



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

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

ADRIANA SARTORIO GEHREN

Papel do partenólídeo na redução do potencial maligno de células de câncer colorretal

Orientador: Dr. José Andrés Morgado Díaz
Coorientador: Dr. Waldemir Fernandes de Souza

RIO JANEIRO

2015



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

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

ADRIANA SARTORIO GEHREN

Papel do partenólídeo na redução do potencial maligno de células de câncer colorretal

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

Orientador: Dr. José Andrés Morgado Díaz

Coorientador: Dr. Waldemir Fernandes de Souza

RIO DE JANEIRO

2015



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

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

ADRIANA SARTORIO GEHREN

**PAPEL DO PARTENOLÍDEO NA REDUÇÃO DO POTENCIAL MALIGNO DE
CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL**

ORIENTADOR: Dr. José Andrés Morgado Díaz

COORIENTADOR: Dr. Waldemir Fernandes de Souza

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr(a)

Prof. Dr(a)

Prof. Dr(a)

Prof. Dr(a)

Prof. Dr(a)

RIO DE JANEIRO

2015

DEDICATÓRIA

*A Deus, à minha amada mãe, da qual sinto
imensas saudades e à minha futura família.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sua presença em minha vida de forma tão concreta, por toda Sua graça e inspiração.

À minha mãe (*in memoriam*), por sua vida dedicada às filhas, por seu exemplo de luta e fé que me impulsionaram até aqui.

Ao meu orientador Dr. José Andrés Morgado, por toda a confiança e apoio diante de tantos desafios impostos neste período, pelas oportunidades dadas a mim para crescimento profissional e pessoal, com certeza levarei para toda vida esta amizade!

Ao meu coorientador Dr. Waldemir Fernandes de Souza, por todo seu apoio científico e humano desde quando comecei minha trajetória no mundo da pesquisa, obrigada por sua generosidade!

À todos os amigos do laboratório conquistados e que me conquistaram com suas batalhas, irreverência extrema, preocupação e interesse uns pelos outros. De fato uma família BIOEST. Cada um de modo especial marcou minha caminhada até aqui. Aos colegas de outros laboratórios que foram tão generosos e também contribuíram para minha formação e crescimento científico.

À todos os professores que passaram por minha vida.

Aos colegas com os quais pude compartilhar um pouco do conhecimento adquirido neste período e que também foram fonte de conhecimento e descobertas.

Agradeço de modo muito especial às minhas "amigas de quarto" amigas para a vida, Mariana, Suellen e Cássia que estiveram ao meu lado desde o início compartilhando dores e vitórias, medos e ímpetos de auto-confiança, me ajudando a ponderar, sendo meu laboratório da vida real, me ajudando a desbravar o terreno da convivência, foram muitas gargalhadas e papos-cabeça. Obrigada meninas!

Aos amigos da vida, em especial Marcela e tio Lino, e a todos que também foram meu apoio mesmo sem compreender todas minhas aflições nesta vida científica, mas tolerando e desculpando todos os encontros cancelados.

À minha irmã e sobrinhos, por serem também parte desta vitória!



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

PAPEL DO PARTENOLÍDEO NA REDUÇÃO DO POTENCIAL MALIGNO DE CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL

RESUMO

Adriana Sartorio Gehren

O câncer colorretal constitui uma das principais causas de câncer no Brasil e no mundo. O microambiente inflamatório desempenha um importante papel na iniciação, promoção e progressão deste tipo de câncer. O TNF- α é um componente deste microambiente e conhecido por ativar via NF- κ B. Neste contexto, o partenolídeo, uma lactona sesquiterpênica, com importante função anti-inflamatória por inibir a via NF- κ B, apresenta-se como uma promissora molécula anticâncer por prevenir progressão no ciclo celular, migração, invasão e sobrevivência de células tumorais. No entanto, seus efeitos no câncer colorretal necessitam ser melhor definidos. O objetivo do presente estudo foi analisar a ação do partenolídeo na reversão de características pró-tumorais em células derivadas de câncer colorretal, Caco-2, HT-29 e HCT-116. Nossos resultados mostram que a atividade de NF- κ B está diferencialmente ativa entre as diferentes linhagens de células de câncer colorretal e que a resposta citotóxica ao tratamento com partenolídeo está relacionada com essa ativação. O partenolídeo foi capaz de prevenir a ativação da via NF- κ B induzida por TNF- α através da redução da fosforilação do I κ B α nas linhagens Caco-2 e HT-29, porém parece ter outro alvo inibitório nas células HCT-116, pois estas não apresentaram redução na translocação nuclear de NF- κ B. Além disso, foi observado que o partenolídeo reduz o potencial proliferativo em todas as linhagens e invasivo nas células HT-29 e HCT-116, assim como inibe a desorganização da E-caderina nos contatos intercelulares destas células. Finalmente, o uso concomitante de PTL e TNF- α parece acentuar a redução de características associadas com progressão de câncer, como a proliferação e a invasão. Em conclusão, nossos achados sugerem que o partenolídeo, por inibir a via NF- κ B, pode controlar importantes eventos celulares relacionados a progressão tumoral, tais como proliferação, invasão e desorganização da adesão célula-célula. Este composto possui uma promissora ação antitumoral, podendo ser futuramente aplicado no tratamento alvo-específico de pacientes com câncer colorretal que apresentem ativação aumentada na via de sinalização NF- κ B.

Palavras-chaves: Câncer colorretal, partenolídeo, NF- κ B, progressão tumoral, E-caderina.



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

PARTHENOLIDE ROLE IN REDUCING THE MALIGNANT POTENTIAL OF COLORECTAL CANCER CELL

ABSTRACT

Adriana Sartorio Gehren

Colorectal cancer is one the main cancer types in Brazil and world. Inflammatory microenvironmet plays an important role in the initiation, promotion and progression of this cancer. TNF- α is an important constituent of this microenvironment, which is known as activator of NF- κ B pathway. In this context, the parthenolide, a sesquiterpene lactone that have anti-inflammatory function through NF- κ B inhibition, presents promising anticancer properties for preventing cell cycle progression, migration, invasion and cell survival. However, the effects on colorectal cancer need to be best understood. This study aims to analyze the parthenolide action reversing pro-tumor characteristics of Caco-2, HT-29 and HCT-116 colorectal cancer cells. Our results shown the NF- κ B pathway is differentially active among cell types of colorectal cancer and citotoxic response to parthenolide treatment has relationship with this level of activation. Parthenolide was able to prevent the TNF- α induced-activation NF- κ B pathway through to decrease I κ B α phosphorylation in Caco-2 and HT-29, but seem have another inhibitory target in HCT-116 cells, because it did not observed reduction of NF- κ B nuclear in these cells. Futhermore, we observed that parthenolide reduces proliferation in all cells and reduces invasion in HT-29 and HCT-116 cells, as well as inhibits E-cadherin disorganization in cell-cell contacts. Ultimately, parthenolide together TNF- α seems accentuate the decrease features associated with cancer progression, proliferation and invasion. In conclusion, we data suggest that parthenolide by NF- κ B pathway inhibition, may control important cell events related with tumoral progression, such as proliferation, invasion and adhesion cell-cell disorganization. This compound has a promising antitumoral action, can be further applied to target specific treatment of patients with colorectal cancer showing increased activation in the NF- κ B signaling pathway.

Keywords: Tumor progression, colorectal cancer, parthenolide, NF- κ B, E-cadherin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abl - Do inglês, *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*
APC - Do inglês, *Adenomatous Polyposis Coli*
ARD - Do inglês, *Ankyrin Repetition-Domain*
BAFF-R - Do inglês *B-cell activating factor receptor*
BCL3 - Do inglês, *B-Cell CLL/Lymphoma 3*
Bcl-x1 - Do inglês *B-cell Lymphoma-extra large*
BRAF - Do inglês, *V-Raf Murine Sarcoma Viral*
CCR - Câncer Colorretal
CD-40 - Do inglês, *Cluster of Differentiation 40*
CDH 1 - Do inglês, *Cadherin 1*
CIN - Do inglês, *Chromosomal Instability*
CIMP - Do inglês, *CpG Island Methylator Phenotype*
CJA - Complexo Juncional Apical
CLDN - Claudina
COX-2 - Cicloxigenase 2
CTNNB - Do inglês, *Catenin (Cadherin-Associated Protein), Beta 1*
DNMT1 - Do inglês, *DNA Methyltransferase*
EGFR - Do inglês, *Epidermal Growth Factor Receptor*
EMSA - Do inglês, *Electrophoretic Mobility Shift Assay*
EMT - Do inglês, *Epithelial Mesenchymal Transition*
FAP - Do inglês, *Familial Adenomatous Polyposis*
GpX - Do inglês, *Glutathione Peroxidase*
GSK3 β - Do inglês, *Glycogen Synthase Kinase 3*
HDAC1- Do inglês, *Histone Deacetylase 1*
HNPCC - Do inglês, *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer*
HSP70 - Do inglês, *Heat Shock Proteins 70 kilodalton*
HTLV1 - Do inglês, *Human T-cell Leukemia Virus 1*
IC₅₀ 20 1 - Do inglês, *Inhibition Coefficient*
IKK - Do inglês, *Inhibitor κ B Kinase*
IL-R - *Interleucin Receptor*
I κ B - Do inglês, *Inhibitor κ B*
JA - Junção Aderente
JAM - Do inglês, *Junctional Adhesion Molecules*
JAK - Do inglês *Janus kinase*
JT - Junção Tight
KRAS - Do inglês, *Kirsten Rat Sarcoma*
LPS - Polissacarídeos
LS - Lactona Sesquiterpênica
MAPK - Do inglês, *Mitogen-activated Protein Kinases*
MDM2 - Do inglês, *Murine Doble minute 2*
MLH1 - Do inglês, *MutL Protein Homolog 1*
MMP-9 - Metaloprotease 9
MMR - Do inglês, *Mismatch Repair*
MnSOD - Do inglês, *Manganese Superoxide Dismutase*
MSI - Do inglês, *Microsatellite Instability*
MSH1 E 6 - Do inglês *MutS protein homolog 1 e 6*
NEMO - Do inglês, *NF- κ B Essential Modifier*

