade de substituírem toda a camada enterocítica do lúmen intestinal em aproximadamente 5 dias, se diferenciando e migrando em direção à luz do órgão (**Figura 1.4**) (Simons & Clevers, 2011).



**Figura 1.4:** Estrutura e organização das criptas intestinais. (A) Ilustração mostrando a estrutura e as células componentes das criptas intestinais. (B) Figura representativa mostrando os diferentes tipos celulares presentes no intestino. Observe a presença das células tronco regenerativas na base das criptas, e das células amplificadoras transitórias que migram em direção ao lúmen intestinal renovando constantemente a camada enterocítica. Adaptado de Barker (2014).

Em células epiteliais, a polaridade celular é estabelecida a partir da compartimentalização gerada pelas diferentes características morfofuncionais entre os domínios de membrana apical e basolateral, e é essencial para a manutenção da integridade da barreira e do transporte que contribui para a homeostase epitelial. Essa assimetria morfológica é formada pela diferença de composição lipídica e proteica entre os dois domínios, que são funcionalmente distintos (Roignot, 2013). Múltiplos processos são

requeridos para o estabelecimento da polaridade celular em epitélios, incluindo a entrega de vesículas contendo proteínas de determinado domínio de membrana (transcitose), a organização do citoesqueleto, e a adesão celular (Goldenring, 2013). Essa polarização celular é bastante evidenciada nos enterócitos do intestino grosso, uma vez que o transporte de moléculas como glicose, aminoácidos e ácidos graxos obtidos no processo da digestão são direcionados aos vasos sanguíneos e linfáticos pela via transcelular, de forma passiva. Já a formação de contatos estruturais entre células vizinhas constitui a via paracelular que possibilita a passagem diferencial de íons e moléculas de forma seletiva. (Jennemann et al, 2012; Loebel & Tam, 2012). A **figura 1.5** mostra os tipos de transporte existentes na região apical e basolateral do epitélio intestinal.



**Figura 1.5: Polaridade celular e tipos de transporte.** A figura mostra os diferentes domínios de membrana (apical e basolateral) regulando a passagem de substâncias pela via transcelular e paracelular. Note as diferentes direções, absorptiva e excretória, que são delimitadas de acordo com a polarização da célula epitelial. Adaptado de Sugano et al, 2010.

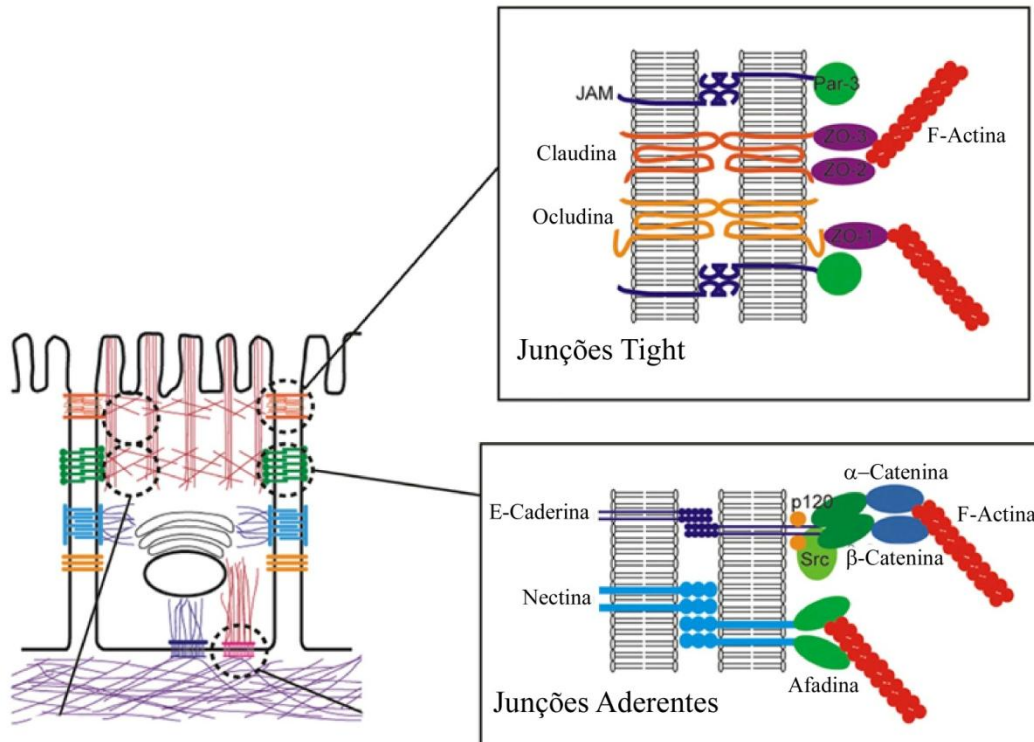
A formação dos contatos célula-célula determina um papel essencial na manutenção da polaridade celular, constituindo a arquitetura típica do epitélio. As forças adesivas estabelecidas entre células vizinhas, mantém a unidade coesa do tecido epitelial fazendo com que o estresse mecânico aos quais os enterócitos são submetidos, não resulte na

desorganização morfológica e funcional do órgão, mantendo-o protegido. Essa estrutura responsável por garantir a resistência tecidual do epitélio, mantendo a adesão intercelular funcional, compõe o chamado Complexo Juncional Apical.

### 1.2.2 Complexo Juncional Apical

O CJA (**Figura 1.6**) em epitélios é subdividido em: Junções *Tight* (JT) e Junções Aderentes (JA). As JT se localizam na porção mais apical do domínio de membrana basolateral, enquanto as JA situam-se logo abaixo das primeiras. As proteínas que compõem o CJA possuem domínios extracelulares capazes de interagir com outras moléculas de mesma natureza, estabelecendo interações homofílicas, ou de composição bioquímica distinta, realizando interações heterofílicas. A porção intracelular da maior parte dessas proteínas interage com moléculas adaptadoras que, por sua vez, se ligam aos componentes do citoesqueleto de actina, estrutura responsável pela arquitetura e remodelamento celular. Essa interação intracitoplasmática auxilia na formação e maturação dos contatos célula-célula e célula-matriz, em pontos de adesão à Matriz Extracelular (MEC). Diversas dessas proteínas que compõem o CJA possuem importante papel na transdução de sinais dentro da célula. Algumas delas podem ser translocadas diretamente ao núcleo onde irão ativar fatores de transcrição relacionados à expressão gênica de proteínas envolvidas em eventos celulares essenciais na progressão tumoral. (Coradini et al., 2011).

Durante a progressão tumoral, a polaridade do epitélio é comprometida pela desestruturação do CJA, o que leva a desmontagem da arquitetura celular e faz com que proteínas de contato célula-célula percam a capacidade de interagir entre si e com o citoesqueleto, fato que é bastante observado durante o desenvolvimento do CCR (Leve & Morgado-Díaz, 2012).



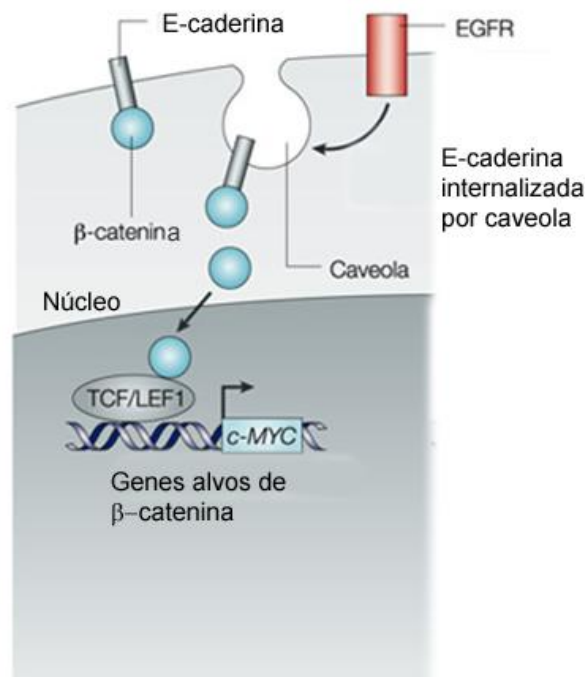
**Figura 1.6: Complexo juncional apical.** O esquema mostra a composição molecular constituinte de cada junção, a qual é constituída por proteínas transmembrana que se ligam, na região citoplasmática, com o citoesqueleto de actina. Observe que as JT se encontram na porção mais apical, enquanto as JA se localizam logo abaixo, na região medial do domínio basolateral. Adaptado de Amin & Vincan, 2012.

A JT é a estrutura responsável pela permeabilidade seletiva a íons e moléculas (função de barreira), sendo responsável também pela regulação da diferença de concentração de macromoléculas (lipídeos e proteínas) entre o compartimento apical e o basolateral (função *fence*). As proteínas de membrana que compõem esse tipo de junção possuem quatro domínios transmembranares, sendo denominadas *tetraspan proteins*, entre as quais estão aqueles pertencentes à família das claudinas, ocludina e tricelulina; e as proteínas de uma passagem transmembrana pertencentes à família das Moléculas de Adesão Juncional (JAM,

do inglês *Junctional Adhesion Molecule*). As porções citoplasmáticas dessas proteínas se ancoram a outras proteínas adaptadoras, como as proteínas pertencentes à família da guanilato quinase associadas à membrana (MAGUK, do inglês *Membrane Associated Guanylate Kinase*) e as zônulas ocludentes-1, -2 e -3 (ZO-1, -2, e -3). Outras proteínas de ancoragem localizadas nas JT possuem sítios catalíticos de sinalização intracelular, como a proteína quinase C atípica (aPKC, do inglês *atypical Protein Kinase C*) e as proteínas de partição-3 e -6 (PAR-3 e -6) (Runkle & Mu, 2013). Em diversos tumores, incluindo os colorretais, a alteração na expressão e localização subcelular de ocludina e claudinas exercem importantes efeitos na progressão do CCR. Um recente trabalho publicado por nosso grupo (de Souza et al., 2013), demonstrou que o aumento da expressão de claudina-3, mediado pelo Fator de Crescimento Epidermal (EGF, do inglês *Epidermal Growth Factor*), foi capaz de aumentar a migração e a formação de colônias em células de adenocarcinoma colorretal, HT-29, contribuindo para o evento maligno.

As JA cumprem importante papel na embriogênese humana, bem como na resistência ao estresse mecânico ao qual o epitélio é constantemente submetido. As principais proteínas constituintes desse complexo são as caderinas, especialmente E-caderina, em epitélios, bem como as nectinas, que juntas correspondem a superfamília das imunoglobulinas (Ig) (Etienne-Manneville, 2011). A estabilização das ligações entre as porções extracelulares dessas moléculas entre duas células vizinhas é mediada por íons cálcio ( $Ca^{2+}$ ). Essas interações homotípicas, proporcionam forças coesivas transversais que impedem a perda de contato lateral entre as células (Coradini et al., 2011). O domínio intracelular de E-caderina interage com as proteínas p120,  $\alpha$ - e  $\beta$ -catenina, e formam um complexo protéico multimérico com os filamentos de actina. E-caderina interage diretamente com p120- e  $\beta$ -catenina, enquanto que  $\alpha$ -catenina se liga a  $\beta$ -catenina estabilizando o complexo de adesão ao citoesqueleto de actina (Collinet & Lecuit, 2013). Diversos estudos apontam que alterações na dinâmica e na estabilidade de proteínas das JA se relacionam a um fenótipo tumoral mais agressivo durante a progressão de diversos cânceres epiteliais, incluindo o CCR, onde a principal proteína dessa estrutura, E-caderina, se encontra pouco expressa nas regiões dos contatos célula-célula, podendo ser endocitada (Kon et al., 2008; Masuelli et al., 2012). E-caderina pode também ser redistribuída no citoplasma, ocasionando o enfraquecimento do complexo de adesão favorecendo o

destacamento e disseminação de células tumorais (Chen et al., 2012). Outra importante consequência da desmontagem das JA é a liberação da  $\beta$ -catenina, levando ao acúmulo dessa proteína no citoplasma, onde poderá ser direcionada a degradação ou então translocada ao núcleo ativando vias de sinalização, através de fatores de transcrição da família de TCF/LEF, relacionadas ao desenvolvimento tumoral, como proliferação, migração e invasão (Howard et al., 2011). Estudos também mostraram que a elevada expressão dessa proteína, e sua aberrante translocação nuclear estão relacionadas ao evento tumorigênico e a progressão dessa doença (Suman et al., 2013), indicando um mau prognóstico para os pacientes (Kousou et al., 2013; Kevans et al., 2013). A **figura 1.7** ilustra esses eventos.



**Figura 1.7. Redistribuição e perda de E-caderina do contato célula-célula.** Ilustração mostrando a internalização de E-caderina. Note o acúmulo de  $\beta$ -catenina no citoplasma e sua posterior translocação para o núcleo ativando genes alvo relacionados ao processo proliferativo, migratório e invasivo. Adaptado de Cavallaro & Christofori, 2004.

Alterações na expressão e localização de proteínas do CJA, como claudinas e ocludina pertencentes às JT, e as proteínas E-caderina e  $\beta$ -catenina, componentes das JA, têm sido relacionadas com a alteração da estrutura e dinâmica do citoesqueleto de actina (Leve et al., 2008; Carothers al., 2006). Assim, o fato de ambas as estruturas estarem ligadas, se relaciona a existência de um fino controle da dinâmica da arquitetura epitelial, onde qualquer alteração neste controle pode induzir modificações relacionadas com o aumento do potencial migratório que contribui para o processo metastático.

### **1.3 Citoesqueleto de actina**

#### 1.3.1 Citoesqueleto de actina: estrutura e função

O citoesqueleto de uma célula é formado por um conjunto de fibras que se distribuem homogeneamente pela membrana plasmática dando sustentação a estrutura celular. O citoesqueleto celular compreende: microfilamentos de actina, microtúbulos (MTs) e filamentos intermediários (FIs).

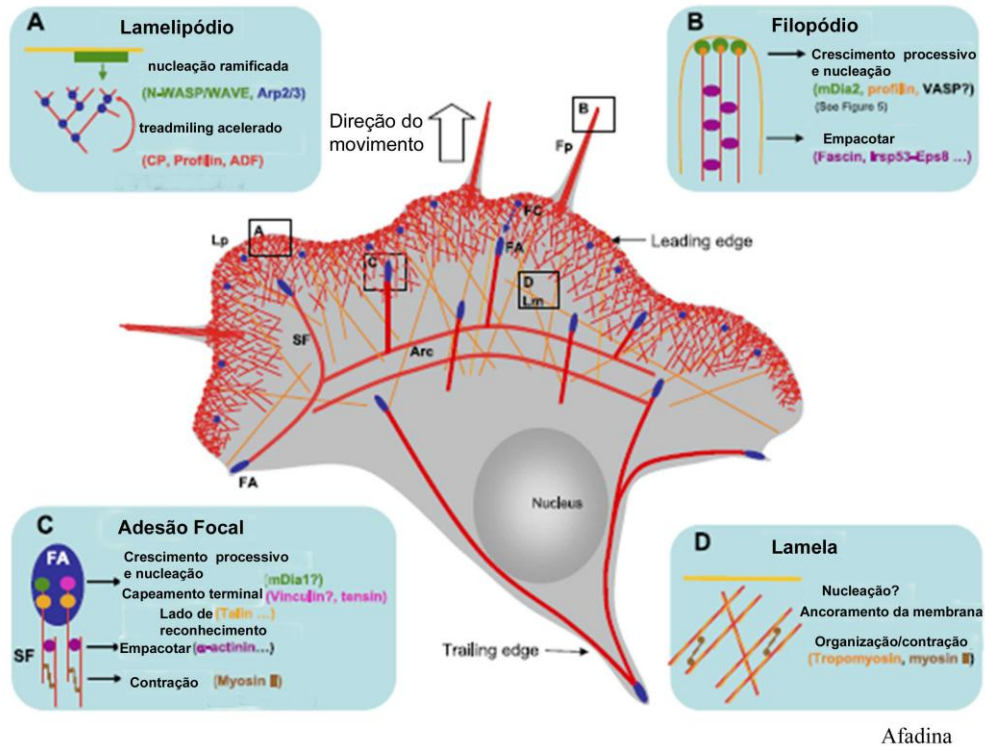
O citoesqueleto de actina é responsável pela dinâmica de movimentação e de alteração/reconstituição da forma da célula, e participa também do tráfico intracelular de organelas e vesículas, bem como da formação de projeções de membrana que possuem papel mecânico-sensorial em resposta aos estímulos do ambiente em que as células se encontram (Mullins & Hansen, 2013; Shah & Keren, 2013). A actina se organiza de duas maneiras distintas para compor o arcabouço do esqueleto celular: na forma globular, denominada G-actina, e na forma filamentar, denominada F-actina ou microfilamentos.

A polimerização dos filamentos de actina se dá a partir de regiões conhecidas como terminações *plus* (+), de crescimento mais rápido, e terminações *minus* (-), de crescimento mais lento. O aumento da extensão de F-actina ocorre com a participação de ATP, que se liga ao monômero de G-actina, formando o complexo G-actina-ATP, que é adicionado a essas terminações, formando uma dupla hélice que se alterna nas isoformas  $\alpha$ - e  $\beta$ -actina. Proteínas como a cofilina, ADF/cofilina, tropomodulina e gelsolina, são capazes de inibir os terminais de polimerização, levando a não extensão dos filamentos de actina e a desmontagem de F-actina devido ao aumento da liberação de G-actina (Disanza et al.,



2005; Dos Remedios, 2003). Esse processo de montagem e desmontagem do citoesqueleto de actina é essencial para a dinâmica de formação de protrusões de membrana que levam a célula a não só alterar sua morfologia e localização espacial, como também proporciona uma maior interação da célula com a MEC (Wen & Janmey, 2013).

Em células epiteliais polarizadas, os polímeros de F-actina citoplasmáticos se situam na região basal da célula, formando as fibras de estresse que a mantém aderida ao substrato, enquanto que em regiões de contato célula-célula, os feixes de actina formam estruturas denominadas “anéis de actina” que agrupam e ancoram proteínas do CJA. Na região do córtex celular, os filamentos de actina formam projeções de membrana que controlam o movimento celular através da dinâmica da montagem e desmontagem de estruturas denominadas filopódios e lamelipódios. Os filopódios são estruturas finas e alongadas formadas a partir de feixes de actina paralelos, já os lamelipódios são prolongamentos mais largos e ondulados formados a partir de ramificações de polímeros de F-actina oriundos de uma região central do citoesqueleto. Logo atrás dessas estruturas que são formadas na borda cortical da célula, entre as regiões de retração e contração celular, se encontra a região correspondente a lamela, que é responsável pela adesão da membrana celular ao substrato, bem como pela organização dos movimentos que acarretam no seu deslocamento (Vinzenz et al., 2012). A região contrária ao sentido de movimentação da célula ao longo do substrato é denominada *trailing edge*, ocorrendo nesse local a contração do corpo celular pela formação de um complexo resultante da interação entre as proteínas actina e a miosina II, que promovem a retração da célula, contribuindo para o fluxo retrógrado do citoesqueleto. Do lado oposto, a região onde ocorre a polimerização do citoesqueleto de actina é denominada *leading edge*, sendo responsável pela movimentação no sentido do *front* (**Figura 1.8**).



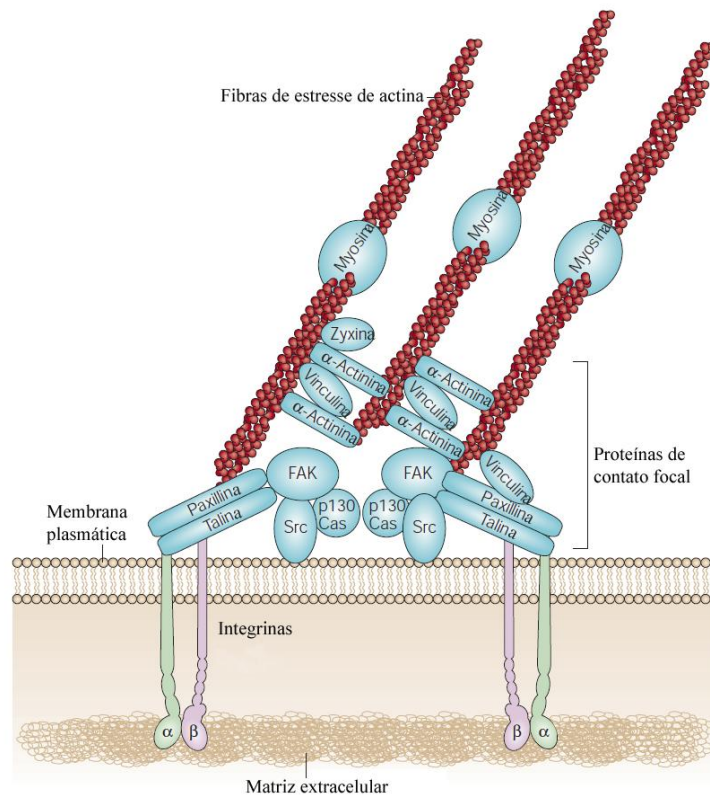
**Figura 1.8: Dinâmica do citoesqueleto de actina durante a migração e adesão celular.** A figura mostra a dinâmica da formação de estruturas envolvidas na migração celular tais como filopódios, lamelipodios, e de adesão focal, em resposta a estímulos migratórios. Observe as proteínas que auxiliam na polimerização da F-actina e nas que compõem o complexo de adesão focal. Adaptado de Claincher & Carlier, 2008.

Além disso, a capacidade da célula aderir ao substrato e migrar de forma orientada é resultado da dinâmica de formação de estruturas componentes da Adesão Focal, além da atividade das pequenas GTPases Rho na polimerização do citoesqueleto de actina.

### 1.3.2 Adesão Focal

As proteínas componentes de Adesão Focal (FA, do inglês *Focal Adhesion*), formam um complexo macromolecular de adesão, capaz de conectar o citoesqueleto de actina ao substrato, fixando a célula à matriz extracelular através de integrinas transmembranares que

se ligam a moléculas extracelulares como fibronectina, vitronectina, laminina, entre outras (Taylor et al., 2011). Essas últimas proteínas, por sua vez, são reconhecidas por moléculas de montagem que formam um complexo multimérico com diversas proteínas, sendo três delas chaves no processo de estabilização e no recrutamento de novas moléculas para amadurecimento das FA nascentes: a talina, a paxilina e a vinculina, que formam trímeros entre si. (Figura 1.9).



**Figura 1.9: Composição molecular das adesões focais.** As adesões focais compreendem um complexo multiprotéico que interage com o citoesqueleto de actina, auxiliando a adesão entre a célula e a matriz extracelular. Note a interação do complexo vinculina-paxilina-talina, que compreende as moléculas chave no recrutamento de outras proteínas de adesão focal, com as integrinas. Adaptado de Mitra et al., 2005.

A formação dessas estruturas focais é essencial durante o processo migratório uma vez que é responsável por estabilizar os filamentos de actina em sua forma polimerizada.

Adicionalmente, elas regulam o processo de montagem e desmontagem do citoesqueleto já que, proteínas do complexo de FA, como a vinculina, possuem sítios de interação com F-actina capazes de auxiliar na adesão da célula ao substrato e no direcionamento de fibras de estresse durante o processo migratório (Thompson et al., 2013). Além disso, as FA são capazes de transmitir forças de tensionamento contribuindo para a dinâmica do fluxo retrógrado do citoesqueleto de actina, o que garante o processo de retração e projeção durante a emissão de protrusões de membranas da célula em seu ambiente. Ainda, as proteínas do complexo de adesão focal podem funcionar como receptores mecânicos para estímulos externos, transmitindo sinais intracelulares que ativam proteínas da família das GTPases Rho alterando a morfologia da célula (Sit & Manser, 2011; Thievensen et al., 2013).

Estudos destacam a importância das FAs na regulação da sinalização celular de pequenas GTPases. Essa sinalização implica na internalização de proteínas das JA, como E-caderina, assim como alterações no papel adesivo das integrinas, modulando a adesão célula-célula ou célula-substrato em eventos fisiológicos e patológicos, incluindo o câncer e o processo metastático subsequente que ocorre em diversos tipos de tumores epiteliais (Balzac et al., 2005). Adicionalmente, uma importante proteína que compõe o complexo de adesão focal, a quinase de adesão focal (FAK, do inglês *Focal Adhesion Kinase*) vem sendo bastante estudada no contexto tumorigênico, uma vez que essa proteína pode contribuir para o desencadeamento de vias de sinalização do gen *c-MYC*, ativado por  $\beta$ -catenina, o que pode corroborar para a progressão de estágios iniciais da carcinogênese, já que esta via alterada pode levar a um descontrole proliferativo do tecido epitelial (Ridgway et al., 2012). Devido à importância da FAK, que atua em diversos eventos pró-tumorais, como angiogênese, invasão, sobrevivência e crescimento celular, essa proteína é descrita como um alvo terapêutico de destaque para o combate à doença e como potencial biomarcador para o diagnóstico clínico (Brunton & Frame, 2008).

