



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

PRISCILA GUIMARÃES DE MARCONDES

Estudo de vias de sinalização celular envolvidas no fenótipo agressivo das progênies de células de câncer colorretal humano sobreviventes à radiação ionizante.

Orientador: Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz

Rio de Janeiro

2015



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

PRISCILA GUIMARÃES DE MARCONDES

Estudo de vias de sinalização celular envolvidas no fenótipo agressivo das progênes de células de câncer colorretal humano sobreviventes à radiação ionizante.

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

Orientador: Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz

Rio de Janeiro

2015

M321e Marcondes, Priscila Guimarães.

Estudo de vias de sinalização celular envolvidas no fenótipo agressivo das progênies de células de câncer colorretal humano sobreviventes à radiação ionizante. / Priscila Guimarães Marcondes. – Rio de Janeiro, 2015.

xii, 60 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Oncologia)– Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2015.

Orientadores: José Andrés Morgado Díaz.

1. Neoplasias Colorretais - radioterapia. 2. Transdução de Sinal. 3. Receptores da Família Eph. I. Díaz Morgado, José Andrés (orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.994347042



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

PRISCILA GUIMARÃES DE MARCONDES

**ESTUDO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULARES ENVOLVIDAS NO
FENÓTIPO AGRESSIVO DAS PROGÊNIES DE CÉLULAS DE CÂNCER
COLORRETAL HUMANO SOBREVIVENTES À RADIOTERAPIA**

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Raquel Maia
Prof. Dra. Etel Gimba
Prof. Dra. Helena Lobo
Prof. Dra. Sheila Coelho– Suplente I
Prof. Dr. André Mencialha– Suplente II

RIO DE JANEIRO

2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, às energias do bem, ou simplesmente à sorte, por toda a gama de fatos que se sucederam e que foram me guiando pelo melhor caminho que eu poderia trilhar até aqui, um caminho de conquistas e aprendizagem. Eu não poderia ser mais abençoada (ou sortuda?), mesmo não sabendo, sinto a necessidade de agradecer por tanta coisa boa nessa fase da minha vida!

Aos meus pais e irmão, Ana, Luiz e Felipe, pelo amor incondicional, apoio e pela tranquilidade de saber que nunca estou nem estarei sozinha!

Ao Dudu e à Cláudia por toda a energia positiva e incentivo!

Aos meus avós Fufu, Jorjão, Zaga e Minda pelo carinho sempre tão grande!

Agradeço ao meu namorado, Eduardo, pelo amor, incentivo e otimismo constantes, por todo o tipo de apoio, desde as formatações sinistras do Word até os abraços que mudavam um dia ruim.

Ao José Morgado pela confiança, ensinamentos e mais do que isso, pelos valores que sempre transmitiu e plantou em nosso Grupo. Grupo este que se tornou minha segunda família.

Agradeço à Família Bioest pelo dia a dia cheio de aprendizagem, discussões científicas, companheirismo, honestidade e gargalhadas! Assim como, pelo sentimento de união e amizade que se sentia a cada dia que estávamos ali juntos e por todos que cruzavam nosso caminho. É uma família pra vida toda, que não se acha duas e que eu já morro de saudades! Valeu Wal, Cidadão (Wallace), Julay (Júlio), Lili, Dri, Nat, Andréa, Léo Nobel (Leonardo), Annie, Érika, Amélia, Pedro, Jenny (Jennifer), GSK (Jéssica), Letícia, Hallan, Murilo e Priscila. Aos integrantes que já saíram do Lab mas que marcaram essa fase da minha vida e que sempre serão parte da família: Rubs, PD, Magro, Tanaka, Sarah, Fernanda, Simone e Taline.

Especialmente, à minha eterna coorientadora, Lílian, por todos os ensinamentos que vão muito além dos científicos e técnicos! Pela paciência, dedicação, apoio de todo tipo e principalmente pela amizade que vou carregar pra sempre!

Às minhas amigas da UFF Camila e Letícia pelo companheirismo, incentivo e altas histórias pra contar rsrs. Também, à minha amiga Raiza, pelo apoio e paciência em meus momentos de estresse.

E finalmente, agradeço a todos aqueles que cruzaram meu caminho nesta etapa de vida e que contribuíram de alguma forma com energias positivas.

“Cancer cells can grow faster, adapt better. They live at the cost of our living and down to their innate molecular core, they are more perfect versions of ourselves.”

Siddhartha Mukherjee



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

**ESTUDO DE VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR ENVOLVIDAS NO FENÓTIPO
AGRESSIVO DAS PROGÊNIES DE CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL
HUMANO SOBREVIVENTES À RADIAÇÃO IONIZANTE**

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Priscila Guimarães de Marcondes

O Câncer colorretal é um dos tipos tumorais mais comuns em homens e mulheres no Brasil e a radioterapia é amplamente utilizada para tumores de reto em estágios avançados. Porém, recorrências locais mais agressivas e metástases pós-tratamento são frequentes, mostrando que a eficácia dessa terapia é desafiada pelos processos biológicos que envolvem a invasão local e a disseminação metastática. Em trabalho prévio de nosso Grupo relatamos que as progênies celulares de câncer colorretal que sobrevivem à irradiação apresentam um fenótipo mais agressivo caracterizado pelo elevado potencial migratório e invasivo com características relacionadas à TEM. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo identificar as vias de sinalização celular que estariam dando suporte a este fenótipo agressivo de maneira a tentar postular potenciais alvos terapêuticos que possam ser utilizados em adjuvância com radioterapia. Nossos resultados mostraram que essas progênies apresentam uma maior expressão do receptor tirosina quinase EphA4 fosforilado. A fim de mimetizar o efeito induzido pela irradiação, foi utilizado um agonista deste receptor, a Doxasozina, e observamos que as progênies controle, provenientes das células não irradiadas, mostraram um aumento da fosforilação de EphA4, assim como dispersão celular, diminuição da expressão e a alteração da localização subcelular de E-caderina. Além disso, através da dupla marcação e análise por imunofluorescência mostramos que nas progênies de células sobreviventes à irradiação, o EphA4 fosforilado co-localiza com a E-caderina no interior das células. Ademais, o silenciamento de EphA4 na progênies de células sobreviventes à radiação diminuiu o alto potencial invasivo destas progênies. Os resultados também mostram que as quinases p-AKT e p-ERK estão mais ativas nesta progênie e que a alta atividade de p-ERK é reduzida com o silenciamento de EphA4. Ademais, a inibição farmacológica das vias PI3K/AKT e ERK1/2 foi capaz de diminuir o alto potencial migratório, enquanto que apenas a inibição da via de PI3K/AKT, reverteu o alto potencial invasivo destas progênies. Em conjunto, nossos resultados mostram que a irradiação causa um aumento da expressão do EphA4 fosforilado na progênies de células sobreviventes. Essa alta atividade gera uma desorganização da adesão intercelular mediada pela E-caderina, favorecendo a dispersão celular. Além disso, indicam que o maior potencial migratório e invasivo observado nessas progênies é sustentado pelas vias de sinalização de ERK1/2 e PI3K/AKT, as quais podem ser responsáveis pela falha terapêutica após a radioterapia neste tipo de câncer



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

**STUDY OF THE SIGNALING PATHWAYS INVOLVED IN THE AGGRESSIVE
PHENOTYPE OF THE PROGENY DERIVED FROM RADIATION SURVIVOR
COLORECTAL CANCER CELLS**

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Priscila Guimarães de Marcondes

Colorectal cancer is one of the most common type of cancer for men and woman in Brazil and radiotherapy is widely used for rectal tumors in advanced stages. However, after this treatment, aggressive local recurrence and metastasis are frequent, showing that the efficacy of this therapy is challenged by the biological process involving local invasion and metastasis. A previous study of our Group showed that the progeny derived from irradiated colorectal cancer cells displayed an aggressive phenotype, including high migratory and invasive potentials as well as EMT-like features. Therefore, the aim of the present study was to analyze signaling pathways that support the aggressive phenotype showed by these progenies in order to postulate new therapeutic targets that could be used as an adjuvant with radiotherapy. Our results shows that this progeny exhibit high expression levels of the phosphorylated receptor EphA4. In order to mimic the effect induced by irradiation, we used an agonist of EphA4, the Doxazosin, and observed that the progeny derived from non-irradiated cells showed high levels of phosphorylated EphA4, cell dispersion as well as decreased expression and altered subcellular localization of E-cadherin. In addition, by double stained and confocal analysis, we observed that the progeny of radiation survivor cells showed colocalization of E-cadherin and phosphorylated EphA4 into the cytoplasm. Moreover, EphA4 silencing in the progeny of irradiation survivor cells reduced the high invasive potential of this progeny. Our results also showed that AKT and ERK1/2 kinases were more active in this progeny and that the high level of phosphorylated ERK 1/2 was reduced after silencing EphA4. Furthermore, we showed that the pharmacological inhibition of PI3K/AKT and ERK 1/2 pathways was able to reduce the high migratory potential, while only the inhibition of PI3K/AKT pathway reduced the high invasive potential of the irradiation survivor progeny. Together, these results suggest that high levels of phosphorylated EphA4 can be induced in the progeny of irradiation survivor cells. This high activation may cause E-cadherin-mediated disorganization of the adherent junctions, favoring cell dispersion. Moreover, our results shows that the high migratory and invasive potentials showed by the progeny of radiation survivor cells are sustained by the PI3K/AKT and ERK 1/2 pathways, which could be responsible for the therapeutic failure after radiotherapy in this type of cancer.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Câncer Colorretal	1
1.1.1. Epidemiologia e fatores de risco	1
1.1.2. Bases moleculares	2
1.1.3. Progressão: Sequencia adenoma-Carcinoma.....	4
1.2. Transição Epitélio-Mesenquimal	8
1.3. Vias de sinalização celular envolvidas na transição epitélio-mesenquimal	10
1.3.1. Os receptores Eph.....	12
1.4. Terapêutica do Câncer colorretal	15
1.4.1. A radioterapia e seus efeitos a nível celular e tecidual.....	16
2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	19
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivo geral.....	20
3.2. Objetivos específicos.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1. Anticorpos	21
4.2. Reagentes e Kits	21
4.3. Cultura de células e tratamento com radiação.....	21
4.4. Manipulação farmacológica de vias de sinalização.....	22
4.5. Obtenção de lisados celulares e Immunoblotting.....	22
4.6. Análise de receptores tirosina quinase (RTK) e fosfo quinases	23
4.7. Imunoprecipitação.....	23
4.8. Imunofluorescência	24
4.9. RNA de interferência e transfecção.....	24
4.10. Ensaio de migração e invasão celular.....	24
4.11. Análise estatística.....	25
5. RESULTADOS.....	26
5.1. As progênies de células sobreviventes à radiação apresentam aumento da atividade do receptor tirosina quinase EphA4.	26
5.2. As progênies de células sobreviventes à radiação não apresentam alteração da localização subcelular de EphA4.	28
5.3. A ativação de EphA4 pelo agonista Doxazosina induz dispersão celular na progênie controle.	29
5.4. O tratamento com Doxazosina desorganiza as junções aderentes, alterando a localização subcelular e reduzindo a expressão de E-caderina na progênie F1 Controle.	31
5.5. As progênies das células sobreviventes à radiação e as progênies controle apresentam pontos de colocalização de E-caderina e EphA4.	33

5.6. O silenciamento de EphA4 é capaz de reduzir o alto potencial invasivo da progênie de células sobreviventes à radiação.....	35
5.7. As progênies de células sobreviventes à radiação apresentam aumento da atividade de AKT e ERK, sendo esta última, dependente de EphA4.....	37
5.8. A inibição das vias de sinalização ERK 1/2 e PI3K/AKT é capaz de reverter o alto potencial migratório induzido pela radiação enquanto que apenas a inibição da via de PI3K/AKT, reverte o alto potencial invasivo.....	39
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
8. CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXO	60

Lista de figuras

Figura 1. Taxas brutas de incidência de câncer, segundo localização primária estimadas para 2014 no Brasil por sexo, exceto pele não melanoma.	1
Figura 2: Sequência Adenoma-Carcinoma. Modelo sequencial da carcinogênese colorretal proposto por Fearon e Vogelstein.....	5
Figura 3: Via canônica Wnt.	7
Figura 4: Eventos envolvidos na Transição Epitélio-Mesenquimal.....	9
Figura 5: Estrutura dos receptores Eph e Ephrinas.	13
Figura 6: Análise da fosfoproteômica de receptores tirosina quinase das progênies de células sobreviventes à radiação.....	27
Figura 7: Análise da localização subcelular do receptor EphA4 nas progênies.....	28
Figura 8: Análise da ativação de EphA4 pela Doxasozina e de sua influência sobre a morfologia da progênie F1 Controle.....	31
Figura 9: Análise da localização subcelular e expressão proteica de E-caderina na progênie F1 Controle tratada ou não com Doxasozina.	32
Figura 10: Análise da localização subcelular de p-EphA4 e E-caderina nas progênies F1 Controle e F1 5 Gy.....	34
Figura 11: Análise do potencial clonogênico e invasivo das progênies F1 controle e F1 5 Gy tratadas ou não com siEphA4.	36
Figura 12: Análise fosfoproteômica das quinase intracelulares das progênies e a influência do silenciamento de EphA4 sobre fosforilação de ERK 1/ 2.	38
Figura 13: Análise da inibição das vias ERK 1/ 2 e PI3K/AKT no potencial migratório e invasivo das progênies de células sobreviventes à radiação.	41

Lista de Abreviaturas

APC - Do inglês, *Adenomatous poliposis coli*
BRAF – Do inglês, *V-Raf Murine Sarcoma Viral*
CCR- Câncer Colorretal
Cdc42 – Do inglês, *Cell division control protein 42 homolog*
CIMP – Do inglês, *Cp GIsland Methylator Phenotype*
CIN – Do inglês, *Chromosomal Instability*
EGF – Do inglês, *epidermal growth factor*
EGFR – Do inglês, *epidermal growth factor receptor*
TEM – Transição Epitélio-Mesenquimal
EPHA/B – Do inglês, *Erythropoietin-producing hepatoma A/B*
ERK1/2/5 – Do inglês, *extracellular-signal-regulated kinase 1/2/5*
FAP - Do inglês, *Familial Adenomatous Polyposis*
FGFR – Do inglês, *fibroblast growth factor receptors*
Fz – Do inglês, *Frizzled*
GSK3 β - Do inglês, *glycogen synthase kinase 3*
HNPCC - Do inglês, *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*
IL-6 – Interleucina 6
JAs - junções aderentes
JNK – Do inglês, *c-Jun N-terminal kinase*
LRP5/6 - Do inglês, *Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 e 6*
MAPK – Do inglês, *Mitogen-activated protein kinases*
MGMT – Do inglês, *6-O-methylguanine-DNA methyltransferase*
MIN ou MSI– Do inglês, *Microsatellite Instability*
MLH1 – Do inglês, *MutL protein homolog 1*
MMP – Metaloprotease
MMR - Do inglês, *Mismatch Repair*
MSH2/6 – Do inglês, *MutS protein homolog 2/6*
MUTYH ou MYH – Do inglês, *Mut Y homolog*
PI3K – Do inglês, *Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphate3-Kinase*
PMS2 – Do inglês, *Postmeiotic segregation increased 2*
RTK – Receptor Tirosina Quinase
TCF/LEF - Do inglês, *T-cell Factor - lymphoid enhancer fator*
TGFB2 – Do inglês, *Receptor de fator de crescimento transformante beta*
Wnt – Do inglês, *wingless*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer Colorretal

1.1.1. Epidemiologia e fatores de risco

O câncer é a primeira causa de morte nos países desenvolvidos e a segunda nos países em desenvolvimento (GLOBOCAN 2012). Estudos apontam que países em desenvolvimento, como o Brasil, vem sofrendo uma transição epidemiológica, que consiste na redução da incidência de doenças infecto parasitárias e aumento da incidência de doenças crônico degenerativas, como o câncer. Dados epidemiológicos mostram que a incidência de câncer no mundo tem aumentado, principalmente, devido ao aumento da expectativa de vida, aumento da capacidade de detecção, bem como à adoção de um estilo de vida com hábitos associados ao câncer (BISHEHSARI, 2014). No Brasil, as estimativas para o ano de 2014 apontam que ocorrerão 576.580 casos novos casos de câncer (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Atualmente, o câncer colorretal (CCR) configura-se mundialmente como o segundo tipo de câncer mais incidente em mulheres e terceiro em homens, sendo a quarta causa de morte por câncer no mundo (GLOBOCAN 2012). No Brasil, a incidência de CCR segue a tendência mundial, apresentando-se como segundo mais incidentes entre mulheres e terceiro em homens, estimando-se 17.530 novos casos de CCR entre as mulheres e 15.070 entre os homens em 2014 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). A Figura 1 ilustra as taxas brutas de incidência e localização primária dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil, exceto pele não melanoma.

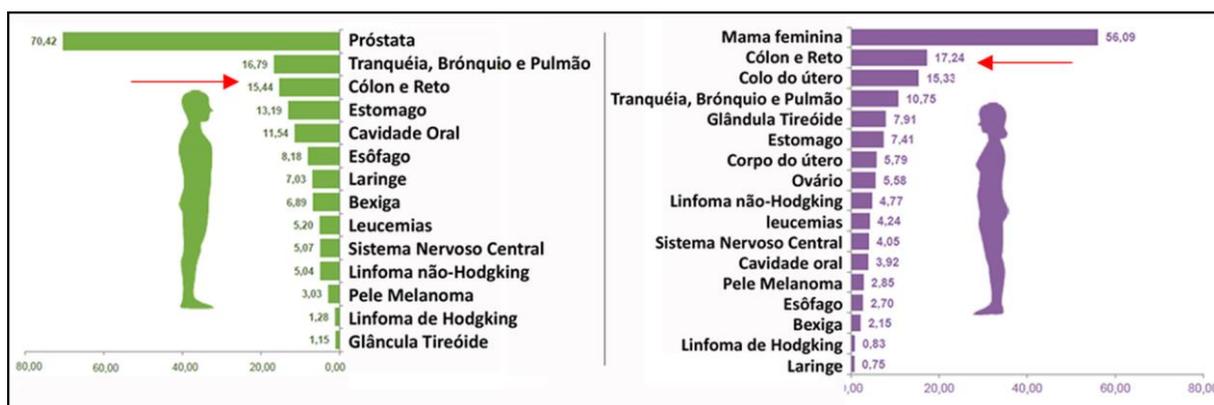


Figura 1. Taxas brutas de incidência de câncer, segundo localização primária estimadas para 2014 no Brasil por sexo, exceto pele não melanoma. O câncer de Cólon e Reto configura-se como o segundo tipo de câncer mais incidente nas mulheres e o terceiro nos homens. Adaptado de (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A sobrevida (taxa de sobrevivência no período de 5 anos após o diagnóstico) global do paciente com CCR é em torno de 65% em países desenvolvidos e menos de 50% em países em

desenvolvimento, sendo o estágio da doença no diagnóstico o fator prognóstico mais importante. Para pacientes com doença localizada, a sobrevida pode chegar a 90%, quando a doença atinge os linfonodos ou adjacências a sobrevida é de 70%. Quando a doença se espalha para órgãos distantes, essa taxa cai para 12%. (DESANTIS et al., 2014). Porém, no Brasil, somente 41% de todos os tumores colorretais são diagnosticados e tratados em estágio localizado, sem envolvimento linfático (HABR-GAMA, 2005).

O desenvolvimento do CCR, assim como de vários outros tipos de câncer, é resultado da interação entre fatores genéticos e ambientais. O CCR está associado a diversos fatores de risco, muitos deles relacionados aos hábitos de vida do indivíduo, como o tabagismo, o etilismo, a obesidade, o sedentarismo e fatores ligados à alimentação, como um alto consumo de produtos industrializados, alimentos embutidos e ricos em gorduras. Outros fatores de risco incluem doenças inflamatórias do intestino como retocolite ulcerativa e doença de Crohn, assim como predisposições genéticas ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino como a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP, do inglês *Familial Adenomatous Polyposis*) e a Síndrome de Lynch ou câncer colorretal hereditário não poliposo (HNPCC, do inglês *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*). Todos esses fatores de risco podem levar à diferentes tipos de manifestação do CCR originados de forma esporádica, hereditária ou familiar. Em contrapartida, o consumo de vegetais, o uso de anti-inflamatórios não-hormonais, terapia de reposição de estrogênio e atividade física são fatores de proteção (CHAN & GIOVANNUCCI, 2010)

1.1.2. Bases moleculares

O CCR de origem esporádica compreende 75% dos casos e é decorrente do acúmulo dos efeitos de fatores ambientais diversos ao longo da vida do indivíduo, uma vez que a própria idade é um fator de risco para o aparecimento deste tipo de câncer, sendo assim mais prevalente em pessoas com mais de 50 anos de idade. As formas hereditárias representam apenas 5% dos casos e são resultantes da ocorrência de mutações em genes de células da linhagem germinativa, herdada ou de novo. As síndromes herdadas são classificadas em poliposas e não poliposas, dentre as poliposas podemos destacar a FAP, que inclui a FAP clássica (detecção de 100 adenomas ou mais) e a FAP atenuada (10 a 100 adenomas) sendo responsáveis por 1% dos casos de CCR. Tais síndromes são associadas a uma mutação germinativa do gene *APC* (do inglês, *Adenomatous poliposis coli*). A proteína codificada por esse gene é multifuncional, sendo crucial para a sobrevivência e proliferação controladas das células do intestino, portanto, mutações em *APC* induzem a formação de pólipos adenomatosos. (JASPERSON et al., 2010).

Estudos recentes, caracterizaram o papel de outras síndromes poliposas, como a Polipose Associada a MYH/ MUTYH, cuja base molecular consiste em mutações nos genes *MUTYH* ou *MYH*, que codificam enzimas de mesmo nome atuantes no reparo do DNA por excisão de bases. (JASPERSON et al., 2010). Outra síndrome poliposa descrita é a Síndrome Poliposa Serrátil, caracterizada pela presença de múltiplos pólipos serrateados, que substituem o papel dos adenomas como lesões precursoras do CCR e mostram o envolvimento dos genes *KRAS* e *BRAF* (YAMANE et al., 2014).