NF- κ B - Do inglês, *Nuclear Factor κ of B Cell*
PIK3CA - *Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphate3-Kinase*
pI κ B - Do inglês, *Phosphorilation Inhibitor κ B*
PTL - Partenolídeo
RIP - Do inglês, *Receptor-Interating Protein*
RNS - Do inglês, *Reactive Nitrogen Species*
ROS - Do inglês, *Reactive Oxygen Species*
SMAD4 - do inglês *SMAD family Member 4*
SNAIL - Do inglês, *Zinc finger protein SNAI*
STAT - Do inglês, *Signal Transducer and Activator of Transcription*
TAD - Do inglês, *Transactivation Domain*
TAK - Do inglês, *Transforming Growth Factor β Activated Kinase 1*
TGF β II - Do inglês, *Receptor de fator de crescimento transformante beta II*
TLR - Do inglês, *Toll-like Receptor*
TNF- α - do inglês, *Tumoral Necrosis Factor alpha*
TNFR - Do inglês, *TNF- α Receptor*
TP 53 - Do inglês *Tumor Protein 53*
TRAF - Do inglês, *TNF- α Receptor Associate Factors*
VEGF - Do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*
WNT - Do inglês, *Wingless*
ZEB 1 e 2 - Proteína de ligação à região E-box com domínio dedo de zinco
ZO-1, 2 e 3 - Do inglês, *Zonula Ocludens*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxas brutas de incidência de câncer, segundo localização primária estimadas para 2014 no Brasil por sexo, exceto pele não melanoma..... 1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de instabilidade genômicas envolvidas na progressão do CCR.....	5
Figura 2. Complexo Juncional Apical	7
Figura 3. Vias de sinalização reguladas por membros das junções aderentes.....	9
Figura 4. Via de sinalização NF- κ B	12
Figura 5. Estrutura química do partenólídeo	15
Figura 6. Modelo da atividade anticâncer do partenólídeo	16
Figura 7. Análise da atividade basal da via NF- κ B e do efeito citotóxico do partenólídeo em células de câncer colorretal.....	28
Figura 8. Análise do tempo resposta de ativação da via NF- κ B após estímulo com TNF- α em células de câncer colorretal.....	29
Figura 9. Análise da ativação da via- κ B após estímulo com partenólídeo em células de câncer colorretal	30
Figura 10. Análise dos níveis de p-I κ B e I κ B total após tratamento comTNF- α e diferentes doses de partenilídeo.....	32
Figura 11. Análise da localização subcelular do NF- κ B em células HT-29 após tratamento com TNF- α e partenólídeo	33
Figura 12. Análise da localização subcelular do NF- κ B em células HCT-116 após tratamento com TNF- α e partenólídeo	34
Figura 13. Análise do potencial proliferativo de células de câncer colorretal sob o tratamento com TNF- α isolado ou em conjunto com o partenólídeo.....	36
Figura 14. Análise do potencial invasivo de células de câncer colorretal sob o tratamento com TNF- α isolado ou em conjunto com partenólídeo.....	38
Figura 15. Análise da localização celular da proteína E-caderina em células HT-29	40
Figura 16. Análise da localização celular da proteína E-caderina em células HCT-116	41

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Câncer Colorretal	1
1.1.1 - Epidemiologia, mortalidade e fatores de risco	1
1.1.2 - Alterações moleculares	4
1.2 - Complexo Juncional Apical	6
1.2.1 - Junções Aderentes	7
1.3 - Via de sinalização NF-κB	10
1.3.1 - Via NF- κ B e Câncer Colorretal.....	13
1.4 - Partenólídeo	15
3 - OBJETIVOS	20
3.1 - Objetivo Geral	20
3.2 - Objetivos Específicos	20
4. METODOLOGIA	21
4.1 - Cultura de células	21
4.2 - Tratamento de ativação e inibição da Via NF-κB	21
4.3 - Ensaio de citotoxicidade (MTT)	22
4.4 - Extrato de lisados proteicos totais	22
4.5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE) e transferência eletroforética	23
4.6 - Incubação com anticorpos	23
4.6 - Proliferação Celular	24
4.7 - Imunofluorescência	24
4.8 - Ensaio de invasão	25
4.9 - Análise estatística	25
5 - RESULTADOS	26
5.1 - A via NF-κB está diferencialmente ativa em linhagens celulares de câncer colorretal e o partenólídeo reduz a viabilidade celular com resposta diferencial entre as linhagens	26
5.2 - TNF-α aumenta os níveis de fosforilação de IκBα	28
5.3 - Partenólídeo diminui os níveis de fosforilação do IκBα induzido por TNF-α nas células Caco-2, HT-29 e HCT-116	29

5.4 Partenólídeo é capaz de diminuir a translocação nuclear do NF-κB induzida por TNF-α nas células HT-29	32
5.5 - Partenólídeo reduz o potencial proliferativo em células de câncer colorretal ativadas com TNF-α	34
5.6 - Partenólídeo reduz a capacidade invasiva das células HT-29 e HCT-116 e quando associado ao TNF-α este efeito é acentuado nas células HT-29.....	36
6 - DISCUSSÃO	42
7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
8 - CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXO.....	59

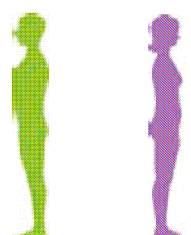
1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Câncer Colorretal

1.1.1 - Epidemiologia, mortalidade e fatores de risco

No último século o mundo sofreu uma transição epidemiológica onde doenças infecto-parasitárias deixaram de ser a principal causa de morte e deram lugar a doenças crônico-degenerativas, dentre elas o câncer. Este cenário deve-se ao avanço no desenvolvimento tecnológico, melhor acesso a tratamento de doenças e diagnóstico precoce, bem como aumento da expectativa de vida, com consequente aumento de exposição a carcinógenos. No mundo, países desenvolvidos e em desenvolvimento sócio-econômico, como o Brasil, o câncer representa a segunda causa de morte, ficando atrás somente das doenças cardiovasculares (BISHEHSARI et al., 2014). Neste contexto, a nível mundial, o câncer colorretal (CCR) configura-se como o terceiro mais frequente entre os homens e o segundo entre as mulheres e constitui a quarta principal causa de morte por câncer em homens e a terceira em mulheres (GLOBOCAN, 2015), representando aproximadamente 10% das causas de morte por câncer CCR (HAGGAR; BOUSHEY, 2009; TARRAGA; ALBERO; MONTES, 2014). O Brasil apresenta taxas de mortalidade e frequência semelhante a mundial, com ocorrência estimada de 15.070 novos casos em homens e 17.530 em mulheres, em 2014 (Tabela 1). (GLOBOCAN, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Tabela 1. Taxas brutas de incidência de câncer, segundo localização primária estimadas para 2014 no Brasil por sexo, exceto pele não melanoma.

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

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: Ministério da Saúde, 2014.

Esta neoplasia apresenta bom prognóstico com índice de cura de 90%, se diagnosticada precocemente, sem acometimento de linfonodos e órgãos à distância. No

Brasil, a sobrevida em 5 anos é de 55%. Já em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, a sobrevida é 64,9%, e em países da Europa Ocidental e Austrália estas taxas tendem a aumentar (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; DESANTIS et al. 2014). Enquanto estes países estão apresentando um declínio nas suas altas taxas de incidência de CCR, graças a investimentos na detecção precoce e remoção de lesões pré-malignas, países em desenvolvimento têm apresentado um aumento nestas taxas, como observado em países da América do Sul, Ásia e África (JEMAL et al., 2011).

O tratamento do CCR varia de acordo com o local e estadiamento ao diagnóstico. Em estágios iniciais I e II o tratamento de escolha é a ressecção radical com linfadenectomia sem adição de outro tratamento. Em estádios mais avançados III e alguns no estágio II do câncer de cólon, a cirurgia é seguida por quimioterapia, para reduzir o risco de recorrência. Em contraste, no câncer de reto é realizado um tratamento prévio com quimioterapia combinado a radioterapia seguido da ressecção cirúrgica nos estádios II e III. A quimioterapia é o principal tratamento em pacientes com CCR avançado e o crescimento na validação de drogas alvo-específicas, como os anticorpos monoclonais, tem contribuído para o tratamento do CCR metastático (DESANTIS et al., 2014). Diversos protocolos de tratamento para CCR utilizam como agentes antineoplásicos os seguintes quimioterápicos: 5-Fluouracila, oxaliplatina, irinotecano e cisplatina combinada a radioterapia. Além destas drogas, algumas moléculas alvo-específicas, classificadas como anticorpos monoclonais, têm sido utilizadas no tratamento de CCR metastático, tais como, bevacizumabe, anti-VEGF, cetuximabe e panitumumabe, ambos anti-EGFR (EDWARDS et al., 2012).

O CCR é uma doença heterogênea de origem em múltiplas alterações genéticas e epigenéticas, que convergem para alterações na regulação de genes envolvidos com crescimento e diferenciação celular (MUNDADE et al., 2014). Diversos fatores de risco estão associados com a maior incidência do CCR, alguns dos quais o indivíduo não pode controlar, como a idade e fatores hereditários, e outros modificáveis que estão associados ao estilo de vida.

A idade tem maior impacto sobre o desenvolvimento do CCR a partir dos 40 anos, atingindo uma maior incidência entre 60 e 70 anos, quando passa a apresentar um risco 50 vezes maior de desenvolvimento desta doença (HAGGAR; BOUSHEY, 2009). As síndromes hereditárias, outro fator de risco não modificável, estão associadas com 5-10% dos CCR, normalmente acometendo indivíduos mais jovens. Essas síndromes podem ser de origem poliposa, como a polipose adenomatosa familiar (FAP, do inglês

Familial Adenomatous Poliposis), que representa cerca de 1% dos cânceres hereditários; ou de origem não poliposa, como a síndrome de Linch ou câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC, do inglês *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*), que representa cerca de 2-6% dos CCR (HAGGAR; BOUSHEY, 2009; TARRAGA; ALBERO; MONTES, 2014). Entre outras síndromes hereditárias mais raras, podemos citar as síndromes de Gardner e de Turcot (ESPLIN, 2014).

Doenças inflamatórias do intestino, como a colite ulcerativa e doença de Crohn, também são consideradas fatores de risco, tendo em vista que aumentam em 4 a 20 vezes a chance de desenvolver CCR. Histórico familiar de CCR também é apontado como um fator de risco, sendo observado em aproximadamente 20% das pessoas que desenvolvem esta doença (SILLA, 2014). Embora as razões ainda não sejam claras, a etiologia dos 20-30% dos CCRs hereditários parece ter relação com a herança de genes de baixa penetrância, porém mais comuns do que aqueles das síndromes bem caracterizadas. Polimorfismos em genes que regulam o metabolismo ou em genes que são regulados por fatores ambientais ou genéticos podem ser citados como estes genes de baixa penetrância, assim como alterações em múltiplos locis que apresentam efeito aditivos no acúmulo de mutações. Estas mutações genéticas de baixa penetrância, a mesma exposição repetitiva a fatores de risco e ou a combinação de ambos podem explicar esta condição ainda não totalmente compreendida (JASPERSON et al., 2010).

Apesar disso, a maior parte dos CCRs não apresentam relação com nenhum dos fatores acima mencionados, sendo enormemente influenciados por fatores ambientais relacionados ao estilo de vida e hábitos alimentares, são denominados esporádicos e correspondem a 70-85% dos CCRs. Sabe-se que uma dieta rica em colesterol, carne vermelha e baixo consumo de vegetais, cálcio, ácido fólico e vitamina B6, ou alto consumo de bebidas alcoólicas, tabagismo, sedentarismo, sobrepeso e obesidade são os fatores de risco que mais têm contribuído para o aumento da incidência deste tipo de câncer (HAGGAR; BOUSHEY, 2009; TARRAGA; ALBERO; MONTES, 2014).

Dessa forma, pode-se notar que o CCR é uma doença que apresenta uma ampla gama de fatores de risco que podem induzir alterações genéticas e epigenéticas, resultando na modificação do padrão de expressão ou regulação de moléculas envolvidas com a modulação de processos fisiológicos. O papel dessas alterações será discutido a seguir.