Outra proteína que vem ganhando destaque no contexto do câncer é a vinculina. Devido ao seu papel no recrutamento de ligantes que compõem as FA e na participação da formação das JA, essa molécula é capaz de estabilizar as junções célula-célula mediando a ligação do citoesqueleto de actina às proteínas como a E-caderina e  $\alpha$ -catenina (Hazan et al., 1997; Weiss et al., 1998; Thompson et al., 2013).

Embora a vinculina seja uma molécula importante na homeostase do epitélio por contribuir para a manutenção das adesões intercelulares e da estabilização do citoesqueleto de actina, o papel exercido por essa proteína no contexto da progressão tumoral, incluindo o do CCR, se apresenta ainda pouco esclarecido. Assim, mais estudos são necessários para compreender de que maneira, e em que contextos, a vinculina atua na progressão de tumores de origem epitelial.

A existência dessas alterações dinâmicas do citoesqueleto de actina está relacionada ao potencial migratório de células tumorais. Essa dinâmica é controlada por pequenas moléculas que catalisam uma série de reações relacionadas com o potencial migratório, as GTPases da família Rho.

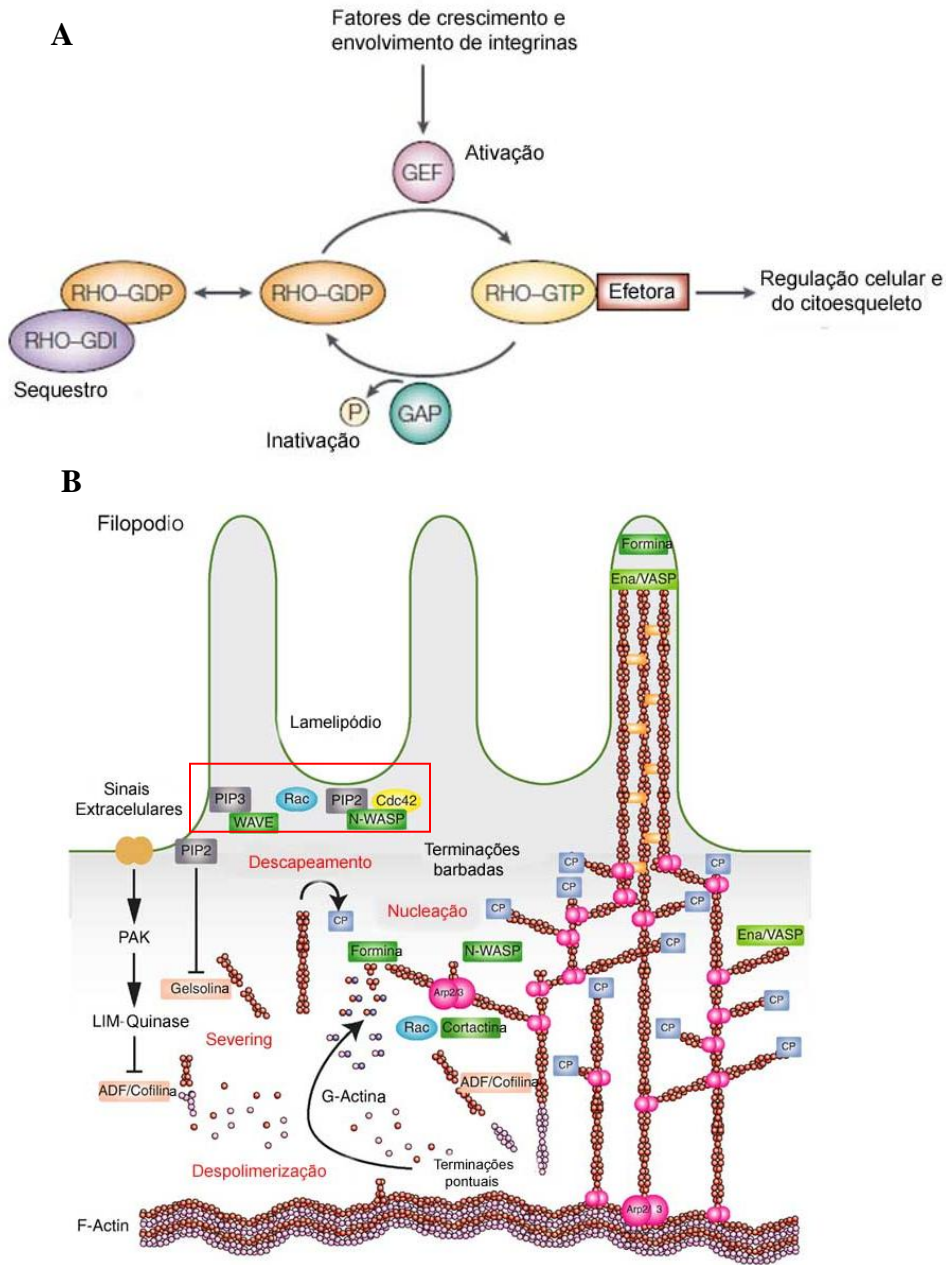
### 1.3.3 GTPases Rho

As proteínas que compõem a superfamília das pequenas GTPases são subdivididas em cinco grupos, sendo estes denominados, Ras, Rab, Arf, Ran e Rho. Particularmente, as proteínas pertencentes à família das pequenas GTPases Rho se subdividem em três tipos principais (Rho, Rac e Cdc42), sendo classificadas de acordo com as funções que exercem na organização do citoesqueleto de actina. Classicamente, o subgrupo das proteínas Rho se relaciona com a formação de fibras de estresse, e possui importante papel na contração e expansão que propicia a motilidade celular. Já os outros dois tipos de pequenas GTPases dessa família, Rac e Cdc42 possuem papel importante na formação de protrusões de membrana do tipo lamelipódio e filopódio, respectivamente, ambas estruturas com papéis determinantes não só no processo de motilidade celular como também na sinalização intracelular gerada por alterações mecânico-sensoriais que levam a resposta aos estímulos externos em que a célula se encontra (Sit & Manser, 2011).

Essas pequenas GTPases, ciclam de um estado inativo, quando Rho se liga a GDP (do inglês, *Guanine Diphosphate*) (RhoGDP), em um estado ativo, quando Rho se liga a GTP (do inglês, *Guanine Triphosphate*) (RhoGTP) (**Figura 1.10**). Essas duas conformações ocorrem na presença de duas moléculas: a GEF (do inglês, *Guanine nucleotide-Exchange Factors*), que possui o papel de troca da molécula de GDP por GTP; e a GAP (do inglês,

*GTPase-activating proteins*) que acelera a hidrólise de GTP, voltando a forma inativa ligada a GDP, pela liberação de fosfato inorgânico (Spiering & Hodgson, 2011).

Outra importante classe de moléculas que atuam na inibição da forma ativa de Rho é a GDI (do inglês *Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor*), que se associa as RhoGDPs e impedem a ciclagem de GDP para GTP. Assim, essas RhoGDIs, inibem a ativação das proteínas Rho, já que são capazes de manter essa GTPase no citosol. No entanto, outros trabalhos mostram que as GDIs são capazes, também, de inibir a atividade de Rac e Cdc42 (Nomanbhoy & Cerione, 1996). Outras proteínas são responsáveis pela dissociação do complexo Rho-RhoGDI: o fator de desacoplamento de GDI (do inglês, *GDI Dissociation Factor*), formado pelo complexo de proteínas ezrina-radixina-moesina (ERM) e a neutrofina R (Moissoglu *et al.*, 2006).



**Figura 1.10: Dinâmica e localização das GTPases Rho.** (A) Esquema representativo do ciclo de ativação de GTPases da família Rho. As GTPases Rho, quando em sua forma ativa (RhoGTP), são estimuladas pela GAP a clivarem GTP. Após a liberação de um fosfato, essas proteínas são mantidas no seu estado inativo (RhoGDP) através da ligação em GDI. Posteriormente, a GEF estimula e catalisa a troca de GDP por GTP, permitindo a interação entre a Rho GTPase ativa e sua proteína efetora, reiniciando o ciclo. (B) Ilustração mostrando a distribuição de proteínas adaptadoras e das pequenas GTPases durante a formação de filopódios e lamelipódios. Note (em vermelho) a presença de Rac e Cdc42 orquestrando esse processo. Adaptado de Sahai & Marshall, 2002; Miyoshi & Takai, 2007.

As proteínas da família Rho, quando se encontram na forma ativa, ligadas à membrana plasmática (**Figura 1.10**), são capazes de interagir com moléculas efetoras que irão desencadear efeitos na dinâmica do citoesqueleto de actina, alterando a morfologia celular durante eventos migratórios e invasivos, assim como outros eventos relacionados com a tumorigênese (Hammar et al., 2009; Alan & Lundquist, 2013). Um trabalho de revisão publicado recentemente por nosso Grupo destaca o papel das proteínas Rho, Rac e Cdc42, bem como de suas efetoras e reguladoras, que possuem papel de destaque em eventos que contribuem para a progressão tumoral como perda de adesão célula-célula, proliferação, migração e invasão celular em CCR (Leve & Morgado-Díaz, 2012).

#### 1.4 Transição Epitélio-Mesênquima

Durante a embriogênese e a ocorrência de eventos patológicos, como a fibrose e as máis formações congênitas, células epiteliais polarizadas são capazes de adquirir um fenótipo fibroblástico a partir da perda de seus marcadores característicos e aquisição de marcadores mesenquimais, típicos de uma morfologia indiferenciada, num processo de reprogramação celular denominado Transição Epitélio-Mesênquima (Zheng & Kang, 2013), como representado na **figura 1.11**. Este evento também vem sendo bem estudado em câncer, onde a aquisição de mutações e alterações estruturais leva o epitélio à desorganização de sua arquitetura diferenciada,



**Figura 1.11: Processo da TEM.** A ocorrência de mutações sequenciais e cumulativas durante o processo da TEM levam a uma progressiva alteração do fenótipo epitelial polarizado para um fenótipo mesenquimal fibroblástico. Observe a perda de marcadores epiteliais e aquisição de caráter mesenquimal durante esse evento. Adaptado de Kalluri & Weinberg, 2009.



Apesar de essencial para a manutenção fisiológica do epitélio, a TEM é um mecanismo chave para a proliferação celular ilimitada, bem como resistência a anoikis (morte celular por ausência de ancoragem) e a aquisição de características migratórias e invasivas, que se relacionam estritamente ao processo metastático (Frisch et al, 2013). A ocorrência de um processo reverso a TEM, ou seja, a aquisição de uma arquitetura polarizada com ganho de marcadores epiteliais, e perda de um fenótipo fibroblástico com supressão de marcadores mesenquimais também é bastante recorrente na fisiologia normal do organismo ou em tumores, sendo essa reversão fenotípica denominada Transição Mesênquima-Epitélio (TME) (Craene & Berx, 2013). A alternância desses dois eventos durante o processo do desenvolvimento tumoral é bem evidenciado durante a metástase, já que o destacamento de um tumor primário e sua disseminação, com posterior fixação de células malignas em um “nicho metastático” secundário depende, respectivamente, da TEM e da TME.

Alguns estudos *in vitro* e *in vivo*, inclusive em modelos de CCR, vêm demonstrando, ao longo dos anos, a importância da perda de marcadores epiteliais, como a E-caderina e  $\beta$ -catenina, e a aquisição de marcadores mesenquimais, como N-caderina, vimentina e fibronectina, no *front* migratório e invasivo de células tumorais (Wang et al, 2013; Suman et al, 2013), no processo metastático, contribuindo para um fenótipo mais agressivo dos tumores sólidos (Wu et al, 2012). No entanto, a mecanística desse evento não está bem elucidada.

## 2. JUSTIFICATIVA

Estudos têm relacionado às vias de sinalização desencadeadas por  $PGE_2$  e  $TGF-\beta$  frente ao contexto inflamatório que precede o desenvolvimento de diversos tipos de tumores. Alguns trabalhos mostram que  $PGE_2$  e  $TGF-\beta$  atuam, isoladamente, na regulação de eventos relacionados a TEM e a modulação de GTPases da família Rho contribuindo para a progressão do câncer colorretal. O papel desses dois mediadores inflamatórios na progressão do evento metastático tem sido bem descrito, uma vez que contribuem para o aumento da invasão, angiogênese e formação de sítios secundários em regiões como, o pulmão, o encéfalo, o fígado e o tecido ósseo. No entanto, em câncer colorretal, poucos estudos relacionam a modulação em conjunto exercida por  $PGE_2$  e  $TGF-\beta$  na TEM e na

ativação de proteínas da família das pequenas GTPases Rho. Dessa forma, não está definido se a associação entre esses mediadores inflamatórios é capaz de regular a ativação dessas GTPases em eventos que alterem a dinâmica do citoesqueleto de actina contribuindo para o processo da TEM. Por tanto, o presente estudo justifica-se pela necessidade de entender o papel destes importantes mediadores inflamatórios e da modulação do citoesqueleto durante a progressão do CCR, focando eventos relacionados a TEM.

### **3. OBJETIVO**

#### 3.1 Objetivo geral

Analisar o papel da interação entre PGE<sub>2</sub> e TGF-β na modulação de eventos relacionados a TEM e a alterações do citoesqueleto de actina e determinar quais efeitos são desencadeados pelo tratamento associado entre esses dois agentes na progressão do CCR.

#### 3.2 Objetivos específicos

Usando linhagens celulares de carcinoma de pulmão e de adenocarcinoma de cólon humano pretendemos:

- Identificar mudanças no perfil de expressão e localização subcelular de marcadores epiteliais e mesenquimais frente ao tratamento com PGE<sub>2</sub> e TGF-β.
- Relacionar alterações da organização do citoesqueleto de actina induzidas pelo tratamento com estes agentes à eventos subsequentes da progressão tumoral como: perda dos contatos intercelulares, migração e proliferação.
- Monitorar a atividade da GTPase RhoA, relacionada com o rearranjo do citoesqueleto de actina frente ao tratamento com esses agentes.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Anticorpos e reagentes: O anticorpo monoclonal produzido em camundongo anti-E-caderina foi obtido da BD bioscience (San Jose, California, EUA). Os anticorpos monoclonais produzidos em camundongo anti-N-caderina e anti-vimentina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). Os anticorpos policlonais produzidos em coelhos anti- $\beta$ -catenina e anti- $\alpha$ -tubulina foram obtidos, respectivamente da Sigma-Aldrich e Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EUA). Os anticorpos secundários conjugados à peroxidase anti-coelho e anti-camundongo foram obtidos da Invitrogen.

A prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)- 9-oxo-11 $\alpha$ ,15S-dihidroxi-prosta-5Z,13E-ácido dien-1-óico- foi adquirido da Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, EUA). O Fator de Crescimento Transformante Beta 1 (TGF- $\beta$ 1) foi obtido da GIBCO (Life Technologies, Carlsbad, EUA). A solução estoque de PGE<sub>2</sub>, foi preparada no solvente orgânico DMSO ficando na concentração de 1 mM e foi armazenada no freezer -80 °C. O TGF- $\beta$ 1 foi preparado numa solução tampão de PBS contendo a proteína carreadora albumina (0,5 % de BSA) ficando na concentração de 1000 ng/ml, sendo estocado a -20 °C.

4.2 Cultura de células: As linhagens celulares HT-29 (# HTB-38) e A549 (# CCL-185), derivadas respectivamente de adenocarcinoma de cólon e de carcinoma de pulmão, foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas VA, EUA). Células A549 foram usadas como controle positivo de indução da TEM utilizando TGF- $\beta$  (Kasai et al., 2005), enquanto células HT-29 apresentam mutações em *BRAF*, *PIK3CA*, *TP53*, *SMAD4* e *APC* (Rowan et al., 2000; Woodford-Richens et al., 2001; Flatmark et al., 2004), com fenótipo moderadamente diferenciado, crescimento em multicamada e elevado potencial invasivo e metastático. As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), 60 mg/L de estreptomicina, 100 mg/L de penicilina G (todos adquiridos da Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), e mantidas a 37° C em uma atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub>. Para realização dos experimentos, células em semi-confluência e em confluência foram lavadas com

solução salina tamponada com fosfato (PBS) e tripsinizadas. Posteriormente, as células foram transferidas para garrafas de 25 cm<sup>2</sup> e 75 cm<sup>2</sup> e placas de 6, 24 e 96 poços.

4.3 Tratamento com TGF- $\beta$ 1 e PGE<sub>2</sub>: As células HT-29 e A549 foram, inicialmente, depletadas de SFB durante 24h e, posteriormente, tratadas com PGE<sub>2</sub> na concentração final de 10 nM (Löffler *et al*, 2008) e/ou com TGF- $\beta$ 1 na concentração final de 5 ng/ml (Kim & Hwan, 2013), durante 24 e 48h. Para investigação do efeito do tratamento combinado, as células foram incubadas com PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$  em suas respectivas concentrações, na mesma solução de desafio e no mesmo tempo de administração. Para os experimentos de atividade da GTPase RhoA, os tratamentos isolados e combinados de PGE<sub>2</sub> (10 nM) e TGF- $\beta$  (5ng/ml) foram realizados nos tempos de 5, 15 e 30 min.

4.4 Obtenção de lisado protéico total: Após os tratamentos realizados, as células foram lavadas 2 x com PBS e homogeneizadas por 30 minutos no gelo em tampão de extração (1% de Triton X-100, 0,5% de Deoxicolato de sódio, 0,2% de SDS, 0,15 M de NaCl, 10 mM de HEPES pH 7,3), contendo coquetel de inibidores de proteases (1:100) e fosfatases (2 mM de ortovanadato e 20 mM de NaF), todos obtidos da Sigma Chemical Co. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 10000 x g por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante resultante, estocado em freezer a – 80 °C. Por fim, a proteína obtida no lisado protéico total foi quantificada através do kit comercial BCA® (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EUA).

4.5 SDS-PAGE, Western blotting e análise densitométrica: Para análise do perfil de expressão de proteínas totais, 30 – 60  $\mu$ g de proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em géis de 7,5, 10 e 12%. Posteriormente, as amostras foram transferidas para a membrana de nitrocelulose utilizando-se o aparelho de transferência semi-seco (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EUA) a uma diferença de potencial equivalente a 10 V por 60 min. As membranas foram bloqueadas por 1 hora em uma solução de 5% de leite desnatado ou 1-3% de solução de albumina (BSA) em TBS-T (20 mM de Tris, pH 7,6, 137 mM de NaCl, 0,1% de Tween-20). Em seguida, foram incubadas durante 4 horas ou “overnight” a 4°C com os anticorpos

primários anti-tubulina (1:1000), anti- $\beta$ -catenina (1:1000), anti-E-caderina (1:2000), anti-N-caderina (1:1500) e anti-vimentina (1:2500) diluídas no tampão de bloqueio. Após duas lavagens com TBS-T durante 15 minutos, as membranas foram incubadas durante 40-60 min com os anticorpos secundários conjugados a peroxidase, anti-camundongo e anti-coelho correspondentes, e a detecção da imunomarcação foi realizada através de reação de quimioluminescência usando o kit ECL (GE Healthcare, UK). A intensidade das bandas foi quantificada por análise densitométrica utilizando o software LabWorks 4.6 (UVP, Cambridge, United Kingdom).

4.6 Microscopia de Imunofluorescência: As células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro, e após os respectivos tratamentos, lavadas 2 x com PBS e fixadas com paraformaldeído e/ou metanol, dependendo da proteína a ser analisada.

4.6.1 Protocolo de fixação com paraformaldeído: Para a marcação das proteínas vinculina e vimentina, as células foram lavadas 3 x com PBS (pH 7.0) e fixadas com paraformaldeído 4% em PBS/CM durante 10 min a temperatura ambiente. Para a proteína vinculina, a monocamada celular foi inicialmente incubada com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 mM, pH 8.0) e permeabilizada com 0.1% de Triton X-100 por 10 min. Foi realizado o bloqueio com 3% de BSA por 30 min, seguido de incubação com anticorpo primário anti-vinculina (1:200) em solução de bloqueio. Posteriormente, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e o anticorpo secundário (1:500) foi adicionado. Por fim, as lâminas foram montadas em solução contendo reagente Antifade Gold ProLong (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). Para a marcação da vimentina, após fixação, as células foram incubadas por 15 min com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (50 mM, pH 8.0), permeabilizadas em solução contendo 0,2% de BSA e 0,1% de Triton-X-100 em PBS/CM durante 30 min, em temperatura ambiente. O bloqueio foi realizado com BSA na concentração de 3% por 30 min. Foi utilizado o anticorpo anti-vimentina conjugado ao fluorocromo  $\text{Cy}^3$  (diluição 1:300). Posteriormente, as células foram lavadas 5 vezes com PBS e as lâminas montadas como indicado acima. As amostras, para ambas as marcações, foram analisadas em microscópio confocal a laser (Fluoview FV10i Overview, Olympus, EUA).

4.6.2 Protocolo de fixação com metanol: Células foram fixadas com metanol a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , re-hidratadas por 15 min com PBS/Cálcio e Magnésio (PBS/CM) e, posteriormente, bloqueadas por 60-90 min à temperatura ambiente com 0,2% de BSA. Em seguida, incubadas com anticorpos primários anti-E-caderina (1:100), anti-N-caderina (diluição 1:50) e anti- $\beta$ -catenina (diluição 1:100), lavadas e incubadas por 1 h com anticorpo secundário anti-coelho e anti-camundongo, conjugados a Alexa Fluor 488 e 546 (diluição 1:200). Posteriormente, as células foram lavadas 5 vezes com PBS e montadas em solução contendo reagente Antifade Gold ProLong (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). A análise foi realizada em microscópio confocal a laser (Fluoview FV10i Overview, Olympus, EUA).

4.7 Detecção dos filamentos de actina: No protocolo utilizado para detecção de actina, as células foram lavadas 3 x com PBS (pH 7.0) e fixadas com paraformaldeído 4% em PBS/CM durante 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, foram permeabilizadas em solução com 0,2% de BSA e 0,1% de Triton-X-100, diluídos em PBS/CM (pH 8.0), por 30 min, e incubadas por 15 min com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (50 mM, pH 8.0) a temperatura ambiente. Para marcação dos filamentos, utilizou-se faloidina conjugada a Rodamina (concentração de 500 ng/mL), diluída em solução permeabilizante durante o tempo de 30 min. Posteriormente, as células foram lavadas 5 vezes com PBS e as lâminas montadas em solução contendo reagente Antifade Gold ProLong (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), e analisadas usando microscopia confocal a laser (Fluoview FV10i Overview, Olympus, EUA).

4.8 Análise Morfométrica: A análise da quantificação das adesões focais, medindo-se a extensão da marcação da vinculina, e da colocalização entre as proteínas vinculina e actina foi realizada através da contagem de 20 campos de colocalização, aleatoriamente selecionados em 5 imagens de cada condição de tratamento (controle,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{TGF-}\beta$ ,  $\text{PGE}_2+\text{TGF-}\beta$ ) obtidas no confocal, utilizando o programa Image Pro-Plus 7.0 (Media Cybernetics, EUA, MD).

4.9 Análise da morfologia celular: Células foram cultivadas até a semi-confluência em lamínulas de vidro, sendo posteriormente tratadas com PGE<sub>2</sub> e TGF-β isoladamente ou em combinação, nas concentrações de 10 nM e 5 ng/ml, respectivamente, nos tempos de 24 h e 48 h. A análise do fenótipo celular foi realizada por microscopia de contraste de fase utilizando o microscópio invertido AxioObserver.Z1 da Zeiss (Oberkochen, Germany) acoplado a um programa de processamento de imagens Axiovision 4.1 Zeiss (Carl Zeiss).

4.10 Ensaio de desagregação e destacamento: Células foram cultivadas até a semiconfluência em placas de 6 poços e submetidas aos tratamentos com PGE<sub>2</sub> e TGF-β nas respectivas concentrações de 10 nM e 5 ng/ml. Posteriormente, as células foram incubadas com tampão de desagregação (0,02% de EDTA e 0,2-0,05% de tripsina) diluído em PBS (pH=7.2). Em seguida a placa foi incubada à 37°C por 10 min e células soltas do substrato foram quantificadas na câmara de Neubauer através da marcação com corante azul de tripan (0.1%) em PBS (pH=7.2). A razão grumo (grupos de 3 células ou mais) pela total de células contadas foi realizado para avaliação da capacidade de desagregação. As células que permaneceram aderidas ao substrato foram submetidas a técnica de Cristal Violeta (**item 4.11**) para avaliação da capacidade de destacamento.