Em relação às síndromes não poliposas, podemos destacar a HNPCC, também conhecido como Síndrome de Lynch. Embora os indivíduos acometidos por essa síndrome desenvolvam poucos pólipos, estes apresentam um fenótipo de instabilidade em microssatélite, caracterizada por mutação da linhagem germinativa em genes de reparo de pareamento incorreto do DNA (genes do tipo MMR, do inglês *Mismatch Repair*), como o *MSH2* e *MLH1* (90%), *MSH6* (10%) e *PMS2* (raro), o que permite uma rápida transformação celular (RUSTGI, 2007). Os outros 20% dos casos de CCR apresentam um certo padrão de ocorrência familiar, sugerindo um componente hereditário, porém, não se enquadram em nenhuma das síndromes bem caracterizadas acima citadas. Sua etiologia ainda é pouco compreendida, estudos sugerem o envolvimento de polimorfismos em genes de suscetibilidade de baixa penetrância (JASPERSON et al., 2010).

Independentemente do tipo de manifestação da doença, o CCR, assim como muitos tipos de tumores, tem como característica básica a desregulação da proliferação e da morte celular, levando ao crescimento descontrolado e à transformação das células. Estas células adquirem alterações e vantagens seletivas de sobrevivência, o que pode culminar na capacidade de se dispersar para tecidos distantes. A maioria dos tumores humanos compartilha dois mecanismos críticos em seu desenvolvimento: A ativação de protooncogenes, que são genes que controlam fisiologicamente eventos como proliferação e sobrevivência; e quando alterados, são chamados de oncogenes e podem estimular esses eventos exageradamente; E a inativação ou desregulação da expressão de genes supressores tumorais, que controlam negativamente o desenvolvimento e o crescimento dos tumores (VOGELSTEIN & KINZLER, 2004).

No caso do CCR, seu desenvolvimento e progressão se dão através da ação cumulativa de genes de suscetibilidade herdados e fatores ambientais, e através de mecanismos celulares variados de transformação neoplásica. Esses eventos, favorecem o acúmulo de mutações gerando o descontrole do crescimento celular e a desorganização tecidual, levando à transformação neoplásica. Dentre estes mecanismos, a instabilidade genômica cumpre um papel central na via de transformação celular, sendo classificada em 3 principais tipos: a) a

instabilidade cromossômica (CIN), b) a instabilidade de microssatélite (MIN ou MSI) e c) o fenótipo metilador de ilhotas CpG (CIMP). Essas vias de transformação celular não se auto excluem, uma vez que existem tumores com características de múltiplas vias (AL-SOHAILY et al., 2012).

A CIN é a principal causa de instabilidade genômica nos CCRs (65-70% dos CCR esporádicos), e é caracterizada pelo ganho ou perda de cromossomos inteiros ou regiões que contêm genes essenciais para a regulação de células e tecidos, sua perda então favorece o processo de carcinogênese. Tais alterações são resultantes de erros no processo de segregação cromossômica, por exemplo (PINO & CHUNG, 2010). A MIN consiste nas frequentes mutações que ocorrem em regiões repetitivas do DNA, as chamadas regiões de microssatélites. Tais regiões, devido a presença de repetições nucleotídicas, são passíveis de erros durante a replicação do DNA, erros estes reparados por enzimas codificadas pelos genes MMR. Sendo assim, a MIN é decorrente da incapacidade dessas enzimas de realizarem o reparo dessas regiões, seja por mutação ou silenciamento epigenético dos genes MMR (POULOGIANNIS et al., 2010). A CIMP é caracterizada pela hipermetilação de ilhotas CpG (regiões ricas em bases nitrogenadas citosina e guanina), tais ilhotas estão presentes em aproximadamente 60-70% das regiões promotoras dos genes e quando estão hipermetiladas induzem uma repressão gênica. Genes como *APC*, *MCC* e *MGMT*, são exemplos de genes hipermetilados que tem um papel importante na carcinogênese colorretal. Além disso, A CIMP pode ser responsável pela MIN em tumores colorretais esporádicos, através da metilação dos genes de MMR, por exemplo, a metilação da região promotora do gene *MLH1*. (WONG et al., 2007).

Na literatura, há controvérsia se a instabilidade genômica é causa ou consequência das alterações de importantes genes durante a progressão tumoral. Porém, por mais que esta relação ainda não esteja clara, o fato é que os genes mais alterados no CCR são os supressores tumorais: *APC*, *TP53*, *SMAD2*, *TGFBR2*; os oncogenes *KRAS*, *PIK3CA*, *TCF7L2*, *NRAS*, *BRAF* e *CTNNB1*; e os genes relacionados ao reparo do DNA: *MLH1*, *MSH2*, *MSH* e *PMS2* (JASS, 2007; NETWORK, 2012). Sendo assim, através do acúmulo de mutações nos genes acima mencionados e outras alterações em vias de sinalização importantes se dá o desenvolvimento e progressão do CCR.

1.1.3. Progressão: Sequencia adenoma-Carcinoma

A progressão do CCR acontece em uma sequência de eventos moleculares e celulares que ocorre a partir das primeiras alterações de um tecido normal até a formação de um tumor maligno e, possivelmente, metastático. Fearon & Vogelstein propuseram em 1990 um modelo

de carcinogênese "*multistep*" chamado de sequência adenoma-carcinoma, sendo a instabilidade genômica a base deste modelo. Esta sequência consiste numa série de eventos que começam com a transformação de um epitélio intestinal normal em adenomas (pólipos), que são tumores benignos, através do excesso de proliferação celular. Deste estágio, avança para um adenoma tardio onde há a desorganização das criptas intestinais e tardiamente, pode evoluir para um adenocarcinoma, podendo então se transformar em um carcinoma. O carcinoma é constituído de células capazes de invadir e migrar pelo tecido adjacente ao tumor, podendo resultar na formação de micro ou macrometástases (FEARON & VOGELSTEIN, 1990), como ilustra a figura 2.

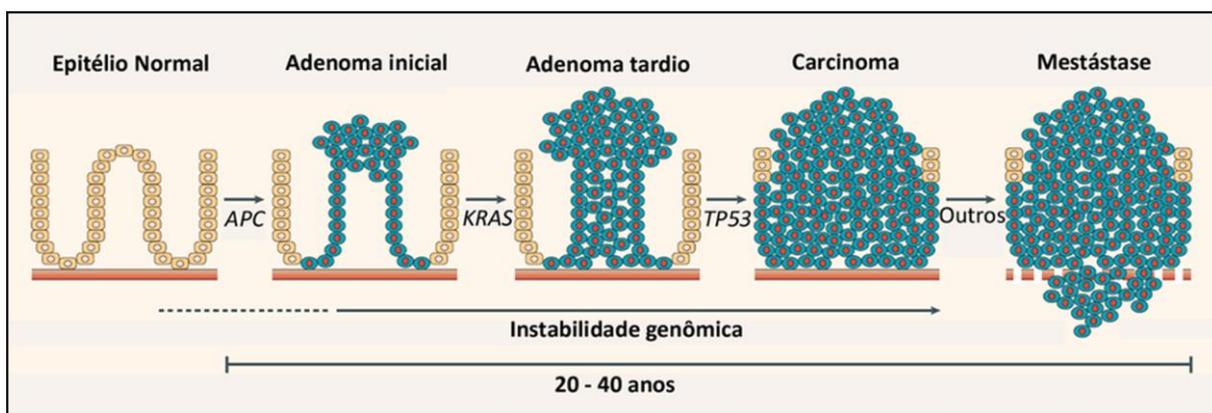


Figura 2: Sequência Adenoma-Carcinoma. Modelo sequencial da carcinogênese colorretal proposto por Fearon e Vogelstein. Mutações específicas no gene *APC* ocorrem durante o desenvolvimento de pólipos e do adenoma inicial, seguidas por mutações em *K-Ras* durante o estágio de adenoma tardio e mutações em *TP53* na transição para o tumor maligno. Adaptado de (RAJAGOPALAN et al., 2003).

O evento genético inicial mais comum é a desregulação da via de sinalização APC, cujo gene encontra-se mutado em 80% dos CCRs esporádicos. A principal função da proteína APC é a manutenção dos níveis de β -catenina intracelular, uma vez que APC faz parte do complexo que encaminha essa proteína para degradação. A perda da função de APC e o concomitante ganho de função extra-juncional da β -catenina confere uma vantagem de seleção e expansão clonal de uma célula epitelial, podendo dar origem à uma displasia (ARENDS, 2013). Neste modelo, mutações em *K-RAS* (do inglês, *Kirsten rat sarcoma*) também cumprem um papel importante, este gene é encontrado mutado em aproximadamente 50% dos CCRs esporádicos. Tais mutações induzem um aumento da proliferação através da via de sinalização RAS-RAF-ERK conferindo vantagens de crescimento à essas células (PINO; CHUNG, 2010). Atualmente, estudos apontam outros dois modelos de progressão do CCR, além do proposto por Fearon e Volgstein, que explicariam o fato de 30% dos casos de CCR não seguirem este modelo, ocorrendo através dos seguintes modelos: a) Via alternativa e b) Via dos pólipos serráteis (PANCIONE et al., 2012). A via alternativa caracteriza-se por ter como evento inicial na progressão a mutação ou silenciamento epigenético

em genes MMR. (KIM et al., 2012) Já a via de pólipos serráteis ainda não está muito bem definida, estudos apontam um fenótipo metilador de ilhas CpG além de um papel muito importante para mutações em *KRAS* e *BRAF* durante as etapas iniciais da progressão do CCR (YAMANE et al., 2014).

A primeira etapa do processo de progressão do CCR consiste na transformação do epitélio intestinal normal em criptas aberrantes, através de uma proliferação desregulada em conjunto com alterações citológicas. Diversas vias de sinalização finamente reguladas controlam a dinâmica da homeostase deste tecido. Dentre elas, a via *Wingless* (WNT) cumpre um papel fundamental na progressão do CCR. A via WNT está diretamente ligada à indução de um estado proliferativo e, mais especificamente, à regulação da progressão do ciclo celular, no qual a β -catenina, uma proteína integrante das junções aderentes, cumpre um papel central nesta via. Grande parte dos tumores colorretais são iniciados por mutações que ativam a via de sinalização WNT (BJERKNES; CHENG, 1999).

Miofibroblastos sub-epiteliais localizados logo abaixo da base da cripta (Nicho de células tronco) secretam glicoproteínas que atuam como ligantes da via WNT. Na ausência destes ligantes, a via WNT está inibida e a β -catenina citoplasmática é encaminhada para a degradação através do complexo composto pelas proteínas GSK3 β (do inglês, *glycogen synthase kinase 3*), Axina, APC e CKI (do inglês, *casein kinase I*). Porém, quando as glicoproteínas WNT solúveis se associam aos receptores Fz (*Frizzled*) e LRP5/6 (do inglês, *Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 e 6*) das células epiteliais, ocorre a ativação da via WNT e desencadeia-se uma cascata de sinalização e dissociação do complexo fosfodestrutivo da β -catenina, inibindo sua via proteossoma. Assim, essa proteína é acumulada no citoplasma, podendo translocar-se ao núcleo e associar-se com o fator transcricional TCF/LEF (do inglês, *T-cell Factor - lymphoid enhancer factor*), induzindo a transcrição de genes como ciclina D1, TCF1 e metaloproteinase 7 (MMP7), mesmo na ausência de ligante, e que são relacionados com a proliferação celular, evasão da apoptose e invasividade celular (CLEVERS; NUSSE, 2012).

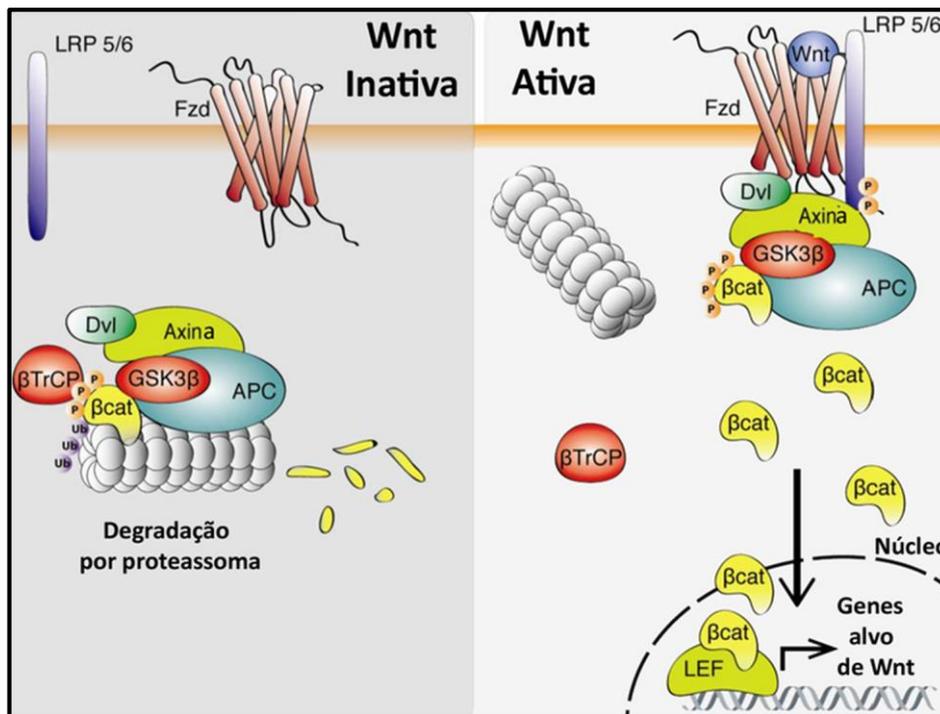


Figura 3: Via canônica Wnt. A figura ilustra a via Wnt inativa (painel esquerdo) na ausência de estímulo. Os níveis de β -catenina citoplasmática são mantidos através do complexo formado por APC/CKI/GSK3/axina. A GSK3 β fosforila β -catenina que é então ubiquitinada pela β TrCP e degradada por proteassoma. A ativação da via Wnt na presença de ligantes ou mutações ativadoras (painel direito) induz a associação do complexo junto ao receptor LRP fosforilado. Desta forma, não há a ubiquitinação da β -catenina, a qual se acumula no citoplasma podendo se translocar ao núcleo onde se associa a fatores transcripcionais e induz a expressão de genes alvos da via Wnt. Adaptado de (INESTROSA; VARELA-NALLAR, 2013).

O acúmulo nuclear da β -catenina é observado nas células da base das criptas e esse acúmulo diminui gradativamente conforme as células se aproximam do topo da cripta (NIESSEN; GOTTARDI, 2008). Alterações nos componentes desta via, como em *APC* e β -catenina são consideradas um evento inicial para formação de pólipos, por favorecer a proliferação celular. Além disso, é importante ressaltar que a β -catenina possui uma importante função estrutural através da associação E-caderina- β -catenina que promove a adesão intercelular através das junções aderentes. Em tumores epiteliais primários, como no CCR, a saída da β -catenina das junções aderentes pode ocasionar a perda dos contatos mediados por E-caderina, principal proteína das junções aderentes, permitindo o destacamento celular e a invasão de tecidos, culminando na sua disseminação para sítios distantes (metástase) (THIERY; SLEEMAN, 2006). Neste contexto, a perda da E-caderina assim como a ativação da via WNT, dentre outros eventos, contribui para a perda de características epiteliais e a aquisição de um fenótipo mesenquimal. Em conjunto, estes eventos morfogenéticos são atualmente conhecidos como transição epitélio-mesenquimal (TEM), fenômeno que ocorre durante as primeiras etapas

da cascata metastática, sendo de fundamental importância e muito discutida na progressão do CCR.

1.2. Transição Epitélio-Mesenquimal

A maioria dos tumores humanos é de origem epitelial e 90% das causas de mortalidade por câncer são atribuídas à metástase, e não ao tumor primário do qual tais lesões malignas são provenientes (GUPTA; MASSAGUÉ, 2006). Similar a outros tipos de câncer, o carcinoma colorretal apresenta uma certa preferência de órgão para formação de metástase, sendo o fígado envolvido em 70% dos casos de metástases provenientes de CCR. O segundo órgão alvo de metástase do CCR é o pulmão, sendo responsável por 20 a 30% de todas as metástases distantes derivadas deste tipo de câncer (SCHLUTER et al., 2006). A habilidade de metastização está associada a diversos aspectos, tais como: capacidade da célula de se destacar da massa tumoral primária, romper a membrana basal, migrar e invadir tecidos adjacentes; intravasalar e sobreviver na corrente sanguínea ou linfática, extravasar e, finalmente, colonizar outros órgãos. Neste contexto a TEM é de suma importância durante das etapas iniciais do processo metastático (HANAHAH; WEINBERG, 2011).

A TEM ocorre de maneira fisiológica, no desenvolvimento embrionário e durante o reparo tecidual, mas pode também ocorrer durante processos patológicos, como a fibrose de tecidos e na progressão tumoral (THIERY et al., 2009). A TEM é um programa morfogênético na qual células epiteliais perdem seus marcadores, como E-caderina, ZO-1 e claudinas e adquirem características mesenquimais, como aumento da expressão de N-caderina, vimentina, fibronectina e aquisição de um fenótipo relacionado à migração e invasão, como mostra a figura 5.

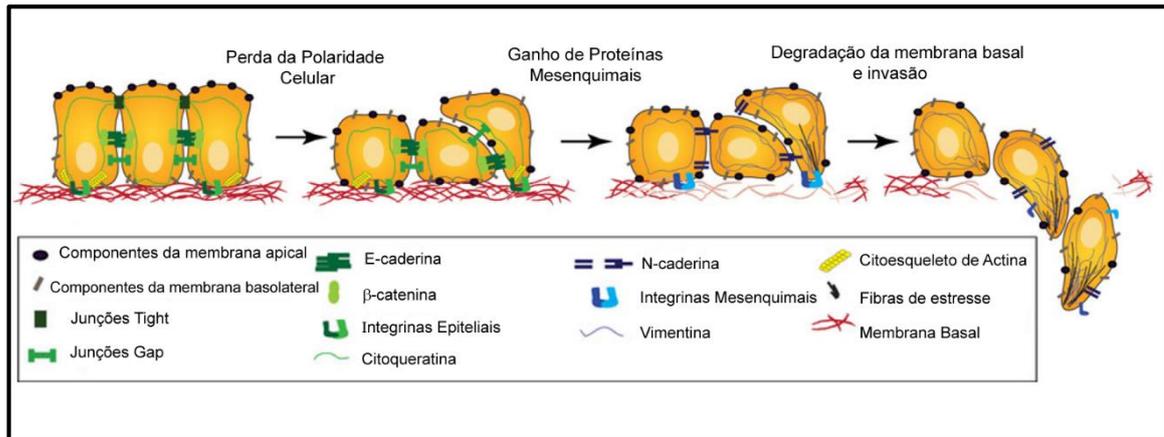


Figura 4: Eventos envolvidos na Transição Epitélio-Mesenquimal. As células epiteliais perdem progressivamente a polaridade e seus marcadores epiteliais e ocorre um ganho de marcadores mesenquimais. Essas características são acompanhadas de um aumento na capacidade migratória/invasiva. Adaptado de (DOUGLAS et al., 2010).

Além das alterações ocorridas na polaridade e na adesão celular, outras mudanças complexas na arquitetura e fisiologia da célula ocorrem concomitantemente. As células em TEM sofrem drásticas alterações no citoesqueleto de actina, essas alterações incluem a aquisição de um fenótipo mesenquimal com a formação de extensões de membrana que são essenciais para a migração celular, como o lamelipódio e filopódio.

O tipo de migração celular mais associado com células em processo de TEM é o mesenquimal, no qual as células isoladas são alongadas (formato fibroblástico) e o processo invasivo requer altos níveis de adesão célula- matriz e proteólise. Porém, independente de TEM, as células tumorais podem migrar de outras maneiras para progredir no processo metastático. Outros tipos de migração celular incluem a migração ameboide (também de células isoladas) e a migração coletiva (na qual as células tumorais mantêm as junções celulares). Os diferentes tipos de migração coexistem no mesmo tumor e, inclusive, são capazes de realizar uma interconversão entre eles dependendo do estímulo do microambiente (FRIEDL; WOLF, 2010). Neste contexto, é importante ressaltar o papel das pequenas GTPases Rho, principais proteínas reguladoras do citoesqueleto. As GTPases Rho têm a capacidade de clivar guanosina trifosfato (GTP), e ciclam entre um estado ativo ligado em GTP e um inativo ligado em guanosina difosfato (GDP) e, juntamente com outras proteínas, regulam a polimerização do citoesqueleto de actina (LEVE; MORGADO-DÍAZ, 2012).

Da mesma forma que a TEM, o processo de transição mesênquimo-epitelial (MET, do inglês *Mesenchymal-Epithelial Transition*), inverso à EMT, é essencial no desenvolvimento

embrionário normal e existem evidências de que este processo ocorra durante a instalação da metástase, permitindo que as células que sofreram EMT e realizaram intravasamento e extravasamento, possam aderir e proliferar nos sítios secundários de metástases (GUNASINGHE et al., 2012). Existe toda uma mecânica que controla os eventos que configuram o desenvolvimento da TEM, sendo regulado através de diversas vias de sinalização e de diferentes formas: Por controle transcricional, através da expressão de fatores de transcrição como Snai1 (Snail), Snai2 (Slug), Twist1 e Zeb, por mecanismos não transcricionais (pequenos RNAs não codificantes e *splicing* alternativo) e controles traducionais e pós traducionais, os quais afetam a estabilidade e localização proteica.

1.3. Vias de sinalização celular envolvidas na transição epitélio-mesenquimal

Durante o processo de TEM há o envolvimento de diversas vias de sinalização, dentre elas podemos citar a importância das vias de Wnt e TGF- β . Essas vias convergem na ativação de fatores de transcrição como Snail, Slug e Twist, que promovem, dentre outras ações, a repressão transcricional de E-caderina (LINDSAY et al., 2012). Além disso, as vias de NOTCH e Hedgehog, cujo papel na embriogênese é bastante conhecido, também foram recentemente associadas à TEM através do aumento da atividade de Snail e de características mesenquimais (TIMMERMAN, et al., 2004; LOURO, et al., 2002). Diversos estudos apontam que proteínas e fatores secretados pelo microambiente tumoral, como a citocina IL-6 por exemplo, têm uma ação importante sobre as células do fronte invasivo da massa tumoral, podendo induzir essas células à entrar no processo de TEM (THIERRY et al., 2009; COLOMIERE et al., 2009).