1.1.2 - Alterações moleculares

As principais vias envolvidas no acúmulo de mutações e instabilidades genômicas que resultam no CCR são 3: 1) Instabilidade cromossômica (CIN do inglês, *Chromosomal Instability*), que ocorre em 80-85% dos CCRs, apresentando alterações no número e estrutura dos cromossomos, acompanhada frequentemente pela perda de heteroziguidade. Esta via está relacionada com a progressão clássica adenoma-carcinoma. Apresentando perda de genes supressores tumorais, tais como *APC* e *p53*, e ativação de proto-oncogenes, como *KRAS*, *c-Src* e *c-Myc*; 2) Instabilidade de microssatélites (MSI do inglês, *Microsatellite Instability*) ou fenótipo hipermutador, que ocorre em 10-15% dos casos, é caracterizada pelo acúmulo de mutações em regiões ricas em repetições de nucleotídeos, chamadas regiões de microssatélites. Nesta condição, o complexo MMR (do inglês, *Mismatch Repair*) é incapaz de corrigir estes erros frequentes durante a replicação de DNA, impossibilitando a replicação fidedigna da fita. Dentre os genes importantes para a formação deste complexo que podem estar silenciados ou mutados são: *MLH1*, *MSH1*, *MSH6* e *PMS2*. Semelhante ao CIN, um dos primeiros eventos na progressão do CCR em MSI é a perda de função do produto do gene *APC*; e 3) Hipermetilação das ilhas CpG (CIMP do inglês, *CpG Island Methylator Phenotype*), também denominado fenótipo serrátil, ocorre em aproximadamente 40% dos casos. Além de sua apresentação clínica diferir das vias anteriores, também é marcado pela presença de mutação em *BRAF* e silenciamento de genes envolvidos na diferenciação celular, reparo de DNA e controle do ciclo celular, mas não mutação em *APC*. Acreditava-se que estas vias eram excludentes entre elas, porém tem-se identificado que podem ocorrer simultaneamente (ARVELO, 2015; SILLA, 2014). A figura 1 mostra a sequência de evolução do tumor para cada uma das vias citadas.

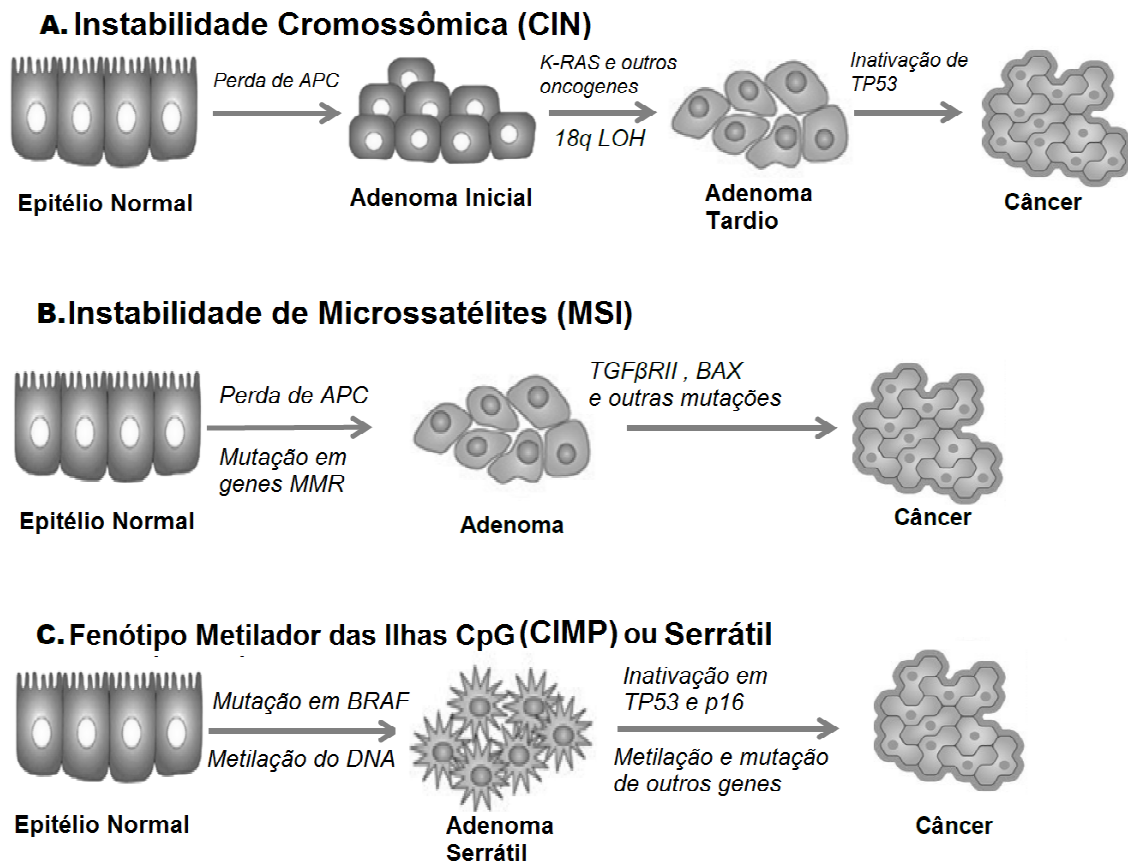


Figura 1. Vias de instabilidade genômicas envolvidas na progressão do CCR. A) Progressão adenoma-carcinoma clássica encontrada em tumores com instabilidade cromossômica; B) Progressão adenoma-carcinoma apresentando alterações iniciais decorrentes de instabilidade de microssatélites; C) Progressão adenoma-carcinoma característica de alterações iniciadas por um fenótipo de hipermetilação das ilhas CpG. Adaptado MUNDADE et al, 2014.

Em decorrência destas instabilidades genômicas, diversas vias de sinalização serão progressivamente alteradas. Na evolução clássica da progressão do CCR, denominada progressão adenoma-carcinoma, ocorre a mutação ou silenciamento no gene *APC*, um supressor tumoral envolvido na regulação da proliferação celular, o que leva a um acúmulo no citoplasma da β -catenina, que logo é translocada para o núcleo, aumentando a ativação da via Wnt/ β -catenina. No núcleo, a β -catenina atua como um cofator transcricional, ativando genes envolvidos com a proliferação celular, além disso a perda de seu papel na adesão célula-célula contribui para processos invasivos e metastáticos (MORIN, 1999; MUNDADE et al., 2014). Neste modelo da sequência adenoma-carcinoma, ocorrerá também um acúmulo de mutações em proto-oncogenes, tais como *KRAS*, *c-Src* e *c-Myc*. Como consequência disso, diversas vias de sinalização apresentam-se ativadas e conferem maior potencial migratório e de sobrevivência, assim

como perda da diferenciação celular a partir da ativação de um programa morfogénico conhecido como transição epitélio-mesênquimal (EMT, do inglês, *Epithelial-Mesenchymal Transition*) (MUNDADE et al., 2014). Durante esse processo, as células epiteliais passam a apresentar gradualmente um fenótipo mesênquimal, sendo observado uma diminuição da expressão proteica de marcadores epiteliais, como E-caderina, ZO-1 e claudinas, e aumento da expressão proteica de marcadores mesênquimais, como vimentina, fibronectina e N-caderina (MICALIZZI; FARABAUGH; FORD, 2010). Uma etapa inicial da EMT é a perda do sistema de adesão célula-célula, reflexo da desorganização do complexo juncional apical.

1.2 - Complexo Juncional Apical

As células epiteliais polarizadas apresentam uma região apical e outra basolateral, mantidas através da adesão intercelular bem estabelecida. A estrutura responsável pela manutenção da polaridade celular é denominada Complexo Juncional Apical (CJA), constituído pelas Junções tight (JTs) e Junções aderentes (JAs). A figura 2 ilustra a composição molecular desta estrutura, onde pode-se observar a interconexão deste complexo ao citoesqueleto de actina (JANG, 2014; MIYOSHI; TAKAI, 2008). A perda da adesão célula-célula tem sido amplamente assumida como um ponto chave na progressão do câncer epitelial, mais particularmente o CCR (MCCAFFREY; MACARA, 2011).

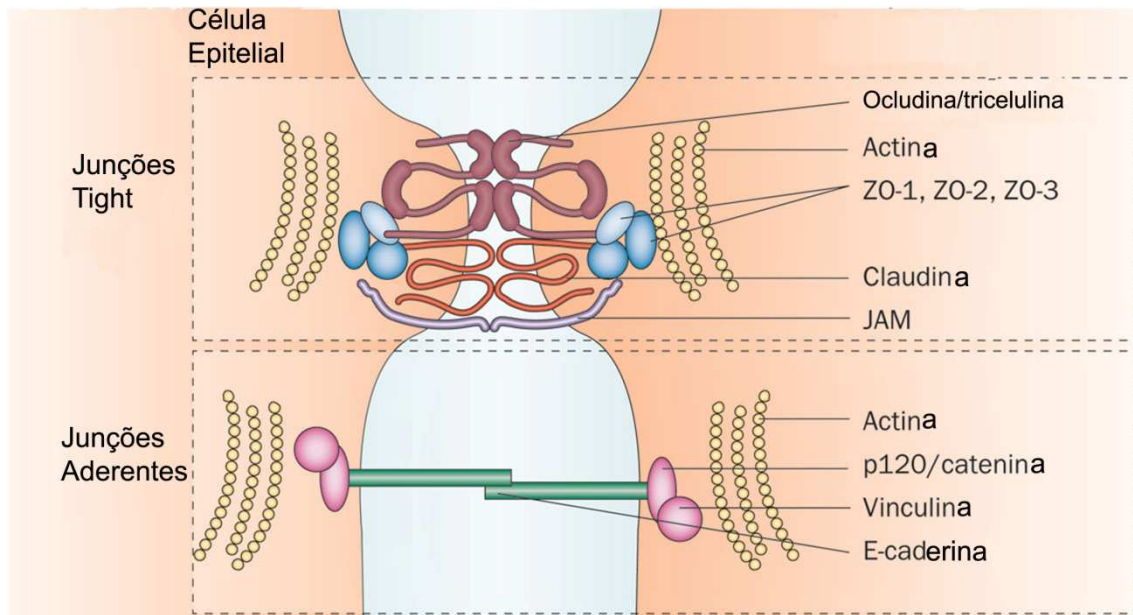


Figura 2. Complexo Juncional Apical. Esquema mostrando o complexo juncional apical, destacando os constituintes moleculares das junções tights e junções aderentes. Adaptado de (NEUNLIST et al., 2012).

1.2.1 - Junções Aderentes

No CJA, as JAs estão localizadas logo abaixo das JTs (Fig. 2) e desempenham uma importante função no estabelecimento da adesão célula-célula, a fim de preservar a arquitetura tecidual (VOGELMANN; NELSON, 2005). A proteína central nesta estrutura é da família das caderinas, que em células epiteliais diferenciadas é classificada como E-caderina. A E-caderina é uma proteína transmembrana com interação homofílica em sua cauda extracelular de maneira cálcio dependente, e em sua cauda citoplasmática interage com o citosqueleto de actina através de proteínas, tais como, p120, α e β -cateninas e vinculina, contribuindo para estabilidade da estrutura celular. As proteínas cateninas são responsáveis pela estabilidade da E-caderina nos contatos intercelulares assim como intermediam a sua interação com a F-actina, contribuindo para regulação deste tipo de citoesqueleto (PERTZ et al., 1999; TAKEICHI, 2014).

Estudos têm demonstrado que a estabilização da E-caderina nas JAs é mantida por sua ligação a p120 catenina, a qual se liga no domínio justamembranar da E-caderina. A perda da interação entre essas duas proteínas leva a internalização da E-

caderina, por via endocítica, a qual poderá ser conduzida a uma via de reciclagem ou degradação proteolítica (NELSON, 2008; TAKEICHI, 2014).

A adesão célula-célula é bastante dinâmica durante processos morfogênicos, possibilitando uma maior reorganização do tecido e motilidade celular. Na fase adulta do indivíduo também é possível observar a regulação dinâmica dessas junções durante processos fisiológicos, como na cicatrização de feridas; e em processos patológicos, como o câncer. No câncer a perda desta adesão célula-célula pode estar relacionada ao desenvolvimento da EMT, apontando a importância para o estudo das vias envolvidas na regulação deste evento.