4.11 Ensaio de Proliferação Celular: O potencial proliferativo foi analisado pela técnica de cristal violeta, onde células tripsinizadas foram contadas na câmara de Neubauer, e, então, plaqueadas na concentração de  $2 \times 10^4$  células em placas de 96 poços. Posteriormente, foram incubadas ou não com os diferentes agentes em estudo. Após 24 h de tratamento, a monocamada foi lavada 2x com PBS (pH 7.0) e fixada com etanol P.A. por 10 min. Em seguida, o corante Cristal Violeta (20% de etanol + 0,05% de cristal violeta) foi adicionado aos poços contendo as células, durante 10 min. O excesso do corante foi eliminado pela lavagem com água Milli-q e a eluição do Cristal Violeta restante foi realizado com metanol, sob agitação no *shaker*, durante 5min. A quantificação da proliferação foi realizada por espectrofotometria de comprimento de onda na faixa de 595 nm, utilizando o leitor de Elisa Spectra Max 190.

4.12 Ensaio de Migração Celular: A migração celular foi avaliada através da técnica de *wound healing*. Células tripsinizadas, foram contadas na câmara de Neubauer, e, então, plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^4$  células em placas de 6 poços. Após esse plaqueamento, as células confluíram em monocamada, sendo, então, depletadas por 24h de SFB. Posteriormente, foi realizado um risco sobre as células em confluência com a utilização de um tip de 200  $\mu$ l. Em seguida, foram tratadas ou não com os diferentes agentes em estudo. Após 24 h de tratamento, foram obtidas micrografias referentes às margens de fechamento da “ferida” induzida sobre a monocamada, utilizando-se um microscópio ótico invertido (AxioObserver.Z1), acoplado a um programa de processamento de imagens Axiovision 4.1 Zeiss.

4.13 Ensaio de Atividade de RhoA: Para análise da atividade da GTPase RhoA, foi realizado o plaqueamento na concentração de  $5 \times 10^4$  células em placas de 6 poços. Após esse plaqueamento, aguardou-se que as monocamadas celulares atingissem uma porcentagem de confluência de 70% sendo, então, realizados os tratamentos com os agentes em questão. Em seguida, foi utilizado o protocolo de detecção de RhoA, *G-Lisa® RhoA Activation Assay Biochem Kit®* (Ver Cat. # BK121, Cytoskeleton, EUA, CO), de acordo com as instruções do fabricante. Por fim, a leitura da atividade da proteína foi realizada por captação da luminescência emitida pelas amostras utilizando-se o aparelho Veritas® Microplate Luminometer (Turner Biosystems, EUA, CA).

4.14 RT-qPCR: Para detecção da expressão de RNA mensageiro (RNAm) foi utilizada a técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*) quantitativa em tempo real (RT-qPCR).

4.14.1 Extração do RNA e Síntese de DNA Complementar: As células foram lavadas duas vezes em PBS 1X (pH=7.2) e o reagente de extração de RNA total TRIzol (Invitrogen, EUA, CA) foi adicionado diretamente às células aderidas respeitando-se o volume final de 500  $\mu$ l de reagente por poço. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e incubadas à temperatura ambiente por 5 min. A etapa seguinte consistiu na centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C e a passagem do sobrenadante para um novo tubo. Foram adicionados



200µl de clorofórmio e o tubo foi submetido a uma agitação vigorosa por 15 segundos seguida por uma incubação por 3 minutos à temperatura ambiente. Passado esse tempo, o tubo foi centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C, e a fase aquosa do sobrenadante foi recuperada em um novo tubo. Foram adicionados 500 µl de isopropanol e a mistura foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, o material foi centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O RNA extraído foi reconstituído em 20 µl de água pura (Invitrogen, EUA, CA) e armazenado à -70°C.

A quantificação da massa do RNA extraído das culturas foi realizada no espectrofotômetro *Nanodrop ND-100* (Thermo Scientific, EUA, FL) a 260nm. Em seguida, 2 µg do RNA extraído foram tratados com DNase (*Amplification Grade - DNase I*, Invitrogen), no qual, ocorreu uma reação contendo 1UDNase I em um volume final de 6 µl e 0,6 µl de 10X DNase I *Reaction Buffer*. O tubo foi mantido por 20 min à 37 °C para que a reação ocorresse. Em seguida, foi realizada a inativação da DNase através da adição de 1 µL de EDTA na concentração de 25 mM, e incubação à 65°C por 10 min. A etapa seguinte foi a de transcrição reversa do RNA.

A construção do DNAs complementares (cDNAs) foi feita com a utilização do kit *SuperScript® III First-Strand Synthesis Super Mix* (Invitrogen, EUA, CA). Em todo o volume de reação contendo 2 µg de RNA, foi adicionado 1 µl do *Primer* oligo(dT)<sub>20</sub> na concentração de 50 µM, 1 µl do Tampão de anelamento contendo um *mix* de dNTPs (10 mM de cada nucleotídeo). A solução final de 8 µl foi incubada no termociclador à 65°C por 5 min, e imediatamente colocada em gelo por pelo menos 1 min. Posteriormente, adicionou-se 10 µl de solução padrão *First-Strand Reaction Mix 2X* e 2 µl da enzima *SuperScript® III/RNaseOUT® Enzyme Mix*. A solução foi homogeneizada com o auxílio de um agitador e incubada a 50°C durante 50 min e inativada com uma incubação posterior de 70°C por 15 min.

4.14.2 PCR em Tempo Real: Para avaliar a variação dos níveis acumulados de RNAm por RT-qPCR, foram utilizados iniciadores específicos para o gene *TWIST1*, *CDH2* (N-caderina), *SNAIL1*(Snail), *VIM* (Vimentina), *CDH1* (E-caderina), *ACTB* (Actina) e

*GAPDH*. O corante utilizado para a detecção da amplificação foi o *SYBR Green* (Applied Biosystems, EUA, CA).

As sequências dos RNAm utilizadas para a construção dos *primers* foram obtidas no banco de dados do genoma humano ([www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide)). A especificidade dos oligonucleotídeos foi determinada previamente *in silico* diante de sua homologia aos dados dos mRNAs humanos através da ferramenta BLAST/HumanGenome ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/humangenome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/humangenome)). Os iniciadores (**Tabela 2**) foram desenhados de acordo com instruções contidas no manual do *Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix and RT-PCR* (Applied Biosystems, EUA, CA) e com auxílio da ferramenta disponível *on-line* na página da IDT (*Integrated DNA Technologies* - [www.idt.org](http://www.idt.org)).

**Tabela 4.1:** Sequências e temperaturas de *melting* dos iniciadores desenhados para a amplificação dos genes analisados, mostrando a sequência senso e a anti senso de cada um deles.

Gene	Iniciador	Sequência 5' para 3'	TM (°C)
<i>SNAIL1</i>	Senso	TCGGAAGCCTAACTACAGCGA	60
	Anti senso	AGATGAGCATTGGCAGCGAG	60
<i>TWIST1</i>	Senso	GGCACCATCCTCACACCTCT	60
	Anti senso	TGGCTGATTGGCACGACCT	60
<i>VIM</i>	Senso	GCCAGATGCGTGAAATGGAA	62
	Anti senso	CTGTCCATCTCTAGTTTCAACCG	62
<i>CDH1</i>	Senso	TGGCGTCTGTAGGAAGGCA	55
	Anti senso	GGCTCTTTGACCACCGCTCT	55
<i>CDH2</i>	Senso	ACCAGGACTATGACTTGAGCC	62
	Anti senso	GGCGTGGATGGGTCTTTCA	62
<i>ACTB</i>	Senso	TACAATGAGCTGCGTGTGG	62
	Anti senso	TAGCACAGCCTGGATAGCAA	62
<i>GAPDH</i>	Senso	ATTCCACCCATGGCAAATTC	62
	Anti senso	GGCGTGGATGGGTCTTTCA	62

As variações dos níveis de RNAm foram normalizadas pelos níveis de *ACTB* e *GAPDH*. Cada reação foi realizada com uma massa de 5 ng de cDNA, 0,05  $\mu$ M de iniciadores específicos para cada gene (senso e anti-senso) e 5  $\mu$ l do reagente 2X *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, EUA, CA). Foram determinadas as curvas padrão e curvas de *Melting* para todos os iniciadores utilizando diferentes quantidades da massa dos cDNAs das células controle, nas quantidades de 10 ng, 1 ng, 0,1 ng e 0,01 ng. As condições de corrida utilizadas para todas as reações consistiram em uma incubação inicial de 95°C por 10 minutos, seguido por um ciclo repetido 55 vezes de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos.

Todas as condições e reações de análise da variação dos níveis de RNAm foram definidas e realizadas utilizando o sistema de detecção de sequência *Rotor-gene*<sup>®</sup> 6000 (Qiagen, EUA, CA) e a análise dos resultados no programa *Rotor-gene*<sup>®</sup> 6000 series software 1.7. e os cálculos de diferença de expressão foram feitos pelo método  $\Delta\Delta C_t$  (Livak e Schmittgen, 2001). Foram realizados no mínimo três experimentos independentes em triplicada para cada condição.

4.15 Análise Estatística: Na análise estatística referente aos ensaios de migração, invasão e proliferação, além dos experimentos de *Western blotting*, foi utilizando o teste estatístico de análise de variância, two-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. Para análise estatística referente aos experimentos de RT-qPCR e análise morfométrica da imunofluorescência, foi realizado o teste t de student, não pareado, sendo utilizado o pós-teste de Dunnet, com intervalo de confiança de 95%. \* $p < 0,05$  ou \*\* $p < 0,01$ .

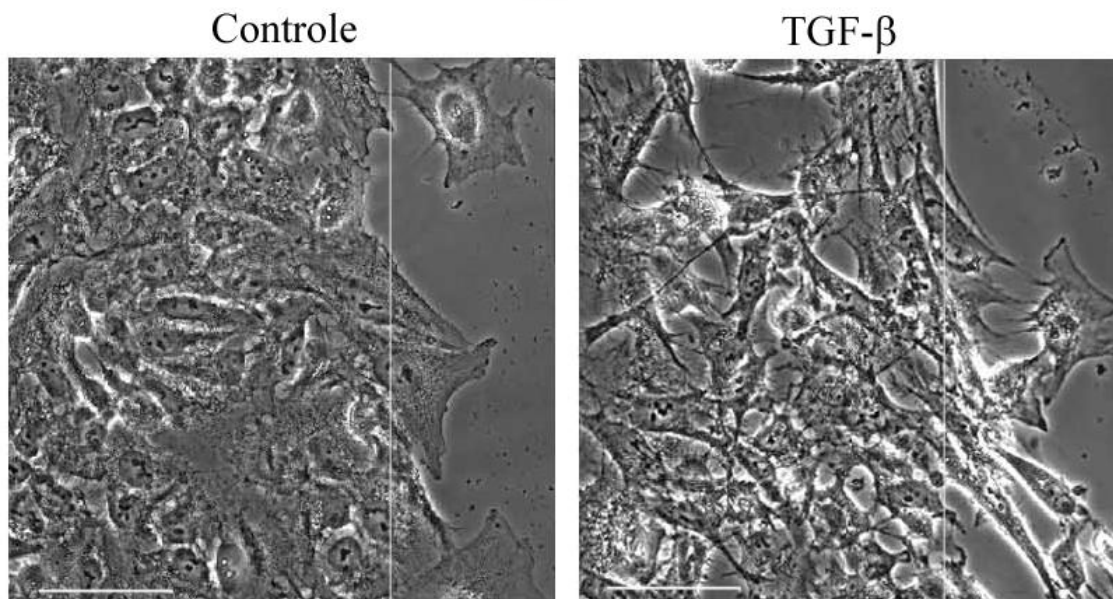
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análise de mudanças no perfil de expressão e localização subcelular de marcadores epiteliais e mesenquimal em células A549 tratadas com TGF- $\beta$ .

#### 5.1.1 TGF- $\beta$ promove alteração do fenótipo celular na linhagem de carcinoma de pulmão A549

Inicialmente, para confirmação do nosso modelo de indução de TEM e de mudanças do citoesqueleto de actina em resposta ao tratamento com TGF- $\beta$ , foi utilizada a linhagem celular de carcinoma de pulmão A549, como controle positivo dessas alterações celulares. Esse mecanismo de indução da TEM, nesta linhagem celular, representa um modelo clássico de ativação das vias canônica e não canônica de TGF- $\beta$  no contexto do microambiente inflamatório do tumor (Meulmeester & Dijke, 2011).

Sendo assim, foi analisada a morfologia, principalmente na região do *front* de migração, de células A549 submetidas à técnica de *wound healing*, em resposta ao tratamento com TGF- $\beta$  (5 ng/ml), após 24h. A imagem de microscopia de contraste de fase mostra que, em comparação ao controle, as células A549 tratadas com TGF- $\beta$  se apresentam morfologicamente mais fibroblásticas, dispostas de forma espalhada, características de células com potencial migratório em direção ao *front* de migração. Dessa forma, observamos que TGF- $\beta$  levou a modificações no fenótipo celular com aquisição de características morfológicas de células mesenquimais, menos polarizada, indicando uma possível ocorrência do processo de TEM nessa linhagem epitelial (**Figura 5.1**).



**Figura 5.1: Análise morfológica de células A549 após 24h de tratamento com TGF-β.** Células foram cultivadas até a semiconfluência, submetidas à técnica de *wound healing* e tratadas como indicado. Observe que após o tratamento, as células apresentaram distribuição esparsa e fenótipo fibroblástico, particularmente no *front* de migração, quando comparadas ao controle. Imagens representativas obtidas por microscopia de contraste de fase. Barra: 50 μm.

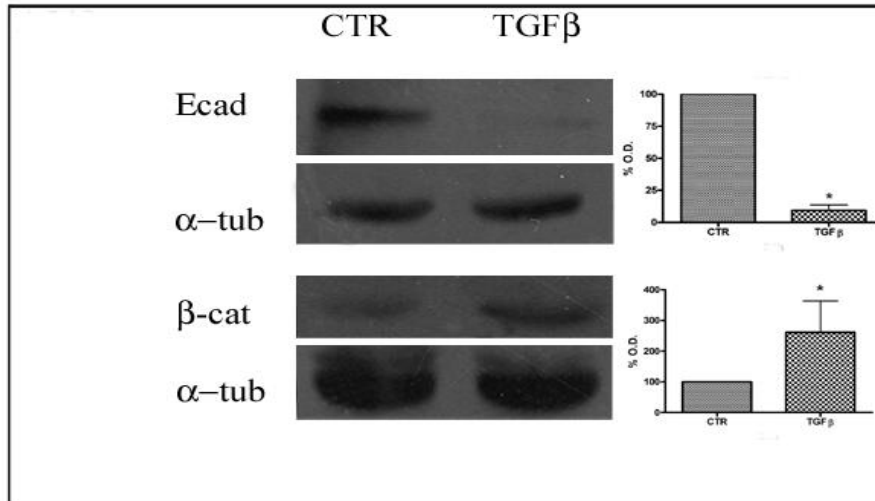
### 5.1.2 TGF-β altera o perfil de expressão e a localização subcelular de marcadores epiteliais e mesenquimais em células A549

A diminuição da expressão de proteínas componentes do CJA, como a E-caderina, tem sido relacionada com o processo de transição epitélio-mesênquima em diversos tipos de tumores, já que a sua presença na região de contato célula-célula é um forte indicativo de supressão tumoral. Por outro lado, a proteína β-catenina apresenta diferentes *pools* que exercem funções distintas no contexto celular, sendo encontrados aglomerados protéicos no núcleo, no citoplasma e na membrana celular (Kam & Quaranta, 2009). Da mesma forma, o aumento na expressão e a localização subcelular de proteínas relacionadas a um fenótipo mesenquimal como, vimentina, N-caderina e actina de músculo liso α ( $\alpha$ -SMA), se relacionam a um fenótipo celular indiferenciado e, consequentemente, indicam um processo de progressão tumoral relacionado com a

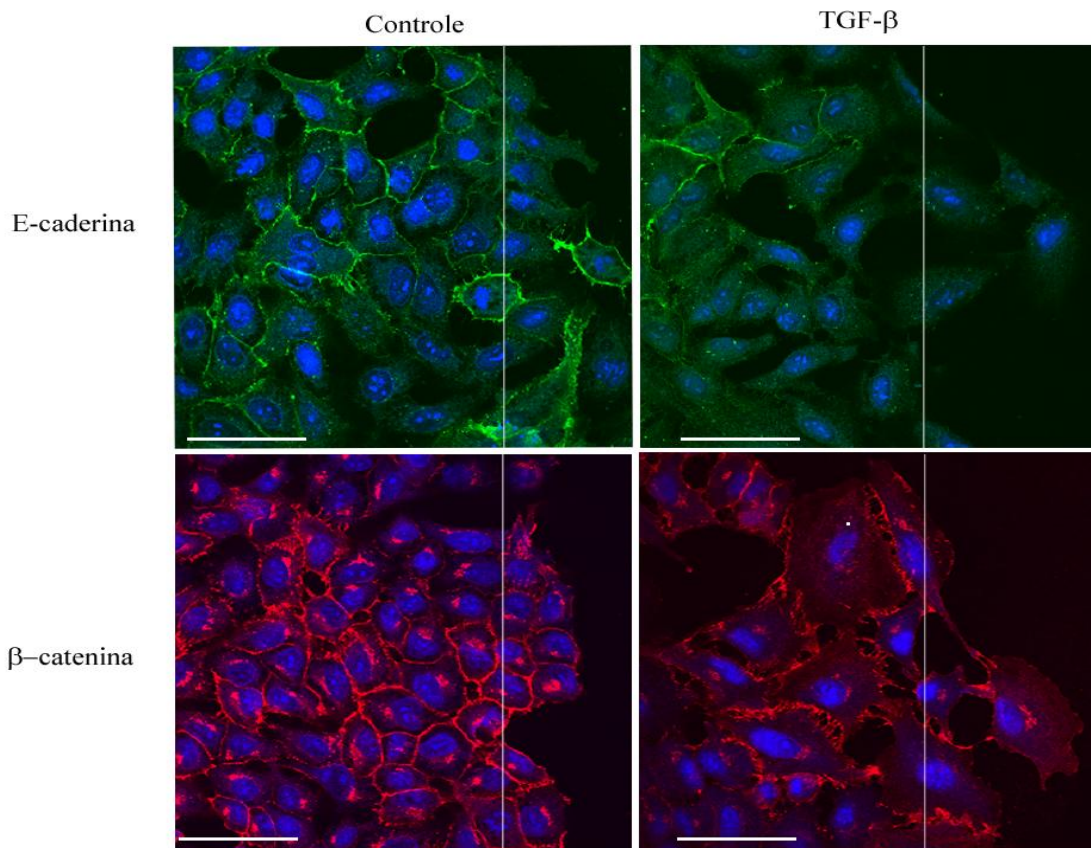
TEM (Mele et al., 2013). A partir dessas considerações, fomos investigar (**Figura 5.2 e Figura 5.3**) se essa alteração do fenótipo celular observada em células migratórias tratadas com TGF- $\beta$  se relaciona com a diminuição de marcadores epiteliais e aumento de marcadores mesenquimais. Os resultados observados por *Western blotting* revelam que o tratamento com TGF- $\beta$  (5 ng/ml), durante 24h, foi capaz de diminuir drasticamente a expressão da proteína E-caderina (\*P<0.05), enquanto a expressão de  $\beta$ -catenina foi aumentada (\*P<0.05) (**Figura 5.2 A**).

Os resultados obtidos por imunofluorescência revelam que ocorreu uma evidente redistribuição de E-caderina com perda de marcação dessa proteína na região de contato célula-célula, nas células tratadas com TGF- $\beta$  em relação ao controle, onde a proteína se mantém principalmente localizada. Em relação à  $\beta$ -catenina, observamos que nas células não tratadas, esta proteína se localiza majoritariamente nos contatos intercelulares e, de forma inesperada, na região perinuclear. Após o tratamento com TGF- $\beta$  ocorreu uma diminuição da proteína em regiões de contato célula-célula, além de uma diminuição na intensidade de marcação perinuclear nas células tratadas (**Figura 5.2 B**

A



B

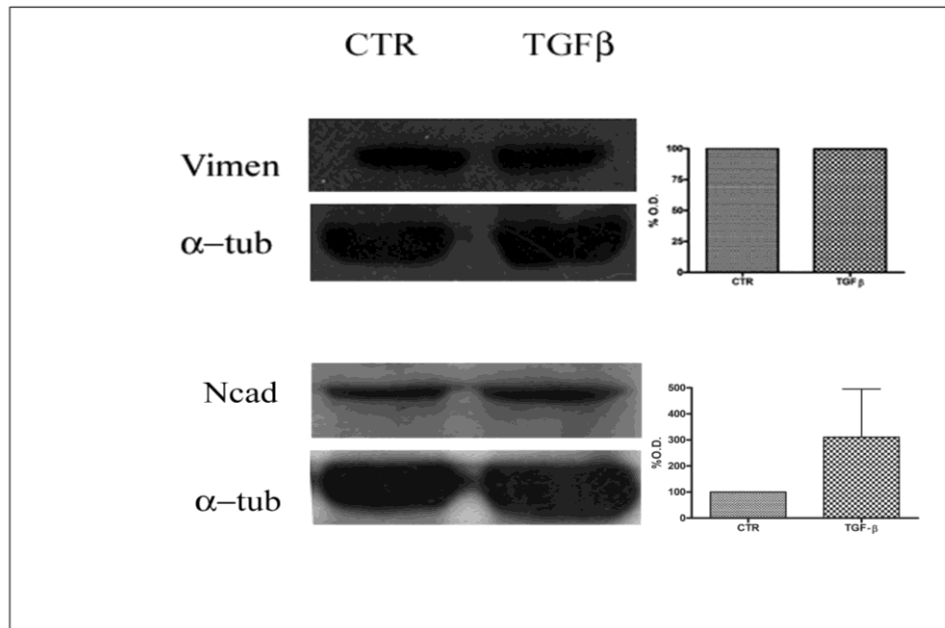
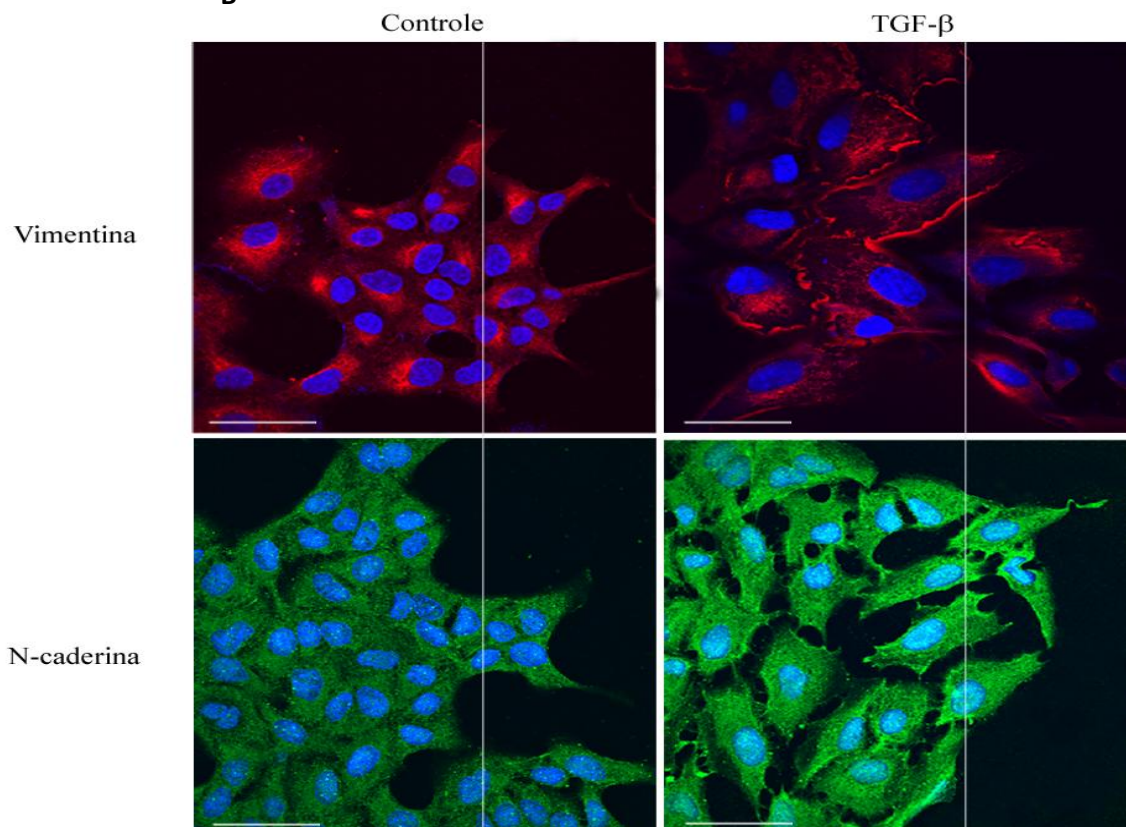


**Figura 5.2:** Análise da expressão e localização subcelular de marcadores epiteliais em células A549 após 24 h de tratamento com TGF- $\beta$ . (A) *Western blotting* e (B) imunofluorescência após *wound healing* para as proteínas E-caderina e  $\beta$ -catenina. Os gráficos são representativos de dois experimentos independentes + SEM \* $P < 0.05$  (ANOVA). E-caderina (Ecad),  $\beta$ -catenina ( $\beta$ -cat),  $\alpha$ -tubulina ( $\alpha$ -tub). Imagens representativas obtidas por microscopia confocal. O DAPI foi utilizado para marcação nuclear. Barra: 50  $\mu$ m.