Ademais, vias de sinalização classicamente relacionadas à proliferação e sobrevivência foram recentemente associadas à TEM em CCR, como é o caso das vias de PI3K/AKT e MAPK (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*) (SIPOS; GALAMB, 2012). A via das MAPK tem um papel central no estado proliferativo da célula tumoral, sendo a via canônica composta por 4 “cascatas”, que são classificadas de acordo com o membro da família de MAPK presente ao final da cascata de fosforilação, são elas: ERK 1 e 2 (*extracellular signal-related Kinases*), JNK 1, 2 e 3 (*c-JUN N-terminal kinase*), p-38-MAPK e ERK5. Fatores de crescimento são considerados os principais reguladores da via de ERK 1 e 2, e o estresse celular é o principal indutor das vias JNK e p38-MAPK, enquanto que estes dois fatores iniciadores são capazes de ativar a cascata de ERK5. Essas cascatas de sinalização, no núcleo, ativam fatores de transcrição como c-Jun c-Fos e c-Myc que promovem a transcrição de genes que regulam o ciclo celular, modulando assim, a proliferação e a sobrevivência celular (PRITCHARD; HAYWARD, 2013).

A via de PI3K/AKT inicia-se pela ativação da subunidade catalítica de PI3K, a qual recruta proteínas que ativam AKT. As principais funções de AKT são estimular a sobrevivência e a proliferação celular, isto acontece de diferentes maneiras, por exemplo, a AKT inibe a GSK3- β , o que impede a degradação de ciclina D1, regulando positivamente o ciclo celular (DIEHL et al., 1998). As vias de PI3K/AKT e MAPK são classicamente associadas à proliferação e sobrevivência, portanto, estão intimamente ligadas ao processo de resistência a tratamentos. No entanto, estudos apontam que estas vias quando desreguladas e no microambiente podem se interconectar com vias que regulam o processo de transição epitélio-mesenquimal, migração e invasão celulares, eventos de extrema importância durante a progressão do CCR (ALEXANDER; FRIEDL, 2012).

Desta forma, os mecanismos que sustentam tanto a proliferação e sobrevivência quanto a invasividade, possuem vários elementos em comum e se complementam. Por exemplo, uma vez ativada, ERK 1 e 2 facilitam o processo de TEM através do aumento da expressão de fatores de transcrição repressores da E-caderina e de reguladores da migração e invasão celular, como as RHO GTPases, (LAMOUILLE et al., 2014). Além disso, a via de Ras pode regular integrinas, induzir a expressão do oncogene *MET* e também a expressão/atividade de MMPs, proteínas que degradam matriz extracelular e possuem um papel crucial no processo de invasão celular (CAMPBELL; CHANNING, 2004). É importante citar também que via de PI3K/AKT é capaz de induzir a ativação da via Wnt, e que, além disso, foi descrito que a via das MAPK pode levar à fosforilação o receptor LRP6, também ativando a via de WNT, a qual é bem associada ao processo de TEM. Ademais, estudos mostram o envolvimento de AKT na regulação da TEM em CCR, sendo responsável por alterações como downregulação de E-caderina e aumento da capacidade invasiva (SIPOS; GALAMB, 2012; GRILLE et al., 2003).

Além das quinases intracelulares citadas acima, há também receptores tirosina quinase (RTKs) envolvidos com a TEM, como é o caso de c-MET, FGFR, EGFR, dentre outros (MOUSTAKAS; HELDINI, 2007). Neste contexto, a subfamília de RTK dos receptores Eph (do inglês, *Erythropoietin-producing hepatoma*) foi recentemente associada à regulação da TEM (KANDOUZ, 2012). Esta subfamília de receptores vêm despertando amplo interesse no estudo do desenvolvimento do câncer epitelial uma vez que estão envolvidos com regulação de diversos processos celulares importantes durante a progressão tumoral, como a organização do citoesqueleto de actina, a adesão intercelular e a motilidade celular.

1.3.1. Os receptores Eph

Os receptores Eph são divididos em tipos A e B, baseado na interação com seus ligantes, as Ephrinas. Existem 9 membros do tipo A (EphA1-8 e EphA10) e 4 membros do tipo B (EphB1-4 e EphB6). Os receptores do tipo A se ligam preferencialmente às Ephrinas do tipo A e os receptores do tipo B, às Ephrinas do tipo B. A exceção é o EphA4, que pode se ligar tanto às Ephrinas A quanto às Ephrinas B. As Ephrinas são classificadas de acordo com a conservação de sua sequência. Ephrinas A são ligadas à membrana plasmática por uma âncora GPI (glicofosfatidilinositol), enquanto Ephrinas B apresentam um domínio transmembrana (KULLARNDER; KLEIN, 2002).

Uma peculiaridade dessa subfamília de RTK é a capacidade de gerar sinais bidirecionais, isto é, o receptor pode agir como um ligante da mesma forma que o ligante Ephrina pode agir como um receptor. A ligação da Ephrina ao receptor induz a atividade tirosina quinase do mesmo gerando a via “*forward*” na célula que expressa o receptor. Porém, esta ligação também pode gerar um sinal para a célula que expressa a Ephrina, chamada de sinalização “*reverse*”. Enquanto a maioria dos RTKs necessitam de dimerização para sua atividade, os receptores Eph, adicionalmente, necessitam de uma organização em aglomerados (STEIN et al., 1998). A figura 5 ilustra a estrutura e tipos de sinalização mediada pelos receptores Eph e ligantes Ephrinas.

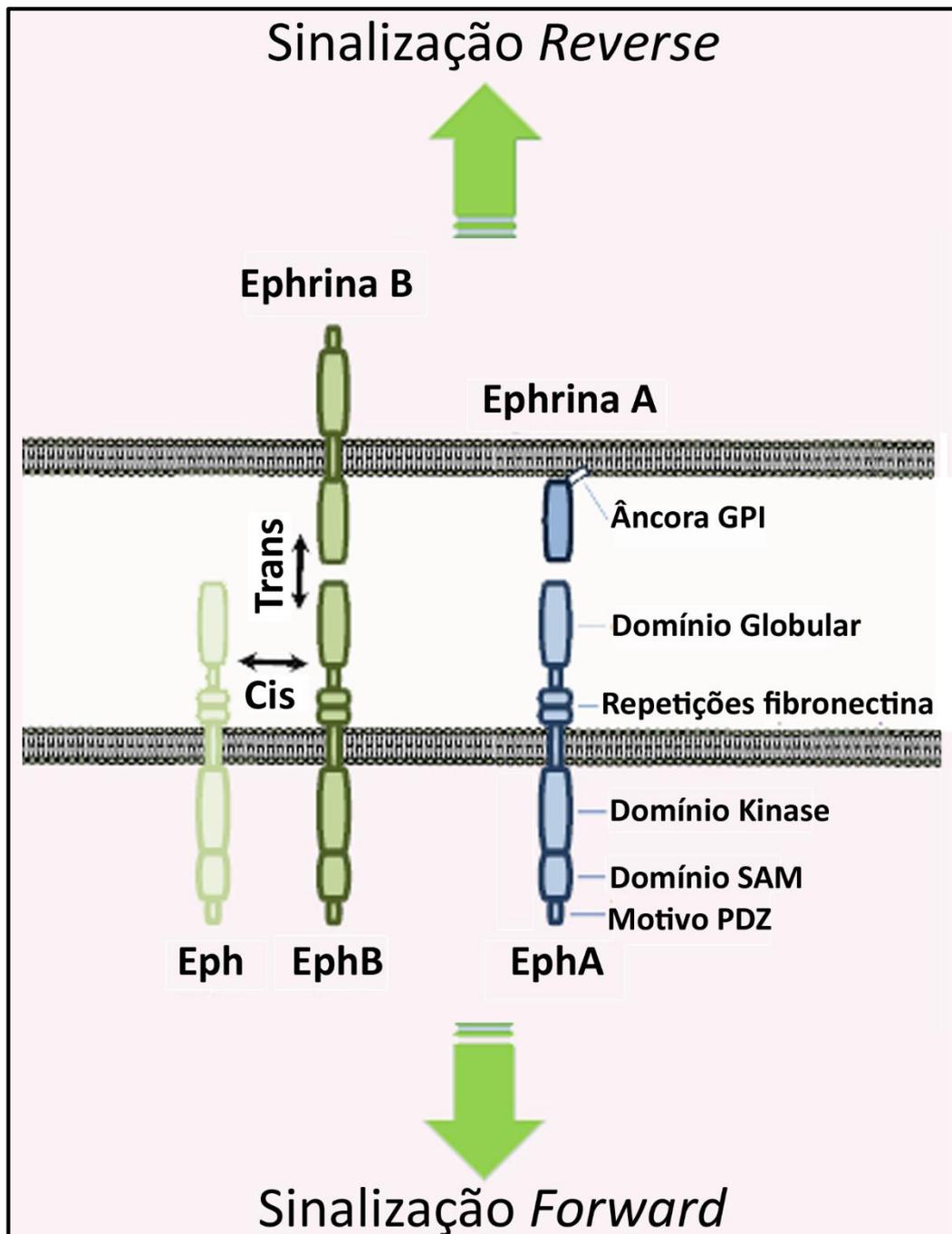


Figura 5: Estrutura dos receptores Eph e Ephrinas. A porção extracelular dos receptores Eph é composta por um domínio de associação com o ligante e duas repetições do tipo fibronectina III. A porção citoplasmática é formada por uma região justamembranar, um domínio Tirosina Kinase, um domínio de ligação proteína-proteína de motivo SAM e um domínio de ligação PDZ na porção C-terminal. As Ephrinas A estão associadas à membrana por uma âncora GPI e as do tipo B possuem um domínio transmembranar. Uma vez ligadas, a Ephrina transmite um sinal forward para a célula que expressa o receptor e este último gera na célula que expressa a Ephrina uma sinalização Reverse. Além disso, Ephs e Ephrinas podem interagir de maneira Trans, se ligando à molécula da célula vizinha, ou de maneira Cis, quando a ligação acontece em moléculas na mesma célula. Adaptado de (KANDOUZ, 2012).

O sistema Eph- Ephrina está envolvido na regulação de diversos processos celulares, como na organização do citoesqueleto de actina, na adesão célula-substrato bem como na adesão intercelular, na morfologia e no movimento celular. Além disso, já foram descritas atividades relacionadas a proliferação e diferenciação celular e essas atividades dependem da combinação dos diferentes receptores com seus possíveis ligantes (PASQUALE, 2008). Os estudos sobre o tema descrevem múltiplas funções do sistema Eph-Ephrina, muitas vezes contraditórias, onde diferentes condições e combinações entre receptor e ligante podem promover adesão ou dispersão celular, por exemplo. Ainda, Astin e colaboradores observaram que a competição entre os tipos de Ephs pode resultar tanto em inibição de migração mediante contato com outra célula quanto na indução de invasividade (ASTIN et al., 2010).

O papel do sistema Eph no desenvolvimento embrionário é mais conhecido, a interação entre receptores e ligantes controla a repulsão ou adesão entre as células assim como o movimento celular durante a padronização de tecidos. O sistema Eph-Ephrina está intimamente ligado ao sistema de adesão celular, uma vez que ele controla a opção de interação entre células ou tecidos diferentes iniciando a formação ou ruptura dos contatos celulares. Neste sentido, estudos já mostraram que adesão intercelular ocorre em um cenário de baixa atividade quinase dos receptores Eph (como baixa densidade de Receptor/Ephrina). Enquanto que uma ativação robusta de Eph em alta densidade de receptor/ligante promove a desestruturação do complexo Eph/Ephrina, destacamento celular e alterações do citoesqueleto mediadas por Rho-GTPase (NIEVERGALL et al., 2011). Além disso, estudos pré-clínicos e dados de amostras humanas demonstram que membros do sistema Eph-Ephrina regulam o crescimento tumoral, invasão e metástase em tumores de mama, de pulmão e colorretais (BREANTLEY-SIEDERS, 2012).

Estudos mostram um aumento de expressão e/ou atividade de vários receptores e Ephrinas em tumores, especialmente em estágios mais avançados da progressão tumoral (DODELET; PASQUALE, 2000; MERLOS-SUAREZ; BATLLE, 2008). No CCR, especificamente, os receptores Eph também se encontram com expressão elevada. (JANES , et al., 2008). Porém, as sinalizações desse sistema são complexas e seu papel na tumorigênese ainda não está bem definido. (BREANTLEY-SIEDERS, 2012).

Em particular, o receptor EphA4, que apresenta a maior promiscuidade de ligações, tem sua alta expressão associada com diversos tipos de tumores, sendo inclusive, fator de mau prognóstico para câncer gástrico, (MIYAZAKI et al., 2013). Estudos observaram que o EphA4 está associado à propriedades agressivas como migração celular e invasividade em alguns tipos tumorais, tais como tumores de mama e gliomas (FOX; KANDPAL, 2004; FUKAI et al., 2008).

Além disso, Liu e colaboradores o correlacionaram com a regulação de metaloprotease em células de pâncreas. (LIU et al., 2014)

O Papel de EphA4 no contexto da adesão celular ainda não está esclarecido, porém estudos indicam que interações do EphA4 com Ephrinas A podem regular a TEM durante o desenvolvimento tecidual normal. A associação entre Eph/Ephrinas com as proteínas de adesão celular envolvidas na TEM ainda não é clara, porém estudos sugerem que os receptores Eph e seus ligantes interagem com diferentes proteínas de membrana como E-caderinas, claudinas e integrinas, controlando a formação das junções celulares e a adesão à matriz extra-celular (KANDOUZ, 2012)

Algumas vias de sinalização já foram descritas por serem ativadas por EphA4, porém estas podem ser dependentes tanto do ligante e do contexto em que a célula se encontra quanto tecido e célula específica. Dentre elas, estão a ativação de Rho e JAK/STAT em células musculares e a ativação transiente de MAPK pela via “*forward*” em células derivadas de câncer de próstata (LAI et al., 2004; SHIN et al., 2008). Ademais, estudos mostram que o EphA4 também pode formar um complexo com FGFR potencializando a via *downstream* deste último, através da ativação de MAPK/Akt/Rac1/Cdc42 (FUKAI et al., 2008). Portanto, EphA4 ativa uma diversidade de vias de sinalização, que continuam a ser identificadas, sendo muitas delas consideradas sinalizações-chave no processo tumorigênico, o que posiciona o EphA4 em um dos principais eixos de vias de sinalização celulares em câncer.

1.4. Terapêutica do Câncer colorretal

O câncer colorretal agrupa tumores do cólon e do reto, sendo os tumores de cólon correspondentes a 72% dos casos de CCR e os de reto, 28%. Embora sejam agrupados na mesma classificação, diferenças anatômicas entre eles fazem com que a abordagem terapêutica, e conseqüentemente as taxas de recorrência da doença sejam diferentes entre tumores de cólon e de reto (CENTELLES, 2012).

O esquema terapêutico é escolhido baseado no estadiamento do tumor. Estes podem ser classificados de acordo com o sistema TNM (do inglês *Tumor–Node–Metastasis*), no qual os tumores são avaliados quanto ao parâmetro “T”, que mensura o quanto a massa tumoral cresceu para dentro da parede intestinal, “N”, a extensão de dispersão do tumor para linfonodos regionais e o parâmetro “M” avalia a presença metástases para outros órgãos. Essas letras são combinadas com número de 1 a 4 para representar a severidade do parâmetro. De acordo com a essa classificação ocorre o estadiamento dos pacientes, que são divididos em estágios de I (doença menos avançada) a IV (doença mais avançada).

O tratamento do câncer colorretal é multidisciplinar, porém por muitos anos a cirurgia foi o único tratamento. No Brasil, a Portaria nº 601, de 26 de junho de 2012, aprova a ressecção cirúrgica por via aberta do tumor primário e linfonodos regionais como o tratamento padrão para os tumores de cólon. Nos pacientes de estágio III e alguns casos de estágio II, a quimioterapia é aplicada. As principais classes de drogas usadas no tratamento do CCR são os agentes platinóides (ex:oxaliplatina), os análogos às pirimidinas precursoras de nucleotídeos (ex:5-fluouracil,5-FU) e os agentes inibidores da topoisomerase (ex:Irinotecano). O esquema padrão de quimioterapia para o CCR inclui o 5-FU, leucovorin e oxaliplatina (FOLFOX) ou 5-FU, leucovorin e irinotecano (FOLFIRI) (TONON et al., 2007). Além dos quimioterápicos clássicos, agentes biológicos com alvo em moléculas-chave de vias de sinalização como os anticorpos monoclonais Bevacizumab (anti-VEGF) e Cetuximab (anti-EGFR) vem sendo testados em estudos clínicos quanto à eficácia no tratamento combinado do CCR (WALDNER; NEURATH, 2010). A radioterapia não é aplicada no câncer de cólon devido à alta toxicidade gerada uma vez que, anatomicamente, o cólon é uma região móvel e órgãos próximos importantes poderiam ser atingidos.

Para o câncer de reto, O tratamento padrão, segundo a Portaria nº 601do Ministério de Saúde do Brasil, de 26 de junho de 2012, é a ressecção cirúrgica total do mesorreto, porém, mesmo após cirurgia ótima, a taxa de recorrência local nesta doença justifica a realização de tratamento multidisciplinar para os pacientes com doença no estágio II e III. A quimiorradioterapia complementar pode ser administrada antes da cirurgia (neoadjuvante) para tumores em estadiamentos T3/T4 ou N1, ou após o procedimento cirúrgico (adjuvante) para tumores em estadiamentos II ou III.

1.4.1. A radioterapia e seus efeitos a nível celular e tecidual

A radioterapia (RT) é uma modalidade terapêutica utilizada na clínica para o tratamento de tumores desde 1897 (PRISE et al., 2005) e é considerada terapia de primeira linha para diversos tumores sólidos, tanto com intenção curativa para tumores primários como paliativa em caso de tumores muito avançados (YACOUB et al., 2006). A RT pode ser administrada de forma adjuvante (após a cirurgia), na qual o objetivo é reduzir possíveis focos microscópicos remanescentes do tumor, ou neoadjuvante (antes da cirurgia), na qual o objetivo é reduzir o tamanho do tumor e facilitar o procedimento operatório (PACH et al., 2012). Dentro dos protocolos terapêuticos do câncer de reto, estudos mostram que a RT neoadjuvante oferece benefícios quanto a recorrência local, porém sem aumento da sobrevida global em comparação ao esquema adjuvante e à apenas cirurgia em pacientes de estágios avançados da doença (tumores com classificação T3 e T4) (GLIMELIUS, 2013)

Os protocolos de RT neoadjuvante consistem em doses hiperfracionadas de 1,8 a 2,0 Gy durante 5 a 7 semanas ou doses hipofracionadas de 5Gy durante 5dias. Os esquemas fracionados tem o objetivo de permitir a reoxigenação da massa tumoral, nos intervalos entre as frações, potencializando a morte das células tumorais, baseado no efeito do oxigênio, no qual as células em um ambiente oxigenado, são muito mais sensíveis à morte por causa da maior geração de espécies reativas de oxigênio (HALL; GIACCIA, 2006). O fracionamento também visa o reparo de células normais afetadas, porém, não só as células do tecido normal, mas também as células tumorais podem se reestabelecer e gerar uma repopulação do tumor pelas células sobreviventes à radiação. Estudos mostram que tumores que reaparecem após a RT tendem a apresentar condições mais agressivas e pior prognóstico (MADANI et al., 2008). Além disso, metástases ocorrem frequentemente após a recorrência pós radioterápica (VICINI et al., 2003; VAN DEN BRINK et al., 2004) e a literatura é inconclusiva em relação ao grupo de pacientes que realmente se beneficiariam dos esquemas existentes de RT (PACH et al., 2012). O insucesso terapêutico pode ser devido à resistência intrínseca (através de mutações e mecanismos epigenéticos pré-existentes no tumor) ou via resistência adquirida (seja por novas mutações induzidas ou alteração de expressão e localização proteica após a exposição ao tratamento, podendo ser por via epigenética), onde diversos mecanismos estão relacionados com ambas as formas de resistência. (ALEXANDER; FRIEDL, 2012)

Durante décadas, a principal ação terapêutica da RT era baseada no dogma central do DNA atingido, no qual os efeitos da radiação eram atribuídos somente ao fato da radiação causar danos ao DNA de forma que ele fique incompatível com a vida celular (PRISE et al., 2005) Desta forma, a maioria dos estudos que investigavam a resistência celular à radiação ionizante focava-se somente nos mecanismos de reparo do DNA das células atingidas pelas radiação. Nas últimas décadas, um novo paradigma tem sido defendido, no qual há um efeito tardio da radioterapia e uma influência do microambiente irradiado sobre as células, ativando complexas vias de sinalização que atuam a nível autócrino e parácrino e são definidos como “*non-targeted responses*” (WARD, 2002). Nesse contexto, estudos mostram que a radiação induz a secreção de fatores de crescimento e citocinas no microambiente irradiado, como EGF (do inglês, *epidermal growth factor*), TNF α (do inglês, *Tumor necrosis factor α*), IL1, IL6 e TGF- β . Além disso, sabe-se que as células não morrem imediatamente após a exposição à radiação e as células sobreviventes continuam interagindo com esse microambiente irradiado (BARCELLOS-HOFF et al., 2005). Tais fatores podem induzir a ativação de diversas vias de sinalização, como por exemplo a vias das MAPK, observada em linhagens de câncer de próstata (SKORTSOVA et al, 2008), o que poderia favorecer a geração de um fenótipo maligno

relacionado à resistência e à invasão (ALEXANDER; FRIEDL, 2012). Além disso, as espécies reativas de oxigênio geradas pela radiação podem atuar como segundos mensageiros em vias de sinalização e alterar a expressão gênica através da ativação de quinases e fosfatases e fatores de transcrição sensíveis (POLI et al., 2004).

No contexto das vias de sinalização induzidas e dos efeitos gerados nas células que sobrevivem à radiação, estudos anteriores do nosso grupo mostraram que a radiação causa desestruturação das junções celulares nas células diretamente atingidas, e que a progênie de células de CCR sobreviventes à radiação apresentam um fenótipo *TEM-like* com um aumento do potencial invasivo e migratório e envolvimento da via Wnt/ β -catenina (DE CARVALHO et al., 2006; BASTOS et al., 2014). De forma geral, a maioria dos estudos focam nos efeitos nas células diretamente atingidas pela radiação, poucos investigam as vias de sinalização induzidas pela radiação e seus efeitos a longo prazo.