A integridade estrutural do complexo caderina-catenina é regulada por quinases que se encontram desreguladas no contexto tumoral. Quando a E-caderina é fosforilada nos resíduos de serina (S684, S686, S692) na região citoplasmática pelas quinases GSK3 β e CKII, a afinidade pela proteína β -catenina é aumentada. Por outro lado, quando a β -catenina é fosforilada em domínios tirosinas (T489, T654) por Src ou EGFR (do inglês, *Epidermal Growth Factor Receptor*) no resíduo T654 e pela proteína tirosina quinase Abl (do inglês, *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*) no resíduo T489, sua afinidade pela E-caderina é diminuída, causando uma ruptura na interação desta proteína com o citoesqueleto de actina e redistribuição celular (NELSON, 2008).

No CCR, em etapas iniciais aproximadamente 70% dos tumores são marcados pela perda de APC com ativação exacerbada da via de sinalização Wnt/ β -catenina e em sua progressão é observado menor expressão da E-caderina, assim como também sua localização celular. Da mesma forma alguns estudos recentes têm relatado um aumento da β -catenina no compartimento nuclear e citoplasmático (CHEN et al., 2013; HUELS et al., 2015).

Na progressão do câncer, tem sido relatada a repressão transcricional da E-caderina por fatores de transcrição, como o SNAIL e os membros da família TWIST, os quais têm sido identificados como importantes reguladores da EMT (NELSON, 2008). Além disso, membros das JAs também são capazes de regular vias de sinalização importantes para proliferação e diferenciação celular, como a via das MAPK e NF- κ B (Fig. 3) (STEPNIAK; RADICE; VASIOUKHIN, 2009).

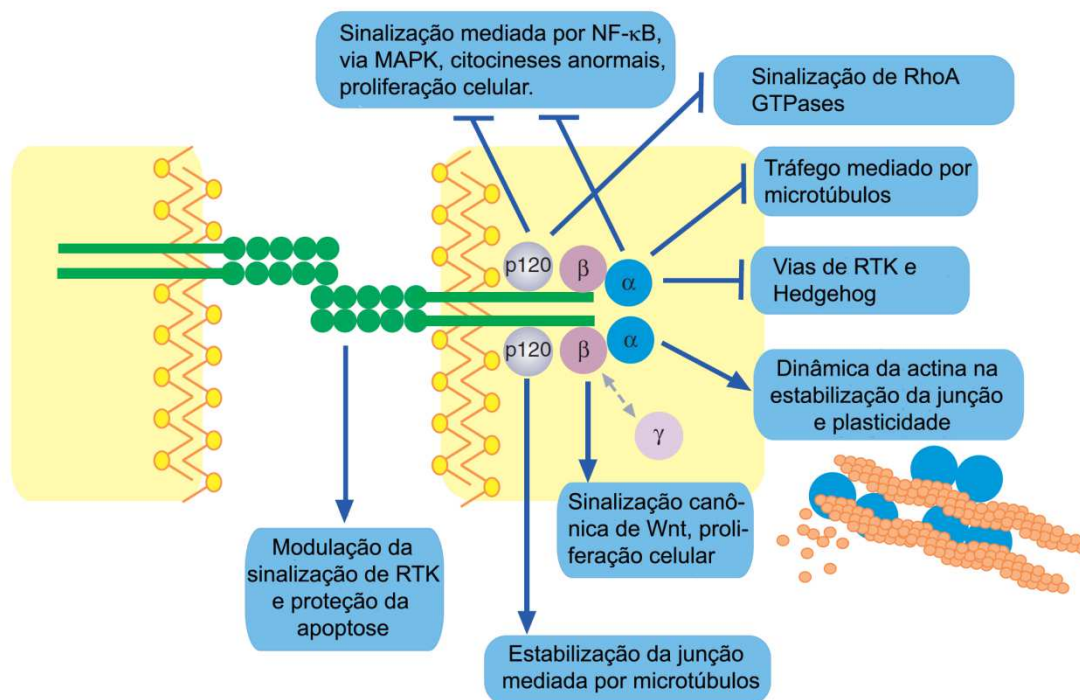


Figura 3. Vias de sinalização reguladas por membros das junções aderentes. A figura mostra as principais proteínas envolvidas na constituição das junções aderentes regulando negativa e positivamente vias de sinalização importantes para regulação da homeostase celular. Estas vias de sinalização regulam a sobrevivência, proliferação e motilidade celular e estabilização dos microtúbulos. Adaptado de (STEPNIAK; RADICE; VASIOUKHIN, 2009)

1.3 - Via de sinalização NF- κ B

A via de sinalização do fator nuclear κ B (NF- κ B, do inglês, *Nuclear Factor Kappa B*) está associada a iniciação, promoção e progressão do câncer, seja por exposição a um microambiente constantemente inflamado, que leva a uma exigência maior de renovação tecidual com aumento da proliferação celular, ou seja por fatores liberados pelas células tumorais que propiciam uma atividade constante desta via, como forma de perpetuar o tumor (XIAO; FU, 2010).

O NF- κ B é composto por uma família de subunidades de fatores de transcrição que regulam a expressão de diversos genes envolvidos na resposta inflamatória e imune, crescimento e desenvolvimento celular. Os membros desta família são RelA (p65), c-Rel, RelB, p50 (precursor p105) e p52 (precursor p100), os quais podem formar homo ou heterodímeros. A diversidade de membros demonstra uma estratégia para a regulação seletiva através da expressão diferencial específica entre eles. Os membros RelA, c-Rel e RelB possuem uma região C-terminal de transativação (TAD, do inglês *Transactivation Domain*), que permite ativar a expressão de genes alvos. Já os membros p50 e p52 possuem uma região de repetição contendo o domínio *ankyrin* (ARD, do inglês *Ankyrin Repetition-Domain*) ao invés do TAD, e quando estão associados na forma homodimérica não são capazes de ativar a expressão de genes alvos (NAPETSCHNIG; WU, 2013; SEN; SMALE, 2010). Em mamíferos, o complexo mais encontrado é o heterodímero p65/p50 (PAHL, 1999).

O NF- κ B encontra-se inibido no citoplasma de células não estimuladas, ligado ao inibidor natural desta via, os I- κ Bs (do inglês *Inhibitor κ B*). Existem sete membros na família I- κ B: o I- κ B α , I- κ B β , BCL-3, I- κ B γ , I- κ B ϵ e as precursoras p100 e p105, sendo estas duas últimas proteínas caracterizadas pela presença de cinco ou sete repetições *ankyrin* com conformação cilíndrica que se liga ao domínio de dimerização. Todos os I- κ Bs reconhecem o NF- κ B por sua região ARD e quando acoplados a subunidade p65 do heterodímero NF- κ B, por exemplo, sofrem uma mudança conformacional e adotam uma forma fechada, causando inibição alostérica (HAYDEN; GHOSH, 2004; NAPETSCHNIG; WU, 2013). A ativação da via NF- κ B pode ocorrer por uma variedade de estímulos associados a estresse e injúria celular, através de indutores tais como as citocinas TNF- α (do inglês, *Tumor Necrosis Factor α*) e IL-1 β (do inglês, *Interleukin 1 β*); produtos bacterianos e virais, tais como LPS (lipossacarídeos), efingomielinase, dupla fita de RNA e proteína Tax do vírus HTLV-1

(do inglês, *Human T-cell Leukimia Virus 1*); estímulos pró-apoptóticos e necróticos, tais como ROS (do inglês, *Reactive Oxygen Species*); radiações ultravioleta e gama (SUN; ANDERSSON, 2002).

Sob estímulo, ocorre a ativação dos receptores de membrana, tais como receptores de TNF- α ou IL-1 β , desencadeando o recrutamento de TRAFs (do inglês, *TNF- α receptor-associated Factor*), que levam a ativação das IKKs (do inglês, *I κ B Kinase*). Na via clássica, a IKK γ ou NEMO (do inglês *NF- κ B Essential Modifier*) está acoplado ao complexo IKK α e IKK β , exercendo uma função regulatória sobre ele. A atividade poliubiquitinadora de RIP (do inglês, *Receptor-Interacting Protein*), ativa a TAK, (do inglês, *Transforming Growth Factor β Activated Kinase 1*), que fosforila IKK β , o qual fica ativo para fosforilar o I κ B α/β . A partir da fosforilação das I κ Bs, elas serão reconhecidas e ubiquitinadas por uma E3 ubiquitina ligase, induzindo uma posterior degradação via proteassoma 26S, liberando o NF- κ B para translocar para o núcleo (Fig. 4) (ADHIKARI; XU; CHEN, 2007; OECKINGHAUS; HAYDEN; GHOSH, 2011).

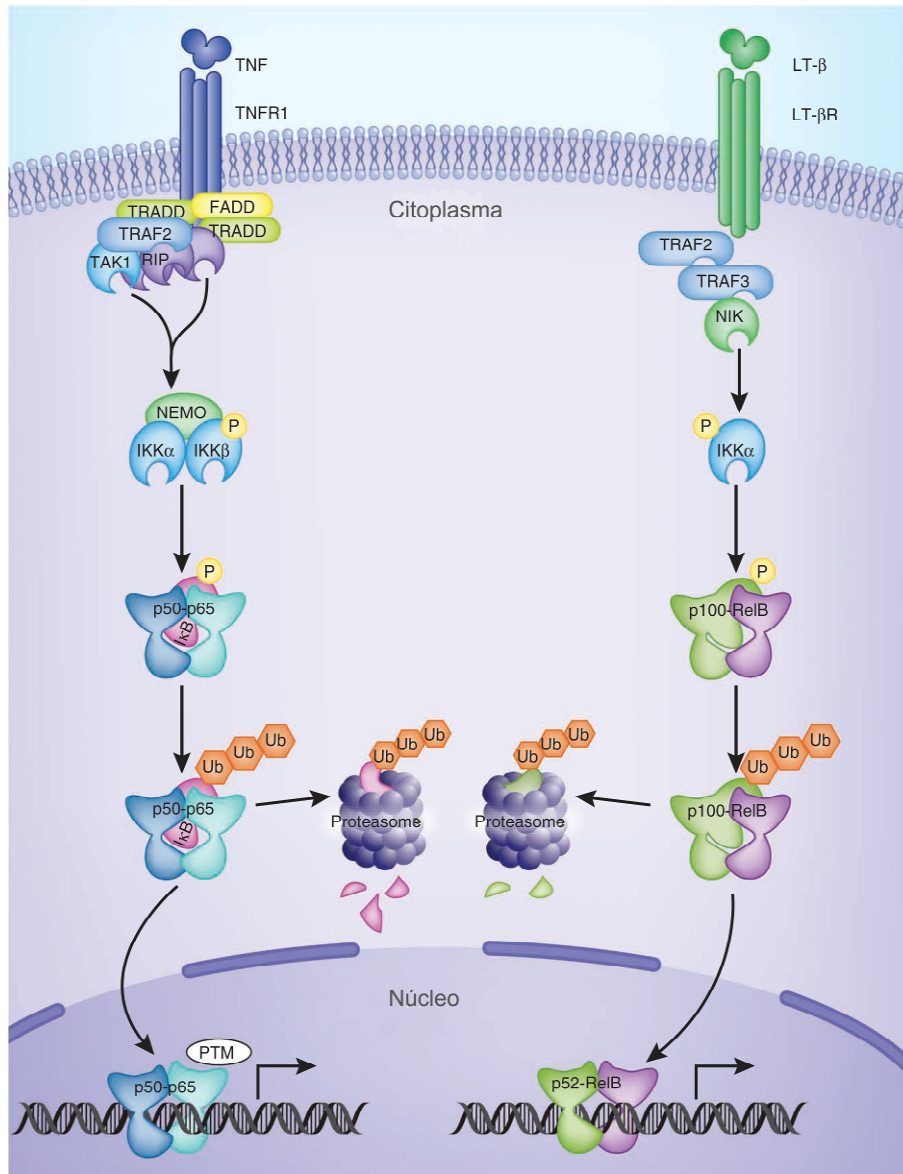


Figura 4. Via de sinalização NF-κB. O esquema mostra a via canônica (à esquerda), demonstrando a ativação do receptor de TNF-α, e é caracterizada pela presença do complexo NEMO/IKKα/IKKβ; e a via não canônica (à direita) caracterizada pela presença da proteína NIK (do inglês NF-κB inducing kinase) IKKα e RelB (Adaptado OECKINGHAUS, HAYDEN e GHOSH 2011).