Por outro lado, não foram observadas alterações na expressão da proteína vimentina após o tratamento com esse agente. No entanto, os níveis de N-caderina, outro importante marcador mesenquimal, se apresentam aumentados em resposta ao tratamento com o TGF- $\beta$  (**Figura 5.3 A**).

A análise por imunofluorescência revela que os filamentos de vimentina apresentam uma reorganização espacial se localizando na região do *front* das células em migração, nas bordas dos lamelipódios das células tratadas em relação às células do controle. Já o perfil de marcação para a N-caderina não apresenta alterações em relação ao controle, normalmente já difusa no citoplasma (Theys et al., 2011), mas sim um aumento na sua intensidade de fluorescência, após o tratamento com TGF- $\beta$  (**Figura 5.3 B**).



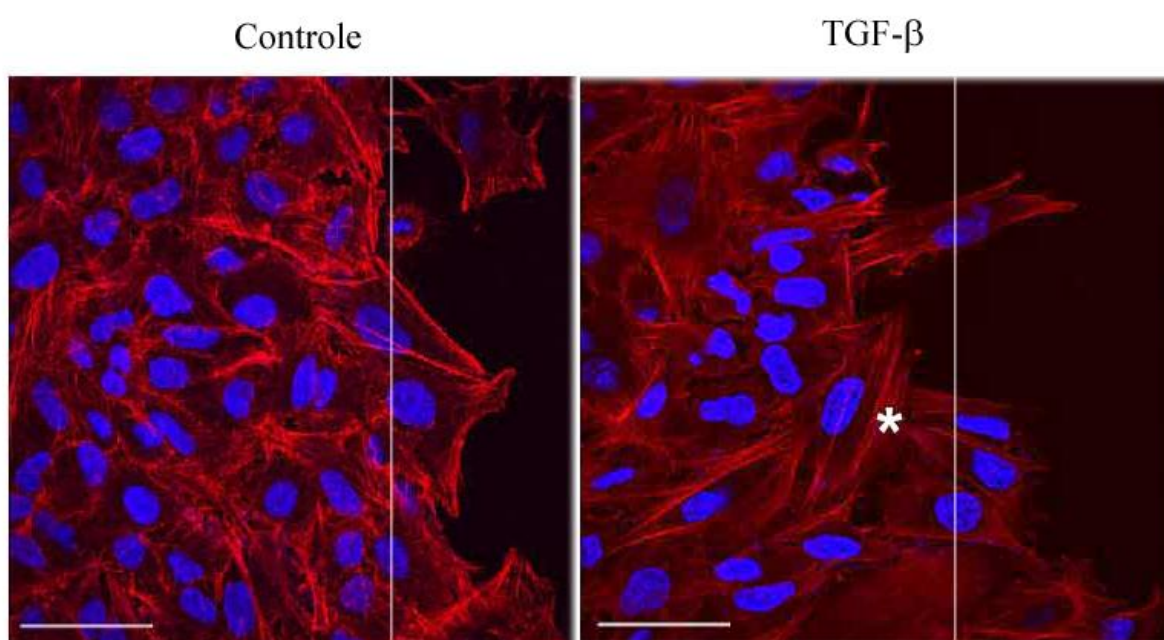
**A****B**

**Figura 5.3:** Análise da expressão e localização subcelular de marcadores mesenquimais em células A549 após 24 h de tratamento com TGF- $\beta$ . (A) *Western blotting* e (B) imunofluorescência após *wound healing* para as proteínas vimentina e N-caderina. Os gráficos são representativos de dois experimentos independentes + SEM \* $P < 0.05$  (ANOVA). Vimentina (Vimen), N-caderina (Ncad),  $\alpha$ -tubulina ( $\alpha$ -tub). Imagens foram obtidas por microscopia confocal. O DAPI foi utilizado para marcação nuclear. Barra: 50  $\mu$ m.

## **5.2 Avaliação da organização do citoesqueleto de actina e da migração em células A549 tratadas com TGF- $\beta$ .**

A reorganização do citoesqueleto de actina é um dos eventos primordiais no processo de migração celular, uma vez que é responsável por direcionar as células na região do *front* orientando-as vetorialmente e sensorialmente no ambiente em que se encontram.

Sendo assim, analisamos a distribuição dos filamentos de F-actina, através da marcação com faloidina-rodamina. As imagens obtidas por microscopia confocal mostram que as células tratadas com TGF- $\beta$ , na concentração de 5 ng/ml, apresentam aumento no número e uma maior redistribuição de fibras de estresse formadas após 24h de tratamento (**Figura 5.4**).

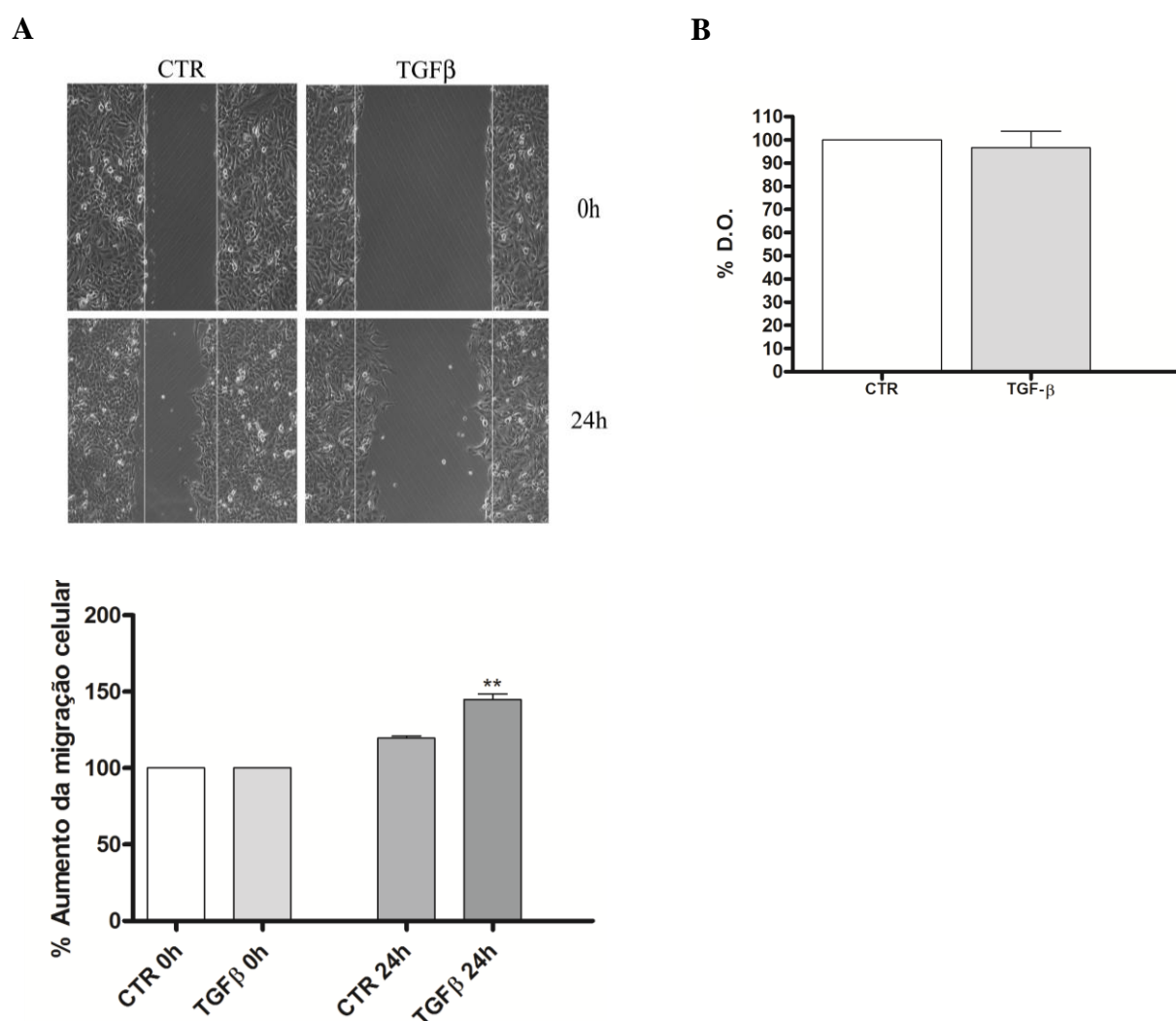


**Figura 5.4:** Análise da distribuição e organização do citoesqueleto de actina em células A549 após 24h de tratamento com TGF- $\beta$ . Células foram submetidas a técnica de *wound healing* e tratadas como indicado. O asterisco indica a formação de fibras de estresse em células do *front* de migração tratadas com o agente. Imagens representativas obtidas por microscopia confocal. Barra: 50  $\mu$ m.

Células A549 foram, também, analisadas quanto à capacidade de migração e de proliferação celular, após tratamento com TGF- $\beta$  (**Figura 5.5**).

Nossos resultados mostram que após 24h de tratamento, TGF- $\beta$  foi capaz de aumentar de forma significativa a migração nessa linhagem celular, em comparação ao controle (**Figura 5.5 A**). No entanto, não é possível observar nenhuma alteração significativa nos ensaios de proliferação celular (cristal violeta) após o mesmo período de tempo, indicando que o maior fechamento do risco na monocamada celular se deve a migração e não a proliferação (**Figura 5.5 B**).

Juntos, esses resultados mostram que TGF- $\beta$  é capaz de alterar não apenas a morfologia, mas também a expressão de marcadores epiteliais e mesenquimais, e a orientação dos filamentos de actina durante o processo migratório.



**Figura 5.5:** Análise da migração e proliferação em células A549 tratadas com TGF- $\beta$  após 24h. (A) Células foram cultivadas, submetidas à técnica de *wound healing* e tratadas como indicado para análise da migração celular. (B) Análise da proliferação celular usando a técnica de cristal violeta, após tratamento. O gráfico representa a média do resultado de três experimentos independentes + S.E.M. \*\*  $p < 0.01$  (ANOVA).

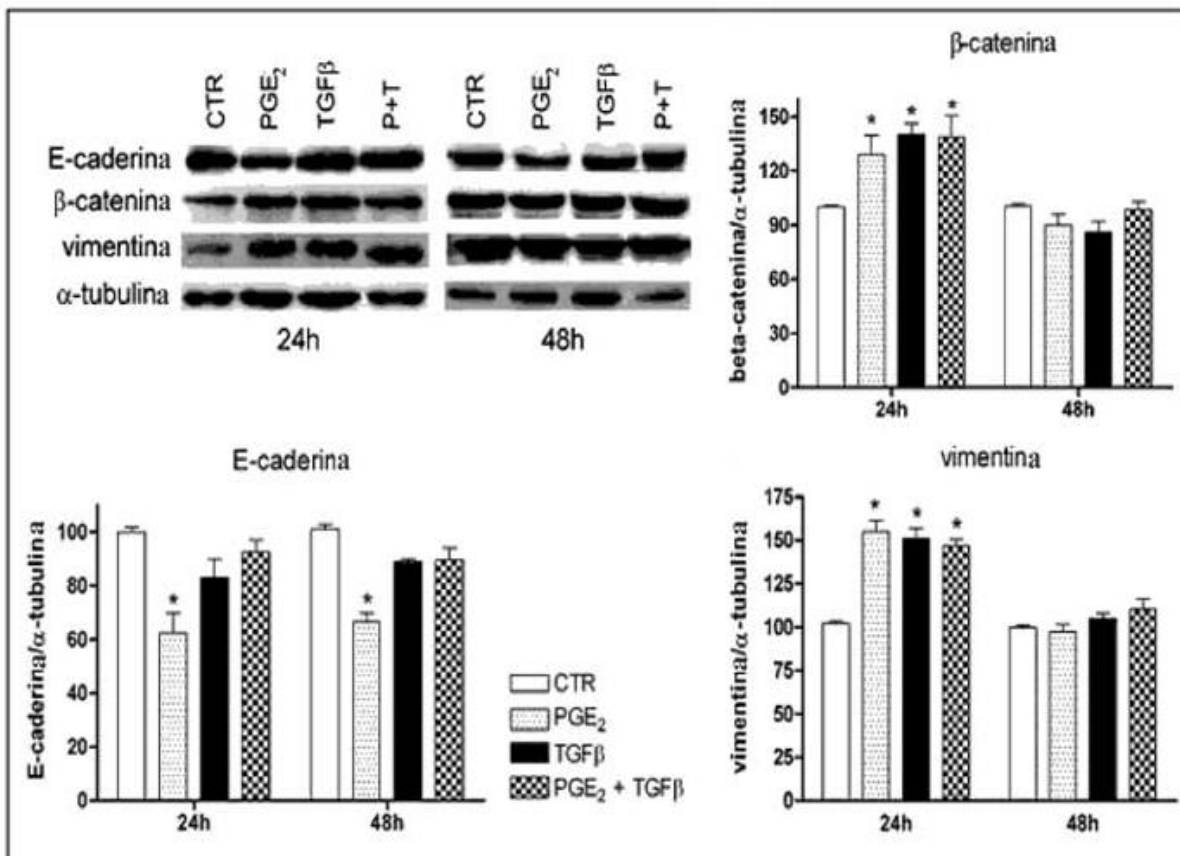
### **5.3 Avaliação da expressão e distribuição subcelular de marcadores epiteliais e mesenquimais e da organização do citoesqueleto de actina em células HT-29 tratadas com PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$ .**

#### **5.3.1 O tratamento isolado com PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$ altera os níveis de expressão protéica e de RNAm dos marcadores epiteliais e mesenquimais, mas não quando esses agentes são administrados em associação**

Após a confirmação de que TGF- $\beta$  foi capaz de causar alterações no fenótipo celular e na organização do citoesqueleto nas células A549, realizamos a análise da expressão e da localização subcelular dos marcadores epiteliais e mesenquimais, bem como da organização do citoesqueleto em células HT-29 tratadas com PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$ , respectivamente nas concentrações de 10 nM e 5 ng/ml. Resultados prévios obtidos por nosso grupo (dados não publicados), utilizando PGE<sub>2</sub>, mostraram que esse mediador inflamatório é capaz de atuar nessa linhagem celular induzindo efeitos pró-tumorais, como aumento de formação de colônias independente de ancoragem e da invasão celular. Dessa forma, analisamos os efeitos causados pela administração isolada e em conjunto de PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$ , em eventos relacionados a TEM e a migração celular.

Os resultados da análise por *Western blotting* (**Figura 5.6**) mostram que o tratamento com PGE<sub>2</sub> diminui de forma significativa (\*P<0.05) a expressão de E-caderina, quando aplicado de forma isolada durante 24h e 48h de tratamento. Já o tratamento com TGF- $\beta$  de forma isolada e em associação com PGE<sub>2</sub> (P+T), não altera de forma significativa a expressão de E-caderina, nos mesmos tempos, mostrando que a associação entre PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$  é capaz de prevenir o efeito de diminuição da expressão desta proteína, observada somente com PGE<sub>2</sub>.

Os tratamentos com PGE<sub>2</sub>, TGF- $\beta$  e P+T aumentam significativamente (\*P<0.05) os níveis da proteína  $\beta$ -catenina no tempo de administração de 24 h. Nenhum efeito significativo é notado durante os tratamentos com PGE<sub>2</sub>, TGF- $\beta$  e com P + T após 48 h. Pode-se observar também, que células HT-29 sem tratamento expressam um nível basal de vimentina. No entanto, quando tratadas com PGE<sub>2</sub>, TGF- $\beta$  e P+T, os níveis de expressão desta proteína aumentam significativamente (\*P<0.05) após 24 h. Já após 48 h, não se detectam alterações na expressão de vimentina em nenhum dos respectivos tratamentos quando comparado ao controle.

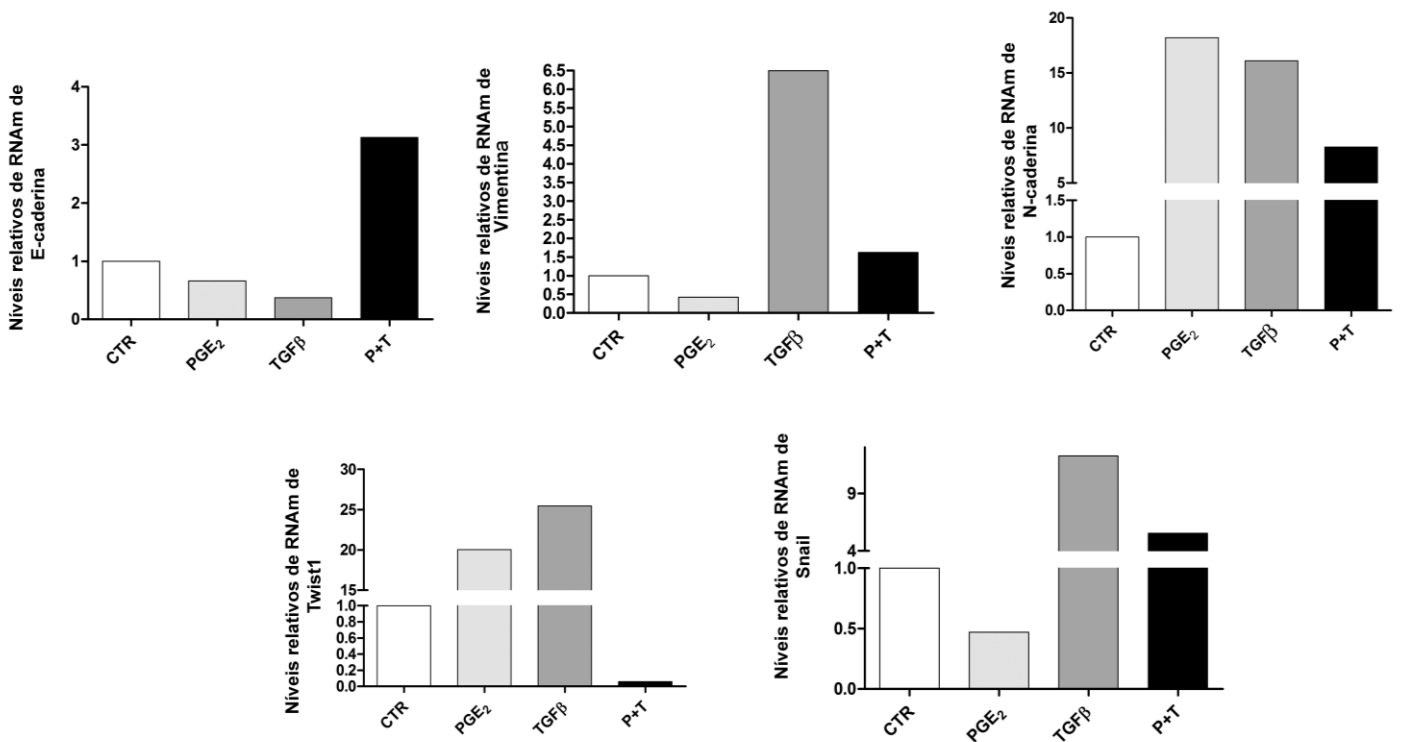


**Figura 5.6:** Análise da expressão protéica de marcadores epiteliais e mesenquimal em células HT-29 após 24h e 48h de tratamento com PGE<sub>2</sub> e TGF-β. Western blotting para as proteínas E-cadherina, β-catenina e vimentina. Os gráficos são representativos de dois experimentos independentes + SEM \*P<0.05 (ANOVA). P+T: PGE<sub>2</sub> + TGF-β.

Em seguida, foram analisados os níveis de expressão do RNA mensageiro (RNAm) (**Figura 5.7**) do marcador epitelial, E-cadherina, dos marcadores mesenquimais, vimentina e N-cadherina, além dos fatores transcricionais, *Twist1* e *Snail*, utilizando a técnica de *Real Time RT-qPCR* (do inglês, *Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*). A escolha desses fatores de transcrição ocorreu pelo fato de *Snail* ser o principal repressor transcricional de E-cadherina em diversos tipos de tumores epiteliais (Mimeault & Batra, 2013), enquanto que *Twist1*, além de reprimir E-cadherina, se relaciona ao aumento de expressão da proteína RhoA/RhoC em linhagens epiteliais, como as de tumores de mama (Bourguignon et al., 2010).

A análise dos resultados após o tratamento com PGE<sub>2</sub> e TGF-β, respectivamente, por 24h, mostra que, isoladamente, os agentes são capazes de reduzir parcialmente os níveis do RNAm de E-caderina, enquanto que o tratamento combinado, é capaz de aumentar drasticamente os níveis de expressão do RNAm dessa proteína. Surpreendentemente, é possível observar uma redução dos níveis de RNAm de vimentina após o tratamento isolado com PGE<sub>2</sub>. Porém, a expressão do RNAm de vimentina, aumenta drasticamente após o tratamento com TGF-β. No tratamento combinado entre os dois agentes, os níveis de expressão de RNAm desta proteína atingem níveis próximos do controle. Já os níveis de RNAm de N-caderina se apresentam elevados após os tratamentos com PGE<sub>2</sub>, TGF-β e P+T, embora neste último caso haja uma redução parcial em comparação aos tratamentos isolados.

Na análise da expressão do RNAm dos fatores transcricionais, os tratamentos isolados com PGE<sub>2</sub> e TGF-β, aumentam os níveis de *Twist1*, enquanto o tratamento combinado diminui drasticamente esses níveis em relação ao controle. Inesperadamente, a expressão do RNAm de *Snail* se apresenta diminuída após o tratamento com PGE<sub>2</sub>, enquanto o tratamento com TGF-β e o tratamento combinado entre os dois agentes é capaz de aumentar os níveis desse fator de transcrição em relação ao controle. Porém, no último caso, em níveis menores que o tratamento isolado com TGF-β.