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Devido à alta frequência de recorrências locais mais agressivas e formação de metástases após a radioterapia no câncer colorretal, surge a necessidade de se compreender os eventos moleculares que induzem as células expostas à radiação ionizantes a não só sobreviver, mas a apresentar um fenótipo com maior agressividade, como o aumento de migração e invasão celular. Nesse sentido, não há estudos sobre as vias de sinalização que sustentam o fenótipo agressivo das progênes de células sobreviventes à radiação em câncer colorretal. Tal fenótipo poderia ser responsável por gerar os eventos relacionados à falha terapêutica descritos anteriormente.

Portanto, um melhor entendimento das vias de sinalização envolvidas nesse processo torna-se de suma importância na tentativa de propor novos alvos para desenvolvimento de fármacos que possam agir em conjunto com a radioterapia a fim de diminuir as altas taxas de falha terapêutica deste importante tipo de câncer.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Identificar vias de sinalização celular envolvidas na aquisição do fenótipo relacionado à TEM resistente e agressivo de células de CCR sobreviventes à radiação ionizante.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar receptores de membrana que são ativados nas progênes de células sobreviventes à radiação;

- Analisar o mecanismo de internalização da E-caderina que poderia contribuir com a dispersão celular observada nas progênes sobreviventes à irradiação;

- Investigar vias de sinalização *downstream* e o mecanismo pelo qual os receptores de membrana estariam dando suporte ao perfil agressivo dessas progênes;

- Avaliar se a inibição das vias ativadas identificadas é capaz de reverter o alto potencial migratório e invasivo das progênes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Anticorpos

O anticorpo monoclonal *mouse* anti EphA4 e *mouse* anti- α -tubulina foi adquirido da Invitrogen Inc. (Carlsbad, CA, EUA). O anticorpo policlonal *rabbit* anti-p-EphA4 (Tyr-602) foi adquirido da Ecm Biosciences (Versailles, KY, USA). O anticorpo *rabbit* anti fosfo tirosina foi adquirido da Millipore (Billerica, MA, USA) O anticorpo monoclonal *mouse* anti-E-caderina (clone 36) foi adquirido da BD Biosciences (San Diego, CA, EUA). Os anticorpos anti-p-AKT e anti-AKT foram adquiridos da Cell Signaling (Danvers, MA, EUA). Os anticorpos *mouse* anti-p-ERK e anti-ERK foram adquiridos na Sigma e o anticorpo *mouse* anti-GAPDH, da Santa Cruz (Santa Cruz Biotech, Dallas, Texas, EUA). Os Anticorpos Alexa Fluor® 488 IgG-*goat*-anti-*mouse* e anti *rabbit*, Alexa Fluor® 546 IgG-*goat*-anti-*mouse* foram obtidos da Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Anti *mouse* e anti-*rabbit* IgG conjugado a HRP foram adquiridos da GE Healthcare (Chalfont St Giles, RU). O 4' dicloridrato de 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI;) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

4.2. Reagentes e Kits

Os kits Human Phospho-RTK Array e Human Phospho-Kinase Array foram adquiridos da R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA). A Doxazosina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) foi dissolvida em DMSO na concentração de 75mM e armazenada em alíquotas a -20°C. O inibidor de MEK, PD98059 (Calbiochem, La Jolla, CA, EUA) foi mantido a -20°C, na concentração de 50 mM. O inibidor de Pi3K, LY294002 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) foi mantido a -20°C, na concentração de 8 mM. O siRNA para EphA4 foi obtido da Dharmacon (GE Healthcare, Buckinghamshire, RU) e o *Scramble*, da Ambion (Life Technologies, Carlsbad, CA, US).

4.3. Cultura de células e tratamento com radiação

A Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano HT-29 (HTB-38 TM) foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, EUA). As células HT-29 são moderadamente diferenciadas, com mutações em BRAF, PIK3CA, TP53, SMAD4 e APC (ROWAN et al., 2000; FLATMARK et al., 2004). As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's Medium, GIBCO -Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina G (100 mg/L) e estreptomicina (60 mg/L), a 37 ° C em estufa com 5 % CO₂/ 95% de O₂. As células em subconfluência foram expostas a

uma única dose de radiação (5Gy) a 25° C utilizando um irradiador gama de ¹³⁷Cs (IBL 437Clife, CIS bio International) a uma taxa de dose de 2,65 Gy / min. As células controle (não irradiadas) foram mantidas em meio DMEM e as células irradiadas mantidas em confinamento com o mesmo meio irradiado durante 24 h. Após este tempo, as células controle e irradiadas foram tripsinizadas (com 0,05% de tripsina /0,02% de EDTA diluídos em PBS); plaqueadas em baixa densidade e mantidas até a formação de colônias progênes e então submetidas aos experimentos seguintes. A progênie derivada de células não irradiadas foram chamadas de " F1 Cont", e a progênie de células irradiadas foram chamadas de "F1 5Gy", como ilustra a figura abaixo.

4.4. Manipulação farmacológica de vias de sinalização

As células controle (não irradiadas) foram mantidas em meio DMEM e as células irradiadas mantidas em confinamento com o mesmo meio irradiado durante 24 h. Após este tempo, as células foram tripsinizadas e plaqueadas já com as respectivas drogas para os ensaios de invasão e migração. Enquanto que para os ensaios de immunoblotting e imunofluorescência, as progênes foram mantidas em DMEM e o tratamento foi realizado 24h antes da análise. O tempo de tratamento das progênes foi de 24 h para todas as drogas e todos os experimentos, sendo a Doxasozina utilizada na concentração final de 23µM, o LY294002 na concentração final de 12 µM e o PD98059 na concentração final de 50 µM, respectivamente.

4.5. Obtenção de lisados celulares e Immunoblotting

As progênes de células HT-29 controle e irradiadas foram homogeneizadas em tampão de lise (1 % de Triton X-100, 0,5% de deoxicolato de sódio, 0,2 % de SDS, NaCl 150 mM, EDTA a 2 mM, Hepes 10 mM, pH 7,4) contendo NaF 20 mM, ortovanadato de sódio 1 mM e coquetel de inibidores de protease (1:100) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA) durante 30 min a 4°C. Os lisados celulares foram submetidos a centrifugação (10.000 g/10 min; 4°C) e os sobrenadantes recolhidos e armazenados a -80°C para análise subsequente. Quantidades iguais de proteína (30µg/µL) provenientes dos lisados celulares foram separadas por SDS-PAGE em géis de poliacrilamida (10%). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, incubadas em tampão de bloqueio (5% de leite desnatado em solução de TBS-T (Tris-HCl, 20 mM, pH 7,6, NaCl 137 mM e Tween 20 0,1%) durante 1 h. Em seguida, foram incubadas *overnight* com anticorpos primários: anti-EphA4 (1:250), anti-α-tubulina (1:1000), anti-E-caderina (1:5000), anti-p-ERK (1:5000), anti-ERK (1:2000), anti-GAPDH (1:2000), anti-p-EphA4 (1:1000), anti-p-tirosina (1:1000), anti-p-AKT (1:1000) e anti-AKT (1:1000). Após sucessivas lavagens, as membranas foram incubadas por 1 h com anticorpos secundários

correspondentes, anti-*mouse* ou anti-*rabbit* conjugados à peroxidase, na diluição de 1:50000 em TBS-T0,01%, por 60 min. As membranas foram lavadas com TBS-T 0,1%, e a detecção da imunomarcagem foi realizada através de reação de quimioluminescência, utilizando o kit ECL Prime (GE Healthcare, Buckinghamshire, RU). A quantificação dos níveis proteicos foi realizada por análise densitométrica usando *software* LabWorks 4.6 (BIO RAD, Upland, CA, EUA). Anti- α - tubulina (1:500) ou anti - GAPDH (1:2000) foram usados como *housekeeping*.

4.6. Análise de receptores tirosina quinase (RTK) e fosfo quinases

Foram utilizados o kit Human Phospho-RTK Array e Human Phospho-Kinase Array (R&D Systems, Minneápolis, MN, EUA). Os lisados celulares de F1 controle e F1 5Gy (obtidos como descrito no item 4.4) foram incubados *overnight* em membranas de nitrocelulose dos Kits. As membranas do kit Human Phospho-RTK Array são revestidas com 49 diferentes anticorpos cada, em duplicata. Já o kit Human Phospho-Kinase Array contém duas membranas para cada lisado a ser analisado contendo ao todo 46 anticorpos anti-fosfoquinases e 2 anticorpos contra 2 proteínas totais. Após a incubação as membranas foram lavadas e incubadas por 1 h com anticorpos pan anti-fosfotirosina e strepto-avidina conjugados à HRP. A reação de quimioluminescência foi usada para detectar os receptores e as quinases intracelulares fosforiladas utilizando o kit ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, RU). A quantificação dos níveis de ativação proteica foi realizada por análise densitométrica usando *software* LabWorks 4.6 (BIO RAD, Upland, CA, EUA).

4.7. Imunoprecipitação

Para imunoprecipitação quantidades iguais de proteína (500 μ g) dos lisados celulares foram pre-cleared com 25 μ l de proteína G conjugada a esferas de sefarose (Zymed, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por 30 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi incubado overnight com 5 μ g de anticorpo primário Anti-EphA4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Em seguida, o sobrenadante foi incubado com proteína G conjugada a esferas de sefarose por 2 horas. Para dissociação, as esferas foram lavadas 3 vezes com PBS e os imunocomplexos foram aquecidos a 100°C em tampão de amostra Laemmli por 5 min. As amostras foram então separadas eletroforéticamente por SDS-PAGE usando géis de poliacrilamida na concentração de 10% e transferidas para membranas de nitrocelulose usando um aparelho de eletrotransferência semi seco (Bio-Rad Laboratories Inc.) a 10 V por 60 min. As membranas foram mantidas em tampão de bloqueio TBS-T contendo leite desnatado 5%, durante 60 min em agitador. Em seguida, foram incubadas com o anticorpo primário anti-fosfo-tirosina e secundário anti *rabbit* conjugado a HRP (GE Healthcare, Buckinghamshire, RU) overnight e por 1 hora a T.A,

respectivamente. As membranas foram lavadas 3 vezes em TBS-T e a detecção da imunomarcacão assim como a quantificacão dos nı́veis proteicos foi realizada como acima descrito.

4.8. Imunofluorescência

Células F1 controle e F1 5Gy foram cultivadas sobre lamínulas de vidro até a formacão de colônias, lavadas com PBS e fixadas com metanol 100% durante 20 min a -20° C. Em seguida, foram re-hidratadas com PBS/CM (PBS contendo CaCl₂ 100 mM e MgCl₂ 100 mM, pH 8,0). Posteriormente, foram bloqueadas com 0,2% de BSA e permeabilizadas com 0.1% Triton X-100 (60 min). Logo após, foram incubadas overnight com os anticorpos primários anti E-caderina (1:300), anti EphA4 (1:25) e anti p- EphA4 (1:25), seguidas de 1h de incubacão com seus respectivos anticorpos secundários conjugados a Alexa flúor 488 ou 546 (diluiçãõ 1:500), em seguida, quando indicado, as lamínulas foram incubadas com DAPI (1:1000; 1 min), lavadas e montadas utilizando Prolong Gold antifade, obtido da Molecular Probes (Carlsbad, CA, EUA). As lamínulas foram visualizadas em Microscópio Confocal à Laser, FV10i-O ou com o Microscópio Confocal de Varredura à Laser Nikon, modelo C2 (Nikon Instruments, Inc, New York) e as imagens foram analisadas através do software FV10-ASW (Olympus, Tokyo, Japan).

4.9. RNA de interferência e transfecção

O siRNA para EphA4 “SMARTpool: siGENOME EPHA4 siRNA” (Cat. M-003118-020005) foi obtida da Dharmacon (GE Healthcare, Buckinghamshire, RU). Como controle negativo (*Scramble*), foi utilizado o “Silencer ®Select Negative Control siRNA” (Cat. 4390844) obtido da Ambion (Life Technologies, Carlsbad, CA, US). As células HT-29 foram irradiadas, esperou-se 24h, e foram então tripsinizadas e plaqueadas em placas de 6 poço para a formacão das colônias progênies. Após 24h, essas progênies foram transfectadas utilizando meio especial para transfecção lipídica, OPIT-MEM® e *delivery* Lipofectamina® RNAiMAX (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Após a transfecção com 5nM de siRNA EphA4 e de *Scramble*, as células foram incubadas por 48 h e então os subseqüentes experimentos foram realizados.

4.10. Ensaios de migração e invasão celular

Para o ensaio de migração celular, células HT-29 F1 Controle e F1 5Gy (3x10⁴) foram cultivadas na superfície superior de insertos de membrana de policarbonato Transwell® (poro de 8 µm; Costar), Enquanto que para os ensaios de invasão celular, as células foram cultivadas

na câmara superior do mesmo inserto, porém, revestido com 20 μ L de Matrigel® (BD Biosciences) diluído 1:10 em DMEM isento de SFB. Para ambos os ensaios, utilizou-se meio DMEM suplementado com 10% de SFB como um quimioatraente na parte inferior da câmara, e após 24 h de incubação a 37°C, as células presentes na superfície superior da membrana foram retiradas com uma haste de algodão, uma vez que as células que atravessaram os poros são aquelas que invadiram e conseqüentemente encontram-se na parte inferior da membrana. A membrana foi então fixada com etanol 100% (por 10 min), coradas com cristal violeta. A migração e a invasão foi quantificada de acordo com a análise microscópica (Axio Observer Z1, Zeiss, Oberkochen, Germany) e a contagem total das células presentes em 5 campos aleatórios. Os valores são representados no gráfico como o número de vezes que a F1 5Gy invadiu em relação ao controle (onde os dados do F1 Controle foram normalizados para 1 e correspondem a média \pm SEM de ensaios em triplicata, em três experimentos independentes.

4.11. Análise estatística

Todos os dados quantitativos apresentados são médias \pm SEM de, pelo menos, três experimentos independentes. A análise estatística e os gráficos de barras foram realizados no programa GraphPad™Prism, 5.0 (GraphPad™ Software, San Diego, CA, EUA) através do teste-*t* de Student. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

5. RESULTADOS

5.1. As progênies de células sobreviventes à radiação apresentam aumento da atividade do receptor tirosina quinase EphA4.

Receptores Tirosina Quinase (RTK) são amplamente expressos nas células e são capazes de transmitir sinais do meio extracelular para o meio citoplasmático e ativar cascatas de sinalização, controlando diversos processos fundamentais para as células tumorais como proliferação e migração celular. Um trabalho prévio do nosso grupo, mostrou que progênies derivadas de células de CCR, HT-29, sobreviventes à radiação apresentavam um fenótipo relacionado à TEM, com aumento do potencial migratório e invasivo (BASTOS et al., 2014). Com o intuito de investigar vias de sinalização celular que estariam dando suporte à este fenótipo mais agressivo, inicialmente, decidimos avaliar o perfil de ativação dos RTKs nessas progênies celulares utilizando o *kit Human Phospho-RTK Array*. Este *kit* detecta o nível de fosforilação da tirosina em resíduos específicos correspondentes à ativação de um conjunto de 49 receptores tirosina quinase em uma única amostra, permitindo a comparação da ativação desses conjunto de receptores em diferentes amostras celulares. Células HT-29 foram irradiadas em subconfluência, confinadas no meio irradiado durante 24 h, tripsinizadas e cultivadas por três dias para permitir a formação de colônias progênies derivadas de *single cells* sobreviventes ao tratamento com irradiação. As colônias derivadas das células não irradiadas originaram as progênies F1 controle e as derivadas das células irradiadas originaram as progênies F1 5 Gy. Em seguida, o extrato proteico de ambas as progênies foi submetido à análise fosfoproteômica através da utilização do *kit Human Phospho-RTK Array*. Foi possível observar que dentre esse conjunto de RTKs, houve um aumento da expressão do receptor EphA4 fosforilado na F1 5 Gy em comparação à F1 Cont (Fig. 6A). Foi observado um aumento em resíduos de fosfotirosina quando o EphA4 foi imunoprecipitado e seguido de *immunoblotting* utilizando o anticorpo anti-p-tirosina (Fig. 6B). Este dado foi novamente confirmado através de *immunoblotting* usando o anticorpo anti-p-EphA4 (tyr 602). Além disso, observamos também que não houve alteração nos níveis de expressão total do EphA4 (Fig. 6C).

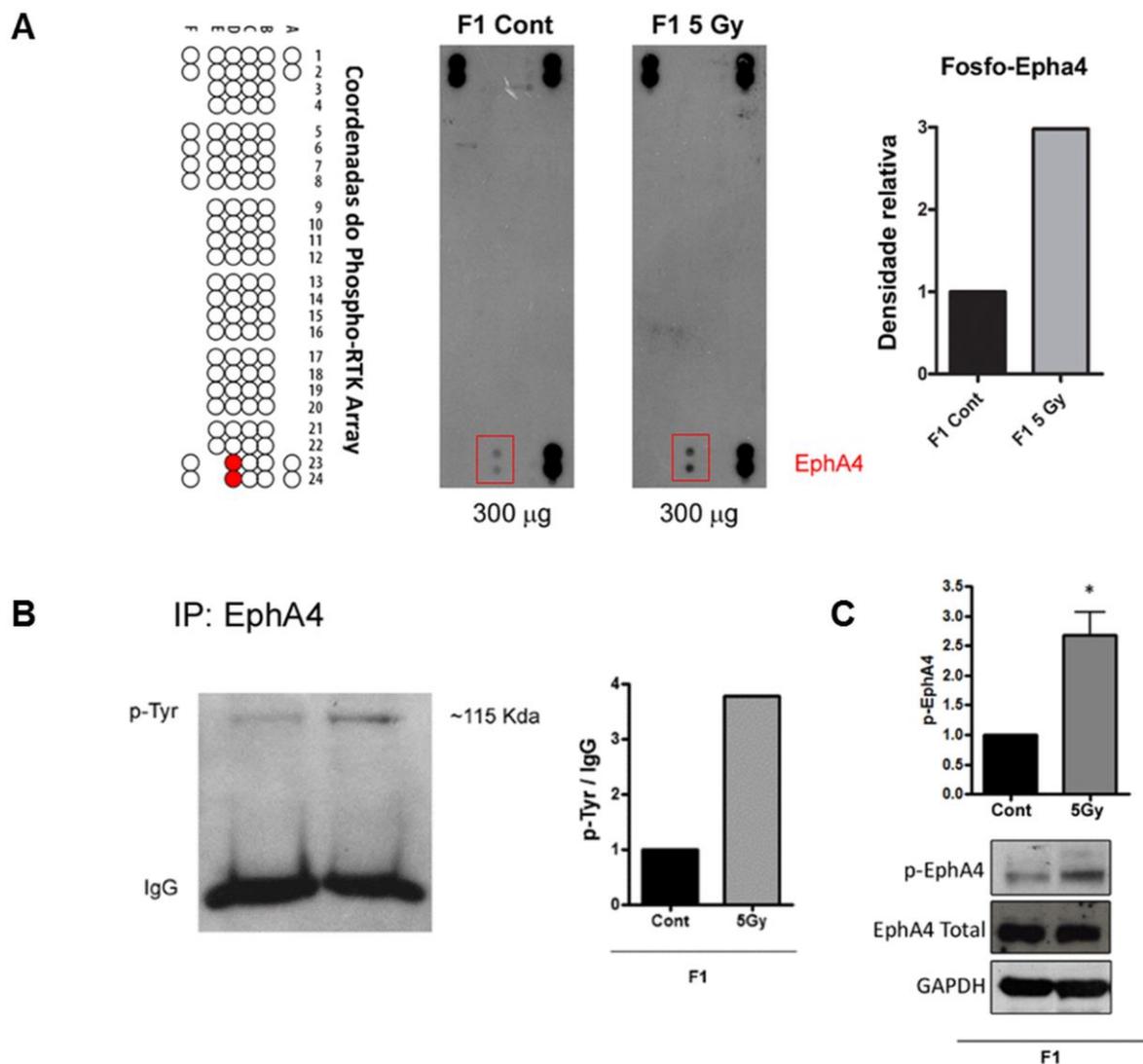


Figura 6: Análise da fosfoproteômica de receptores tirosina quinase das progênes de células sobreviventes à radiação. A: Painel com as coordenadas dos *spots* do *Phospho-RTK array*, o gráfico representa o nível relativo de fosforilação do receptor EphA4, expresso através dos valores da densidade relativa dos *spots* de um experimento único (Normalização: F1 Cont=1). Os *spots* assinalados em vermelho correspondem ao EphA4. B: Ensaio de imunoprecipitação do Epha4. O gráfico mostra os dados da expressão de fosfo-tirosina (fosfo-tirosina / IgG) dos lisados de F1 5 Gy em relação aos lisados de F1 Cont (Normalização: F1 Cont = 1), dados de um experimento único. C: Análise dos níveis de fosforilação e totais do EPHA4. O gráfico mostra os dados da expressão de p-EphA4 (Tyr 602) e níveis totais de EphA4 dos lisados de F1 5 Gy em relação aos lisados de F1 Cont (Normalização: F1 Cont = 1). O GAPDH foi usado como controle endógeno de expressão proteica e os dados são representativos da média \pm SEM de quatro experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste-*t* de Student, * $p < 0,05$.