No núcleo, o NF-κB reconhecerá as regiões promotoras de genes alvos, ativando a transcrição destes genes. Ao todo, são mais de 150 genes que podem ser regulados por este fator transcricional, e em resumo estão envolvidos na expressão de citocinas, imunorreceptores, moléculas de adesão celular, genes de resposta ao estresse, reguladores de apoptose, fatores de crescimento e seus moduladores, fatores de transcrição como c-myc, p53, enzimas tais como colagenase I e gelatinase, e outros como, ciclinas D1 e D3, laminina B2 e vimentina (PAHL, 1999).

Diversos receptores estão envolvidos com a ativação desta via, dentre eles podemos citar: o TNFR, IL-1R (do inglês, *Receptor Interleukin-1*), TLR (do inglês, *Receptor Toll-like*), CD-40 (do inglês, *Cluster of Differentiation 40*) e BAFF-R (do inglês, *B-cell Activating Factor Receptor*). Um ativador clássico da via NF- κ B é o TNF- α . Esta citocina apresenta-se como uma proteína integral de membrana ou como uma citocina solúvel liberada após uma clivagem proteolítica. Os receptores do TNF- α são classificados como TNFR1 encontrado na maioria das células do corpo e é ativado pelo ligante solúvel, e como TNFR2 o qual é expresso primariamente nas células hematopoiéticas e é ativado principalmente pelo ligante integrado a membrana. A ativação da via por TNFR1 pode ter dois diferentes resultados finais que dependerão do contexto celular. A ativação de NF- κ B, em um contexto normal, promove a transcrição de importantes reguladores negativos da apoptose frente, por exemplo, a altos níveis de ROS, neste caso se a resposta celular não for satisfatória ocorrerá o desencadeamento de vias pró-apoptóticas mais tardias. Neste contexto o TNF- α é uma molécula importante na comunicação durante a resposta de defesa celular, inflamação e organogênese. Porém, diversas condições patológicas, incluindo o câncer, são caracterizadas por um desbalanço entre a sobrevivência e apoptose celular. Este evento, em alguns casos, tem sido associado a aumento plasmático desta citocina. (BALKWILL, 2006).

Os primeiros relatos relacionados a importância desta via no câncer foi em leucemias, a descrição do próprio NF- κ B foi em células B leucêmicas (SEN; BALTIMORE, 1986). Entretanto, atualmente, diversos artigos vêm relacionando a atividade desta via em diversos tipos de cânceres epiteliais, tais como, próstata, pele, fígado, mama e intestino (BISWAS et al., 2004; JIN et al., 2013; LUEDDE; SCHWABE, 2011; SAKAMOTO; MAEDA, 2010).

1.3.1 - Via NF- κ B e Câncer Colorretal

No CCR, assim como nos demais tumores epiteliais, a via NF- κ B tem apresentado um importante papel na iniciação, promoção e progressão do câncer. Neste tipo de câncer, a fase da iniciação da tumorigênese parece depender mais desta via nos cânceres associados a inflamação crônica, enquanto que os tumores esporádicos se beneficiam da atividade desta via em períodos mais tardios do desenvolvimento tumoral (BEN-NERIAH; KARIN, 2011; HORST et al., 2009).

A ativação sustentada da via NF- κ B, antes do estabelecimento do tumor, produz ROS/RNS (do inglês, *Reactive Nitrogen Species*), o que leva a uma extensiva lesão no DNA causando a perda de genes supressores tumorais como o *APC*, e desta forma atua sinergicamente com resposta pró-proliferativa e antiapoptótica (MEIRA et al., 2008; SHAKED et al., 2012). Embora a inflamação crônica também tenha um papel importante na promoção e progressão do tumor, estudos cada vez mais tentam compreender esta relação (PEDDAREDDIGARI; WANG; DUBOIS, 2010).

Nos cânceres esporádicos, o aumento da ativação desta via foi identificada em regiões do *front* invasivo de tecidos tumorais, onde foi observado uma assinatura de transcrição gênica bastante diversa da encontrada no centro do tumor e em regiões adjacentes normais. Isso indica que os genes alvos do NF- κ B têm relação com o tipo e o grau de diferenciação celular, ressaltando sua função como um "maestro" que orquestra o microambiente tumoral para modular os diferentes tipos celulares que o compõem (HORST et al., 2009).

Estudos clínicos têm demonstrado que o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (NSAID, do inglês *Non Steroidal Antiinflammatory Drugs*) reduzem o risco de CCR em 40-50%. Além de sua ação inibindo a produção de prostaglandinas, atualmente sabe-se da atuação de alguns NSAID, como a aspirina, inibindo o NF- κ B (PEDDAREDDIGARI; WANG; DUBOIS, 2010; SEUFERT et al., 2013). Neste sentido, diversos compostos naturais com conhecida ação inibitória da via NF- κ B vêm sendo estudados em modelos *in vivo* e *in vitro*. Entretanto, frente a possíveis efeitos controversos na inibição desta via tão importante para o funcionamento normal da célula, estudos vêm sendo realizados a fim desvendar mecanismos regulados por estes inibidores e assim contribuir para o desenvolvimento de uma terapia alvo-específica com redução de citotoxicidade em células normais (HOESEL; SCHMID, 2013). Dentre os produtos naturais que têm como alvo o NF- κ B, encontra-se o partenolídeo.

1.4 - Partenólídeo

O partenólídeo (PTL) é uma lactona sesquiterpênica (LS), extraída das folhas do *Chrysanthemum parthenium*, que tem sido usado por séculos devido a suas propriedades antiinflamatórias. A LS é um composto lipofílico de difusão passiva através da membrana citoplasmática celular, constituído por 15 carbonos, possui três isoprenos (5-C) um dos quais é o grupo lactona (éster cíclico), neste composto a região relacionada com sua atividade biológica é α -metileno- γ -lactona (Figura 5) (GHANTOUS et al., 2013). A principal atividade biológica deste composto pode ser atribuída a forte inibição do NF- κ B, descrita inicialmente em 1997 (BORK et al., 1997).

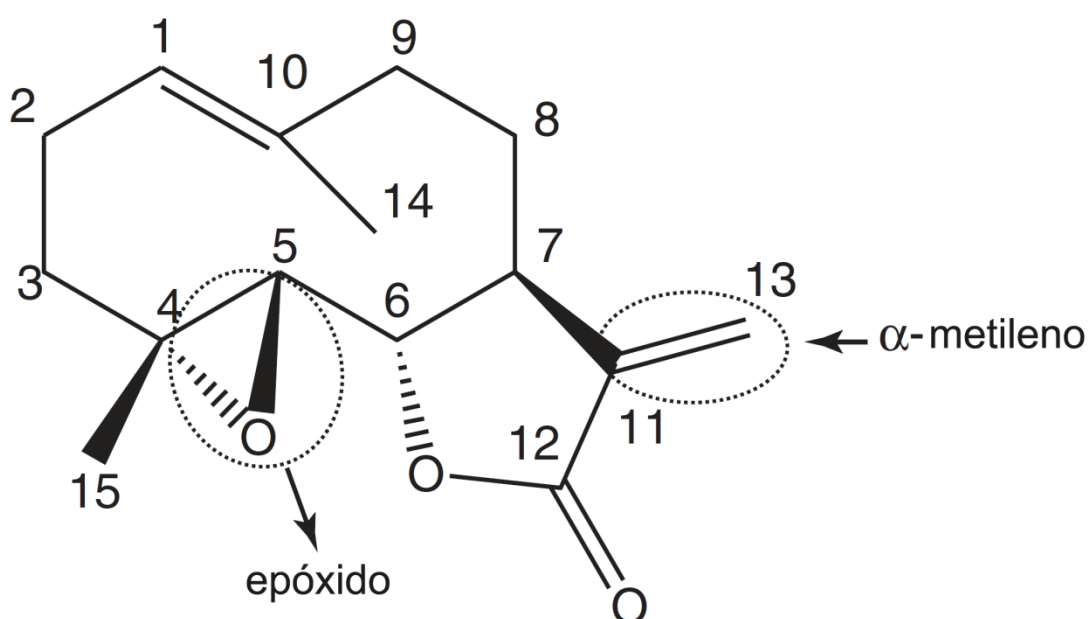


Figura 5. Estrutura química do partenólídeo. Em destaque a região epóxido (éter cíclico) e a região biologicamente ativa, α -metileno. Adaptado GHANTOUS, 2013.

A região α -metileno- γ -lactona interage especialmente com grupos sulfidril, os quais são comumente encontrados em proteínas, o que causa grande citotoxicidade. Entretanto, novos estudos mostraram que a estrutura de algumas LS, incluindo mudanças estereoquímicas e conformacionais, provavelmente restringem ataques não específicos a grupos tiol. A figura 6 mostra as diversas vias de sinalização conhecidamente atingidas por este composto, evidenciando suas atividades biológicas anticâncer (GHANTOUS et al., 2010, 2013; MATHEMA et al., 2012).

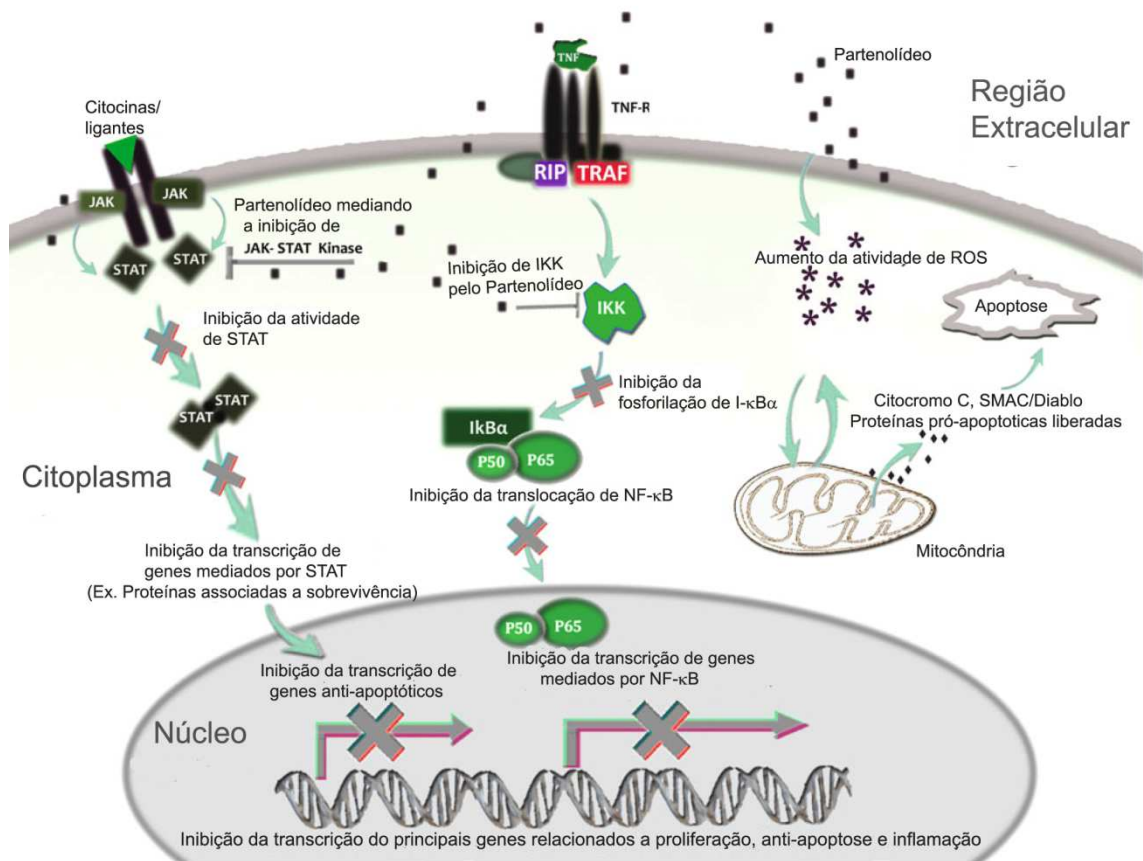


Figura 6. Modelo da atividade anticâncer do partenóldeo. Esquema demonstrando atividade biológica do partenóldeo. A figura mostra a inibição da via JAK/STAT; da via NF-κB nos três principais alvos já descritos IKK, I-κB e p65; e no balanço de ROS intracelular. Adaptado Mathema, 2012.