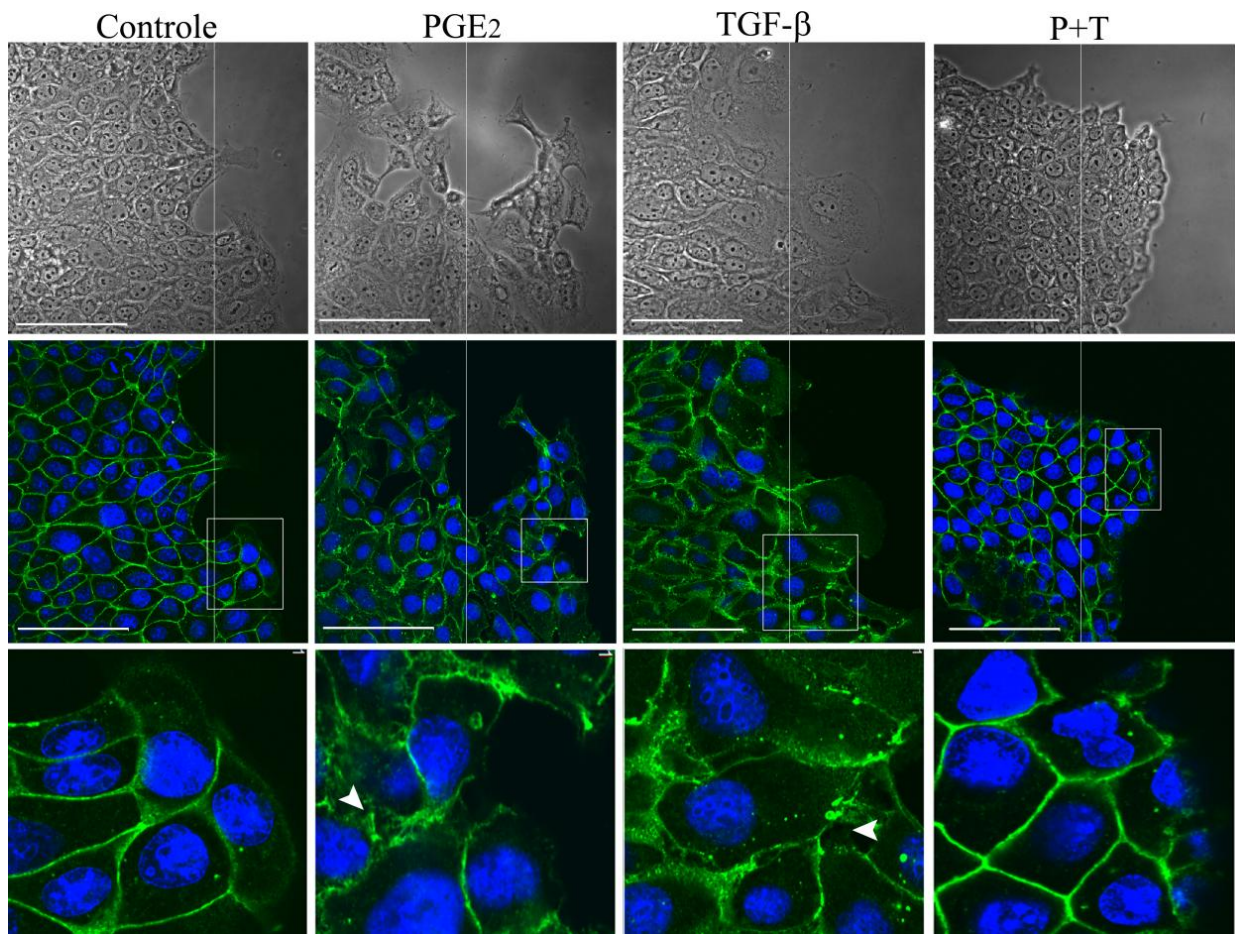
**Figura 5.7:** Análise da expressão do RNAm dos marcadores epitelial e mesenquimais, e de fatores de transcrição em células HT-29 após tratamento com PGE<sub>2</sub> e TGF-β por 24h. Células foram tratadas como indicado e submetidas a técnica de RT-qPCR para as proteínas E-caderina, vimentina e N-caderina e para os fatores transcricionais *Twist 1* e *Snail*. Os gráficos são representativos de um experimento. P+T: PGE<sub>2</sub> + TGF-β.

### 5.3.2 O tratamento isolado com PGE<sub>2</sub> e TGF-β altera a localização subcelular de marcadores epiteliais e mesenquimal, mas não quando esses agentes são administrados de forma associada

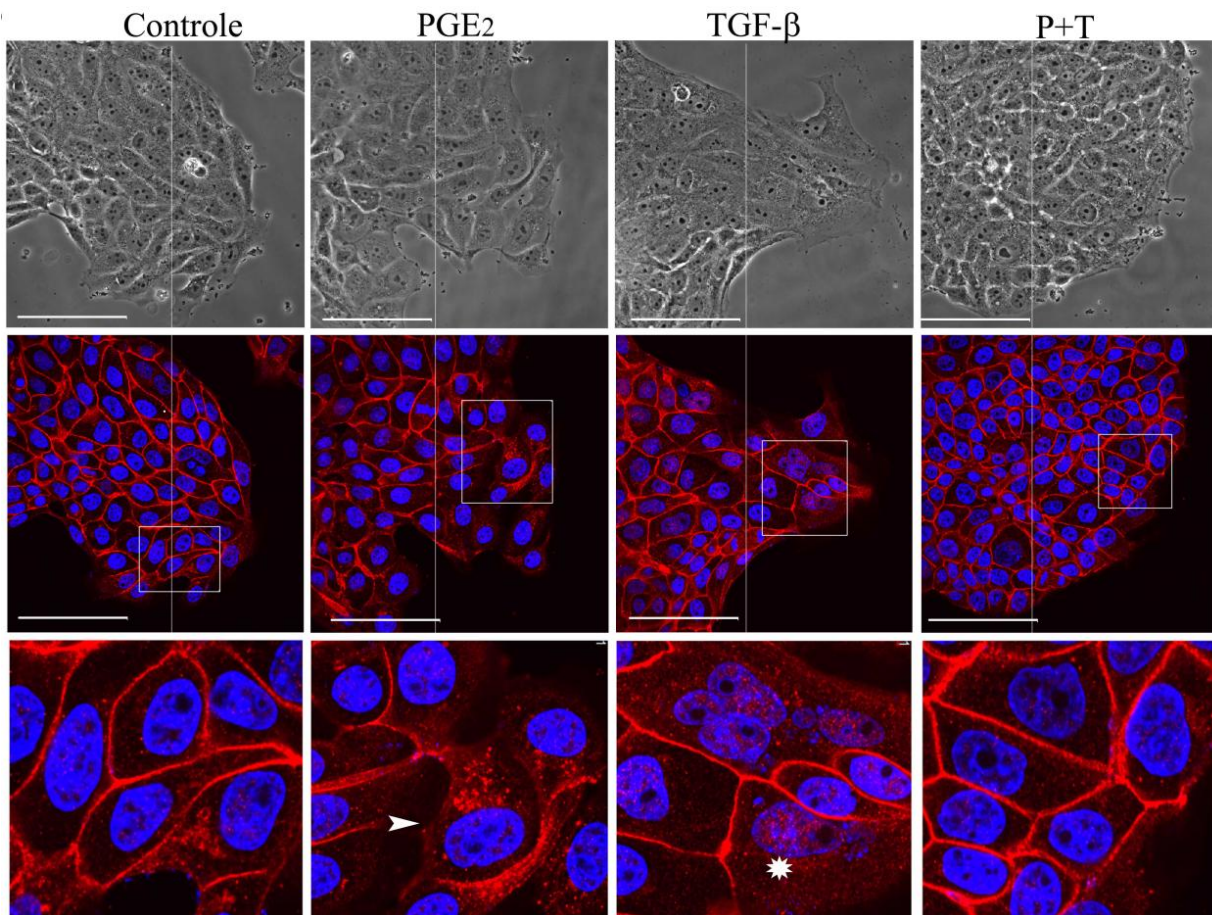
A análise da localização subcelular pela técnica de imunofluorescência mostra que tanto o tratamento isolado com PGE<sub>2</sub>, quanto com TGF-β, perturba as junções célula-célula alterando a localização subcelular das proteínas E-caderina (**Figura 5.8**) e β-catenina (**Figura 5.9**), após 24h de tratamento, principalmente no *front* de migração das células HT-29. No entanto, o tratamento associado entre esses dois agentes inibe o

efeito causado pelo tratamento isolado de cada um desses agentes, prevenindo a desorganização do contato celular e mantendo a E-caderina e  $\beta$ -catenina nas junções intercelulares. Surpreendentemente, observamos a presença de marcações pontuais de  $\beta$ -catenina na região nuclear quando tratado com TGF- $\beta$ , indicando um acúmulo nessa organela, o que pode sugerir um aumento da atividade de seus alvos transcricionais no núcleo.





**Figura 5.8:** Análise da localização subcelular do marcador epitelial E-caderina em células HT-29 após 24h de tratamento com PGE<sub>2</sub> e TGF-β. Imunofluorescência após *wound healing* para a proteína E-caderina. Note as cabeças de seta nas figuras da parte inferior, que representam regiões aumentadas correspondentes àquelas destacadas num quadrado nas imagens da parte média da figura, indicando alteração e perda de marcação de E-caderina em regiões de contato célula-célula e a recuperação da localização após tratamento associado com os agentes. Imagens foram obtidas por microscopia confocal. Na parte superior da figura são mostradas imagens obtidas por contraste de fase dos respectivos tratamentos. O DAPI foi utilizado para marcação nuclear. P+T: PGE<sub>2</sub> + TGF-β. Barra na parte superior e média: 50 μm. Zoom óptico na parte inferior: 66,67 X.



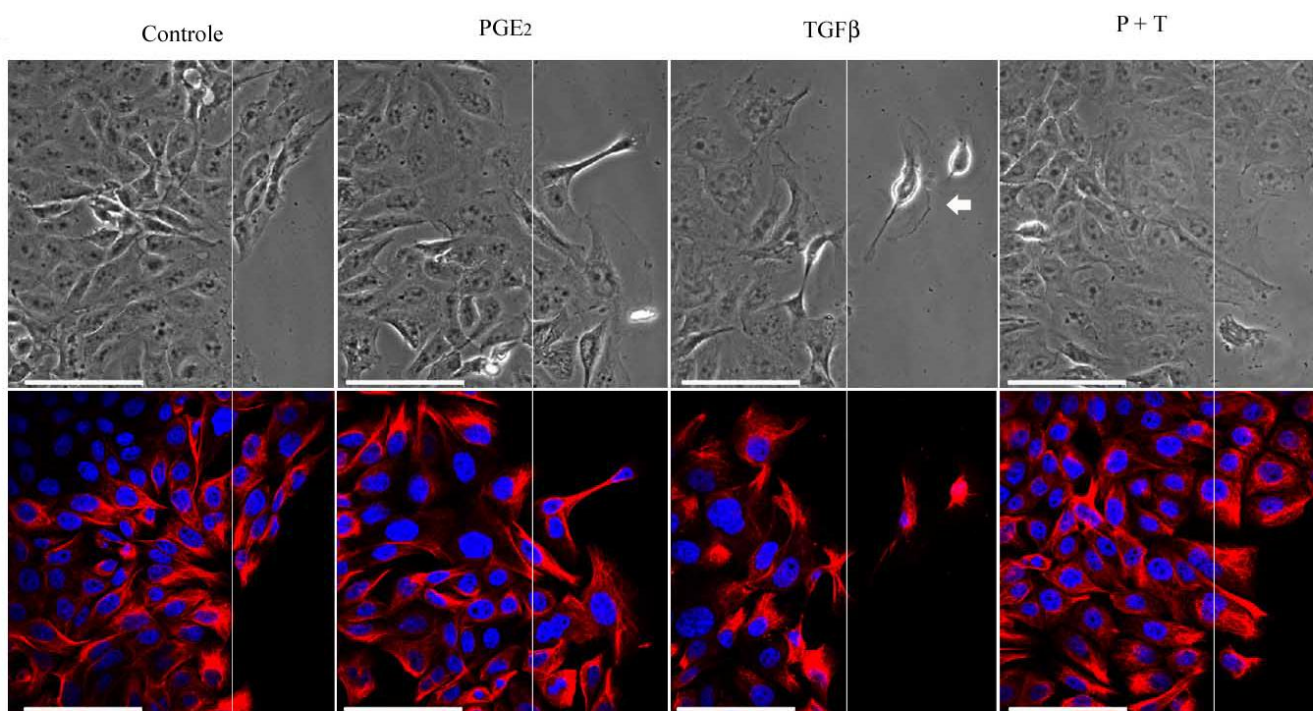
**Figura 5.9:** Análise da localização subcelular da proteína  $\beta$ -catenina em células HT-29 após 24h de tratamento com  $\text{PGE}_2$  e  $\text{TGF-}\beta$ . Imunofluorescência após *wound healing* para a proteína  $\beta$ -catenina. Note a cabeça de seta e o asterisco nas figuras da parte inferior, que representam regiões aumentadas correspondentes àquelas destacadas num quadrado nas imagens da parte média da figura, indicando, respectivamente, a perda de marcação de  $\beta$ -catenina em regiões de contato célula-célula e o acúmulo de  $\beta$ -catenina nuclear. Imagens foram obtidas por microscopia confocal. Na parte superior da figura são mostradas imagens obtidas por contraste de fase dos respectivos tratamentos. O DAPI foi utilizado para marcação nuclear. P+T:  $\text{PGE}_2$  +  $\text{TGF-}\beta$ . Barra na parte superior e média: 50  $\mu\text{m}$ . Zoom óptico na parte inferior: 66,67 X.



5.3.3 O tratamento isolado com PGE<sub>2</sub> e TGF-β altera a localização subcelular de vimentina, bem como a organização do citoesqueleto de actina, mas quando esses agentes são administrados de forma associada ocorre uma aparente reversão destes efeitos em células HT-29

Em seguida, foi feita a análise de distribuição dos filamentos intermediários de vimentina pela técnica de imunofluorescência, após o tratamento por 24h com PGE<sub>2</sub>, TGF-β e P+T.

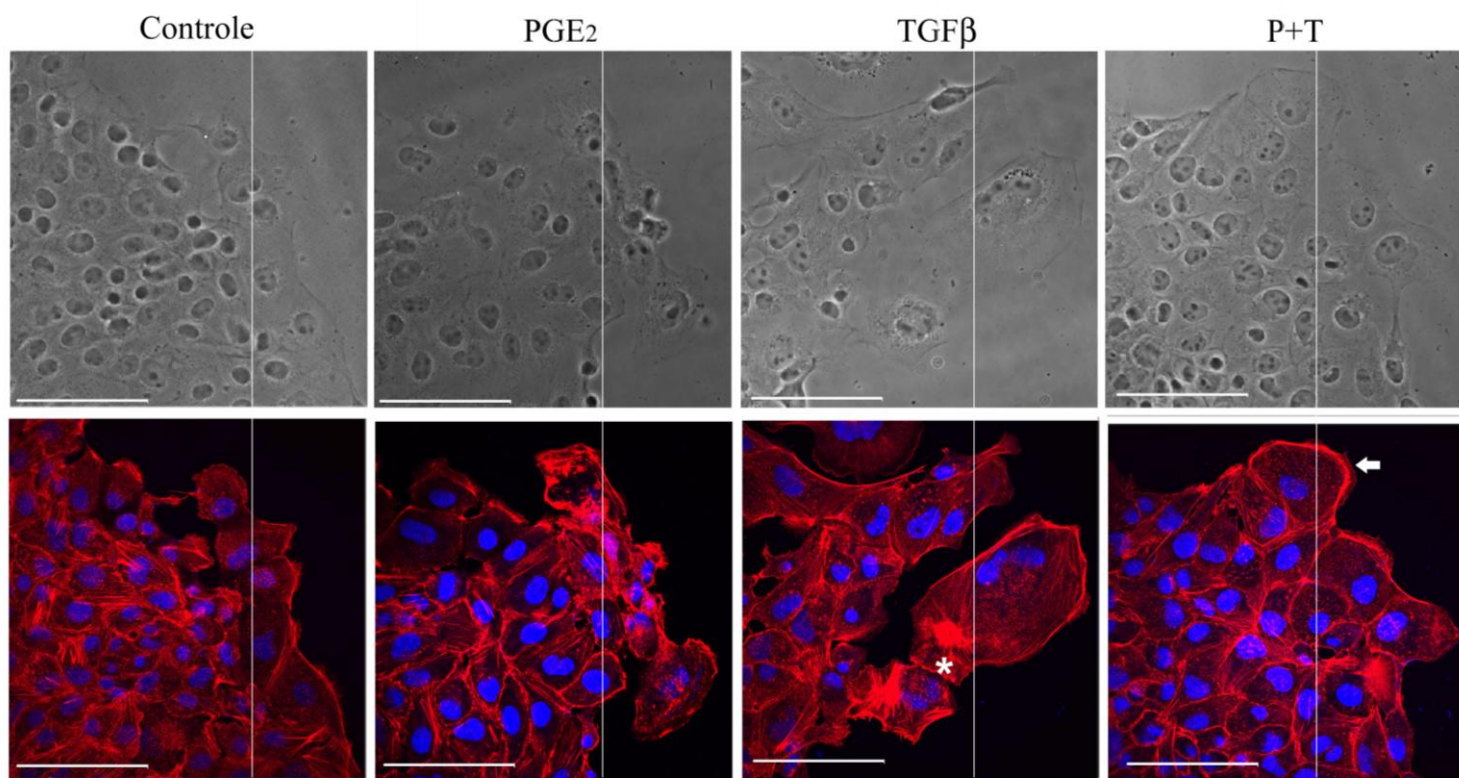
Foi possível observar que os tratamentos isolados com PGE<sub>2</sub> e TGF-β causam uma visível redistribuição desses filamentos, principalmente em regiões localizadas nas protrusões de membranas do tipo lamelipódio no *front* de migração celular. No tratamento em associação com esses agentes (P+T), se observa uma reversão parcial da localização de vimentina nessa região, embora possam ser observadas protrusões de membranas nesse local (**Figura 5.10**).



**Figura 5.10: Localização subcelular do marcador mesenquimal vimentina em células HT-29 após 24h de tratamento com PGE<sub>2</sub> e TGF-β.** Imunofluorescência após *wound healing* para os filamentos intermediários de vimentina. Note a concentração de vimentina nas protrusões de células migratórias presentes no *front*. Imagens foram obtidas por microscopia confocal. A seta na figura indica a presença de protrusão de membrana do tipo lamelipódio. Na parte superior da figura são mostradas imagens obtidas por contraste de fase dos respectivos tratamentos. O DAPI foi utilizado para marcação nuclear. P+T: PGE<sub>2</sub> + TGF-β. Barra: 50 μm.

A mesma análise foi realizada para o perfil de organização do citoesqueleto de actina de actina, após os mesmos tratamentos (**Figura 5.11**).

Os tratamentos isolados com PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$  mostram que os filamentos de F-actina sofrem uma redistribuição nas regiões próximas ao *front* de migração celular, em células que apresentam protrusões de membrana do tipo lamelipódio. É interessante observar, no tratamento com TGF- $\beta$ , a formação de *clusters* de actina na região oposta ao *front* de migração, onde são recrutadas proteínas para formação de adesões focais que organizam e orientam a formação de fibras de estresse durante o evento migratório (Humphries et al., 2007). Por outro lado, o tratamento combinado entre esses dois agentes foi capaz de inibir a redistribuição dos filamentos de actina, mantendo um padrão de marcação predominantemente cortical na *leading edge*, como pode ser observado no controle.



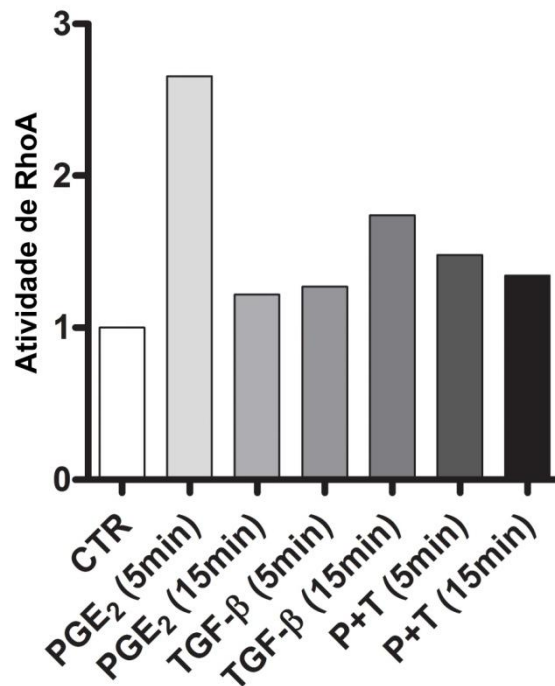
**Figura 5.11: Análise da organização do citoesqueleto de actina em células HT-29 após 24h de tratamento com PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$ .** Células foram crescidas, submetidas à técnica de *wound healing* e, após os respectivos tratamentos, marcadas com faloidina conjugada a rodamina. O asterisco mostra a concentração de *clusters* de actina nas células do *front* tratadas com TGF- $\beta$  e a seta indica a localização cortical de actina de células migratórias presentes no *front*, após o tratamento combinado (P+T). Imagens foram obtidas por microscopia confocal. Na parte superior da figura são mostradas imagens obtidas por contraste de fase dos respectivos tratamentos. O DAPI foi utilizado para marcação nuclear. P+T: PGE<sub>2</sub> + TGF- $\beta$ . Barra: 50  $\mu$ m.

## **5.4 Avaliação da atividade de RhoA, migração, capacidade de adesão célula-célula e célula-substrato e formação de adesões focais em células HT-29 tratadas com PGE<sub>2</sub> e TGF-β.**

### **5.4.1 O tratamento isolado com PGE<sub>2</sub> e TGF-β aumenta a atividade da GTPase RhoA, mas a associação entre esses agentes não altera essa atividade em células HT-29**

A proteína RhoA possui importante papel durante o processo de migração, uma vez que sua ativação aumenta a formação de estruturas filamentosas de actina, conhecidas como fibras de estresse, essenciais no processo de transmissão de forças mecânicas entre a célula e o substrato, através da formação de contatos focais (Gad et al, 2012).

A fim de investigarmos se os tratamentos com PGE<sub>2</sub>, TGF-β e P+T eram capazes de ativar a proteína RhoA, as células foram crescidas, tratadas com esses agentes por 5 e 15 minutos e a atividade de RhoA foi determinada utilizando o kit G-lisa®. Os resultados observados mostram que o tratamento isolado com PGE<sub>2</sub> é capaz de aumentar em quase o triplo a atividade da proteína RhoA em comparação ao controle, após 5 min. No entanto, o mesmo tratamento com PGE<sub>2</sub>, durante o período de 15 min, não altera os níveis de ativação de RhoA. No tratamento com TGF-β, durante o tempo de 5 min, não se observa a ativação de RhoA em comparação ao controle. Porém, com 15 min de tratamento, esse mesmo agente eleva a atividade dessa proteína em relação ao controle em quase duas vezes. Já o tratamento associado entre PGE<sub>2</sub> e TGF-β, causa uma reversão parcial nos níveis de atividade da proteína RhoA em comparação ao controle, tanto em 5 quanto em 15min (**Figura 5.12**).



**Figura 5.12:** Análise da atividade da proteína RhoA em células HT-29 após o tratamento com PGE<sub>2</sub> e TGF-β. Células foram tratadas como indicado e a atividade da proteína RhoA foi detectada e quantificada utilizando o kit G-lisa®. Os gráficos de barras são representativos de um único experimento. P+T: PGE<sub>2</sub> + TGF-β.

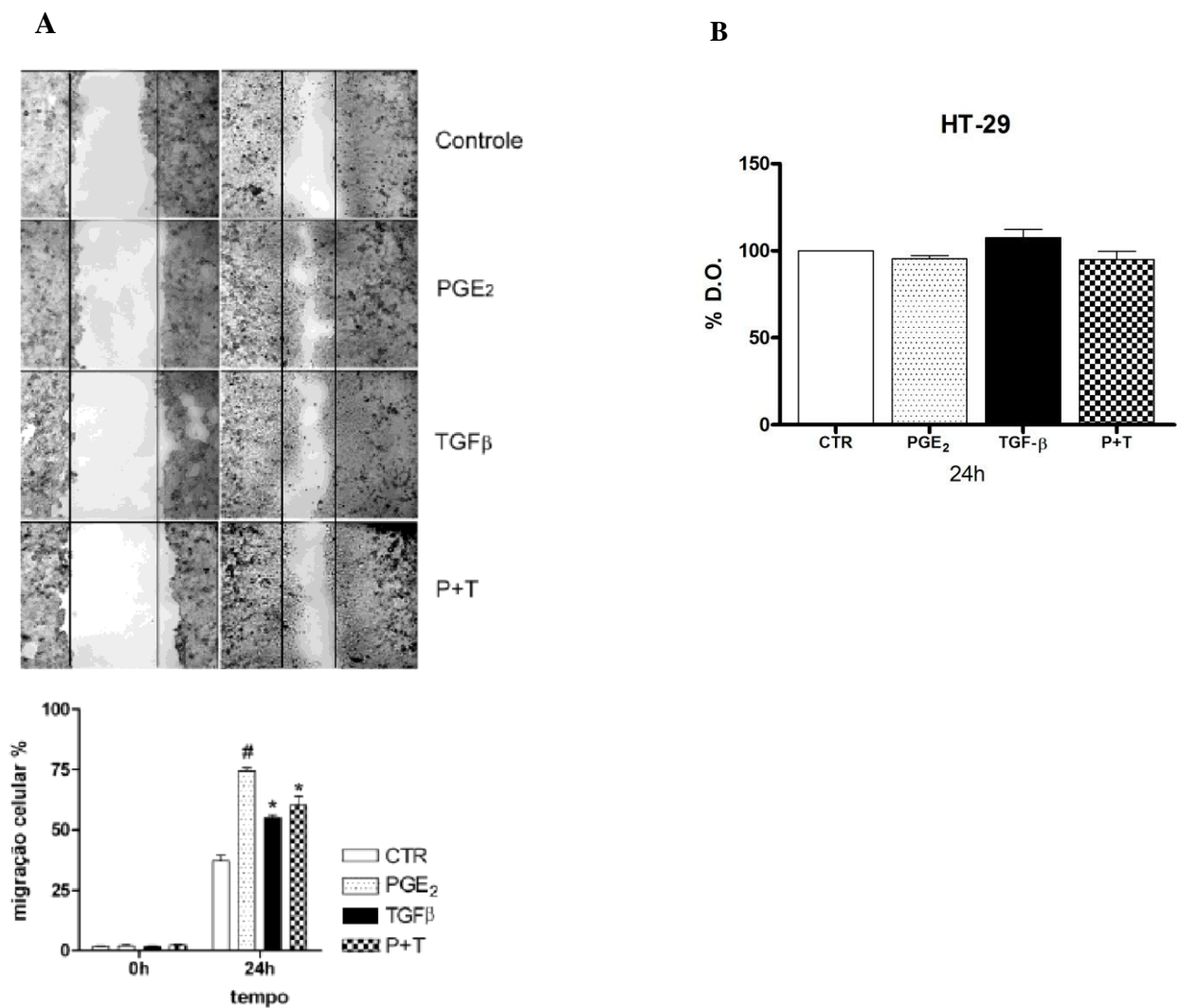
#### 5.4.2 O tratamento isolado de PGE<sub>2</sub> e TGF-β assim como a associação entre os dois agentes aumenta a capacidade migratória de células HT-29

A alta capacidade migratória adquirida pelas células transformadas é um dos principais eventos envolvidos com a progressão de diversos tumores epiteliais e que é estimulado por agentes inflamatórios persistentes nesse microambiente alterado (Wilson et al., 2013). Frente a esse contexto, PGE<sub>2</sub> e TGF-β, se destacam como dois mediadores secretados mutuamente no tecido acometido pelo tumor, estando relacionados com o aumento da capacidade migratória de células cancerígenas (Vo et al., 2013). A capacidade de migração após os diferentes tratamentos com estes agentes foi analisada pela técnica de *wound healing*, após 24 h de tratamento (**Figura 5.13**).