5.2. As progênies de células sobreviventes à radiação não apresentam alteração da localização subcelular de EphA4.

A função de um receptor pode variar de acordo com sua localização subcelular e não há na literatura uma análise da distribuição do EphA4 em células de CCR, tampouco da influência da radiação sobre a distribuição deste receptor. Portanto, com o objetivo de avaliar se ocorreria uma alteração na localização subcelular de EphA4 nas progênies F1 5 Gy em comparação às progênies F1 Cont, foi realizada a técnica de imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-EphA4 total. As imagens de imunofluorescência obtidas por microscopia confocal mostram um perfil de marcação do EphA4 tanto citoplasmático quanto na região de contatos intercelulares na F1 Cont enquanto que na F1 5 Gy, a marcação é predominantemente citoplasmática e acompanha os prolongamentos celulares, uma vez que estas progênies não apresentam contatos intercelulares. Esse resultado mostra que as progênies de células sobreviventes à radiação não apresentam alteração da localização subcelular do EphA4

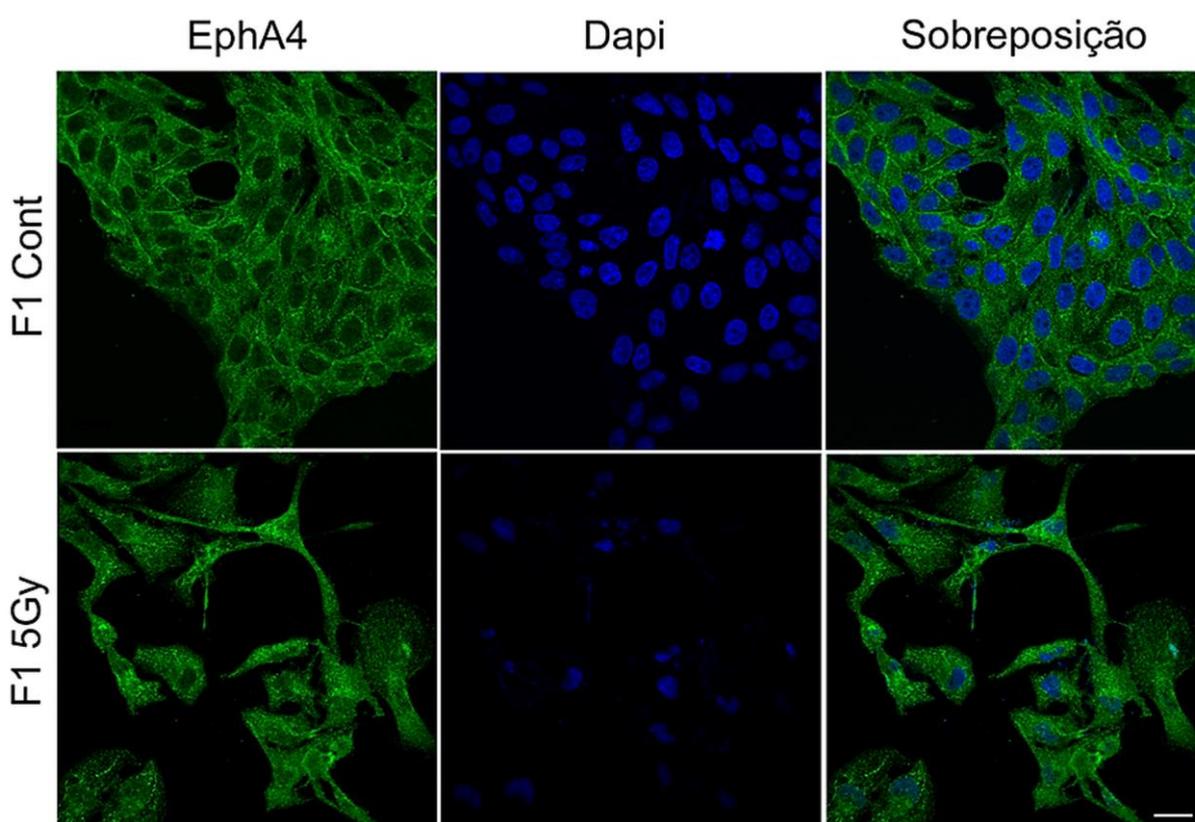


Figura 7: Análise da localização subcelular do receptor EphA4 nas progênies. As progênies foram cultivadas em lamínulas de vidro até a formação de colônias e submetidas à imunofluorescência para avaliar a localização subcelular de EphA4. O núcleo foi marcado com DAPI. Imagens representativas de três experimentos independentes. F1 Cont representa a progênies controle e F1 5Gy, a progénie de células sobreviventes à radiação. Barra: 20 μ m.

5.3. A ativação de EphA4 pelo agonista Doxazosina induz dispersão celular na progênie controle.

Uma vez que a progênie F1 5Gy apresentou altos níveis de fosforilação do EphA4 em relação ao controle e que o efeito da ativação deste receptor não é descrito na literatura em células de CCR, investigou-se a influência da ativação do EphA4 nas células HT-29 (F1 Cont), avaliando se a ativação deste receptor poderia gerar e um fenótipo similar ao das progênies de células sobreviventes à radiação (F1 5Gy). Para isso usamos um agonista deste receptor, o Mesilato de Doxazosina (Carduran®) ou Doxazosina a fim de verificar a ativação do EphA4 nas progênies F1 Cont e F1 5 Gy. A Doxazosina é um bloqueador α -1-adrenérgico aprovado pela Anvisa, indicado para a hipertensão e hiperplasia da próstata (age no tônus vascular e alivia os sintomas). Petty e colaboradores relataram que esta droga age como um agonista, sendo capaz de ligar-se e ativar o receptor EphA2 em células de câncer de próstata e através de ensaios *in silico* observaram que a Doxazosina também possui homologia para se ligar ao receptor EphA4 e ativá-lo. Estes dois receptores (EphA2 e EphA4) apresentam uma estrutura muito semelhante e a ativação de EphA2, nas doses testadas, era independente do bloqueio do receptor adrenérgico (PETTY et al., 2012). Portanto, após estabelecer o IC50 (44 μ M) da Doxazosina para a linhagem HT-29 (Fig.8A), a dose correspondente ao IC20 (23 μ M) foi escolhida pelo fato de ser capaz de ativar o receptor e causar o mínimo de morte celular possível, sendo melhor para analisar alguns parâmetros funcionais. As células F1 Cont e F1 5 Gy foram tratadas em subconfluência com 23 μ M de Doxazosina por 5, 15 e 30 minutos e em seguida submetidas à técnica de *immunoblotting* com o objetivo de avaliar a cinética de ativação do EphA4. A figura 8B mostra que o tratamento com Doxazosina é capaz de ativar o EphA4 tanto na F1 Cont quanto na F1 5 Gy, sendo o aumento nos níveis de fosforilação mais discretos na F1 5 Gy, uma vez que o EphA4 já encontra-se com altos níveis de fosforilação. Visto isso, foi analisado o efeito desta ativação, através da Doxazosina, na morfologia das células HT-29 (F1 Cont), como um controle positivo da ativação de EphA4, com o intuito de avaliar se esta ativação seria capaz de gerar um fenótipo similar ao da F1 5 Gy. As F1 Cont foram tratadas com 23 μ M de Doxazosina por 24 h e observadas sob microscopia de contraste de fase. Observa-se que o tratamento com Doxazosina induz uma certa dispersão celular na F1 controle, sugerindo que a ativação desse receptor pode ter uma influência na desorganização dos contatos intercelulares, o que mimetiza o efeito induzido pela radiação na adesão celular (Fig. 8C)

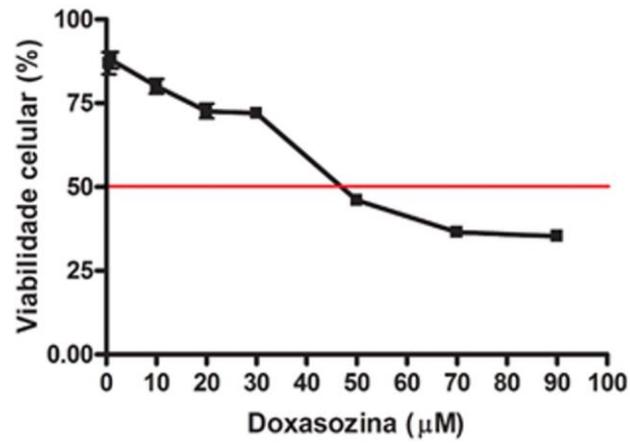
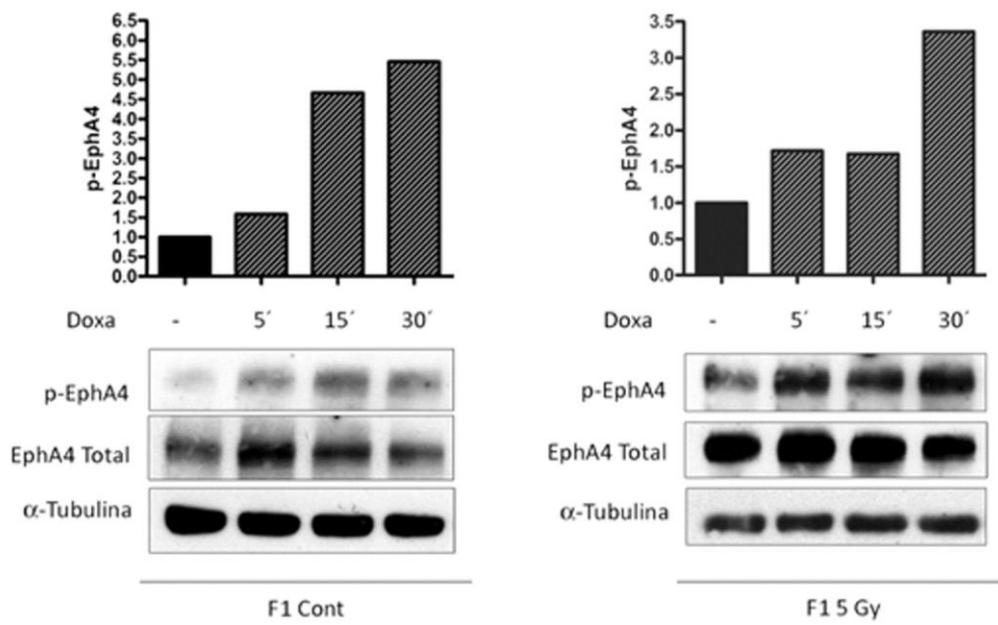
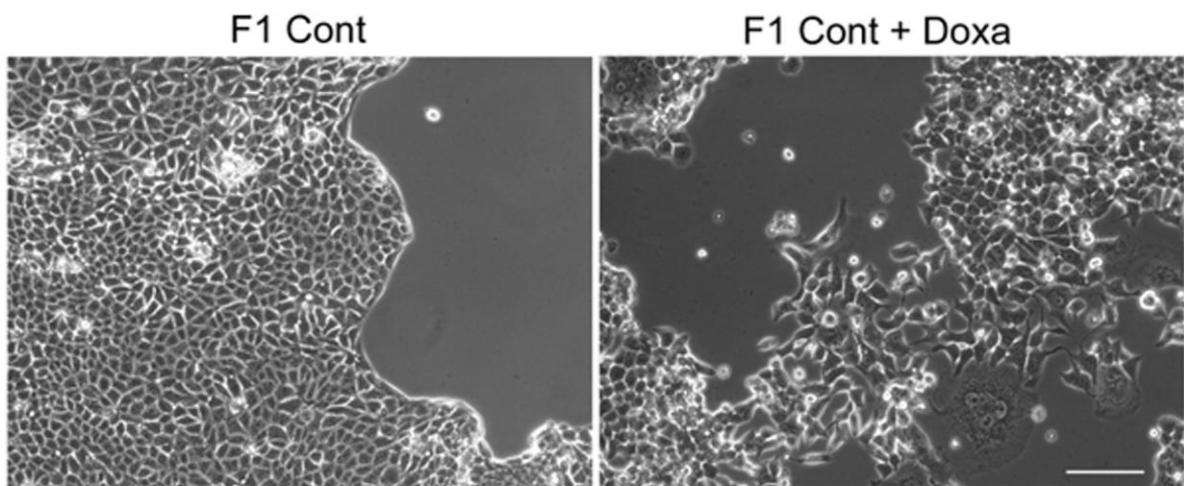
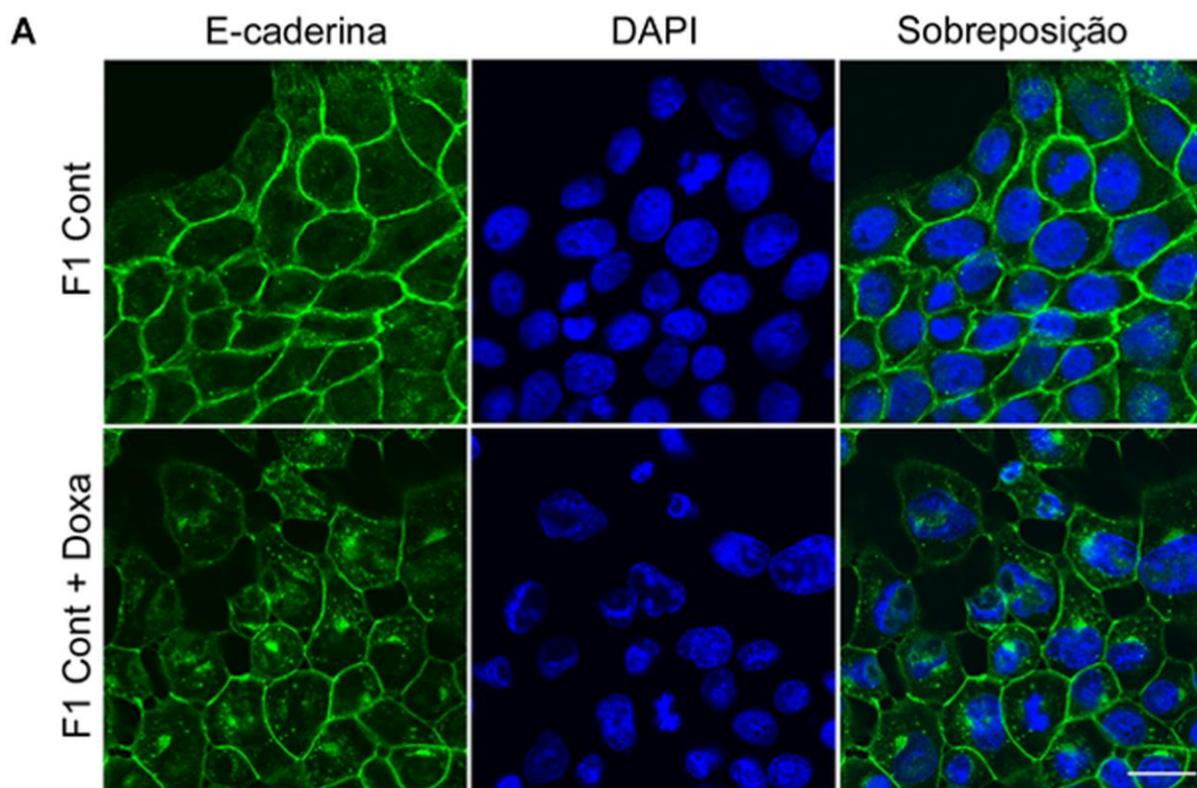
A**B****C**

Figura 8: Análise da ativação de EphA4 pela Doxazosina e de sua influência sobre a morfologia da progênie F1 Controle. A: Análise do IC50 de Doxazosina na linhagem HT-29. O gráfico representa a porcentagem de viabilidade celular no tratamento com diferentes doses de Doxazosina. B: As progênies F1 Cont e F1 5 Gy foram cultivadas e tratadas em subconfluência com 23 μ M de Doxazosina por 5, 15 e 30 minutos antes da extração das mesmas e submetidas à análise por *immunoblotting* da fosforilação (p-EphA4 Tyr-602) e níveis totais de EphA4 nas F1 Controle. Os gráficos representam os dados da expressão de p-EphA4 nos lisados de F1 Controle tratados com Doxazosina nos tempos indicados em relação aos lisados de F1 Controle sem tratamento (Normalização: F1 Controle = 1). A α - tubulina foi utilizada como controle endógeno de expressão proteica. Dados de experimento único. C: A morfologia celular da F1 Controle e F1 controle tratada por 24 h com 23 μ M de Doxazosina foi analisada por microscopia de contraste de fase. Imagens representativas de 3 experimentos independentes. Barra: 50 μ m.

5.4. O tratamento com Doxazosina desorganiza as junções aderentes, alterando a localização subcelular e reduzindo a expressão de E-caderina na progênie F1 Controle.

Visto que o tratamento com Doxazosina, ativa o EphA4 e desorganiza os contatos intercelulares, como observado na Figura 8B, analisamos a influência do tratamento com Doxazosina na localização subcelular e na expressão de E-caderina, a principal proteína das junções aderentes e que é bem descrita por estar “downregulada” e com alteração da sua localização nos contatos intercelulares nas células em TEM (THIERY et al, 2009). Além disso, no estudo prévio do nosso Grupo, foi mostrado que as progênies de células sobreviventes à radiação, que apresentavam um fenótipo TEM-like, também tinham expressão reduzida e localização subcelular alterada de E caderina (BASTOS et al, 2014). Imagens de imunofluorescência (Fig. 9A) obtidas por microscopia confocal mostram a progênies F1 controle com uma marcação de E-caderina predominante nas áreas de contato intercelular. No entanto, o tratamento com Doxazosina induz uma internalização da E-caderina e acúmulo na região perinuclear, embora ainda exista marcação nos contatos intercelulares. Além disso, foi observado por *immunoblotting*, que o tratamento com a Doxazosina reduz os níveis de expressão proteicos de E-caderina em comparação à F1 controle sem tratamento (Fig. 9B). Esses resultados sugerem que a ativação de EphA4 causa desorganização das junções aderentes, com internalização e diminuição da expressão de E-caderina, o que favoreceria uma maior dispersão celular.



B

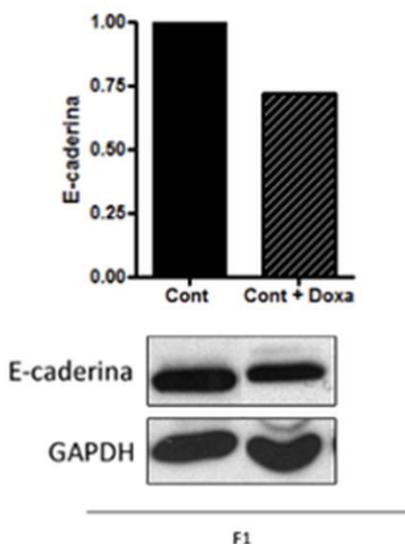


Figura 9: Análise da localização subcelular e expressão proteica de E-caderina na progênie F1 Controle tratada ou não com Doxasozina. A: As progênieis celulares foram plaqueadas e cultivadas em lamínulas de vidro até a formação de colônias, tratadas por 24 h com 23 μ M de Doxasozina e submetidas à imunofluorescência para avaliar a localização subcelular de E-caderina. O núcleo foi marcado com DAPI. Imagens representativas de três experimentos independentes. Barra: 20 μ m. B: Análise por *immunoblotting* dos níveis proteicos de E-caderina em lisados celulares das progênieis F1 Controle tratadas ou não com 23 μ M de Doxasozina por 24 h. Os gráficos representam os dados da expressão de E-caderina nos lisados de F1 controle tratado com Doxasozina em relação aos lisados da F1 Controle sem tratamento (Normalização: F1 Controle = 1). O GAPDH foi utilizado como controle endógeno de expressão proteica. Dados representativos da média \pm SEM de dois experimentos independentes.

5.5. As progênies das células sobreviventes à radiação e as progênies controle apresentam pontos de colocalização de E-caderina e EphA4.

Estudos sugerem que receptores da família Eph poderiam interagir com a E-caderina e atuar em sua regulação (KANDOUZ, 2012). Além disso, outros estudos mostram que esses receptores podem ser endocitados após sua ativação e que esse mecanismo de internalização gera dispersão celular (NIEVERGAL et al., 2011). Nossos resultados mostram que o tratamento com Doxazosina causa internalização e redução da expressão da E-caderina, assim como induz ativação do EphA4. Contudo, a relação entre a regulação de E-caderina e a endocitose de receptores Eph após sua ativação nunca foi descrita em câncer. Desta forma, foi investigado se essas duas proteínas poderiam estar sendo internalizadas juntas na progênie F1 5 Gy, através de imunofluorescência em marcação dupla para p-Epha4 (Tyr-602) e E-caderina. A figura 10 mostra que p-Epha4 na progênie F1 Cont está localizado tanto no citoplasma quanto nos contatos intercelulares. Enquanto que a E-caderina encontra-se predominantemente nos contatos intercelulares. Ademais, observa-se que a progênie F1 5 Gy apresenta marcação citoplasmática tanto para p-EphA4 quanto para E-caderina, e que a sobreposição dessas duas marcações revela pontos citoplasmáticos de colocalização, sugerindo que p-Epha4 e E-caderina possam estar sendo internalizadas juntas.