A via NF-κB é inibida principalmente por uma ligação direta com suas subunidades, o grupo exometileno se liga a subunidade p65 por alquilação na cisteína 38, a qual é crucial para formar pontes de hidrogênio com fosfato da fita de DNA, porém nem todas as cisteínas são alvos do PTL. Já foi visto que a cisteína 120 protege contra o efeito inibitório do PTL (GARCÍA-PIÑERES et al., 2001). Outro alvo nesta via é o complexo IKK, onde há uma inibição direta do IKKβ, em altas concentrações do PTL foi observada também inibição em IκB (GHANTOUS et al., 2013).

Além de inibir classicamente a via NF-κB, o PTL afeta a função antioxidante do sistema tioredoxina, responsável por manter balanceado o nível de ROS, sendo principalmente afetadas as enzimas glutamato-cisteína ligase e glutatona peroxidase, aumentando os níveis intracelular de ROS (D'ANNEO et al., 2013). Também bloqueia a polimerização da tubulina, por inibir a tubulina carboxipeptidase, atrapalhando e impedindo a divisão celular. Epigeneticamente, inibe a DNA metiltransferase I (DNMT, do inglês, *DNA Methyltransferases I*) e depleta a histona deacetilase I (HDAC

I, do inglês, *Histone Deacetylase I*) normalmente mais ativas em células tumorais (BRUECKNER; LYKO, 2004; DAI et al., 2010). O PTL também foi capaz de mediar efeitos nos receptores de morte através da redução de fosforilação e atividade da proteína STAT, o qual pode ser atribuído ao seu efeito inibitório em JAK, desta forma inibe a transcrição de genes relacionados a sobrevivência (CARLISI et al., 2011).

Recentemente, estudos têm destacado o papel do PTL como uma molécula anticâncer com atividade mais efetiva em células tumorais, provavelmente por estas terem a maquinaria alvo mais ativa quando comparado a células normais (MATHEMA et al., 2012). Em melanoma, a ação do PTL foi satisfatória sobre células-tronco do câncer, apresentando grande influencia em sua capacidade de auto-renovação, reduzindo significativamente o número destas células (CZYZ; KOPROWSKA; SZTILLER-SIKORSKA, 2013). Em glioblastoma, foi capaz de reduzir a proliferação, invasão e angiogênese inibindo a via Akt/NF-κB (NAKABAYASHI; SHIMIZU, 2012). Em modelos *in vivo* e *in vitro* de tumor renal, o partenólídeo foi capaz de reduzir o crescimento tumoral através da inibição de NF-κB, neste estudo foi observado redução na expressão de IL-8 (interleucina-8), VEGF (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*), MMP-9 (metaloprotease-9), Bcl-xL e Cox-2 no tumor induzido no modelo xenográfico (OKA et al., 2007).

O PTL apresenta-se também como um potencializador de terapias anticâncer, tais como quimioterapia e radioterapia. Em células de carcinoma de pulmão, A549, ele foi capaz de reverter a resistência a doxorrubicina, por atenuar a atividade da via de sinalização NF-κB e diminuir a expressão de HSP70 (XIN et al., 2013). Além disso, aumentou a radiosensibilidade em modelo de câncer de próstata, por suprimir a expressão da enzima antioxidante MnSOD e GpX e ativar a degradação de Bcl-xL (SUN et al., 2007; XU et al., 2013). Em células de osteossarcoma conhecidas por serem radorresistentes, o tratamento combinado do PTL com radioterapia reduziu significativamente a viabilidade celular, devido o aumento de ROS (ZUCH et al., 2012).

Em modelos de CCR a principal ação do PTL descrita é seu efeito pró-apoptótico. Em linhagem de células de carcinoma colorretal, HCT-116, foi relatado que o tratamento com PTL induz a degradação de MDM2, uma ubiquitina ligase reguladora negativa da proteína p53, aumentando assim a atividade de p53 e consequentemente diminuindo a viabilidade celular (GOPAL; CHANCHORN; DYKE, 2009). Além disso, tem sido observado nesta mesma linhagem um aumento da expressão dos receptores de morte, e dos efeitos anti-inflamatórios do Balsalazide, um anti-inflamatório conjugado a

um antimicrobiano, induzindo apoptose (KIM et al., 2015a, 2015b). Não obstante, em modelo xenográfico de CAC, o PTL também induziu a apoptose reduzindo a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2, por inibir a via NF- κ B (KIM et al., 2015c). Desta forma, destacamos a importância em descrever a ação do PTL nos eventos celulares e moleculares envolvidos na progressão do câncer.

2. JUSTIFICATIVA

Como mencionado, o desenvolvimento do CCR sofre grande impacto da atuação de vias associadas a inflamação, contendo inclusive, um grupo exclusivo de tumores associados a ela. Entretanto, sabemos hoje que o microambiente inflamatório é um dos *hallmarks* do câncer, e sua influência perdura desde a iniciação até a progressão tumoral. Sendo assim, vias inflamatórias como a via NF- κ B são alvos importantes para compreensão de eventos associados a progressão do câncer, e neste cenário a utilização de produtos naturais com função anti-inflamatória e antitumorigênica, como o PTL, apresentam-se como uma estratégia na compreensão da resposta celular a sua atividade e seu impacto na reversão destes eventos associados a progressão tumoral.

Além disso, o efeito anticâncer do PTL vem sendo cada vez mais postulado como uma terapia em potencial com efeito sinérgico às terapias vigentes atualmente em câncer. No entanto, mais estudos devem ser realizados a fim de compreender melhor seus mecanismos de ação, a fim de direcioná-lo de forma mais correta como uma nova molécula terapêutica alvo-específica em câncer. Desta forma, além da via NF- κ B, o PTL apresenta-se também como um importante alvo de estudos para melhor compreensão de seu impacto no desenvolvimento e progressão do CCR.

Sendo assim, faz-se necessário investimentos em pesquisas que visam compreender o impacto de vias específicas e suas drogas-alvo, tendo em vista que para a evolução da terapia em câncer é preeminente o desenvolvimento destes tipos de drogas, a fim de corresponder a grande complexidade e especificidade dos tumores.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Investigar o papel do partenólídeo, um inibidor da via de NF- κ B, na reversão das características celulares e moleculares associados com a progressão do câncer colorretal usando linhagens celulares deste tipo de câncer.

3.2 - Objetivos Específicos

- 1) Estabelecer o IC₅₀ do partenólídeo em diferentes linhagens celulares de CCR para avaliar mudanças fenotípicas;
- 2) Avaliar o comportamento fenotípico em relação a eventos relacionados com a progressão do CCR, tais como proliferação e invasão
- 3) Investigar o papel do ativador clássico da via NF κ B, o TNF- α nos eventos relacionados acima e a inibição da via pelo tratamento com partenólídeo.
- 4) Avaliar a localização subcelular de proteínas do complexo juncional, frente ao tratamento com partenólídeo.

4. METODOLOGIA

4.1 - Cultura de células

As linhagens celulares de adenocarcinoma colorretal humano Caco-2 (HTB-37), HT-29 (HTB-38) e HCT-116 (CCL-247) foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, EUA). As células Caco-2 crescem em monocamadas e em confluência são bem diferenciadas, apresentando características de enterócitos. Estas células são heterozigotas para as mutações em *APC*, *p53*, *SMAD4* e *CTNNB* (gene da β -catenina). Nesta última proteína ocorre perda de uma serina alvo de fosforilação e responsável por sua ligação em APC, entretanto sem afetar a formação de complexos com APC, E-caderina ou α -catenina (ILYAS et al., 1997; MAGUDIA; LAHOZ; HALL, 2012). As células HT-29 são moderadamente diferenciadas, crescem em multicamadas e apresentam mutações em *BRAF*, *PIK3CA*, *TP53*, *SMAD4* e *APC* (ROWAN et al., 2000; FLATMARK et al., 2004). Já as células HCT-116 são menos diferenciadas e crescem em multicamadas, apresentam mutação em *CTNNB*, *KRAS* e *TGF β IIIR* (DUNN et al., 2011; KE et al., 2014). As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco'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), à 37 ° C em estufa com 5 % CO₂ e 95% de O₂.

4.2 - Tratamento de ativação e inibição da Via NF- κ B

As células eram plaqueadas e cultivadas em meio fresco sem tratamento por 24h ou até atingirem a confluência de 60%, e então eram submetidas aos tratamentos descritos a seguir.

As linhagens celulares foram submetidas a tratamentos com TNF- α (Life Technology - Califórnia, EUA) na dose de 20ng/mL para análise de ativação da via NF- κ B e dos eventos celulares provocados por esta ativação, conforme relatado por Wang et al. (2013). Os tempos foram alternados de acordo com os tipos celulares. Para a análise de ativação da via NF- κ B, as células Caco-2 foram tratadas com esta citocina por 15 minutos, e as células HT-29 e HCT-116 por 30 minutos. Para a análise dos eventos celulares decorrentes da atividade da via NF- κ B foram testados tempos de 24 h e 48 h.

Os tratamentos com o PTL (Sigma Aldrich - St. Louis, EUA) foi definido a partir do IC₅₀ (do inglês, *Inhibition Coeficient of 50%*) de cada linhagem, calculado pelo programa GraphPad PrimsTM 4.0. As doses de PTL utilizadas nas células Caco-2 foram: 1 µM (IC₁), 10 µM (IC₂₀) e 20 µM (IC₅₀). Para as células HT-29, foram utilizadas as doses de 1 µM (IC₁), 4 µM (IC₂₀) e 10 µM (IC₅₀). As células HCT-116 foram submetidas ao tratamento com PTL nas doses de 1 µM (IC₁), 4 µM (IC₂₀) e 8 µM (IC₅₀). As células foram pré-tratadas com PTL isoladamente por 1h. Posteriormente, as células foram tratadas com PTL sozinho ou em conjunto com o TNF-α por períodos de tempo específicos a cada ensaio funcional.