Os resultados mostram que, após o tempo de 24 h, o tratamento isolado com PGE<sub>2</sub>, causa significativo aumento da migração celular, quando comparado ao controle. Esse

resultado também é observado no tratamento isolado com TGF- $\beta$ . Inesperadamente, o tratamento associado desses dois agentes, no tempo de 24 h, mostra um aumento parcial da migração se comparado ao controle, embora de forma menos efetiva do que o tratamento isolado de PGE<sub>2</sub>, demonstrando que o tratamento associado, aparentemente, possui um efeito supressor, principalmente, sobre a capacidade de PGE<sub>2</sub>, isoladamente, induzir um aumento da migração celular (**Figura 5.13 A**).

A fim de avaliarmos se o aumento da migração celular se deve ao efeito de PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$ , e não a um eventual aumento da capacidade proliferativa das células HT-29 realizamos o ensaio de cristal violeta, para avaliar a capacidade de proliferação das células tratadas com esses agentes após 24 h. Os resultados mostram que nenhum dos tratamentos leva a alterações significativas na capacidade proliferativa neste período de tempo (**Figura 5.13 B**).



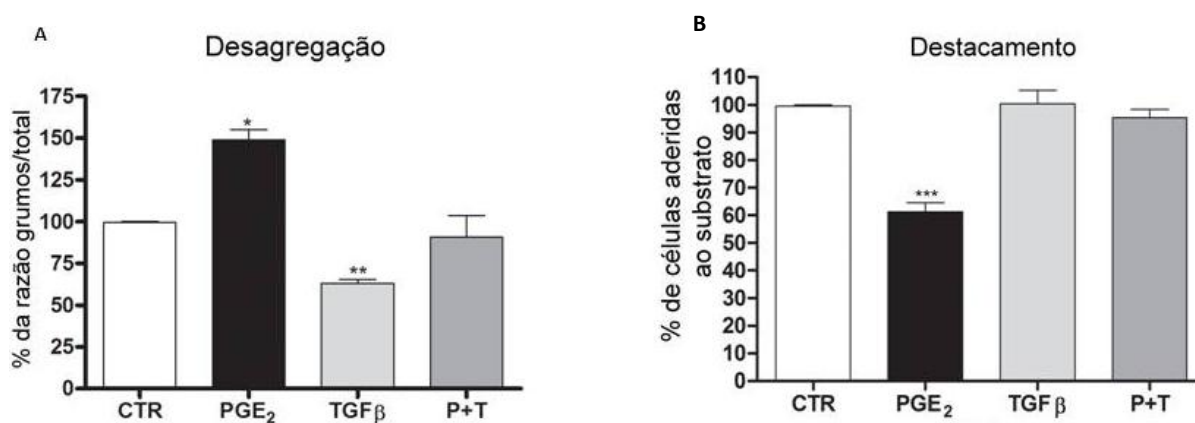
**Figura 5.13: Análise da migração e proliferação celular na linhagem HT-29 após o tratamento com PGE<sub>2</sub> e TGF-β durante 24h.** (A) Células foram cultivadas, submetidas a técnicas de *wound healing* e tratadas como indicado para avaliação da migração celular. (B) Análise da proliferação usando a técnica de cristal violeta. Os gráficos representam a média do resultado de três experimentos independentes + S.E.M. \*  $p < 0.05$ , #  $p < 0.01$  (ANOVA). P+T: PGE<sub>2</sub> + TGF-β.



### 5.4.3 O tratamento isolado com PGE<sub>2</sub> e TGF-β altera a capacidade de desagregação e destacamento celular, mas a associação desses agentes aparentemente inibe esses efeitos em células HT-29

Durante as etapas que envolvem eventos como aumento da migração e invasão celular, células tumorais alteram sua capacidade de adesão célula-célula e célula-matriz, respectivamente em resposta a alterações na estrutura do complexo juncional apical e na interação das células com proteínas da matriz extracelular, como as integrinas (Sit & Manser, 2011). Dessa forma, investigamos a capacidade das células HT-29 desagregarem umas das outras e destacarem do substrato após o tratamento com PGE<sub>2</sub> e TGF-β, durante o tempo de 24h (**Figura 5.14**).

A análise dos resultados mostra que o tratamento isolado com PGE<sub>2</sub> é capaz de aumentar a formação de aglomerados celulares (grupo de 3 ou mais células) em relação ao grupo controle. Porém, o tratamento isolado com TGF-β aumenta a capacidade de desagregação das células HT-29. No entanto, o tratamento associado entre os dois agentes não altera a desagregação de forma significativa em relação ao controle (**Figura 5.14 A**). Por outro lado, o tratamento isolado com PGE<sub>2</sub> aumenta de modo significativo a capacidade de destacamento das células do substrato, enquanto o tratamento isolado com TGF-β não altera a adesão célula-substrato o que também é observado em relação ao tratamento em associação entre os dois agentes (**Figura 5.14 B**).



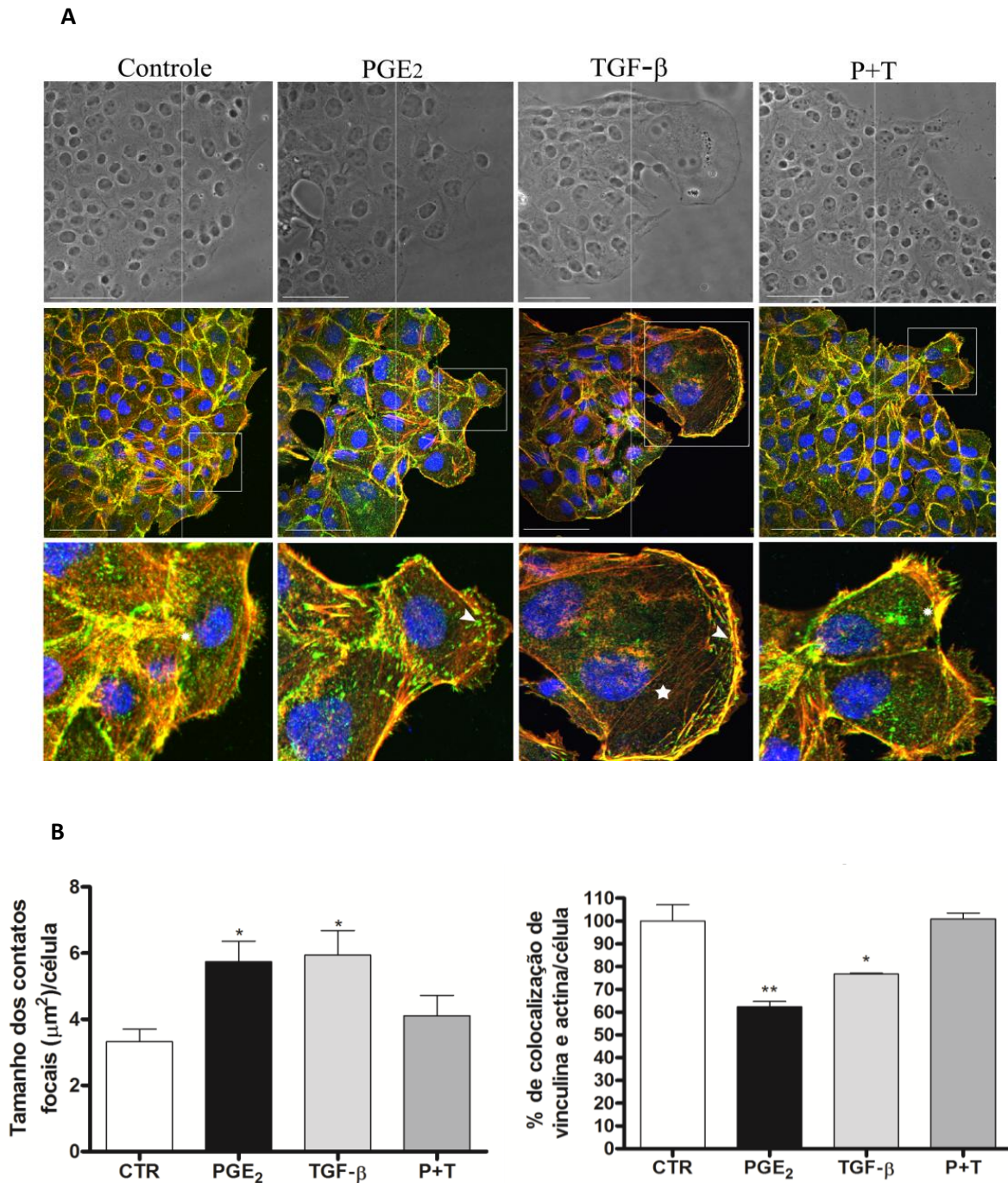
**Figura 5.14:** Análise da capacidade de adesão célula-célula e célula-substrato na linhagem HT-29 após o tratamento com PGE<sub>2</sub> e TGF-β durante 24h. Células foram incubadas e tratadas como indicado, sendo a adesão célula-célula e célula-substrato avaliadas, respectivamente, pelo ensaio de (A) desagregação e (B) destacamento. Os gráficos representam a média do resultado de três experimentos independentes + S.E.M. \* p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 (ANOVA). P+T: PGE<sub>2</sub> + TGF-β.

#### 5.4.4 O tratamento isolado com PGE<sub>2</sub> e TGF-β aumenta a formação de adesões focais e diminui a co-localização vinculina-actina, mas não quando esses agentes são administrados de forma associada em células HT-29

Alguns estudos apontam a importância exercida pela vinculina nas forças de tensão que medeiam a ligação entre o citoesqueleto de actina e receptores de membrana como as integrinas durante os eventos de invasão e migração celular (Ziegler et al., 2006). Nesse contexto, é conhecido o papel exercido por TGF-β no recrutamento de proteínas de adesão focal que se ligam a actina, dentre elas a vinculina, em eventos migratórios que envolvem linhagens celulares tumorais do epitélio, como a A549 (Tada et al., 1997). No entanto, o papel exercido por PGE<sub>2</sub> no contexto da expressão e ativação de vinculina ainda não é muito bem descrito em CCR, embora estudos demonstrem que esse prostanóide é capaz de aumentar a adesão celular, a migração e a invasão através da ativação de proteínas de adesão focal como paxilina e FAK, em tumores hepáticos (Bai et al., 2006).

Dessa forma, decidimos analisar a formação de adesões focais utilizando a marcação de faloidina conjugada a rodamina para detecção de filamentos de actina e o anticorpo contra a proteína vinculina, sendo a análise realizada por microscopia confocal, após o tratamento com PGE<sub>2</sub> e TGF-β (**Figura 5.15**).

Os resultados obtidos por microscopia confocal e análise morfométrica mostram que o tratamento isolado com PGE<sub>2</sub> é capaz de aumentar o recrutamento de proteínas de adesões focais na região do *front* de migração onde ocorre a co-localização de vinculina com actina em resposta ao tratamento. No entanto, a co-localização dessas proteínas diminui na região da lamela e da *leading edge* da célula. Os mesmos resultados foram observados para o tratamento isolado com TGF-β, embora possa ser notado um aumento da co-localização vinculina/actina na extremidade da borda celular após o tratamento com esse agente. O tratamento em associação entre PGE<sub>2</sub> e TGF-β não altera o tamanho das adesões focais nem a porcentagem de co-localização entre vinculina e actina em comparação ao controle.



**Figura 5.15:** Análise da distribuição e quantificação da formação de adesões focais identificadas pela co-localização entre vinculina e actina em células HT-29 após tratamento com PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$  durante 24h. (A) Células foram cultivadas, submetidas a técnica de *wound healing*, tratadas como indicado e marcadas com faloidina-rodamina e anti-vinculina. (B) Análise morfométrica do tamanho das adesões focais, assim como da porcentagem de co-localização de vinculina e actina. As cabeças de seta, nas figuras da parte inferior que representam os maiores aumentos das regiões destacadas nas figuras do meio, indicam regiões onde o tamanho dos contatos focais é maior e a colocização entre vinculina e actina é mais fraca (verde), enquanto que o asterisco, também nas figuras da parte inferior, indica uma região onde o tamanho das adesões focais é menor e a colocização é mais forte (amarelo). A estrela, também na figura da parte inferior, indica a formação de fibras de estresse. Imagens foram obtidas por microscopia confocal. Na parte superior da figura são mostradas imagens obtidas por contraste de fase dos respectivos tratamentos. Os gráficos representam a média do resultado de dois experimentos independentes + S.E.M. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  (ANOVA). P+T: PGE<sub>2</sub> + TGF- $\beta$ . Barra na parte superior e média: 50  $\mu\text{m}$ . Zoom óptico na parte inferior: 66,67 X.

Juntos, estes resultados indicam que os tratamentos isolados com PGE<sub>2</sub> e TGF-β, são capazes de alterar parâmetros que levam ao desenvolvimento de um fenótipo celular mais agressivo tais como aumento da expressão de marcadores mesenquimais e diminuição de marcadores epiteliais, perda de contato intercelular e entre a célula e o substrato, bem como aumento do potencial migratório, enquanto o tratamento associado entre esses dois agentes, na maior parte das vezes, inibiu esses eventos na linhagem celular HT-29.

## 6. DISCUSSÃO

O processo inflamatório se destaca como uma resposta do sistema imune no combate a patógenos e agentes externos que levam a perturbação da homeostase do organismo. Quando o estímulo inflamatório persiste por longos períodos, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, podem gerar uma resposta exacerbada e descontrolada da inflamação, tornando-a crônica, e alterando a fisiologia de vários órgãos e tecidos, incluindo o epitelial (Elinav et al., 2013). Nesse contexto, o intestino é uma estrutura constantemente submetida à estímulos inflamatórios decorrentes do estresse mecânico diário sofrido e pela função absorptiva dos enterócitos durante a digestão. Assim, o microambiente inflamatório estabelecido, dentre outros fatores, pode acarretar num desbalanço proliferativo e, conseqüentemente, na progressão da seqüência adenoma-carcinoma, culminando no desenvolvimento da metástase (Klein-Goldberg et al., 2013).

Vários fatores inflamatórios são secretados no próprio microambiente tumoral dentre eles a PGE<sub>2</sub> e o TGF- $\beta$ . Ambos são conhecidos como mediadores de importantes em eventos relacionados à progressão de diversos tipos de câncer, incluindo o CCR (Baratelli et al., 2010; Ding et al., 2010; Tiam & Schiemann, 2010), uma vez que são sintetizados em grandes quantidades por células do próprio sistema imune e/ou por células tumorais que se encontram em estado hiperproliferativo em seus sítios de localização (Su et al., 2010). Os efeitos de ambos mediadores vêm sendo analisados de forma isolada em eventos relacionados ao CCR. No entanto, estudos mostrando a associação destes fatores pró-inflamatórios na progressão deste tipo de câncer tem sido pouco explorados.

No presente estudo utilizamos, inicialmente, a linhagem celular de carcinoma de pulmão A549, com o intuito de reproduzirmos os efeitos de indução da TEM desencadeado por TGF- $\beta$ , já conhecidos para essas células e, adicionalmente, observamos alterações na organização do citoesqueleto de actina em resposta ao tratamento com esse agente inflamatório. Diversos estudos mostram que TGF- $\beta$ , na linhagem A549, é capaz de causar alterações na expressão e localização subcelular de marcadores epiteliais e mesenquimais, bem como intensificar processos relacionados a um fenótipo tumoral mais agressivo, como aumento da migração e invasão (Edlund et al., 2002; Kasai et al., 2005). Em nosso estudo, observamos que essas células adquirem um fenótipo fibroblástico e facilidade de destacamento no *front* de migração quando comparado ao grupo controle (**Figura 5.1**). Observamos também, diminuição da

expressão de E-caderina e aumento dos níveis de  $\beta$ -catenina (**Figura 5.2 A**), assim como perda de contato célula-célula e aquisição de um fenótipo indiferenciado nas células do *front* migratório, como observado por imunofluorescência para estas proteínas (**Figura 5.2 B**). Esses resultados corroboram com os já descritos na literatura e confirmam o efeito do TGF- $\beta$  na indução de eventos relacionados com a TEM (Medici et al. 2006; Ikushima & Miyazono, 2012; Vo et al., 2013).

De forma interessante, observamos também aumento nos níveis do marcador mesenquimal N-caderina, mas não da proteína vimentina (**Figura 5.3 A**). Um estudo realizado por Meng et al. (2011) mostrou que o tratamento dessa linhagem celular com TGF- $\beta$ , na concentração de 5 ng/ml, durante 24 h, não foi capaz de alterar significativamente os níveis de expressão protéica de vimentina, sendo observadas alterações significativas na expressão dessas proteínas a partir de 48 h e 72 h de tratamento com esse agente. Esse resultado pode refletir uma resposta dose, tempo e célula específica de TGF- $\beta$ , uma vez que em outras linhagens celulares como a SW480, derivada de adenocarcinoma colorretal, esse agente foi capaz de aumentar a expressão de vimentina no período de 24 h de tratamento (Li et al., 2010). De qualquer maneira, o aumento na intensidade de marcação de N-caderina em células com perfil migratório e a localização da vimentina na borda de células do *front* após o tratamento com TGF- $\beta$  (**Figura 5.3 B**), corroboram os resultados observados na literatura (Yang et al., 2013).

Ainda, em células A549, observamos um aumento da formação de fibras de estresse (**Figura 5.4**) e da capacidade migratória nessa linhagem após o tratamento com TGF- $\beta$  (**Figura 5.5 A**). O aumento de fibras de estresse indica um fenótipo mais agressivo das células tumorais (Edlund et al., 2002). Juntos, esses resultados mostram que TGF- $\beta$  é um importante indutor do processo migratório em células tumorais que sofrem TEM, o que pode resultar em um estágio subsequente de intravasão destas na corrente sanguínea e, posteriormente, no desenvolvimento de metástases (Wakefield & Hill, 2013).

Após a confirmação dos efeitos causados por TGF- $\beta$  em eventos relacionados com o desenvolvimento da TEM nas células A549, analisamos o efeito de PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$  na linhagem HT-29. Resultados observados por nosso Grupo indicam que quando essas células são tratadas com ambos mediadores inflamatórios, de forma isolada, são capazes de induzir alterações na morfologia e em eventos funcionais, tais como o desenvolvimento de um fenótipo mesenquimal, bem como o aumento da invasão e formação de colônias dependente e independente de ancoragem (dados não publicados).

Em relação à presença desses dois mediadores inflamatórios no microambiente tumoral, alguns estudos relatam resultados contraditórios quanto à modulação exercida por COX-2 e TGF- $\beta$  em modelos que mimetizam o CCR. Um estudo mostrou que células normais de epitélio intestinal de rato, RIE-1, transformadas com o oncogene *RAS* e que superexpressam a GTPase RhoA, quando tratadas com um anticorpo contra TGF- $\beta$ , não foram capazes de alterar a expressão da enzima precursora de PGE<sub>2</sub> (Du et al., 2005). Por outro lado, Jain et al.(2004) publicou um trabalho mostrando que alguns antiinflamatórios não esteroidais, como a indometacina e a aspirina, são capazes de aumentar a expressão de um gene antitumoral pertencente à superfamília de TGF- $\beta$ , conhecido como NAG-1, levando a redução de COX-2 e, indiretamente, contribuindo para reversão do fenótipo maligno em células HCT-116, derivadas de CCR. Dessa forma, e dando continuidade ao projeto acima mencionado, no presente estudo analisamos os eventos relacionados com a TEM desencadeados pelo tratamento em associação com PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$  e, em particular com a aquisição do potencial migratório.

O presente estudo, usando células HT-29, mostra que o perfil de expressão da E-caderina foi diminuído após o tratamento com PGE<sub>2</sub>, enquanto a proteína  $\beta$ -catenina e o marcador mesenquimal vimentina, apresentaram aumento nesses níveis em todos os tratamentos realizados (**Figura 5.6**). Esses resultados indicam que PGE<sub>2</sub> ao diminuir a expressão de E-caderina poderia estar induzindo TEM como já foi descrito (Rodriguez et al., 2012), e confirmam seu efeito tumorigênico (Kim et al., 2011; Jee et al., 2012). Por outro lado, o fato de TGF- $\beta$  não ser capaz de alterar a expressão desse marcador epitelial, parece ser contraditório frente a alguns resultados observados no presente estudo. No entanto, esse achado pode ser explicado pela concentração em que esse fator inflamatório foi administrado, bem como a linhagem celular utilizada, além do conhecido papel dual exercido por TGF- $\beta$  frente às distintas etapas do desenvolvimento carcinogênico (Meulmeester & Dijke, 2011). Estudos vêm mostrando que o aumento dos níveis citoplasmáticos de  $\beta$ -catenina, é essencial para a indução e manutenção do processo da TEM em células iniciadoras do evento carcinogênico, bem como nas células que já se encontram em estágios intermediários e tardios da progressão do CCR (Senda et al., 2007). A expressão aumentada dos níveis totais de  $\beta$ -catenina não traduz, necessariamente, uma maior localização nuclear dessa proteína e consequente ativação da via Wnt/ $\beta$ -catenina, uma vez que a detecção da atividade dos promotores transcrpcionais da família TCF/LEF, alvo de  $\beta$ -catenina, precisa ser mensurada para que

se justifique uma translocação dessa proteína para o núcleo (Schuijers et al., 2014). Dessa forma, esses resultados indicam que em células com um perfil de invasão mais agressivo, representada em nosso estudo pela HT-29, tanto PGE<sub>2</sub> quanto TGF-β poderiam estar promovendo a TEM, uma vez que o aumento de vimentina e β-catenina, assim como a diminuição da expressão da E-caderina, estão relacionados a este evento (Spaderna et al., 2006; Acloque et al., 2008). Adicionalmente, estudos recentes sugerem que a ativação de vias alternativas de sinalização celular, a partir da cascata desencadeada por TGF-β, pode estar sendo requerida para o evento de indução da TEM durante a progressão do câncer (Tsubaki et al., 2011). Em nosso modelo de estudo, a associação entre PGE<sub>2</sub> e TGF-β levou a efeitos antagônicos em relação a uma resposta pró-tumoral e a TEM. Esses resultados contrários aos eventos observados na maior parte dos tratamentos isolados com esses agentes podem ser explicados pela ativação de vias alternativas de TGF-β, como as de Ras e JNK, que podem estar sendo recrutadas para inibir a expressão de COX-2 e, conseqüentemente, a cascata de sinalização de PGE<sub>2</sub>, embora mais estudos sejam necessários para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo.