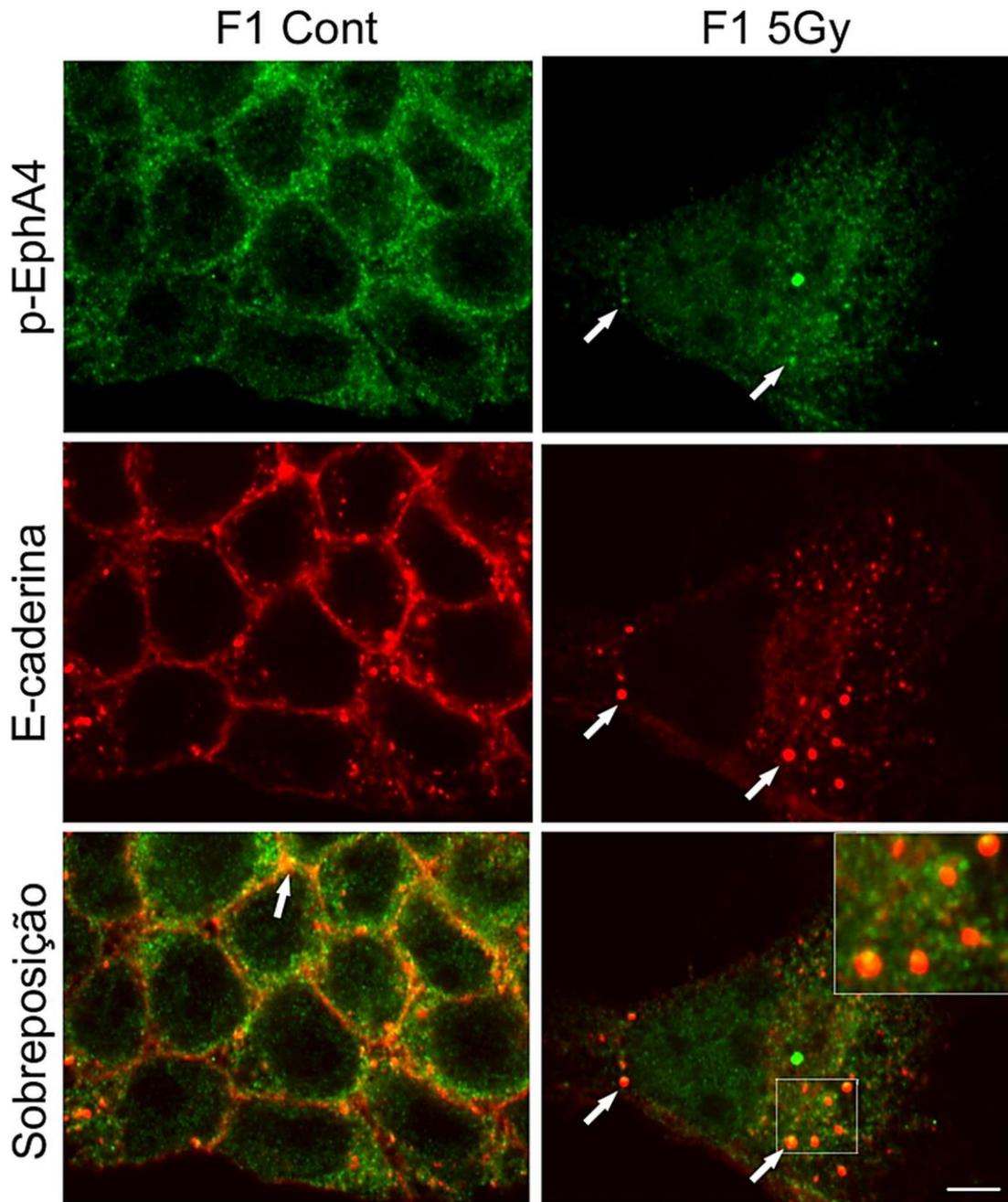


Figura 10: Análise da localização subcelular de p-EphA4 e E-caderina nas progênes F1 Controle e F1 5 Gy. As progênes F1 Controle e F1 5 Gy HT-29 foram cultivadas em lamínulas até a formação de colônias, fixadas e marcadas simultaneamente para p-EphA4 (tyr-602) e E-caderina. Imagens de sobreposição através de microscopia confocal mostram pontos de colocalização entre p-EphA4 e E-caderina, observada através dos pontos amarelos/alaranjados indicados pelas setas. Imagens de experimento único. Barra: 5 μ m.

5.6. O silenciamento de EphA4 é capaz de reduzir o alto potencial invasivo da progênie de células sobreviventes à radiação.

A fim de avaliar se o EphA4 cumpre um papel essencial na aquisição do fenótipo agressivo apresentado pela F1 5 Gy, o qual inclui um alto potencial invasivo, as progênies F1 5 Gy foram submetidas ao silenciamento de EphA4 por siRNA e analisadas quanto ao perfil clonogênico e invasivo. A figura 13A mostra a eficiência do silenciamento do Epha4, mediado por siRNA, na concentração de 5nM no tempo 48h após a transfecção. Através do ensaio clonogênico (Fig. 13B), observou-se que o silenciamento de EphA4 na progênie F1 5 Gy não altera a capacidade de formação de colônia desta progênie. Porém, o silenciamento do Epha4 foi capaz de reduzir o alto potencial invasivo induzido pela radiação na progênie F1 5 Gy (Fig. 11C). Dessa forma, os resultados sugerem que a ativação do EphA4 cumpre um papel importante na aquisição do alto potencial invasivo, induzido pela radiação, apresentado pelas progênies F1 5 Gy.

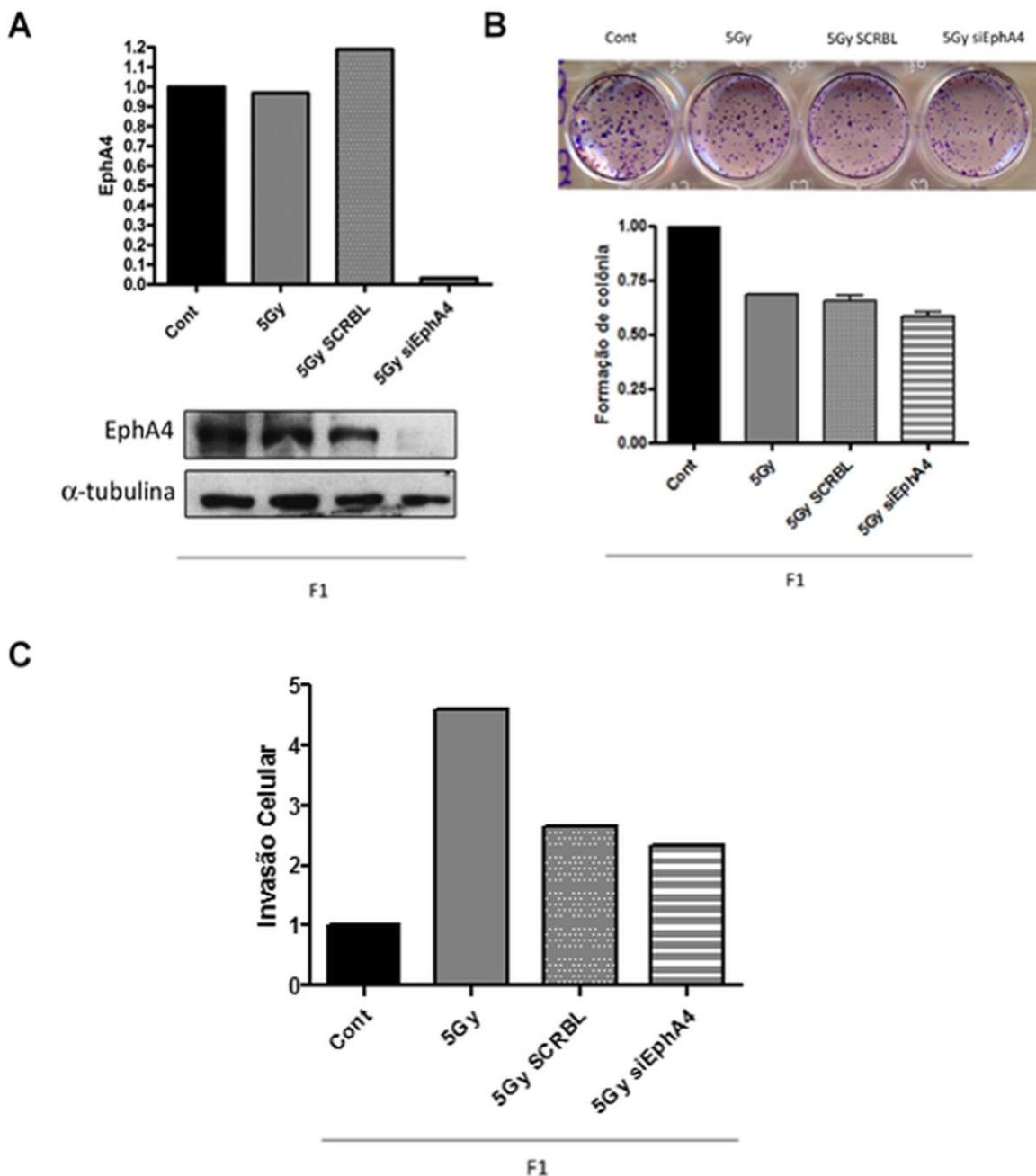


Figura 11: Análise do potencial clonogênico e invasivo das progênies F1 controle e F1 5 Gy tratadas ou não com siEphA4. A: Análise da expressão do EphA4 após silenciamento com siRNA. O gráfico representa os dados da expressão de EphA4 nos lisados das progênies F1 Cont, F1 5 Gy tratadas com SCRBL, F1 5Gy tratadas com siEphA4 em relação aos lisados da F1 Cont (Normalização: F1 Cont = 1). Dados de experimento único. B: Análise do potencial clonogênico das progênies após o silenciamento com siRNA. Imagens representativas do ensaio clonogênico das progênies F1 Cont, F1 5 Gy tratadas com SCRBL, F1 5Gy tratadas com siEphA4 e F1 5Gy sem tratamento. O gráfico representa os dados do nível de formação de colônias medida através da densidade óptica (595 nm) do eluato de cristal violeta de dois experimentos independentes utilizando triplicatas técnicas, (Normalização: F1 Cont = 1). C: Análise do potencial invasivo das progênies após o silenciamento com siRNA. O gráfico representa o número de vezes que invasão alterou nos diferentes grupos em relação a F1 Cont (Normalização: F1 Cont = 1). Dados de experimento único.

5.7. As progênies de células sobreviventes à radiação apresentam aumento da atividade de AKT e ERK, sendo esta última, dependente de EphA4.

Analisar o perfil de quinases fosforiladas na célula é essencial para compreender como a mesma responde à determinados estímulos e mudanças no microambiente. Com o intuito de analisar as vias de sinalização celulares *downstream* de EphA4 que possam cumprir um papel importante na aquisição do fenótipo relacionado à TEM das progênies F1 5 Gy, foi utilizado o *kit Phospho kinase Array*. Esse kit detecta simultaneamente o nível de fosforilação em resíduos específicos de 43 quinases intracelulares e 2 proteínas totais em uma única amostra, permitindo a comparação da ativação desses conjunto de quinases em diferentes amostras. Através da figura 12A, observa-se um aumento da fosforilação de p-AKT, p-ERK 1/2, p-GSK3 e p- β -catenina na progênie F1 5 Gy, em relação à F1 Cont. Os níveis de GSK3 e de β -catenina fosforilados corrobora os resultados obtidos no trabalho previamente publicado pelo nosso Grupo, no qual as progênies F1 5 Gy apresentaram ativação da via wnt/ β -catenina, na qual essas duas proteínas cumprem um papel fundamental (BASTOS *et al.*, 2014). Existem evidências de que as vias de PI3K/AKT e de ERK1/2 induzem eventos relacionados à TEM, por exemplo, através da regulação da expressão/atividade de metaloproteases e do aumento da expressão do fator transcricional repressor da E-caderina, Snail (CAMPBELL; CHANNING, 2004; GRILLE *et al.*, 2003). Os resultados obtidos no *array*, de aumento dos níveis de AKT e ERK 1/ 2 fosforiladas, foram confirmados por *immunoblotting* (Fig. 12B). Uma vez que estudos mostraram a ativação das vias de AKT e ERK 1/ 2 pela via *forward* do EphA4 em células de glioma (FUKAI *et al.*, 2008), e que o EphA4 encontra-se mais fosforilado nas progênies F1 5 Gy, foi analisado se o silenciamento de EphA4 revertia os altos níveis de p-ERK 1/2 expressos na F1 5 Gy. A figura 12C mostra que o silenciamento do EphA4 foi capaz de diminuir os níveis de fosforilação da p-ERK 1/2 da progênie F1 5 Gy. Esses resultados mostram que a ERK 1/2 está mais ativa na progênie de células sobreviventes à radiação em comparação à progênie controle e sugerem que essa ativação é dependente de EphA4.

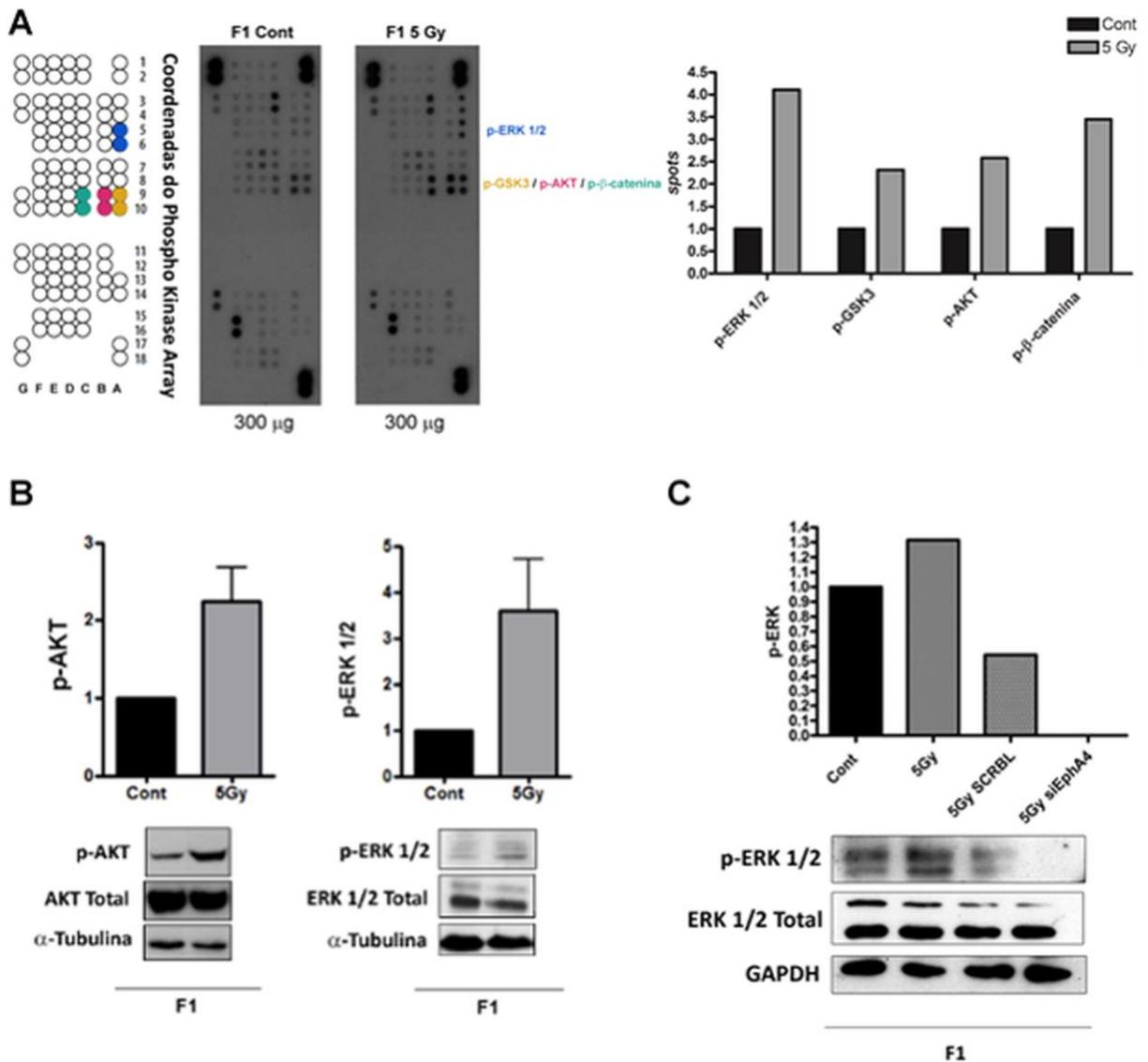


Figura 12: Análise fosfoproteômica das quinase intracelulares das progênie e a influência do silenciamento de EphA4 sobre fosforilação de ERK 1/ 2. A: A figura mostra as coordenadas dos spots do Phospho-quinase array e o gráfico representa o nível das quinases p-ERK 1/ 2, p-GSK3, p-AKT e p-β-catenina dos lisados da F1 5 Gy em relação aos lisados da F1 Cont, através dos valores da densidade relativa dos spots de experimento único (Normalização: F1 Cont=1). B: Análises por imunoblotting da fosforilação e níveis totais de p-AKT e p-ERK 1/ 2 nas progênie F1 Controle e F1 5 Gy. A α-tubulina foi usada como controle endógeno de expressão proteica e a figura é representativa de dois experimentos independentes. C: Análises por imunoblotting dos níveis de fosforilação e níveis totais de ERK 1/ 2 nas progênie F1 Cont, F1 5 Gy tratado com o siRNA SCRBL, tratado com siEphA4, e sem tratamento. Os gráficos representam o nível de fosforilação da quinase p-ERK. Dados de experimento único.

5.8. A inibição das vias de sinalização ERK 1/2 e PI3K/AKT é capaz de reverter o alto potencial migratório induzido pela radiação enquanto que apenas a inibição da via de PI3K/AKT, reverte o alto potencial invasivo.

Com o objetivo de investigar o papel da ativação vias de sinalização PI3k/AKT e ERK1/2 na aquisição do fenótipo agressivo das progênes F1 5 Gy, realizou-se a inibição farmacológica da via de PI3K/ AKT usando o inibidor de PI3K, LY294002 (12 μ M); da via de ERK 1/ 2, através do inibidor de MEK, PD98059 (50 μ M); ou a inibição de ambas as vias através do tratamento conjunto com os dois inibidores, sendo todos os tratamentos realizados apenas na progênie F1 5 Gy por 24 h. A figura 13A mostra a especificidade dos inibidores utilizados uma vez que os tratamentos reduzem a fosforilação das quinases correspondentes. Uma vez que as progênes F1 5 Gy apresentam um aumento da fosforilação de PI3K/AKT, ERK1/2 (Fig. 12) e EphA4 (Fig. 8); e que o silenciamento do epha4 por siRNA foi capaz de diminuir o alto potencial invasivo dessas progênes (Fig. 11), avaliamos se as vias PI3k/AKT e ERK1/2 constituem alvos *downstream* de EphA4 e se tais vias dão suporte ao alto potencial migratório e invasivo da progênie F1 5 Gy. Através da figura 13B observa-se que o tratamento isolado com LY294002 e PD98059 foi capaz de reduzir o alto potencial migratório induzido pela radiação na progênie F1 5 Gy. No entanto, a figura 11C mostra que apenas o tratamento isolado com o LY294002, mas não com PD98059, e o tratamento conjunto com os dois inibidores reverteu o alto potencial invasivo apresentado pelas progênes F1 5 Gy. Em conjunto, esses resultados indicam que as vias de sinalização PI3K/AKT e ERK 1/ 2, cuja ativação da última se mostrou ser dependente de EphA4, cumprem um importante papel na manutenção do fenótipo agressivo, caracterizado por um alto potencial migratório e invasivo, apresentado pela progênie de células sobreviventes à radiação.

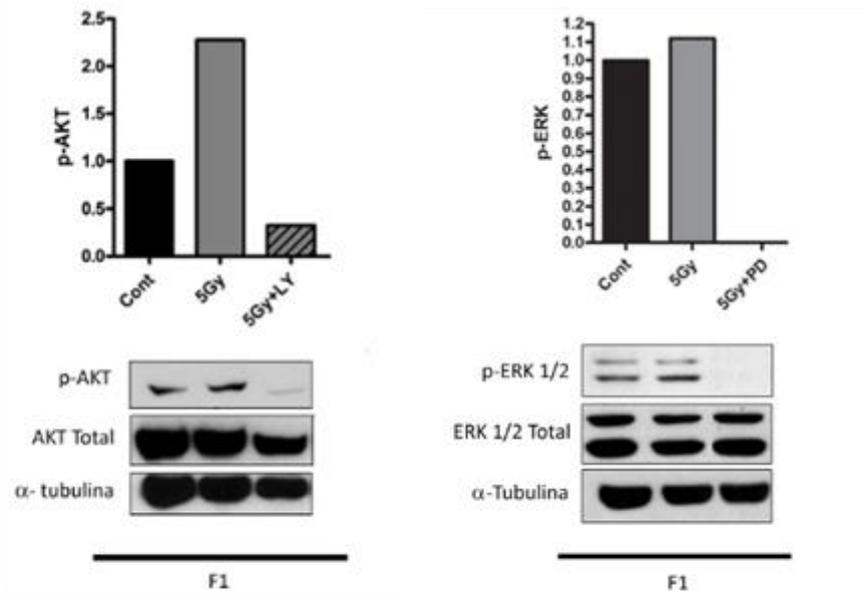
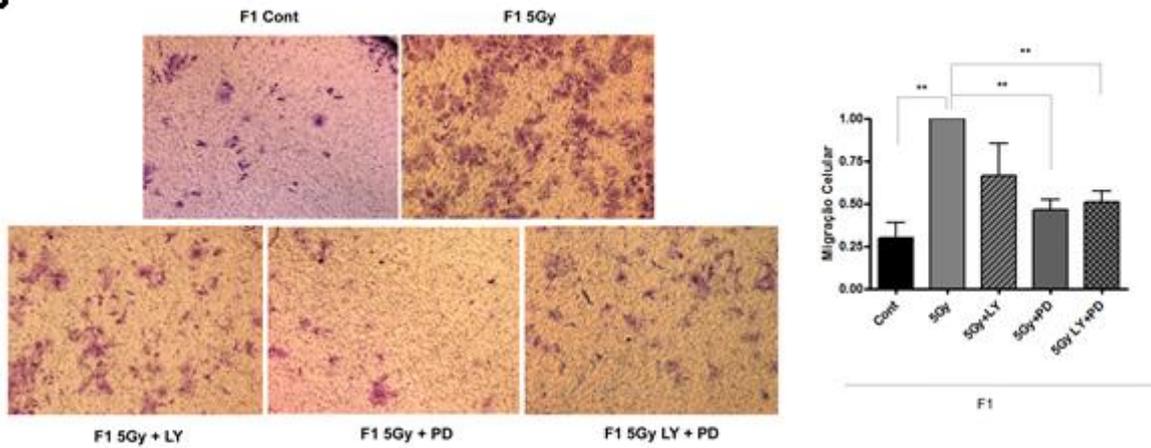
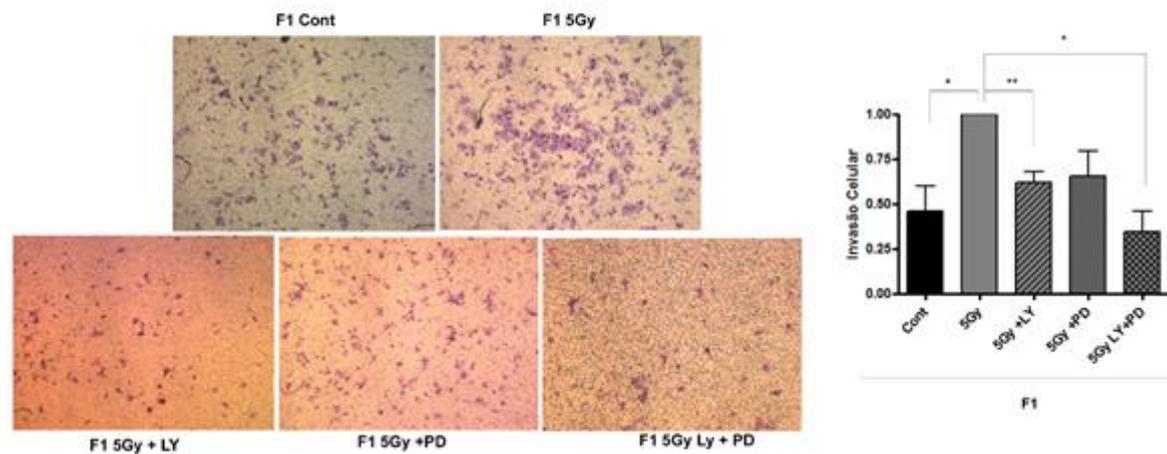
A**B****C**

Figura 13: Análise da inibição das vias ERK 1/ 2 e PI3K/AKT no potencial migratório e invasivo das progênes de células sobreviventes à radiação. A: Análises por *immunoblotting* da fosforilação e níveis totais de p-ERK 1/ 2 e p-AKT nas progênes F1 Cont, F1 5 Gy e F1 5 Gy tratada com LY294002 e PD98059. A α -tubulina foi usada como controle endógeno de expressão proteica e os dados são de experimento único (Normalização: F1 Cont = 1). B: As progênes F1 Cont e F1 5 Gy foram cultivadas em insertos Transwell® e submetidas ao ensaio de migração. C: As progênes F1 Cont e F1 5 Gy foram cultivadas em insertos Transwell® cobertos com Matrigel® e submetidas ao ensaio de invasão. Os gráficos representam o número total de células que migraram (B) e invadiram (C) na F1 cont, F1 5Gy tratada com LY294002 e PD98059 o em relação a F1 5 Gy (Normalização: F1 5 Gy = 1). Os dados são representativos da media \pm SEM de três experimentos independentes, a análise estatística foi realizada pelo teste-*t* de Student e a diferença foi considerada significativa quando * $p < 0,05$ e ** $p < 0.01$.