4.3 - Ensaio de citotoxicidade (MTT)

Com o objetivo de analisar a viabilidade celular e identificar o IC₅₀ de cada linhagem celular ao tratamento com PTL, foi realizado o ensaio de citotoxicidade celular. Células Caco-2, HT-29 (ambas 1 x 10⁴ células), e HCT-16 (3 x 10³ células) foram cultivadas em placas de 96 poços. Após 24h, foram tratadas com Partenolídeo nas doses de 1 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM e 30 µM. Ao término do tratamento (24 h), as células foram incubadas a 37°C, por 2 horas, com 250 µg/mL de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. Em seguida, os cristais de formazan formados foram dissolvidos em 100 µL de DMSO. A viabilidade foi quantificada por espectrofotometria no comprimento de onda de 538 nm usando um leitor de microplacas Spectra Max 190 (Molecular Devices - Califórnia, EUA). O valores gerados pela absorbância foram normalizados em relação ao controle e a curva de citotoxicidade foi analisada pelo programa GraphPadTM Prism 4.0 (GraphPadTM Software, San Diego, CA, EUA), a fim de encontrar o IC₅₀. A partir do IC₅₀ foram calculados o IC₁ e IC₂₀, no site <http://www.graphpad.com/quickcalcs>. Os ensaios foram feitos em quintuplicata e em três experimentos independentes.

4.4 - Extrato de lisados proteicos totais

Após os diferentes tratamentos, as monocamadas celulares foram homogeneizadas em tampão de lise (Triton X-100 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,2%, cloreto de sódio 150 mM, EDTA 2 mM, Hepes 10 mM, pH 7,3), contendo

fluoreto de sódio 20 mM, ortovanadato de sódio 2 mM e um coquetel de inibidores de proteases 1:100 (Sigma-Aldrich) por 30 minutos, à 4° C. Após este período de lise, as amostras foram centrifugadas a 10.600 g por 10 minutos (4° C), sendo o sobrenadante coletado e armazenado em *freezer* a -80°C para análise posterior.

4.5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE) e transferência eletroforética

Para avaliar os níveis de expressão das proteínas de interesse, quantidades iguais de proteínas (30 ou 60 µg) foram aplicadas no gel de corrida. Para estimar a concentração protéica dos lisados totais foi utilizando um kit comercial para dosagem de proteína (Bio- Rad Laboratories Inc., Hercules - Califórnia, EUA). As proteínas foram separadas por SDS-PAGE, usando géis de poliacrilamida na concentração de 10% ou 13%, e transferidas para membranas de nitrocelulose, utilizando-se o aparelho de transferência semi-seco (Bio-Rad Laboratories Inc - Califórnia, EUA.), a 10 V (1h). As membranas foram mantidas em tampão de bloqueio, TBS-T (Tris-HCl, 20 µM, pH7,6, NaCl 137 mM e Tween 20 0,1%) contendo leite desnatado 5%, durante 60 minutos em agitador orbital.

4.6 - Incubação com anticorpos

Em seguida, as membranas de nitrocelulose foram incubadas com os anticorpos primários de interesse, diluídos em TBS-T *overnight*. Foram utilizados os anticorpos produzidos em coelho anti-IκB total, na concentração de 1:1500; anti-IκB fosforilado (serina 32/36), na concentração de 1:1000, anti-α-tubulina, na concentração de 1:2000 (Cell Signalling Technology - Boston, EUA); e o anticorpo produzido em camundongo anti-E-caderina, na concentração de 1:2500 (BD Biosciences - Nova Jersey, EUA), após o período de incubação as membranas foram lavadas com o tampão TBS-T por um tempo de 10 minutos por duas vezes e intercaladas por duas lavagens rápidas. Posteriormente, foram incubadas com os anticorpos secundários (anti-camundongo IgG e anti-coelho IgG, conjugados a peroxidase; diluição de 1:40.000 em TBS-T) por 60 minutos, seguida pelo método de lavagem acima citado. A detecção das proteínas em estudo foi determinada utilizando-se um kit comercial de quimioluminescência (Amersham Biosciences GE healthcare, Buckinghamshire, Reino

Unido) e a análise densitométrica foi efetuada utilizando-se o programa Labworks 4.6 (UVP Inc., Upland - Califórnia, EUA). Os valores densitométricos das proteínas de interesse foram normalizados em relação a proteína constitutiva e normalizados em relação ao controle.

4.6 - Proliferação Celular

A análise da proliferação celular após os diferentes tratamentos, foi realizado através do ensaio de cristal violeta. Células células Caco-2 e HT-29 (8×10^3) e HCT-116 (3×10^3) foram semeadas em placas de 96 poços, e após o período de 24 h iniciou-se os tratamentos com TNF- α 20ng/mL, PTL 1 μ M e 4 μ M sozinho ou em conjunto com TNF- α 20ng/mL. Após 0, 24, 48 e 72 horas de tratamentos, as células foram fixadas em etanol 100% (10 minutos). Posteriormente, foram incubadas com solução contendo cristal violeta (cristal violeta 0,05% em etanol 20%), por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado metanol por 5 minutos, a fim de solubilizar o cristal violeta que foi incorporado nas células. A quantificação colorimétrica foi realizada em leitor de microplacas Spectra Max 190 (Molecular Devices - Califórnia, EUA), a 595 nm. Foram realizados três experimentos independentes.

4.7 - Imunofluorescência

As células HT-29 e HCT-116 foram cultivadas sobre lamínulas de vidro até atingirem a 60% de confluência. Neste momento, foram tratadas com TNF- α (20ng/mL), PTL (1 μ M, 4 μ M, 8 μ M e 10 μ M) sozinho e concomitante com TNF- α (20ng/mL), e após 30 min foram incubadas com anticorpo da p65. e após 48h foram incubadas com anticorpos para E-caderina e Claudina-3. Após este período foram lavadas três vezes com PBS contendo MgCl₂ 1mM e CaCl₂ 0,1 mM (PBS/CM), pH8.0. Logo, foram fixadas em metanol P.A., a -20°C por 20 minutos e submetidas a solução de bloqueio BSA 3% diluído em PBS pH8.0 por 1 hora. As células foram então incubadas por 3 horas com anticorpo primário anti-p65 (1:150 - Sigma Aldrich - St. Louis, EUA) e *overnight* com anti-E-caderina (1:300) e anti-claudina-3 (1:80), diluídos na solução de bloqueio. Após lavagem, foram incubadas com anticorpo secundário anti coelho ou anti camundongo, conjugado a Alexa flúor 488 (Invitrogen - Califórnia, EUA) por 1 hora, a 37°C. Finalmente, as células foram lavadas com PBS e as lamínulas

foram montadas com antifade (Life Technologies - Califórnia, EUA) em lâminas. As imagens foram obtidas em microscópio confocal (Olympus Fv10i-O - Japão).

4.8 - Ensaio de invasão

Células HT-29 (3×10^5) e HCT-116 ($1,5 \times 10^5$) foram cultivadas na superfície superior de insertos de membrana de policarbonato Transwell® (poro de 8 μm ; Costar Maine, EUA) revestido com 30 μL de Matrigel® (BD Biosciences - Nova Jérsei, EUA) diluído 1:10 em DMEM isento de SFB. Na parte superior do inserto, as células foram semeadas com DMEM contendo 10% de SFB, e na parte inferior da membrana foi criado um ambiente quimio-atraente, com DMEM contendo 20% de SFB. Em ambos compartimentos foram acrescentados os tratamentos, com TNF- α 20ng/mL e PTL 1 μM sozinho ou concomitante com TNF- α e incubadas a 37° C em estufa, por 48h as células HT-29 e 24 h as células HCT-116. Após este período as células presentes na superfície superior da membrana foram removidas com uma haste de algodão, e as células que haviam atravessado os poros e se encontravam na parte inferior da membrana, foram fixadas com metanol 100% (por 20 min à -20°C), e marcadas com DAPI por 1 minuto. A quantificação foi realizada utilizando-se microscopia óptica (Axio Observer Z1, Zeiss, Oberkochen, Alemanha). O Controle foi normalizado para 1 e corresponde a média \pm SEM de ensaios em triplicata, em dois experimentos independentes.

4.9 - 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 4.0 (GraphPad™ Software, San Diego, CA, EUA) através do teste-*t* de Student. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$.

5 - RESULTADOS

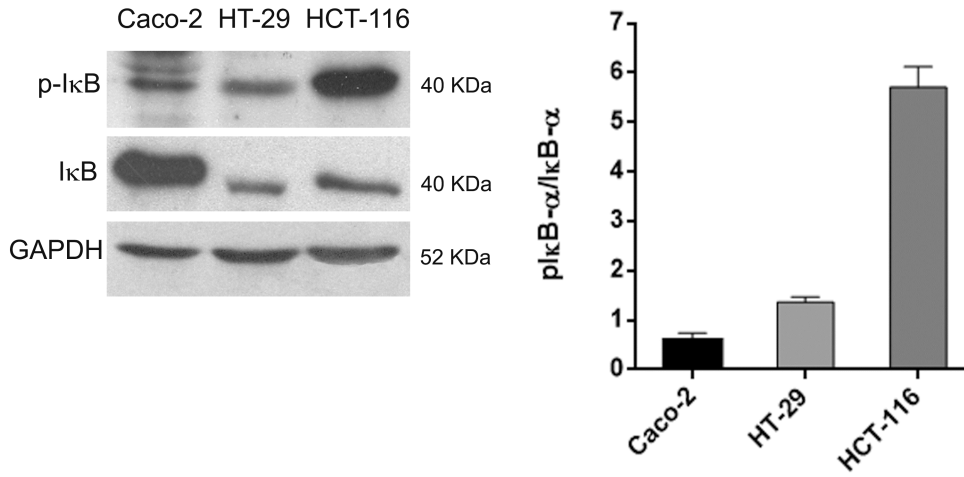
5.1 - A via NF- κ B está diferencialmente ativa em linhagens celulares de câncer colorretal e o partenólídeo reduz a viabilidade celular com resposta diferencial entre as linhagens

A principal atividade biológica do PTL descrita é a inibição da via NF- κ B (GHANTOUS et al., 2013). Para melhor compreender seu papel inibitório em células de CCR, inicialmente investigamos a ativação basal desta via através da análise da fosforilação do I κ B α , nas linhagens celulares: Caco-2, HT-29 e HCT-116. A fosforilação do I κ B α pela IKK é um ponto importante na cascata de sinalização da via NF- κ B. Este evento desencadeia um processo de degradação do I κ B α , pelo reconhecimento desta proteína por ubiquitinas-ligase, levando a uma consequente degradação por proteassoma, possibilitando a liberação do NF- κ B para o núcleo (OECKINGHAUS; HAYDEN; GHOSH, 2011). Foi observado que as células apresentam nível diferenciado tanto na expressão do I κ B α total quanto em seus níveis fosforilados (Fig. 7A). A figura mostra que apesar das células Caco-2 expressarem um nível maior do I κ B α total a sua forma fosforilada é menor quando comparada as células HT-29 e HCT-116 as quais expressam um nível menor do I κ B α total e apresentam níveis de p-I κ B α mais elevado, principalmente nesta última linhagem. Assim podemos atribuir que as células HCT-116 apresentam alta atividade basal da via NF- κ B, seguidas das células HT-29 que apresentam uma atividade basal intermediária e as células Caco-2 apresentam baixa atividade basal desta via de sinalização.