Os resultados obtidos por imunoblotting relatados acima foram confirmados através da análise dos níveis de RNAm dos marcadores mesenquimais e epiteliais utilizando a técnica de RT-qPCR (**Figura 5.7**). Foram observadas alterações similares no perfil de expressão dos RNAm para esses marcadores após a administração isolada dos agentes inflamatórios. Trabalhos recentes mostram que a diminuição dos níveis protéicos e do RNAm de marcadores epiteliais, como a E-caderina, e o aumento desses mesmos níveis para os marcadores mesenquimais, como a vimentina, podem servir como biomarcadores para metástase linfonodal proveniente de tumores de CCR, além de indicarem um mau prognóstico para pacientes com esse tipo de quadro clínico (Toiyama et al., 2013). Nosso resultado mostrando que o tratamento isolado com PGE<sub>2</sub> foi capaz de diminuir os níveis do RNAm de vimentina foi surpreendente, uma vez que observamos um aumento significativo nos níveis dessa proteína por *western blotting*. No entanto, esse resultado pode indicar um mecanismo de *turn over* gerado pelo aumento dos níveis de expressão protéica de vimentina, o que inibiria uma maior transcrição de RNAm dessa molécula (Bjornsti & Houghton, 2004). Porém, seria necessária a realização de experimentos que indicassem o aumento do RNAm de vimentina após tratamento com PGE<sub>2</sub>, em tempos inferiores a 24h. Da mesma forma, analisamos os níveis de expressão do RNAm dos fatores transcricionais *Twist1* e *Snail*,



e observamos que os tratamentos isolados com os agentes aumentaram a expressão de *Twist1*, enquanto apenas TGF- $\beta$  foi capaz de aumentar os níveis de *Snail*. Novamente observamos uma redução inesperada dos níveis de RNAm de *Snail* após o tratamento com PGE<sub>2</sub>. Contudo, o aumento dos níveis de RNAm de outros fatores transcricionais como *Slug*, e o próprio *Twist1*, importantes repressores de E-caderina (Nagaishi et al., 2012), podem compensar a diminuição de *Snail* causada pela prostaglandina.

Tanto na análise dos resultados de expressão protéica quanto dos níveis de RNAm, a associação entre os dois mediadores inflamatórios foi capaz de inibir o efeito causado por pelo menos um dos agentes administrados de forma isolada, indicando uma atividade anti-tumoral relacionada à associação de PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$ . Trabalhos na literatura relatam que COX-2 é capaz de inibir a via canônica de TGF- $\beta$  (via das Smads) levando a ocorrência do processo de TEM em células de glândula mamária murina NMuMG, impedindo a translocação do complexo Smad-2/-3 para o núcleo e aumentando a ativação dos receptores EP através da sinalização autócrina de PGE<sub>2</sub>. (Neil et al., 2008). Por outro lado, um trabalho publicado por Takai et al. (2013), mostra que em células de carcinoma de pulmão, A549, ocorre downregulação de COX-2, após 24h de tratamento com TGF- $\beta$ , levando a inibição do crescimento e ao aumento do processo fibrótico em resposta a TEM. Dessa forma, vias não canônicas desencadeadas por TGF- $\beta$  poderiam inibir a expressão de COX-2 e, conseqüentemente, de marcadores mesenquimais, além de contribuir para o aumento na expressão do marcador epitelial. Essas alterações estariam relacionadas contrariamente à cascata de sinalização de PGE<sub>2</sub> via interação com seus receptores do tipo EP, contribuindo assim para a inibição de efeitos pró-tumorais gerados pelos tratamentos isolados com esses dois agentes.

Diversos estudos apontam que a redistribuição das proteínas E-caderina e  $\beta$ -catenina, além da formação de projeções da membrana, estão envolvidas com o processo de perda de polaridade celular do epitélio e aquisição de um fenótipo fibroblástico característico da TEM (Morrison et al., 2013). Nossos resultados obtidos na análise de distribuição subcelular por imunofluorescência mostram que os tratamentos isolados com PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$  levaram a perda de marcação dessas proteínas nos contatos célula-célula, sugerindo a indução da TEM, além de ocasionarem o aparecimento de protrusões de membrana do tipo filopódio e lamelipódio no *front* de migração (**Figura 5.8 e 5.9**). Adicionalmente, nossa observação de que o tratamento com TGF- $\beta$  foi capaz de induzir o aparecimento de marcações pontuais nucleares de  $\beta$ -catenina, indica uma possível interação entre esta proteína e seus fatores transcricionais no núcleo. Já a

análise da localização da vimentina mostrou que PGE<sub>2</sub> e TGF-β administrados de forma isolada, podem estar induzindo eventos pró-tumorais através da redistribuição desses filamentos intermediários (**Figura 5.10**), aumentando o potencial migratório da HT-29. Um estudo publicado por Mendez et al. (2010) também mostra que a presença de estruturas derivadas de projeções de membranas no *front* de migração celular está relacionada com uma maior expressão da vimentina, durante o processo de TEM.

Em análise para F-actina nas células HT-29 submetidas à técnica de *wound healing*, observamos que tanto PGE<sub>2</sub> quanto TGF-β foram capazes de reorganizar o citoesqueleto de actina em células com perfil migratório, onde o padrão de redistribuição desses filamentos apresentou uma localização mais citoplasmática do que cortical em comparação a células não tratadas (**Figura 5.11**). Da mesma forma, esses agentes levaram a formação de projeções de membrana do tipo lamelipódio, mostrando um efeito de transformação fenotípica relacionado ao aumento da migração celular. Interessante notar a presença de aglomerados pontuais dos filamentos de actina na região anterior ao *front* de migração das células submetidas ao tratamento com TGF-β. A presença desses agrupamentos de F-actina indica um maior recrutamento de proteínas constituintes do complexo de FA nascente, já que durante o processo migratório, as células estão submetidas a grandes forças de tracionamento relacionadas ao fluxo retrógrado e anterógrado do citoesqueleto de actina, bem como a capacidade de adesão célula-substrato, especialmente na presença de integrinas, que indicam a rápida capacidade de polimerização e despolimerização dos filamentos de actina (Roca-Cusachs et al., 2012). Por outro lado, percebemos que a associação entre os dois mediadores inflamatórios reverteu os efeitos ocasionados pelos tratamentos isolados, o que sugere um possível efeito anti-tumoral durante o evento de migração nessa linhagem celular. Esse último achado, aparentemente, é contrário a alguns resultados mostrando que a associação entre esses dois mediadores inflamatórios foi capaz de aumentar a migração de células LLC1, derivadas de carcinoma de pulmão (Young, 2004). No entanto, diferentes vias de sinalização ativadas por TGF-β, podem ocasionar diminuição de fibras de estresse e, assim, reduzir a capacidade de migração celular (Varga et al., 2005; Voorneveld et al., 2014) como observado em nosso achados.

Nossos resultados para análise de atividade da GTPase RhoA, mostraram que os dois fatores inflamatórios ativaram essa GTPase na linhagem HT-29 em tempos distintos, enquanto que a associação entre esses dois agentes não alterou os níveis de atividade de RhoA (**Figura 5.12**). É conhecido que a ativação de RhoA ocorre em

intervalos de tempo curtos, o que é intensificado durante a migração e a invasão de células tumorais (Shang et al., 2012). Sendo assim, observamos uma rápida ativação de RhoA, como esperado, embora a prostaglandina tenha ocasionado uma atividade mais precoce (5 min) dessa proteína em comparação a uma ativação mais tardia (15 min) após o tratamento com TGF- $\beta$ . Isso pode explicar o perfil migratório induzido por PGE<sub>2</sub> (Choi et al., 2011), uma vez que esse fator inflamatório exerce seu efeito em relação a RhoA poucos minutos após a célula ser desafiada com esse agente, levando a alterações precoces na morfologia e, conseqüentemente, no aumento da capacidade de migração celular. No entanto, para o tempo de 15 min, o efeito de PGE<sub>2</sub> sobre a atividade de RhoA se apresentou próximo aos níveis do controle. Nesse mesmo tempo, TGF- $\beta$  ativou essa GTPase, embora em níveis menores que a prostaglandina no tempo de 5 min. Imamichi et al. (2005), mostrou que TGF- $\beta$  é capaz de induzir a formação de adesões focais através da ativação de Erk e JNK, de forma independente de Smad 4, além de levar a ativação de RhoA através dessas vias alternativas, justificando o recrutamento tardio da sinalização não canônica durante o evento de migração celular. Esses tempos de ativação distintos exercidos sobre RhoA após o tratamento isolado com os fatores inflamatórios, poderiam indicar mecanismos distintos de ação sobre determinadas vias de sinalização que precisam ser investigadas em nosso modelo de estudo.

Ao analisarmos os resultados obtidos no ensaio de *wound healing*, observamos que a PGE<sub>2</sub> aumentou a motilidade celular de modo significativo em células HT-29 (**Figura 5.13 A**). Estudos mostraram que esse prostanóide aumenta a migração e a invasão em diversas linhagens celulares de CCR através da reorganização do citoesqueleto de actina via ativação de PI3K, sendo que esse efeito desencadeado por PGE<sub>2</sub> é dependente da transativação intracelular de EGFR mediada por Src (Buchanan *et al.*, 2003; Greenhough *et al.*, 2009). Além disso, outro estudo mostra que esse prostanóide é capaz de aumentar a migração através da interação de PGE<sub>2</sub> com os receptores EP-3, em células HCA-7, derivadas de câncer de cólon (Fujino et al., 2011). No presente estudo observamos também que TGF- $\beta$  aumentou a capacidade migratória das células HT-29 (**Figura 5.13 A**). Alguns trabalhos vêm mostrando a importância das vias de sinalização de Smad e p38 MAPK ativadas por TGF- $\beta$  em estágios mais avançados da metástase (Heldin *et al.*, 2009). Mise et al., (2012) mostra que a Zyxina, um alvo direto da proteína Smad-3 fosforilada (P-Smad3), regula: a) a expressão das proteínas de junções celulares; b) a expressão de integrina  $\alpha 5\beta 1$ ; e c) a adesão célula-matriz, podendo

contribuir para eventos de migração celular e TEM durante o desenvolvimento e progressão de tumores de pulmão.

Quando esses agentes foram administrados de forma conjunta, foi observada uma inibição parcial da migração em relação ao controle. Esse resultado pode refletir o alto potencial migratório das células HT-29 aliado ao tratamento com PGE<sub>2</sub>, contribuindo para a manutenção de maiores níveis da atividade de RhoA mesmo após cessado o estímulo do prostanóide, no tempo em que a migração foi analisada, ainda que tenha sido realizado o tratamento associado entre PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$ . Por outro lado, a capacidade proliferativa dessa linhagem celular não foi alterada por nenhum dos tratamentos em questão (**Figura 5.13 B**), indicando que a ocorrência de um maior potencial migratório após os tratamentos realizados não é decorrência de um aumento da população celular.

Em seguida, na análise funcional da perda de adesão célula-célula e célula-substrato, foi observado que o tratamento com PGE<sub>2</sub> aumentou a capacidade dessas células se manterem unidas umas as outras quando destacadas do substrato, enquanto que o tratamento com TGF- $\beta$  induziu uma maior capacidade de desagregação celular (**Figura 5.14 A**). Esses resultados podem indicar que, apesar do tratamento com o prostanóide inibir a expressão de E-caderina, importante para a manutenção dos contatos intercelulares, outras proteínas constituintes do complexo juncional apical, como as pertencentes a junções *tight* (claudinas e ocludinas), bem como os desmossomos, podem não apresentar alterações em seus níveis de expressão em resposta ao tratamento com PGE<sub>2</sub>. Um trabalho mostrou que a administração isolada de PGE<sub>2</sub> não é capaz de levar a alterações nos níveis de expressão e na localização subcelular das claudinas-2 e -4, sendo necessária a presença de EGF para que mudanças nesses parâmetros possam ser observadas (Flores-Benitez et al., 2009). Além disso, esse resultado pode sugerir uma potencial capacidade de migração coletiva atribuída ao tratamento com o PGE<sub>2</sub>, ao comparar esse efeito *in vivo*, no momento em que as células se destacam de um possível foco primário tumoral e intravasam em direção à circulação sanguínea, durante o processo metastático (Friedl & Wolf, 2009). No entanto, para o resultado de destacamento após o tratamento com os dois agentes, foi observado que apenas PGE<sub>2</sub> foi capaz de diminuir a capacidade das células de se aderirem ao substrato, enquanto TGF- $\beta$  não alterou a capacidade de destacamento da linhagem HT-29 (**Figura 5.14 B**). Este achado pode indicar que o fator de crescimento não possui papel predominante na capacidade dessa linhagem celular de se soltar da matriz extracelular,

mas sim na capacidade dessas células migrarem de forma mesenquimal ou amebóide (Yilmaz & Christofori, 2010), embora mais ensaios devam ser realizados para confirmação dessa hipótese. No entanto, o tratamento combinado desses dois agentes mostrou um maior potencial de inibição das alterações observadas no destacamento e desagregação, quando comparados às administrações desses mediadores inflamatórios isolados, indicando um efeito preventivo sobre esses eventos.

Por fim, foi possível observar que tanto PGE<sub>2</sub> quanto TGF- $\beta$  alteraram o padrão de colocalização entre vinculina e actina, bem como o tamanho das adesões focais (**Figura 5.15**). A vinculina é uma das proteínas-chave, juntamente com paxilina e talina, no ancoramento do citoesqueleto de actina às integrinas existentes na matriz extracelular. Além disso, recruta proteínas constituintes das FA formando um complexo nascente de ancoramento que auxilia no processo migratório celular (Thompson et al., 2013). Estudos mostraram que a vinculina é essencial para: a) a organização dos filamentos de actina na região de *leading edge*; b) a tração propagada através da MEC; c) a formação e ciclagem das FA. No entanto, é dispensável para o amadurecimento da adesão focal, embora recrute proteínas para a formação desse complexo (Thievessen et al., 2013). O papel exercido pela vinculina no contexto tumoral é bastante complexo e pouco explorado frente ao evento migratório, principalmente quanto à influência desses dois agentes inflamatórios na modulação da interação vinculina-actina. Em nosso modelo celular, a ocorrência do evento migratório do tipo mesenquimal (**Figura 5.13 A**), destaca o papel da vinculina não só na transmissão de forças de tracionamento, como também na estabilização da interação dessa proteína com as fibras de estresse dorsais e transversais, orientando a dinâmica desse processo através da montagem e desmontagem dos filamentos de actina nas regiões do lamelipódio e da lamela celular (Vallénus, 2013). Assim, dependendo do instante em que é observada a dinâmica de migração celular e a localização dessas proteínas, a ligação entre vinculina e actina pode sofrer alterações não só quanto à força de interação, como também na distribuição espacial dessas moléculas no citoplasma dessas células migratórias. Dessa forma, embora tenhamos observado uma evidente colocalização de vinculina com actina na região de *leading edge* após o tratamento com TGF- $\beta$ , essa colocalização quase não foi notada nas regiões da lamela e da *trailing edge*, onde é possível observar a presença de fibras de estresse, o que não ocorreu após o tratamento com PGE<sub>2</sub>, onde a colocalização na região da *leading edge* e da lamela foi significativamente menor do que nas células não tratadas. O aumento no tamanho da marcação para vinculina após o tratamento com

esses dois agentes (**Figura 5.15 B**) também é um forte indicativo do processo de estabilização dos filamentos de actina nas regiões do *front* de migração, uma vez que o maior comprimento da marcação para vinculina indica um processo de recrutamento de proteínas que compõem as FA, bem como uma maior interação com F-actina, influenciando diretamente na velocidade do fluxo anterógrado e no direcionamento vetorial dessas células durante esse evento.

Foi interessante notar também que para os resultados obtidos na desagregação/destacamento e na formação de adesões focais, que o tratamento associado entre esses dois agentes reverteu os efeitos observados nos tratamentos isolados com PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$ . Isso pode sugerir, novamente, um papel na inibição de eventos relacionados à migração celular e, conseqüentemente, à progressão tumoral, onde a interação entre esses dois fatores inflamatórios pode determinar a inibição mútua de vias de sinalização e, dessa forma, contribuir para a supressão tumoral.

## 7. CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que o tratamento com TGF- $\beta$  na linhagem celular A549 foi capaz de:

- a) ocasionar uma diminuição nos níveis protéicos de E-caderina e aumentar a expressão de  $\beta$ -catenina e do marcador mesenquimal N-caderina, bem como alterar a localização subcelular dessas proteínas, e;
- b) alterar a organização do citoesqueleto de actina e aumentar o fenótipo migratório, eventos relacionados com o desenvolvimento da TEM.

Da mesma forma, em células HT-29, observamos que os tratamentos com PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$  foram capazes de:

- a) diminuir a expressão do marcador epitelial E-caderina, e aumentar a expressão de  $\beta$ -catenina e dos marcadores mesenquimais vimentina e N-caderina ao nível protéico e de RNAm;
- b) ocasionar a redistribuição subcelular das proteínas E-caderina,  $\beta$ -catenina e vimentina bem como do citoesqueleto de actina induzindo o aparecimento de fibras de estresse;
- c) aumentar a atividade da GTPase RhoA nos distintos tempos analisados de forma concomitante ao aumento da migração celular;
- d) alterar a capacidade de adesão célula-célula e célula-substrato e;
- e) aumentar o tamanho dos contatos focais, como visto pela colocalização vinculina-actina, embora diminua a capacidade dessa colocalização na zona de retração e no *front* de migração;
- f) enquanto que o tratamento combinado entre esses dois agentes foi capaz de inibir os efeitos observados na expressão protéica e do RNAm dos marcadores mesenquimais e epiteliais, na distribuição subcelular das proteínas analisadas e na reorganização do citoesqueleto de actina, na atividade da proteína RhoA, na desagregação e destacamento, e no tamanho dos contatos focais, em relação aos tratamentos isolados.

De uma maneira geral, nossos resultados indicam que PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$  são capazes de exercer efeitos pró-tumorais quando administrados de maneira isolada, enquanto que o tratamento combinado entre esses agentes foi capaz de inibir alterações morfológicas, moleculares e funcionais relacionadas, principalmente, ao evento migratório e a TEM. Dessa forma, estes dois mediadores inflamatórios poderiam estar interagindo em nosso modelo de estudo de maneira a determinar uma inibição mútua de vias pró-tumorais, onde a “cascata” de sinalização desencadeada por COX-2 poderia estar sendo reprimida, enquanto que as vias deflagradas por TGF- $\beta$  (canônica e não canônica) poderiam ter

seus efeitos direcionados para uma resposta predominante na supressão tumoral, de acordo com o papel dual exercido por essa citocina no contexto do câncer. No entanto, é necessária a realização de mais estudos que justifiquem quais vias de sinalização estão envolvidas nesses eventos de inibição da progressão tumoral e que fatores moleculares determinam esse *switch* de resposta no contexto da administração conjunta de PGE<sub>2</sub> e TGF-β em CCR.



## 7. Referências

1. Aclouque H, Thiery J P, Nieto M A (2008). The physiology and pathology of the EMT. Meeting on the Epithelial–Mesenchymal Transition. *EMBO Rep*, 9: 322–326.
2. Alan J K, Lundquist E A. (2013). Mutationally activated Rho GTPases in cancer. *Small\_GTPases*, 2:4(3).
3. Bai X M, Zhang W, Liu N B, Jiang H, Lou K X, Peng T, Ma J, Zhang L, Zhang H, Leng J. (2009). Focal adhesion kinase: Important to prostaglandin E2-mediated adhesion, migration and invasion in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep*, 21: 129-136.
4. Baratelli F, Lee JM, Hazra S, Lin Y, Walser TC, Schae D, Pak PS, Elashoff D, Reckamp K, Zhang L, Fishbein MC, Sharma S, Dubinett SM. (2010). PGE(2) contributes to TGF-beta induced T regulatory cell function in human non-small cell lung cancer. *Am J Transl Res*, 2(4): 356-67.
5. Bjornsti M A, Houghton P J. (2004). The tor pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev*, 4: 335-348.
6. Bourguignon L Y, Wong G, Earle C, Krueger K, Spevak C C. (2010). Hyaluronan-CD44 interaction promotes c-Src-mediated twist signaling, microRNA-10b expression, and RhoA/RhoC up-regulation, leading to Rho-kinase-associated cytoskeleton activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem*, 285(47): 36721-35.
7. Buchanan FG, Wang D, Bargiacchi F, DuBois RN (2003). Prostaglandin E2 regulates cell migration via intracellular activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, 278: 35451-35457.
8. Carothers A M, Javid S H, Moran A E, Hunt D H, Redston M, Bertagnolli M M. (2006). Deficient E-cadherin adhesion in C57BL/6J-Min/+ mice is associated with increased tyrosine kinase activity and RhoA-dependent actomyosin contractility. *Exp Cell Res*, 312:387 – 400.

9. Cavallaro U, Christofori G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*, 4(2): 118-32.
10. Centelles JJ. (2012). General aspects of colorectal cancer. *ISRN Oncol*, 14:1-19.
11. Chell S D, Witherden I R, Dobson R R, Moorghen M, Herman A A, Qualtrough D, Williams A C, Paraskeva C. (2006). Increased EP4 Receptor Expression in Colorectal Cancer Progression Promotes Cell Growth and Anchorage Independence. *Cancer Res*, 66: 3106-3113.
12. Chen X, Wang Y, Xia H, Wang Q, Jiang X, Lin Z, Ma Y, Yang Y, Hu M. (2012) Loss of E-cadherin promotes the growth, invasion and drug resistance of colorectal cancer cells and is associated with liver metastasis. *Mol Biol Rep*, 39: 6707-6714.
13. Chia W K, Ali R, Toh H C (2012) Aspirin as adjuvant therapy for colorectal cancer-reinterpreting paradigms. *Nat. Rev. Clin. Oncol*, 9:561–570.
14. Choi H J, Lee D H, Park S H, Kim J, Do K H, An T J, Ahn Y S, Park C B, Moon Y. (2011). Induction of human microsomal prostaglandin E synthase 1 by activated oncogene RhoA GTPase in A549 human epithelial cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 413: 448–453.
15. Collinet C, Lecuit T (2013). Stability and dynamics of cell-cell junctions. *Prog Mol Biol Trans Sci*, 116: 25-47.
16. Coradini D, Casarsa C, Oriana S. (2011). Epithelial cell polarity and tumorigenesis: new perspectives for cancer detection and treatment. *Acta Pharmacol Sin*, 32: 552-64.
17. De Craene B, Berx G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer*, 13 (2): 97-110.
18. de Souza W F, Fortunato-Miranda N, Robbs B K, de Araújo W M, de-Freitas-Junior J C, Bastos L G, Viola J P, Morgado-Díaz J A. (2013). Claudin-3 overexpression increases the malignant potential of colorectal cancer cells: roles

- of ERK1/2 and PI3K-Akt as modulators of EGFR signaling. *PLoS One*, 8 (9):1-13.
19. Deschoolmeester V, Boeckx C, Baay M, Weyler J, Wuyts W, Van Marck E, Peeters M, Lardon F, Vermorken J B. (2010). KRAS mutation detection and prognostic potential in sporadic colorectal cancer using high-resolution melting analysis. *Br J Cancer*, 103: 1627-1636.
  20. Désirée Spiering and Louis Hodgson.(2011). Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adh Migr*, 5:2, 170-180.
  21. Ding Q, Bai YF, Wang YQ, An RH. (2010). TGF-beta1 reverses inhibition of COX-2 with NS398 and increases invasion in prostate cancer cells. *Am J Med Sci*, 339(5):425-32.
  22. Disanza, A., Steffen, A., Hertzog, M., Frittoli, E., Rottner, K. & Scita, G. (2005). Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cel Mol Life Sci*, 62: 955-970.
  23. Dormond O, Foletti A, Paroz C, Rüegg C. (2001). NSAIDs inhibit alpha V beta 3 integrin-mediated and Cdc42/Rac-dependent endothelial-cell spreading, migration and angiogenesis. *Nat Med*,7(9):1041-7.
  24. Dos Remedios C G, Chhabra D, Kekic M, Dedova I V, Tsubakihara M, Berry D A, Nosworthy N J. (2003). Actin Binding Proteins: Regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev*, 83: 433-473.
  25. Du J, Jiang B, Barnard J. (2005). Differential Regulation of Cyclooxygenase-2 in Nontransformed and Ras-Transformed Intestinal Epithelial Cells. *Neoplasia*, 7: 761 – 770.
  26. Edlund S, Landstrom M, Heldin C H, Aspenstrom P. (2002). Transforming Growth Factor-beta induced Mobilization of Actin Cytoskeleton Requires Signaling by Small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol Biol Cell*, 13: 902–914.
  27. Edlund, S., Landström, M., Heldin, C. H., Aspenström, P. (2003) Smad7 is required for TGF-β-induced activation of the vs mall GTPase Cdc42. *J Cell Sci*,

117: 1835-1846.

28. Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA.(2013). Inflammation induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganism. *Nat Rev Cancer*, 13 (11):759-71.
29. Ehrlich M, Gutman O, Knaus P, Henis Y I. (2012). Oligomeric interactions of TGF- $\beta$  and BMP receptors. *FEBS Letters.*, 586:1885–1896
30. Wang H, Wang HS, Zhou BH, Li CL, Zhang F, Wang XF, Zhang G, Bu XZ, Cai SH, Du J.(2013) .Epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by TNF- $\alpha$  requires AKT/GSK-3 $\beta$ -mediated stabilization of snail in colorectal cancer. *PLoS One*, 8(2).
31. Etienne-Manneville S. (2011). Control of polarized cell morphology and motility by adherens junctions. *Semin Cell Dev Biol*, 22: 850– 857.
32. Fanelli A, Ghisi D, Fanelli G.(2013) Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) in clinical practice: managing gastric and cardiovascular risks. *Acta Biomed*, 84(2):98-101.
33. Fearon ER, Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 81:759–767.
34. Flatmark K, Maelandsmo GM, Martinsen M, Rasmussen H, Fodstad Ø. (2004). Twelve colorectal cancer cell lines exhibit highly variable growth and metastatic capacities in an orthotopic model in nude mice. *Eur J Cancer*, 40: 1593-1598.
35. Flores-Benitez D, Rincon-Heredia R, Razgado L F, Larre I, Cerejido M, Contreras R G.(2009). Control of tight junctional sealing: roles of epidermal growth factor and prostaglandin E2. *Am J Physiol Cell Physiol*, 297: C611–C620.
36. Friedl P, Wolf K. (2009). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J. Cell Biol*, 188: 11–19.

37. Frisch S M, Schaller M, Ciepely B. (2013). Mechanisms that link the oncogenic epithelial–mesenchymal transition to suppression of anoikis. *J Cell Sci*, 126: 21–29.
38. Fujino H, Toyomura K, Chen X B, Regan J W, Murayama T. (2011). Prostaglandin E2 regulates cellular migration via induction of vascular endothelial growth factor receptor-1 in HCA-7 human colon cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 81: 379–387.
39. Fulton AM, Ma X, Kundu N. (2006). Targeting prostaglandin E EP receptors to inhibit metastasis. *Cancer Res.*, 66(20):9794-7.
40. Gad A K, Rönnlund D, Spaar A, Savchenko A A, Petronyi G, Blom H, Szekely L, Widengren J, Aspenström P. (2012). Rho GTPases link cellular contractile force to the density and distribution of nanoscale adhesions. *FASEB J*, 26(6):2374-82.
41. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence in 2012.
42. Goldenring JR. (2013). A central role for vesicle trafficking in epithelial neoplasia: intracellular highways to carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, 13(11):813-20.
43. Greenhough A, Smartt H J, Moore A E, Roberts H R, Williams A C, Paraskeva C, Kaidi A . (2009). The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*, 30:377–386.
44. Hammar E, Tomas A, Bosco D, Halban P A. (2009). Role of the Rho-ROCK (Rho-Associated Kinase) Signaling Pathway in the Regulation of Pancreatic  $\beta$ -Cell Function. *Endocrinology*, 150(5):2072–2079.
45. Heldin C H, Landstrom M, Moustakas A. (2009). Mechanism of TGF $\beta$  signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial–mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol*, 21:166–176.

46. Hill M J, Morson B C, Bussey H J R. (1978). Aetiology of adenoma-carcinoma sequence in large bowel. *Lancet*, 4: 245-247.
47. Horbelt D, Denkis A, Knaus P. (2012). A portrait of Transforming Growth Factor  $\beta$  superfamily signalling: Background matters. *Int J Biochem Cell Biol*, 3621:1-6.
48. Howard S, Deroo T, Fujita Y, Itasaki N. (2011). A Positive Role of Cadherin in Wnt/b-Catenin Signalling during Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS*, 6 (8): 1-16.
49. Humphries J D, Wang P, Streuli C, Geiger B, Humphries M J, Ballestrem C. (2007). Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol*, 179 (5): 1043-57.
50. Hutchison J, Cohen Z, Onyeagucha B C, Funk J, Nelson M A. (2013). How microRNAs influence both hereditary and inflammatory-mediated colon cancers. *Cancer Genet*, 13:1-8.
51. Ikushima H, Miyazono K. (2012). TGF- $\beta$  signal transduction spreading to a wider field: a broad variety of mechanisms for context-dependent effects of TGF- $\beta$ . *Cell Tissue Res*, 347:37-49.
52. Imamichi Y, Waidmann O, Hein R, Eleftheriou P, Giehl K, Menke A. (2005). TGF beta-induced focal complex formation in epithelial cells is mediated by activated ERK and JNK MAP kinases and is independent of Smad4. *Biol Chem*, 386 (3):225-36.
53. Instituto Nacional de Câncer, INCa. Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCa, 2013.
54. Jain A K, Moore S M, Yamaguchi K, Eling T E, Baek S J. (2004). Selective Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Induce Thymosin  $\beta$ -4 and Alter Actin Cytoskeletal Organization in Human Colorectal Cancer Cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 311 (3): 885-91.

55. Javelaud D, Pierrat M J, Mauviel A (2012). Crosstalk between TGF- $\beta$  and hedgehog signaling in cancer. *FEBS Lett*, 586 (14): 2016-25.
56. Jee YS, Jang TJ, Jung KH. (2012). Prostaglandin E (2) and interleukin-1 $\beta$  reduce E-cadherin expression by enhancing snail expression in gastric cancer cells. *J Korean Med Sci*, 27(9):987-92.
57. Jennemann R, Kaden S, Sandhoff R, Nordstrom V, Wang S, Volz M, Robine S, Amen N, Rothermel U, Wiegandt H, Grone HJ. (2012). Glycosphingolipids are essential for intestinal endocytic function. *J Biol Chem*, 287(39): 32598-616.
58. Jin C H, Wang A H, Chen J M, Li R X, Liu X M, Wang G P, Xing L Q (2011). Observation of Curative Efficacy and Prognosis Following Combination Chemotherapy with Celecoxib in the Treatment of Advanced Colorectal Cancer. *J Int Med Res*, 39: 2129 – 2140.
59. Kalluri R, Weinberg RA. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119(6):1420-8.
60. Kam Y, Quaranta V. Cadherin-bound  $\beta$ -catenin feeds into the Wnt pathway upon adherens junctions dissociation: evidence for an intersection between  $\beta$ -catenin pools. (2009). *PLoS One*, 4(2).
61. Kasai H, Allen J T, Mason R M, Kamimura T, Zhang Z. (2005). TGF- $\beta$ 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res*, 6:56.
62. Kevans D, Wang L M, Sheahan K, Hyland J, O'Donoghue D, Mulcahy H, O'Sullivan J. (2011). Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Protein Expression in a Cohort of Stage II Colorectal Cancer Patients With Characterized Tumor Budding and Mismatch Repair Protein Status. *Int J Surg Pathol*, 19(6): 751–760.
63. Kim H N, Narayanan N K, Lasano S, Narayanan B. (2011). Modulation of PGE2-induced EP4 expression on snail signaling and the impact on epithelial-mesenchymal transition: significance of EP4 antagonism. *Anticancer Res*, 31(12):4347-57.

64. Kim J, Hwan Kim S. (2013). CK2 inhibitor CX-4945 blocks TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in A549 human lung adenocarcinoma cells. *PLoS One*, 8(9).
65. Klein-Goldberg A, Maman S, Witz IP. (2013). The role played by the microenvironment in site-specific metastasis. *Cancer Lett.* S0304-3835(13)00604-6.
66. Kon S, Tanabe K, Watanabe T, Sabe H, Satake M. (2008). Clathrin dependent endocytosis of E-cadherin is regulated by the Arf6GAP isoform SMAP1. *Exp Cell Res*, 14 (7): 1415-28.
67. Kouso H, Yano T, Maruyama R, Shikada Y, Okamoto T, Haro A, Kakeji Y, Maehara Y.(2013). Differences in the expression of epithelial–mesenchymal transition related molecules between primary tumors and pulmonary metastatic tumors in colorectal cancer. *Surg Today*, 43: 73-80.
68. Le Clainche C, Carlier M F. (2008). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev*, 88 (2): 489-513.
69. Leve F, Morgado-Díaz J A. (2012). Rho GTPase Signaling in the Development of Colorectal Cancer. *J Cell Biochem*, 113:2549–2559.
70. Leve F, Souza W, Morgado-Díaz J A. (2008). A Cross-Link between Protein Kinase A and Rho-Family GTPases Signaling Mediates Cell-Cell Adhesion and Actin Cytoskeleton Organization in Epithelial Cancer Cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 327(3):777-88.
71. Li Y, Zhu X, Zeng Y, Wang J, Zhang X, Ding Y, Liang L. (2010). FMNL2 Enhances Invasion of Colorectal Carcinoma by Inducing Epithelial-Mesenchymal Transition. *Mol Cancer Res*, 8:1579-1590.
72. Loebel D A F, Tam P P L (2012). Rho GTPases in endoderm development and differentiation. *Small GTPases*, 3: 40–44.
73. Löffler I, Grün M, Böhmer F D, Rubio I (2008). Role of cAMP in the promotion of colorectal cancer cell growth by Prostaglandin E2. *BMC Cancer*, 8:380.



74. Masuelli L, Budillon A, Marzocchella L, Mrozek M A, Vitolo D, Di Gennaro E, Losito S, Sale P, Longo F, Ionna F, Muraro R, Modesti A, Bei R. (2012). Caveolin-1 overexpression is associated with simultaneous abnormal expression of the E-cadherin/ $\alpha$ - $\beta$  catenins complex and multiple ErbB receptors and with lymph nodes metastasis in head and neck squamous cell carcinomas. *Cell Physiol*, 227 (9): 3344-53.
75. Medici D, Hay E D, Goodenough D A (2006). Cooperation between Snail and LEF-1 transcription factors is essential for TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell*, 17:1871-1879.
76. Medzhitov R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454: 428-35.
77. Mele V, Muraro MG, Calabrese D, Pfaff D, Amatruda N, Amicarella F, Kvinlaug B, Bocelli-Tyndall C, Martin I, Resink TJ, Heberer M, Oertli D, Terracciano L, Spagnoli GC, Iezzi G.(2013). Mesenchymal stromal cells induce epithelial-to-mesenchymal transition in human colorectal cancer cells through the expression of surface-bound TGF- $\beta$ . *Int J Cancer*, 10:1-12.
78. Mendez M G, Kojima S, Goldman R D. (2010). Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J*, 24(6): 1838-51.
79. Meng X, Ezzati P, Wilkins J A. (2011). Requirement of Podocalyxin in TGF-Beta Induced Epithelial Mesenchymal Transition. *PLoS One* 12, 6(4).
80. Meulmeester E, Dijke P. (2011). The dynamic roles of TGF- $\beta$  in cancer. *J Pathol*, 223: 205–218.
81. Mimeault M, Batra S K. (2013). Molecular biomarkers of cancer stem/progenitor cells associated with progression, metastases, and treatment resistance of aggressive cancers. (2014). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 23(2): 234-54.

82. Mise N, Savai R, Yu H, Schwarz J, Kaminski N, Eickelberg O. (2012). Zyxin Is a Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF $\beta$ )/Smad3 Target Gene That Regulates Lung Cancer Cell Motility via Integrin  $\alpha 5\beta 1$ . *J Biol Chem*, 287:31393-31405.
83. Miyoshi J, Takai Y. (2007). Structural and functional associations of apical junctions with cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*, 1778: 670-691.
84. Moissoglu K, Slepchenko B M, Meller N, Horwitz A F, Schwartz M A In vivo dynamics of Rac-membrane interactions. *Mol Biol Cell*, 17:2770-2779.
85. Morrison C D, Parvani J G, Schiemann W P. (2013). The relevance of the TGF- $\beta$  Paradox to EMT-MET programs. *Cancer Lett*, 341 (1): 30-40.
86. Mullins R D, Hansen S D. (2013). In vitro studies of actin filament and network dynamics. *Curr Opin Cell Biol*, 25(1): 6–13.
87. Nagaishi M, Nobusawa S, Tanaka Y, Ikota H, Yokoo H, et al. (2012) Slug, Twist, and E-Cadherin as Immunohistochemical Biomarkers in Meningeal Tumors. *PLoS ONE*, 7(9).
88. Neil J R, Johnson K M, Nemenoff R A, Schiemann W P. (2008). Cox-2 inactivates Smad signaling and enhances EMT stimulated by TGF- $\beta$  through a PGE<sub>2</sub>-dependent mechanisms *Carcinogenesis*, 29: 2227–2235.
89. Noah T K, Donahue B, Shroyer N F (2011). Intestinal development and differentiation. *Exp Cell Res*, 317 (19): 2702–2710.
90. Nomoto K, Tsuta K, Takano T, Fukui T, Yokozawa K, Sakamoto H, Yoshida T, Maeshima A M, Shibata T, Furuta K, Ohe Y, Matsuno Y. (2006). Detection of EGFR mutations in archived cytologic specimens of non-small cell lung cancer using high-resolution melting analysis. *Am J Clin Pathol*, 126(4): 608-15.
91. Nürnberg A, Kitzing T, Grosse R. (2011). Nucleating actin for invasion. *Nat Rev Cancer*, 11 (3): 177-87.
92. Oft M, Heider K H, Beug H. (1998). TGF beta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Biol*, 8(23):1243-52.

93. Paduch R, Kandefér-Szerszeń M, Szuster-Ciesielska A, Plewka K. (2010). Transforming growth factor-beta1 modulates metalloproteinase-2 and -9, nitric oxide, RhoA and alpha-smooth muscle actin expression in colon adenocarcinoma cells. *Cell Biol Int*, 34: 213-223.
94. Pan M H, Lai C S, Wu J C, Ho C T. (2011). Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. *Mol Nutr Food Res*, 55: 32-45.
95. Plotnikov S V, Pasapera A M, Sabass B, Waterman C M. (2012). Force Fluctuations within Focal Adhesions Mediate ECM-Rigidity Sensing to Guide Directed Cell Migration. *Cell*, 151: 1513–1527.
96. Robbins & Cotran (2010). *Patologia – Bases patológicas das doenças*, 8ª edição. Elsevier, 1480 páginas.
97. Roca-Cusachs P, Iskratsch T, Sheetz M P. (2012). Finding the weakest link – exploring integrin-mediated mechanical molecular pathways. *J Cell Sci*, 125:3025–3038.
98. Rodriguez F J, Lewis-Tuffin L J, Anastasiadis P Z. (2012). E-cadherin's dark side: Possible role in tumor progression. *Biochim Biophys Acta*, 1826:23–31.
99. Rognot J, Peng X, Mostov K. (2013). Polarity in Mammalian Epithelial Morphogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(2).
100. Rowan AJ, Lamlum H, Ilyas M, Wheeler J, Straub J, et al. (2000) APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 3352-3357.
101. Roy S, Majumdar A P. (2012). Signaling in colon cancer stem cells. *J Mol Signal*, 7(1):11.
102. Runkle E A, Mu D. (2013) Tight junction proteins: From barrier to tumorigenesis. *Cancer Letters* 337, 41–48.
103. Sahai E, Marshall C J. (2002). Rho GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2:133-142.

104. Sandouk F, Al Jerf F, Al-Halabi M H. (2013). Precancerous lesions in colorectal cancer. *Gastroenterol Res Pract*, 2013: 1-11.
105. Schuijers J, Mokry M, Hatzis P, Cuppen E, Clevers H.(2014). Wnt-induced transcriptional activation is exclusively mediated by TCF/LEF. *EMBO J*, 33:146–156.
106. Senda T, Iizuka-Kogo A, Onouchi T, Shimomura A. (2007). Adenomatous polyposis coli (APC) plays multiple roles in the intestinal and colorectal epithelia. *Med Mol Morphol*, 40:68–81.
107. Shah E A, K Keren. (2013). Mechanical forces and feedbacks in cell motility. *Current Opinion in Cell Biology*, 25 :550–557.
108. Shang X, Marchioni F, Sipes N, Evelyn C R, Jerabek-Willemsen M, Duhr S, Seibel W, Wortman M, Zheng Y. (2012). Rational Design of Small Molecule Inhibitors Targeting RhoA Subfamily Rho GTPases. *Chem Biol*, 19:699–710.
109. Simons BD, Clevers H. (2011). Stem cell self-renewal in intestinal crypt. *Exp Cell Res*, 317:2719-2724.
110. Sit S T, Manser E. (2011). Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*, 124:679-683.
111. Site do INCa:  
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal/prevencao>, acessado em 16/09/2013, às 14:28 h.
112. Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, Berx G, Eger A, Merkel S, Jung A, Kirchner T, Brabletz T. (2006). A Transient, EMT-Linked Loss of Basement Membranes Indicates Metastasis and Poor Survival in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 131: 830–840.
113. Su W H, Cheng M H, Lee W L, Tsou T S, Chang W H, Chen C S, Wang P H. (2010). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs for Wounds: Pain Relief or Excessive Scar Formation? *Mediators Inflamm*, 4: 1-8.

114. Sugano K, Kansy M, Artursson P, Avdeef A, Bendels S, Di L, Ecker G F, Faller B, H Fischer, Gerebtzoff G, Lennernaes H, Senner F.(2010). Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nat Rev Drug Discov*, 9: 597-614.
115. Suman S, Kurisetty V, Das T P, Vadodkar A, Ramos G, Lakshmanaswamy R, Damodaran C. (2013). Activation of AKT Signaling Promotes Epithelial–Mesenchymal Transition and Tumor Growth in Colorectal Cancer Cells. *Mol Carcinog*, 9999:1–10.
116. Tada A, Kato H, Takenaga K, Hasegawa S. (1997). Transforming growth factor  $\beta$ 1 increases the expressions of high molecular weight tropomyosin isoforms and vinculin and suppresses the transformed phenotypes in human lung carcinoma cells. *Cancer Letters*, 121: 31–37.
117. Takai E, Tsukimoto M, Kojima S. (2013). TGF- $\beta$ 1 Downregulates COX-2 expression leading to decrease of PGE<sub>2</sub> production in human lung cancer A549 cells, which is involved in fibrotic response to TGF- $\beta$ 1. *PLoS one*, 8(10): e76346.
118. Tanaka M N, Diaz B L, De Souza W, Morgado- Diaz J A . (2008). Prostaglandin E<sub>2</sub>-EP1 and EP2 receptor signaling promotes apical junctional complex disassembly of Caco-2 human colorectal cancer cells. *BMC Cell biol*, 2-9:63.
119. Taylor M P, Koyuncu O O, Enquist L W. (2011). Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. *Nat Rev Microbiol*, 9(6): 427-39.
120. Theys J, Jutten B, Habets R, Paesmans K, Groot A J, Lambin P, Wouters B G, Lammering G, Vooijs M. (2011). E-Cadherin loss associated with EMT promotes radioresistance in human tumor cells. *Radiother Oncol*, 99:392–397.
121. Thievessen I, Thompson P M, Berlemont S, Plevock K M, Plotnikov S V, Zemljic-Harpf A, Ross R S, Davidson M W, Danuser G, Campbell S L, Waterman C M.(2013). Vinculin–actin interaction couples actin retrograde flow to focal adhesions, but is dispensable for focal adhesion growth. *J. Cell Biol*, 202: 163–177.

122. Thompson P M, Tolbert C E, Campbell S L. (2013). Vinculin and metavinculin: oligomerization and interactions with F-actin. *FEBS Lett*, 587 (8): 1220-9.
123. Tian M, Schiemann WP. (2010). PGE<sub>2</sub> receptor EP2 mediates the antagonistic effect of COX-2 on TGF-beta signaling during mammary tumorigenesis. *FASEB J*, 24(4):1105-16.
124. Toiyama Y, Yasuda H, Saigusa S, Tanaka K, Inoue Y, Goel A, Kusunoki M. (2013). Increased expression of Slug and Vimentin as novel predictive biomarkers for lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 34 (11): 2548-2557
125. Tsubaki M, Yamazoe Y, Yanae M, Satou T, Itoh T, Kaneko J, Kidera Y, Moriyama K, Nishida S. (2011). Blockade of the Ras/MEK/ERK and Ras/PI3K/Akt pathways by statins reduces the expression of bFGF, HGF, and TGF $\beta$  as angiogenic factors in mouse osteosarcoma. *Cytokine*, 54: 100–107.
126. Vallenius T. (2013) Actin stress fibre subtypes in mesenchymal-migrating cells. *Open Biol*, 3: 130001.
127. Varga A E, Stourman N V, Zheng Q, Safina A F, Quan L, Li X, Sossey-Alaoui K, Bakin A V. (2005). Silencing of the Tropomyosin-1 gene by DNA methylation alters tumor suppressor function of TGF- $\beta$ . *Oncogene*, 24: 5043-5052.
128. Vinzenz M, Nemethova M, Schur F, Mueller J, Narita A, Urban E, Winkler C, Schmeiser C, Koestler S A, Rottner K, Resch G P, Maeda Y, Small J V. (2012). Actin branching in the initiation and maintenance of lamellipodia. *J Cell Sci*, 125: 2775-85.
129. Vo B T, Morton D Jr, Komaragiri S, Millena A C, Leath C, Khan S A. (2013). TGF- $\beta$  effects on prostate cancer cell migration and invasions are mediated by PGE<sub>2</sub> through activation of PI3K/AKT/mTOR pathway. *Endocrinology*, 154 (5): 1768-79.
130. Voorneveld P W, Kodach L L, Jacobs R J, Liv N, Zonneville A C, Hoogenboom J P, Biemond I, Verspaget H W, Hommes D W, de Rooij K, van

- Noesel C J, Morreau H, van Wezel T, Offerhaus G J, van den Brink G R, Peppelenbosch M P, ten Dijke P, Hardwick J C H. (2014). Loss of SMAD4 Alters BMP Signaling to Promote Colorectal Cancer Cell Metastasis via Activation of Rho and ROCK. *Gastroenterology*, doi: 10.1053/j.gastro.2014.03.052.
131. Wakefield L M, Hill C S. (2013). Beyond TGF- $\beta$ : roles of other TGF- $\beta$  superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer*, 13 (5): 328-41.
132. Wang D, R N DuBois. (2013). An inflammatory mediator, Prostaglandin E<sub>2</sub>, in colorectal cancer. *Cancer J*, 19: 502-510.
133. Watanabe K, Kawamori T, Nakatsugi S, Ohta T, Ohuchida S, Yamamoto H, Maruyama T, Kondo K, Narumiya S, Sugimura T, Wakabayashi K.(2000). Inhibitory effect of a prostaglandin E receptor subtype EP(1) selective antagonist, ONO-8713, on development of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in mice. *Cancer Lett*, 156(1):57-61.
134. Wen Q, Janmey P A. (2013). Effects of non-linearity on cell-ECM interactions. *Exp Cell Res*, 319: 2481-2489.
135. Wilson K, Lewalle A, Fritzsche M, Thorogate R, Duke T, Charras G. Mechanisms of leading edge protrusion in interstitial migration. *Nat Commun*, 4:2896.
136. Woodford-Richens KL, Rowan AJ, Gorman P, Halford S, Bicknell DC, et al. (2001) SMAD4 mutations in colorectal cancer probably occur before chromosomal instability, but after divergence of the microsatellite instability pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 9719-9723.
137. Wu Z Q , Brabletz T, Fearon E, Willis A L, Hu C Y, Li X Y, Weiss S J. (2012). Canonical Wnt suppressor, Axin2, promotes colon carcinoma oncogenic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(28):11312-7.
138. Yang T, Chen M, Sun T. (2013). Simvastatin attenuates TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition in human alveolar epithelial cells. *Cell Physiol Biochem*, 31 (6): 863-74.

139. Yilmaz M, Christofori G. (2010). Mechanisms of Motility in Metastasizing Cells. *Mol Cancer Res*, 8:629-642.
140. Yokoyama U, Iwatsubo K, Umemura M, Fujita Takayuki, Ishikawa Y (2013). The Prostanoid EP4 Receptor and Its Signaling Pathway. *Pharmacol Rev*, 65:1010–1052.
141. Young A L, Chalmers C R, Hawcroft G, Perry S L, Treanor D, Toogood G J, Jones P F, Hull M A. (2013). Regional differences in prostaglandin E<sub>2</sub> metabolism in human colorectal cancer liver metastases. *BMC Cancer*, 13:92.
142. Young MR. (2004). Tumor-derived prostaglandin E<sub>2</sub> and transforming growth factor-beta stimulate endothelial cell motility through inhibition of protein phosphatase-2A and involvement of PTEN and phosphatidylinositide 3-kinase. *Angiogenesis*, 7(2):123-31.
143. Zhang Y E. (2009). Non-Smad pathways in TGF- $\beta$  signaling. *Cell Res*, 19:128-139.
144. Zheng H, Kang Y. (2013). Multilayer control of the EMT master regulators. *Oncogene*, doi:10.1038/onc.2013.128.
145. Ziegler W H, Liddington R C, Critchley D R .(2006). The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol*, 16: 453–460.