6. DISCUSSÃO

A Radioterapia (RT) é uma modalidade terapêutica amplamente utilizada para tumores de reto em estágios avançados e sua aplicação resulta em benefícios em relação a recorrência local em comparação à cirurgia e/ou a quimioterapia apenas, principalmente através da estratégia de RT neoadjuvante. Porém, a maioria dos estudos não consegue demonstrar um aumento da sobrevida global dos pacientes que recebem RT. Neste sentido, artigos mostram que tumores que reaparecem após a RT tendem a apresentar condições mais agressivas e pior prognóstico (MADANI et al., 2008). Além disso, metástases ocorrem frequentemente após a recorrência pós-radioterápica (VICINI et al., 2003; VAN DEN BRINK et al., 2004). Desta forma, fica claro que a eficácia da RT é desafiada pelos processos biológicos que envolvem a invasão local e a disseminação metastática das células sobreviventes, resultando em falha terapêutica.

Ademais, um importante fato relacionado à essa terapia é a gravidade dos efeitos colaterais produzidos, em especial aqueles do trato gastrointestinal, os quais vão desde náuseas à obstrução intestinal (BIRGISSON et al., 2007). Devido a este fato, realiza-se o fracionamento da dose total, o que permite o reparo de células normais afetadas, minimizando os efeitos colaterais. Porém, não só as células do tecido normal, mas também as células tumorais podem se reestabelecer. Neste contexto, o estresse terapêutico gerado pela radiação é imposto sobre as células tumorais sobreviventes e células de tecidos adjacentes, induzindo diversos eventos que incluem: Variação dos níveis de oxigênio e nutrientes, ativação de células estromais e do sistema imune e uma intensa geração de diversas citocinas e fatores de crescimento. Tais fatores controlam, não só o processo de reparação tecidual do estroma como também induzem a ativação de vias de sinalização nas células tumorais sobreviventes à radiação (ALEXANDER; FRIEDL, 2012). Portanto, o microambiente gerado pela radiação pode induzir vias de sinalização nas células tumorais, as quais podem adquirir um fenótipo mais agressivo que favorece o processo de invasão e metástase.

Nesta linha de evidências, um estudo anterior do nosso grupo demonstrou que as células sobreviventes à radiação ionizante dão origem a progênies com fenótipo relacionado à TEM que são altamente agressivas, as quais podem ser responsáveis pela progressão do câncer relacionada à falha terapêutica após o tratamento com a RT (Bastos et al, 2014). No entanto, as vias de sinalização e os eventos celulares e moleculares envolvidos neste processo permanecem por ser definidos. Desta forma, o presente estudo analisou as vias de sinalização que seriam responsáveis pela aquisição do fenótipo agressivo das progênies de células sobreviventes à radiação, caracterizando melhor este processo.

Os resultados obtidos mostram que progênies de células sobreviventes à radiação apresentam um aumento da atividade do receptor tirosina quinase EphA4 (Fig. 6), o que não é acompanhado pelo aumento de sua expressão ou por alterações em sua distribuição subcelular (Fig. 7). A alta expressão/atividade de EphA4 foi relatado em diversos tipos de tumores incluindo o CCR e sua “upregulação” contribui para propriedades agressivas como migração celular, invasividade e metástases em uma variedade de tumores (LIIZUMI et al., 2006). Porém, não há na literatura estudos que mostrem a associação da atividade deste receptor com o processo de radioresistência em nenhum tipo de câncer. É possível especular que essa maior ativação de EphA4 encontrada na progênie F1 5 Gy seja devido à uma maior expressão de seus ligantes Ephrinas, as quais poderiam ser estimuladas pelo estresse da radiação, o que resultaria em uma maior interação do EphA4 com esses ligantes. Até o momento, um único estudo relacionou a radiorresposta às Ephrinas, no qual foi observado um aumento da expressão de Ephrina A1 em células de carcinoma de células escamosas radioresistentes, mas não nas radiosensíveis, após exposição à raios gama (NOJIRI et al., 2009). Adicionalmente, outro estudo mostrou que a Ephrina A1 foi capaz de promover a angiogênese e facilitar o processo metastático *in vivo* de células tumorais de mama (BRANTLEY-SIEDERS et al., 2006), sugerindo um papel importante para Ephrina A1 durante a progressão tumoral.

Não há na literatura estudos sobre a ativação do EphA4 em células de CCR, tampouco sobre sua relação com o processo de radiorresposta em nenhum tipo de câncer. Desta forma, investigamos o efeito da ativação do EphA4 nas células HT-29 através de um agonista, a Doxazosina. A Doxazosina é um é um bloqueador α -1-adrenérgico aprovado pela Anvisa, indicado para a hipertensão e hiperplasia da próstata. Esta droga age como um agonista, sendo capaz de ligar-se e ativar o receptor EphA2 em células de câncer de próstata e através de ensaios *in silico* observaram que a Doxazosina também possui homologia para se ligar ao receptor EphA4 e ativá-lo (PETTY et al 2012). No presente estudo, verificamos que o tratamento com Doxazosina mostrou ser capaz de elevar os níveis de fosforilação do EphA4 na progênies F1 Cont e F1 5Gy, sendo o aumento nos níveis de fosforilação mais discretos na F1 5 Gy, uma vez que o EphA4 já encontra-se com altos níveis de fosforilação (Fig.8A).

Visto isso, analisou-se os efeitos da ativação deste receptor nas progênies F1 Cont, a fim de verificar se essa ativação poderia gerar um fenótipo similar ao apresentado pela F1 5Gy. Observamos que a ativação do EphA4 na progênie F1 Cont gerou uma maior dispersão celular, sugerindo uma alteração dos contatos intercelulares (Fig 8B). Esta alteração nos contatos celulares foi corroborada através da análise da distribuição subcelular de E-caderina na progênie F1 Cont tratada com Doxazosina (Fig. 9A). Tais resultados mostram que a E-caderina foi

internalizada, sendo também observada em aglomerados citoplasmáticos na região perinuclear, embora ainda haja E-caderina nos contatos intercelulares. É possível sugerir que estes aglomerados citoplasmáticos correspondam à E-caderina sendo internalizada em vesículas e, uma vez que a expressão de E-caderina foi reduzida com o tratamento com Doxazosina (Fig.9B), é possível que esta proteína esteja seguindo a via de endocitose e degradação lisossomal, (PALACIOS et al., 2005). Nesta linha de evidências, Yan e colaboradores relataram que a ativação de EphA4 foi capaz de diminuir a expressão de E-caderina e mediar a TEM em células de hepatoma (YAN et al., 2013). Além disso, no embrião de *Xenopus*, por exemplo, a atividade de EphA4 foi capaz de causar perda da adesão celular, e da polaridade apical/basolateral, iniciando pela desestruturação da ligação entre caderinas de células vizinhas (WINNING et al., 2008). Ainda, Liu e colaboradores mostraram que EphA4 aumentou a expressão de Snail, um conhecido repressor transcricional de E-caderina (LIU et al., 2014), cujo RNA mensageiro encontra-se superexpresso nas progênes F1 5 Gy (BASTOS et al, 2014). Essas evidências sugerem que além de atuar na endocitose e degradação de E-caderina, existe um possível mecanismo pelo qual EphA4 possa estar diminuindo a expressão de E-caderina à nível transcricional na progênes F1 5 Gy, porém, mais estudos são necessários para elucidar essa hipótese. Adicionalmente, um outra maneira pela qual a ativação do receptor EphA4 pode gerar perda da adesão celular é por endocitose do complexo Eph/Ephrina, seguido de perda de adesão e repulsão celular (PASQUALE, 2008). Assim, nossos resultados mostrando que a internalização do EphA4 acontece juntamente com a E-caderina, como observado através dos pontos de colocalização citoplasmáticos entre essas duas proteínas na progênie F1 5 Gy (Fig 10), sugerem que ambas as proteínas são internalizadas uma vez que o EphA4 seja ativado.

Estudos mostram que a regulação de E-caderina por receptores Eph é recíproca e que a adesão intercelular dependente de E-caderina pode regular a expressão desses receptores, assim como sua localização na membrana plasmática e sua ativação por Ephrinas (ARVANITIS; DAVY, 2008; IRETON; CHEN, 2005). A regulação que envolve as junções aderentes e os receptores Eph ainda não está clara e parece depender dos tipos de receptores e ligantes, assim como do tipo celular envolvido. O fato é que a perda da expressão de E-caderina leva ao enfraquecimento dos contatos intercelulares, o que coincide com padrões de expressão/ativação alterados de receptores Eph. Portanto, a desregulação do sistema Eph/Ephrina com as junções aderentes contribui para o potencial maligno de células tumorais, através de alterações na adesão intercelular (NIEVERGAL et al., 2011). No entanto, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese em nosso modelo.

A desorganização das junções aderentes causa uma maior dispersão celular, favorecendo o processo de migração e invasão e há evidências de que a ligação Eph/Ephrina com subsequente ativação destes receptores resulte em perda da adesão e repulsão (NIEVERGAL et al., 2011). Neste sentido, os resultados da figura 11C indicam que o silenciamento do EphA4 reduz o alto potencial invasivo, induzido pela radiação, das progênes F1 5 Gy, sugerindo que uma maior ativação de EphA4 poderia contribuir para o processo de invasividade na progênie F1 5 Gy. De fato, Estudos relatam que o EphA4 regula a disseminação de células de próstata através da repulsão intercelular mediado por Vav2-RhoA e que, em células de câncer de pâncreas, este receptor aumenta a atividade de MMP-2, uma metaloprotease bem conhecida por regular a invasividade celular no CCR (LIU, et al., 2014) (BATSON, et al., 2004). Ainda no que tange à progressão do CCR, a alta expressão desse receptor foi associada a metástases derivadas de tumores colorretais no fígado (OSHIMA, et al., 2008), emergindo como um possível biomarcador para metástases hepáticas em pacientes com CCR. Células tumorais apresentam uma alta capacidade de proliferar e formar colônias, características relacionadas ao potencial maligno (QUINTANA et al, 2008). A fim de avaliar a este parâmetro nas progênes silenciadas ou não com EphA4, foi realizado o ensaio de formação de colônia dependente de ancoragem a partir de uma única célula. Os resultados da figura 11B mostram que a F1 5Gy apresenta uma menor capacidade de formação de colônia quando comparada a F1 Cont. e que o silenciamento de EphA4 não foi capaz de alterar a capacidade clonogênica da F1 5Gy. Em conjunto, estes resultados sugerem que o EphA4 cumpre um papel importante na aquisição de um fenótipo com maior dispersão e invasividade celular das progênes F1 5Gy mas que não regula a capacidade de formação de colônia dessas progênes.

Diversas vias de sinalização podem ser ativadas pelo receptor EphA4, tais como MAPK e JAK-STAT (LAI et al, 2004; SHIN, et al, 2008), e no presente estudo, investigou-se as vias de sinalização *downstream* de EphA4 que possam dar suporte ao fenótipo agressivo relacionado à invasão e migração apresentado pela progênes F1 5 Gy. Observou-se que essa progênie apresentava um aumento da expressão de p-AKT, p-ERK 1/2, p-GSK3 e p- β -catenina, em relação à F1 Controle (Fig. 12A). A fosforilação de GSK3 e de β -catenina, corrobora os resultados obtidos no trabalho previamente publicado pelo nosso Grupo, no qual as progênes F1 5 Gy apresentaram ativação da via Wnt/ β -catenina, na qual essas duas proteínas cumprem um papel fundamental (BASTOS et al., 2014). Nossos resultados mostram que a ativação de ERK 1/2 na progênie F1 5Gy parece ser dependente de EphA4, uma vez que o silenciamento deste receptor levou a uma drástica redução dos níveis de fosforilação de ERK1/2 (Fig. 12C). Tal resultado está de acordo com relatos da literatura que observaram a ativação transiente de

MAPK pela via “*forward*” do EphA4 em células derivadas de câncer de próstata (SHIN et al., 2008). Também com relatos que mostram que a ativação das vias de sinalização de MAPK/Akt/Rac1/Cdc42 *downstream* de EphA4 estão envolvidas com o aumento da migração em células de glioma (FUKAI et al., 2008).

As vias de PI3K/AKT e ERK 1/2 são, de forma, geral associadas aos processos de sobrevivência e proliferação celular, sendo bem descrito o papel dessas vias durante as primeiras etapas da tumorigênese. Porém, pouco se sabe sobre seu papel em eventos tardios da progressão tumoral. Estudos recentes mostram que ativação da via de PI3K/AKT e ERK 1/2 regulam tanto processos de sobrevivência e resistência à tratamentos quanto processos de migração e invasão relacionados à falha terapêutica, através de vias de sobrevivência alteradas e interconectadas com vias de invasividade. (ALEXANDER; FRIEDL, 2012). Portanto, a ativação dessas vias pode ser responsável pelo suporte ao fenótipo resistente e agressivo apresentado pela progênie F1 5 Gy. De fato, a figura 13B mostra que o tratamento com os inibidores de MEK e o tratamento conjunto com inibidor de MEK e de PI3K foi capaz de reduzir o alto potencial migratório induzido pela radiação na progênie F1 5 Gy, sugerindo que este efeito é correspondente apenas ao inibidor de MEK. No entanto, apenas o tratamento com o inibidor de PI3K reverteu o alto potencial invasivo apresentado pelas progênies F1 5 Gy, sendo este efeito potencializado com o tratamento conjunto dos dois inibidores (Fig.13C). De acordo com este resultado, diversos estudos pré-clínicos e clínicos, inclusive em CCR, sugerem que a inibição concomitante de ambas as vias PI3K/AKT e MAPK potencializa a eficácia do tratamento em comparação à inibição isolada de cada uma das vias, uma vez que: a) há robustas evidências de que essas vias apresentem vários pontos de *crossstalk*; b) A inibição de apenas uma via gera um efeito compensatório através da outra via por mecanismo de *feedback* envolvendo MEK/EGFR/PI3K; c) estudos relatam que a ativação da via PI3K/AKT gera resistência ao inibidor de MEK, e vice-versa (ROPER et al., 2014; SHIMIZU et al., 2012). Porém, o impacto clínico da grande toxicidade causada pela inibição de ambas as vias permanece em avaliação.

A inibição isolada das vias de sinalização de PI3K/Akt e ERK é aplicada em diversos pré-clínicos e parecem ter resultados promissores (ROPER, et al., 2014). Embora ainda nenhum inibidor dessas vias tenha sido aprovado para o tratamento do CCR, estudos de fase III randomizados com pacientes com tumores de pâncreas e de rim, obtiveram bons resultados com o inibidor da via de pi3k/akt/mtor, resultando na aprovação do Everolimus e Temozolomida para os referidos tipos tumorais (MOTZER, et al., 2008) (YAO, et al., 2011). Além disso, o inibidor de MEK Trametinib foi recentemente aprovado pelo FDA (*food and drug administration*) para

o tratamento de melanomas. Quanto a tumores colorretais, atualmente há em curso estudos de fase I II com inibidores de da sinalização de AKT, MK2206 e Nelfinavir, respectivamente. Há também um estudo de fase I testando o inibidor de MEK AZD6244 em conjunto com quimiorradioterapia em pacientes com tumores de reto. Nesse contexto, nossos resultados mostram que as vias PI3K/AKT e ERK1/2 cumprem um importante papel no fenótipo agressivo apresentado pelas progênies de células sobreviventes à radiação, e sugerem que estas vias possam ser responsáveis pela falha terapêutica relacionada aos eventos biológicos que envolvem invasão celular após a RT em câncer de reto.

Estudos mostraram a ativação de ambas as vias PI3K/AKT e MAPK pelo EphA4 em células de glioma (FUKAI et al, 2008), e nossos resultados indicam que a alta ativação da via de ERK1/2 na F1 5Gy seja dependente de EphA4. É necessário confirmar esta hipótese assim como investigar se a ativação da via PI3K/AKT é *downstream* de EphA4 no nosso modelo celular. No entanto, considerando que o bloqueio de um receptor *upstream* às duas principais vias de sinalização no câncer possa ser um alvo terapêutico promissor, a inibição de EphA4 poderia ser uma estratégia interessante a ser usada em conjunto com a radioterapia a fim de reduzir as altas taxas de falha terapêutica causada pela invasão local e metastatização.

Quanto ao desenvolvimento de drogas com alvo em EphA4, até o momento, não há estudos clínicos em andamento com inibidores desse receptor para o tratamento do câncer, uma vez que o interesse em seu papel na tumorigênese é recente e seu entendimento é desafiado pela alta complexidade do sistema Eph/Ephrina. A associação de EphA4 com neuropatologias é melhor entendida e, nesta área, tem surgido alguns estudos em humanos usando um peptídeo antagonista de EphA4 que tem obtido bons resultados quanto ao aumento da sobrevida na doença neuronal motora (VAN HOECKE, 2012). Tal peptídeo poderia ser futuramente testado quanto a seu efeito em reduzir as propriedades agressivas de tumores. Além disso, alguns estudos *in vitro* têm focado no desenvolvimento de novos inibidores de EphA4 (QIN et al., 2008; LAMBERTO et al., 2014). Portanto, o interesse no papel do receptor EphA4 quanto à regulação de propriedades malignas vêm crescendo e revelando que o bloqueio de EphA4 poderia ser uma estratégia terapêutica interessante no combate ao câncer, particularmente, o CCR.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento do CCR requer uma abordagem multidisciplinar cirúrgica, quimioterápica e radioterápica e, até pouco tempo, o único tratamento quimioterápico utilizado para CCR era o 5-fluorouracil (5-FU) sozinho ou combinado com oxaliplatina e irinotecano (WALDNER; NEURATH, 2010). Novas terapias-alvo com anticorpos monoclonais contribuíram para o tratamento de CCR, porém, apenas alguns subgrupos de pacientes se beneficiam dessa abordagem devido à resistência dos tumores a essas drogas (WALDNER; NEURATH, 2010). Tais fatos evidenciam a necessidade da descoberta de novos alvos terapêuticos para o tratamento do CCR. Além disso, a radioterapia é amplamente utilizada em tumores avançados de reto e as altas taxas de recorrência local mais agressiva e metástases refratárias constituem o principal motivo de falha terapêutica (MADANI et al., 2008; VICINI et al., 2003). Desta forma, torna-se de extrema relevância o estudo dos mecanismos celulares que regulam os eventos relacionados à invasividade e metástase após exposição à radiação, os quais são responsáveis pela falha do tratamento.

Embora mais estudos sejam necessários para elucidar o papel de EphA4 na radiorresposta, o presente estudo mostrou que o aumento da atividade de EphA4 induzido pela radiação pode ser responsável pela desorganização da adesão intercelular das progênies de células sobreviventes a radiação. Tal fato poderia contribuir para o alto potencial migratório e invasivo, através da ativação de vias de sinalização centrais como PI3K/AKT e MAPK. Os resultados também mostram que estas vias de sinalização, classicamente relacionadas à proliferação e sobrevivência, podem cumprir um papel essencial na manutenção de um fenótipo resistente e agressivo, reforçando a ideia de que estes eventos não são isolados e que a aquisição de resistência à um tratamento pode favorecer um fenótipo invasivo e vice-versa (ALEXANDER; FRIEDL, 2012).

Em conjunto, esses dados possibilitam um maior entendimento do processo de radiorresposta, com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos que possam ser usados em conjunto com a radioterapia a fim de diminuir as altas taxas de falha terapêutica deste importante tipo de câncer.

8. CONCLUSÕES

- A progênie de células sobreviventes à radiação, caracterizada por um fenótipo relacionado à TEM, resistente e agressivo, apresenta um aumento da atividade do receptor tirosina quinase EphA4;
- A ativação do EphA4 parece estar relacionada com a downregulação e a internalização da E-caderina o que contribuiria para a desorganização das junções aderentes;
- Os resultados do silenciamento do EphA4 indicam que o este receptor pode contribuir para o alto potencial invasivo e regular a ativação de ERK1/2 na progênie de células sobreviventes;
- As vias de sinalização PI3K/AKT e ERK1/ 2 estão mais ativas na progênie de células sobreviventes e são responsáveis pelo alto potencial migratório e invasivo apresentado por elas.
- As vias de PI3K/AKT e ERK1/2 podem constituir alvos interessantes para novas combinações terapêuticas em conjunto com a radioterapia, com intuito de reduzir o fenótipo agressivo das células que sobrevivem ao tratamento.
- O Epha4 pode ser um interessante marcador e alvo terapêutico a ser usado juntamente com a radioterapia, a fim de reduzir os eventos relacionados à falha terapêutica pós-radioterápica no CCR.

REFERÊNCIAS

- Alexander S, Friedl P. 2012. **Cancer invasion and resistance: interconnected processes of disease progression and therapy failure.** Trends Mol Med 18:13-26.
- Al-sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. 2012. **Molecular pathways in colorectal cancer.** J Gastroenterol Hepatol 27: 1423–1431.
- Arends M. 2013. **Pathways of colorectal carcinogenesis.** Appl Immunohistochem Mol Morphol 21: 97-102.
- Arvanitis D, Davy A. 2008. **Eph/ephrin signaling: networks.** Genes Dev 22: 416–429.
- Astin, J, Batson J, Kadir S, Charlet J, Persad RA, Gillatt D, Oxley JD, Nobes CD., 2010. **Competition amongst Eph receptors regulates contact inhibition of locomotion and invasiveness in prostate cancer cells.** Nat Cell Biol 12:1194-204.
- Baines A, Xu D, Der C. 2011. **Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues.** Future Med Chem 14: 1787–1808.
- Barcellos-hoff M, Park C, Wright E. 2005. **Radiation and the microenvironment - tumorigenesis and therapy.** Nat Rev Cancer 5:867–75.
- Bastos L, de Marcondes PG, de-Freitas-Junior JC, Leve F, Mencalha AL, de Souza WF, de Araujo WM, Tanaka MN, Abdelhay ES, Morgado-Díaz JA. 2014. **Progeny from Irradiated Colorectal Cancer Cells Acquire an EMT-like Phenotype and Activate WNT/ β -catenin Pathway.** Journal of Cellular Biochemistry 12:2175-87.
- Batson J, MacCarthy-Morrogh L, Archer A, Tanton H, Nobes CD. 2004. **EphA receptors regulate prostate cancer cell dissemination through Vav2–RhoA mediated cell–cell repulsion.** Biol Open.3(6):453-62.
- Bishehsari F. 2014. **Epidemiological transition of colorectal cancer in developing countries: Environmental factors, molecular pathways, and opportunities for prevention.** World J Gastroenterol 20(20):6055-72.
- Bjerknes M, Cheng H. 1999. **Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors.** Gastroenterology, 116: 7–14.
- Brantley-Sieders D, Fang WB, Hwang Y, Hicks D, Chen J. 2006. **Ephrin-A1 Facilitates Mammary Tumor Metastasis through an Angiogenesis-Dependent Mechanism Mediated**

by **EphA Receptor and Vascular Endothelial Growth Factor in Mice**. *Cancer Res* 21:10315-10324.

Brantley-Sieders D. 2012. **Clinical relevance of Ephs and ephrins in cancer: lessons from breast, colorectal, and lung cancer profiling**. *Semin Cell Dev Biol* 66(21):102-108.

Buda A, Pignatelli M. 2011. **E-cadherin and the cytoskeletal network in colorectal cancer development and metastasis**. *Cell Commun Adhes* 18(6) 133-143.

Campbell P, Channing J. 2004. **Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis**. *Semin Cancer Biol* 14(2) 105–114.

Centelles J. 2012. **General Aspects of Colorectal Cancer**. *ISRN Oncology* 2012:139268, 1-19.

Chan A, Giovannucci E. 2010. **Primary Prevention of Colorectal Cancer**. *Gastroenterology* 138(6):2029–2043.

Clevers H, Nusse R. 2012. **Wnt/ β -catenin signaling and disease**. *Cell*, 149:1192-1205.

Christie Hospital NHS Foundation Trust. **Dual REctal Angiogenesis or MEK Inhibition radioTHERAPY Trial (DREAMtherapy)**. In: *ClinicalTrials.gov* [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000- [2015 March 20]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01160926>

Colomiere M, Ward AC, Riley C, Trenerry MK, Cameron-Smith D, Findlay J, Ackland L, Ahmed N. 2009. **Cross talk of signals between EGFR and IL-6R through JAK2/STAT3 mediate epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinomas**. *Br J Cancer* 100: 134-144..

de Baco F, Luraghi P, Medico E, Reato G, Girolami F, Perera T. 2011. **Induction of MET by ionizing radiation and its role in radioresistance and invasive growth of cancer**. *J Natl Cancer Inst* 103:645–61.

de Carvalho A, de Souza W, Morgado-Díaz J. 2006. **Morphological and molecular alterations at the junctional complex in irradiated human colon adenocarcinoma cells, Caco-2**. *Int J Radiat Biol* 82:658-68.

Desantis, C, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, Alteri R, Robbins AS, Jemal A. 2014. **Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2014**. *Ca cancer j clin* 64(4):252-71.

- Diehl J, Roussel M, Cheng M, Sherr C. 1998. **Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization.** *Genes Dev* 12: 3499–511..
- Dodelet V, Pasquale E. 2000. **Eph receptors and ephrin ligands: embryogenesis and tumorigenesis.** *Oncogene* 19(49):5614–5619.
- Fearon E, Vogelstein B. 1990. **A genetic model for colorectal tumorigenesis.** *Cell* 61: 759-767.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. **GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11**
- Fox BP, Kandpal RP. 2004. **Invasiveness of breast carcinoma cells and transcript profile: Eph receptors and ephrin ligands as molecular markers of potential diagnostic and prognostic application.** *Biochem Biophys Res Commun* 4: 882-92.
- Friedl P, Wolf K. 2010. **Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model.** *J Cell Biol* 188(1):188:119.
- Fukai J, Yokote H, Yamanaka R, Arao T, Nishio K, Itakura T. 2008. **EphA4 promotes cell proliferation and migration through a novel EphA4-FGFR1 signaling pathway in the human glioma U251 cell line.** *Mol Cancer Ther* 7(9):2768-2778.
- Glimelius B. 2013. **Neo-adjuvant radiotherapy in rectal cancer.** *World J Gastroenterol* 19(46): 8489-8501.
- Grille S, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, van Roy F, Lee-Kwon W, Donowitz M, Tsihchlis PN, Larue L. 2003. **The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines.** *Cancer Res* 63(9): 2172-2178.
- Gschwind A, Fischer O, Ullrich A. 2004. **The discovery of receptor tyrosine.** *Nature* 4: 361-370.
- Gunasinghe N, Wells A, hompson E, Hugo H. 2012. **Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer.** *Cancer Metastasis Rev* 31(3-4): 469-478.
- Gupta G, Massagué J. 2006. **Cancer metastasis: building a framework.** *Cell* 127: 679–695.

- Habr-Gama A. 2005. **Câncer colorretal – A importância de sua prevenção.** Arq Gastroenterol 1:2-3.
- Hall E, Giaccia A. 2006. The Oxygen effect. Em: **Radiobiology for the radiologist.** 6th edition. s.l.:Lippincott Williams and Wilkins Publishing, p. 656.
- Inestrosa NC, Varela-Nallar L. 2013. **Wnt Signaling Roles on the Structure and Function of the Central Synapses: Involvement in Alzheimer's Disease.** Em: Trends in Cell Signaling Pathways in Neuronal Fate Decision", edited by Wislet-Gendebien, S.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; Ministério da Saúde. 2013. **Estimativa. 2014. Rio de Janeiro.**
- Hanahan D, Weinberg R. 2011. **Hallmarks of cancer: the next generation.** Cell 144(5): 646-74.
- Hess A, Margaryan N, Seftor E, Hendrix M. 2007. **Deciphering the signaling events that promote melanoma tumor cell vasculogenic mimicry and their link to embryonic vasculogenesis role of the Eph receptors.** Dev Dyn 236(12): 3283–3296.
- Ireton R, Chen J., 2005. **EphA2 receptor tyrosine kinase as a promising target for cancer therapeutics.** Curr Cancer Drug Targets 5: 149–157
- Janes P, Adikari S, Lackmann M. 2008. **Eph/ephrin signalling and function in oncogenesis: lessons from embryonic development.** Curr Cancer Drug Targets 8: 473–479.
- Jasperson K, Tuohy T, Neklason D, Burt R. 2010. **Hereditary and Familial Colon Cancer.** Gastroenterology 138(6): 2044–2058.
- Jass J. 2007. **Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features.** Histopathology 50:113-30.
- Kandouz M. 2012. **The Eph/Ephrin family in cancer metastasis: communication at the service of invasion.** Cancer Metastasis R 31(1-2): 353–373.
- Karapetis C, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, Zalcberg JR. 2008. **K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer.** N Engl J Med 17:1757-65.

- Kim SH, Park CK, Cho YB, Yun SH, Lee WY, Chun HK. 2012. **An alternative pathway in colorectal carcinogenesis based on the mismatch repair system and p53 expression in Korean patients with sporadic colorectal cancer.** *Ann Surg Oncol* 12:4031-40.
- Kosinski C, Li VS, Chan AS, Zhang J, Ho C, Tsui WY, Chan TL, Mifflin RC, Powell DW, Yuen ST, Leung SY, Chen X. 2007. **Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors.** *Proc Natl Acad Sci* 104:15418-23.
- Kullarnder K, KLEIN R. 2002. **Mechanisms and functions of Eph and ephrin signaling.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 475–486.
- Lai K, Chen Y, Po H. 2004. **Identification of the Jak/Stat Proteins as Novel Downstream Targets of EphA4 Signaling in Muscle: Implications in the regulation of acetylcholinesterase expression.** *J Biol Chem* 279(14): 13383-13392.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. 2014. **Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:178-96.
- Lawrenson I, Wimmer-kleikamp S, Lock P, Schoenwaelder S. 2001. **Ephrin-A5 induces rounding, blebbing and deadhesion of EphA3-expressing 293T and melanoma cells by CrkII and Rho-mediated signalling.** *Journal of Cell Science* 115(5): 1059-1072.
- Leve F, Morgado-díaz JA. 2012. **Rho GTPase signaling in the development of colorectal cancer.** *J Cell Biochem* 8:2549-59
- Lindsay T, Syamal B, Paul K. 2012. **Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies.** *Int J Biochem Mol Biol* 3(2): 117-136.
- Liu C, Huang H, Wang C, Kong Y. 2014. **Involvement of ephrin receptor A4 in pancreatic cancer cell motility and invasion.** *Oncology letters* 7(6): 2165-2169.
- Liizumi M, Hosokawa M, Takehara A, Chung S, Nakamu. 2006. **EphA4 receptor, overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma, promotes cancer cell growth.** *Cancer Sci* 97(11): 1211-1216.
- Louro I, Bailey EC, Li X, South LS, McKie-Bell PR, Yoder BK, Huang CC, Johnson MR, Hill AE, Johnson RL, Ruppert JM. 2002. **Comparative geneexpression profile analysis of GLI and c-MYC in n epithelial model of malignant transformation.** *Cancer Res* 62(20): 5867-5873.

- Madani I, de Neve W, Mareel M. 2008. **Does ionizing radiation stimulate cancer invasion and metastasis?**. Bull cancer 3: 292-300.
- Maher MT, Flozak AS, Stocker AM, Chem A, Gottardi CM. 2009. **Activity of the beta-catenin phosphodestruction complex at cell-cell contacts is enhanced by cadherin-based adhesion.** J Cell Biol 186: 219-28.
- Maastricht Radiation Oncology. **Nelfinavir, a Phase I/Phase II Rectal Cancer Study.** In: ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000- [Cited 2015 March 20]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00704600>
- Medema J, Vermeulen L. 2011. **Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer.** Nature 474:318-26..
- Merlos-Suarez A, Batlle E. 2008. **Eph–ephrin signalling in adult tissues and cancer.** Curr Opin Cell Biol 20: 194–200 .
- Miyazaki K, Inokuchi M, Takagi Y, Kato K, Kojima K, Sugihara K. 2013. **EphA4 is a prognostic factor in gastric cancer.** BMC Clinical Pathology 13(1): 13:19.
- Moustaka A, Heldini CH. 2007. **Signaling networks guiding epithelial–mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression.** Cancer Sci 8: 1512–1520.
- Nelson W. 2003. **Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity.** Nature 422(6933):766-774.
- National Cancer Institute. **Akt Inhibitor MK2206 in Treating Patients With Previously Treated Colon or Rectal Cancer That is Metastatic or Locally Advanced and Cannot Be Removed by Surgery.** In: ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000- [2015 March 20]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/show/NCT01802320>
- Network C. 2012. **Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer.** Nature 487:330-7.
- Niessen C, Gottardi C. 2008. **Molecular components of the adherens junction.** Biochim Biophys Acta 1778: 562-571.
- Nievergall E, Lackmann M, Janes P. 2011. **Eph-dependent cell-cell adhesion and segregation in development and cancer.** Cell Mol Life Sci 11:1813-42

- Oshima T, Akaike M, Yoshihara K, Shiozawa M, Yamamoto N, Sato T, Akihito N, Nagano Y, Fujii S, Kunisaki C, Wada N, Rino Y, Tanaka K, Masuda M, Imada T. 2008. **Overexpression of EphA4 gene and reduced expression of EphB2 gene correlates with liver metastasis in colorectal cancer.** *Int J Oncol* 33(3): 573-577.
- Pach R, Kulig J, Richter P. 2012. **Randomized clinical trial on preoperative radiotherapy 25 Gy in rectal cancer—treatment results at 5-year follow-up.** *Langenbecks Arch Surg* 397(5): 801–807.
- Palacios F, Tushir JS, Fujita Y, D'Souza-Schorey C. 2005. **Lysosomal targeting of E-cadherin: a unique mechanism for the down-regulation of cell-cell adhesion during epithelial to mesenchymal transitions.** *Mol Cell Biol* 25:389-402
- Pancione M, Remo A, Colantuoni C. 2012. **Genetic and Epigenetic Events Generate Multiple Pathways in Colorectal Cancer Progression.** *Pathol Res Internat.* 2012:509348
- Pasquale E. 2008. **Eph-Ephrin Bidirectional Signaling in Physiology and Disease.** *Cell* 133(1): 38-52.
- Peinado H, Olmeda D, Cano A. 2007. **Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?.** *Nat. Rev. Cancer* 7: 415–428.
- Petty A, Myshkin E, Qin H, Guo H, Miao H, Tochtrop GP, Hsieh JT, Page P, Liu L, Lindner DJ, Acharya C, MacKerell AD Jr, Ficker E, Song J, Wang B. 2008. **A small molecule agonist of EphA2 receptor tyrosine kinase inhibits tumor cell migration in vitro and prostate cancer metastasis in vivo.** *PLoS One* 7(8):e42120
- Pino M, Chung D, 2010. **The chromosomal instability pathway in colon cancer.** *Gastroenterology*, 138: 2059-2072..
- Pinto D, Clevers H. 2005. **Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium.** *Exp Cell Res*, 306: 357-363.
- Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E. 2004. **Oxidative stress and cell signalling.** *Curr Med Chem* 11:1163–82.
- Porter A, Vaillancourt R. 1998. **Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis.** *Oncogene* 16: 1343-1352.
- Poulogiannis G, Frayling I, Arends M. 2010. **DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome.** *Histopathology* 56: 167-179.

- Prise K, Schettino G, Folkard M. 2005. New insights on cell death from radiation exposure. *Lancet Oncol* 6(7): 520-528.
- Pritchard A, Hayward N. 2013. **Molecular Pathways: Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Mutations and Drug Resistance**. *Clin Cancer Res* 19(9): 2301-2309.
- Roper J, Sinnamon MJ, Coffee EM, Belmont P, Keung L, Georgeon-Richard L, Wang WV, Faber AC, Yun J, Yilmaz ÖH, Bronson RT, Martin ES, Tschlis PN, Hung KE. 2014. **Combination PI3K/MEK inhibition promotes tumor apoptosis and regression in PIK3CA wild-type, KRAS mutant colorectal cancer..** *Cancer Lett*, pp. 347(2):204-11.
- Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. 2008. **Efficient tumour formation by single human melanoma cells**. *Nature* 456: 593-598.
- Rajagopalan H, Nowak M, Vogelstein B, Lengauer C. 2003. **The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer**. *Nature Reviews* 3(9): 695-700.
- Rajalingam K, Schreck R, Ulf R, Albert S. 2007. **Ras oncogenes and their downstream targets**. *Biochim Biophys Acta*. 8:1177-95.
- Rustgi, A., 2007. **The genetics of hereditary colon cancer**. *Genes Dev* 21: 2525–2538.
- Samuels Y, Samuels Y1, Diaz LA Jr, Schmidt-Kittler O, Cummins JM, DeLong L, Cheong I, Rago C, Huso DL, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. 2005. **Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells**. *Cancer Cell* 6:561-73..
- Schluter, K, Gassmann P, Enns A, Korb T, Hemping-Bovenkerk A, Hölzen J, Haier J. 2006. **Organ-specific metastatic tumor cell adhesion and extravasation of colon carcinoma cells with different metastatic potential**. *Am J Pathol* 169(3): 1064-1073.
- Sipos F, Galamb O. 2012. **Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon**. *World J Gastroenterol* 7: 601-608.
- Shimizu, T, Tolcher AW, Papadopoulos KP, Beeram M, Rasco DW, Smith LS, Gunn S, Smetzer L, Mays TA, Kaiser B, Wick MJ, Alvarez C, Cavazos A, Mangold GL, Patnaik A. 2012. **The Clinical Effect of the Dual-Targeting Strategy Involving PI3K/AKT/mTOR and RAS/MEK/ERK Pathways in Patients with Advanced Cancer**. *Clin Cancer Re* 8:2316-25.
- Shin J, Gu C, Kim J, Soochul P. 2008. **Transient activation of the MAP kinase signaling pathway by the forward signaling of EphA4 in PC12 cells**. *BMP Reports* 41(6): 479-484.

- Stein E, Lane AA, Cerretti DP, Schoecklmann HO, Schroff AD, Van Etten RL. 1998. **Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses.** *Genes Dev* 12(5): 667–678.
- Taube, J, Herschkowitz JI, Komurov K, Zhou AY, Gupta S, Yang J, Hartwell K, Onder TT, Gupta PB, Evans KW, Hollier BG, Ram PT, Lander ES, Rosen JM, Weinberg RA, Mani SA. 2010. **Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes.** *Proc Natl Acad Sci* 107:15449-54.
- Testa J, Abellacosa A. 2001. **AKT plays a central role in tumorigenesis.** *Proc Natl Acad Sci* 98: 10983–5.
- Thierry J, Acloque H, Huang R, Nieto M. 2009. **Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease.** *Cell* 139(5): 871–890..
- Thiery J, Sleeman J. 2006. **Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:131-42.
- Timmerman LA1, Grego-Bessa J, Raya A, Bertrán E, Pérez-Pomares JM, Díez J, Aranda S, Palomo S, McCormick F, Izpisua-Belmonte JC, de la Pompa JL. 2004. **Notch promotes epithelial mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation.** *Genes Dev* 18: 99-115.
- Tonon L, Secoli S, Caponero R. 2007. **Câncer colorretal: uma revisão da abordagem terapêutica com bevacizumabe.** *Revista Brasileira de Cancerologia* 2: 173-182.
- Turner J, 2009. **Intestinal mucosal barrier function in health and disease.** *Nat Rev Immunol* 11: 799-809.
- Van Den Brink M, Stiggelbout AM, van den Hout WB, Kievit J, Klein Kranenbarg E, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Rutten HJ, Wiggers T, van de Velde CJ. 2004. **Clinical Nature and Prognosis of Locally Recurrent Rectal Cancer After Total Mesorectal Excision With or Without Preoperative Radiotherapy.** *J Clin Oncol* 22:3958-3964.
- Van ES, Barker N, Clevers H. 2003. **You Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway.** *Curr Opin Genet Dev* 13(1): 28-33.
- Van Hoecke A, Schoonaert L, Lemmens R, Timmers M, Staats KA, Laird AS, Peeters E, Philips T, Goris A, Dubois B, Andersen PM, Al-Chalabi A, Thijs V, Turnley AM, van Vught PW, Veldink JH, Hardiman O, Van Den Bosch L, Gonzalez-Perez P, Van Damme P, Brown RH.

2012. EPHA4 is a disease modifier of amyotrophic lateral sclerosis in animal models and in humans. Nat Med- 9:1418-22

Vicini F, Kestin L, Huang R, Martinez A. 2003. **Does local recurrence affect the rate of distant metastases and survival in patients with early-stage breast carcinoma treated with breast-conserving therapy?**. Cancer 97:910–9.

Vogelstein B, Kinzler K. 2004. **Cancer genes and the pathways they control.** Nat Med 10: 789-99.

Waldner M, Neurath M. 2010. **The molecular therapy of colorectal cancer.** Mol Aspects Med: 2:171-8.

Ward J. 2002. **The radiation induced lesions which trigger the bystander effect.** Mutat Res 499: 151–54.

Wijnhoven B, Dinjens W, Pignatelli M. 2000. **E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer.** W Br J Surg 8: 992-1005.

Winning R, Wyman T, Walker G. 2001. **EphA4 Activity Causes Cell Shape Change and a Loss of Cell Polarity in Xenopus laevis embryos.** Differentiation 68(2-3): 126–132.

Wong J, Hawkins N, Ward R. 2007. **Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis.** Gut 56:. 140–148.

Yacoub A, Miller A, Caron A, Qiao L, Curiel L, Fisher PB. 2006. **Radiotherapy-induced signal transduction.** Endocr Relat Cancer 1: 99-114.

Yamane L, Scapulatempo-Neto C, Manuel R, Guimarães D. 2014. **Serrated pathway in colorectal carcinogenesis.** World J Gastroenterol 10: 2634-2640.

Yan Y, Luo YC, Wan HY, Wang J, Zhang PP, Liu M, Li X, Li S, Tang H. 2013. **MicroRNA-10a is involved in the metastatic process by regulating Eph tyrosine quinase receptor A4-mediated epithelial-mesenchymal transition and adhesion in hepatoma cells.** Hepatology 2: 667-67

Yin Y, Shen W. 2008. **PTEN: a new guardian of the genome.** Oncogene 27: 5443–5453.

Zhao C, Bu X. 2012. **Promoter methylation of tumor-related genes in gastric carcinogenesis.** Histol Histopathol 27(10): 1271-1282.

ANEXO