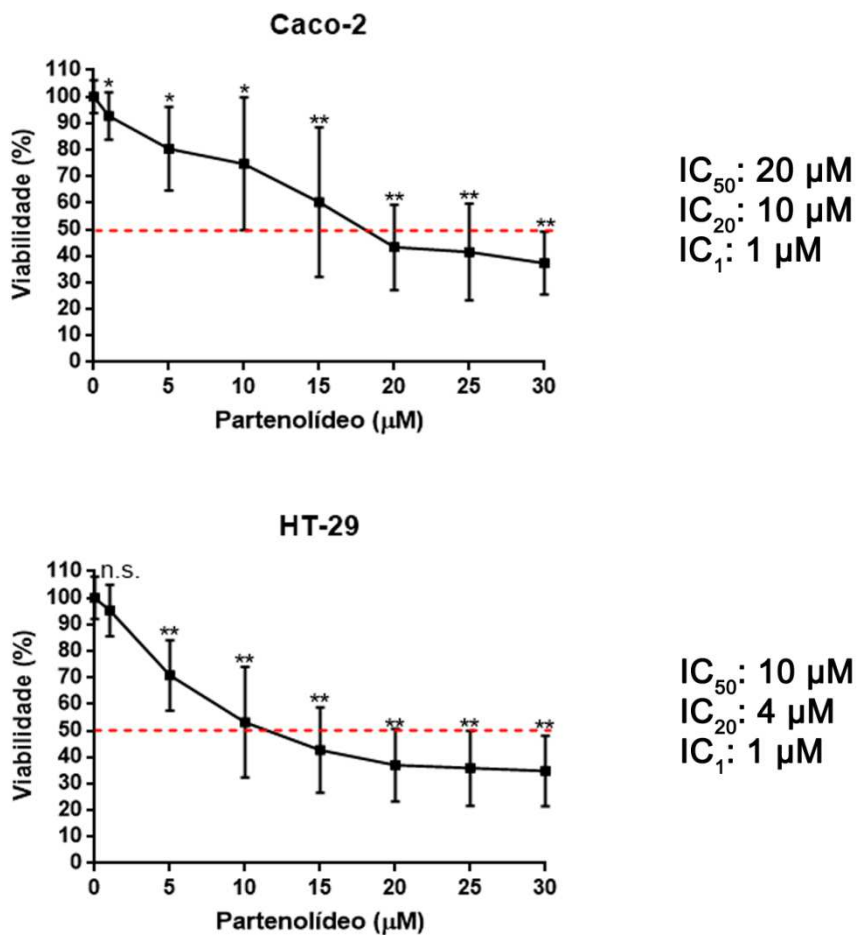
Posteriormente, analisamos o efeito citotóxico do PTL nas diferentes linhagens celulares a fim de determinar a sensibilidade de cada linhagem celular a este agente e assim definir as doses a serem utilizadas nos ensaios posteriores. A sensibilidade celular ao PTL foi determinada a partir do cálculo do IC₅₀ de cada linhagem. Observamos que as células Caco-2 foram mais resistentes ao tratamento com PTL (IC₅₀ = 20 μ M), as células HT-29 apresentaram efeito citotóxico intermediário (IC₅₀ = 10 μ M) e as células HCT-116 apresentaram maior sensibilidade ao tratamento (IC₅₀ = 8 μ M) (Fig. 7B). Em conjunto, esses resultados indicam que o nível de fosforilação do I κ B α pode estar diretamente relacionado ao efeito citotóxico do PTL nas diferentes linhagens celulares.

A partir do cálculo do IC₅₀, foram calculadas a dose sem efeito citotóxico (IC₁) de 1 μ M e a dose de IC₂₀ de todas as linhagens para posteriores análises de eventos

celulares. As células Caco-2 apresentaram IC_{20} de 10 μM e as células HT-29 e HCT-116 de 4 μM , como indicado na figura.



B



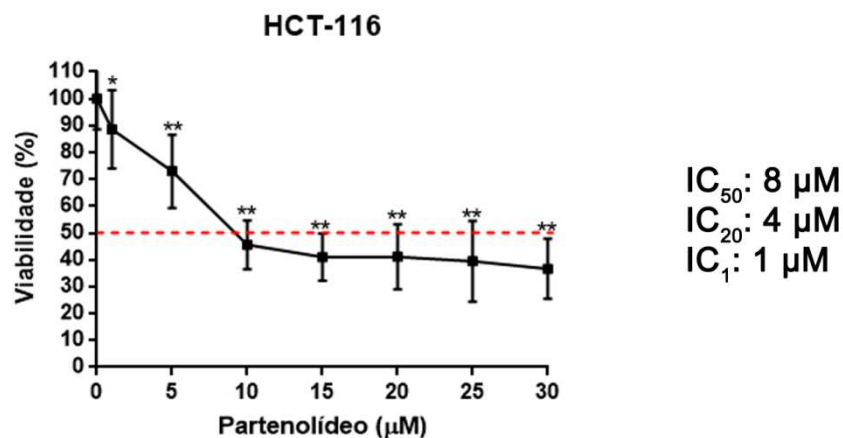


Figura 7. Análise da atividade basal da via NF- κ B e do efeito citotóxico do partenolídeo em células de câncer colorretal. **A:** As células Caco-2, HT-29 e HCT-116 foram cultivadas até a semi-confluência e posteriormente os lisados totais foram obtidos e analisados por imunoblotting para p-I κ B α e I κ B α . A ativação da via NF- κ B foi quantificada através da razão entre p-I κ B α e I κ B α total. Dados referentes a dois experimentos independentes. GAPDH foi usado como controle da quantidade de proteína aplicada por lane. **B:** Cálculo do IC_{50} nas células Caco-2, HT-29 e HCT-116. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, cultivadas por 24 h e após este período foram tratadas com diferentes doses de partenolídeo (0, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM e 30 µM). Os gráficos representam a porcentagem da viabilidade celular após diferentes doses de tratamento com o Partenolídeo por 24 h. O coeficiente de inibição (IC, do inglês Inhibition Coefficient) foi calculado pelo programa GraphPad Prism 4. Dados referentes a três experimentos independentes. Análise estatística utilizada: teste-t de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; n.s, não significativo.

5.2 - TNF- α aumenta os níveis de fosforilação de I κ B α

O TNF- α , um ativador clássico da via NF- κ B, é uma importante citocina pró-inflamatória associada com aspectos importantes da carcinogênese como transformação celular, sobrevivência, proliferação, invasão, angiogênese e metástase (WANG; LIN, 2008). A fim de analisar o efeito inibitório do PTL nesta importante via de sinalização, as células Caco-2, HT-29 e HCT-116 foram tratadas com 20 ng/mL de TNF- α por diferentes períodos de tempo (0, 5, 15, 30, 60 e 360 minutos). A dose de TNF- α foi estabelecida a partir de um estudo realizado em células HCT-116 (WANG et al., 2013). Para identificar o melhor tempo de ativação da via NF- κ B, submetemos as linhagens celulares a diferentes tempos de tratamento com TNF- α , e analisamos o perfil de fosforilação do I κ B α . A Figura 8 mostra que as células Caco-2 apresentaram um pico de ativação em 15 minutos, mostrando-se mais sensível ao estímulo. Já as células HT-29 e HCT-116 apresentaram pico de ativação em 30 minutos.

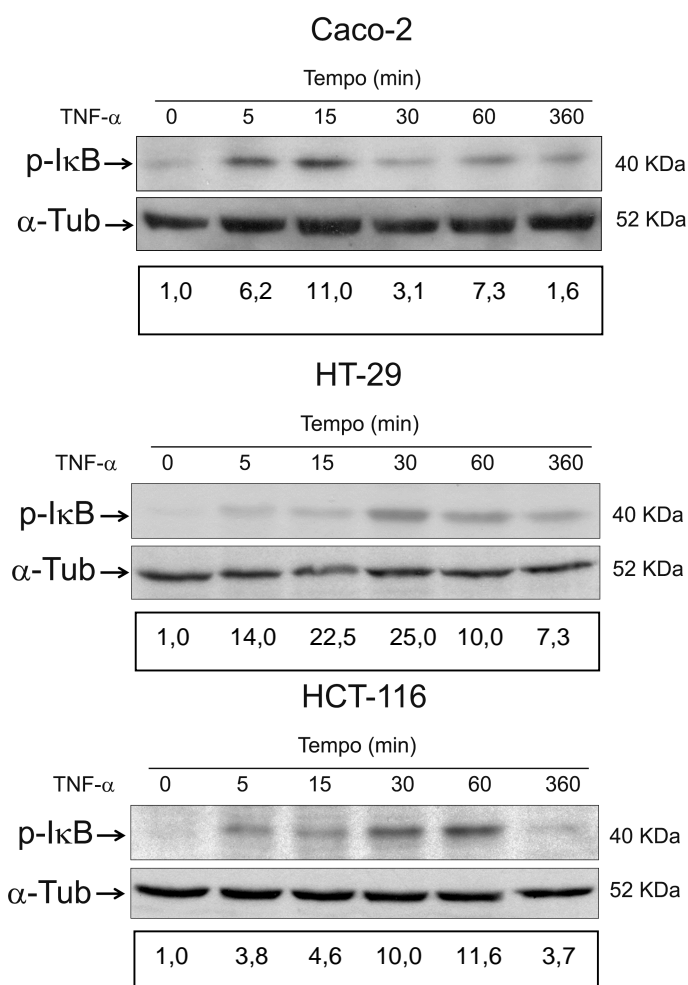


Figura 8. Análise do tempo resposta de ativação da via NF-κB após estímulo com TNF-α em células de câncer colorretal. As células Caco-2, HT-29 e HCT-116 foram cultivadas até a semi-confluência e tratadas com 20 ng/mL de TNF-α por diferentes tempos como indicado. Depois, os lisados totais foram obtidos e analisados por imunoblotting para p-IκBα. A ativação da via NF-κB foi quantificada através da razão entre p-IκBα e α-tubulina, a qual foi usada como controle da quantidade de proteína aplicada por Lane. Valores referentes a média das densitometrias. Normalização: Tempo 0=1. Imagens representativas de três experimentos independentes.

5.3 - Partenólídeo diminui os níveis de fosforilação do IκBα induzido por TNF-α nas células Caco-2, HT-29 e HCT-116

Em estudo anterior, foi mostrado que o tratamento com dose elevada do PTL (25 μM) inibe parcialmente a fosforilação de IκBα em células Jukart, ao inibir parcialmente o complexo quinase de IκB (IKC, do inglês, *IκB Kinase Complex*) (GARCÍA-PIÑERES et al., 2001). Por outro lado, o PTL também é um conhecido produtor de ROS, o qual está relacionado com o aumento da atividade da via NF-κB (D'ANNEO et al., 2013). Com base nesses dados, verificamos se alguma das doses utilizadas de PTL poderia aumentar a atividade da via NF-κB. Para-isso, as células foram tratadas previamente por 1h com as doses de PTL nas concentrações de IC₁, IC₂₀

e IC₅₀ para cada linhagem celular, e posteriormente analisamos o perfil de fosforilação da IκBα. Como mostrado na figura 9, nenhuma das doses utilizadas de PTL alterou o nível de fosforilação do IκBα quando comparado com o grupo controle.

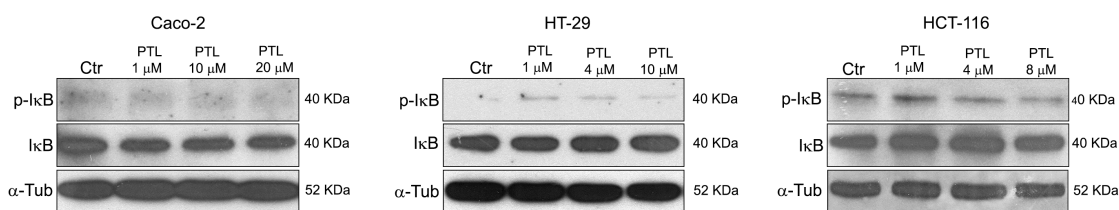
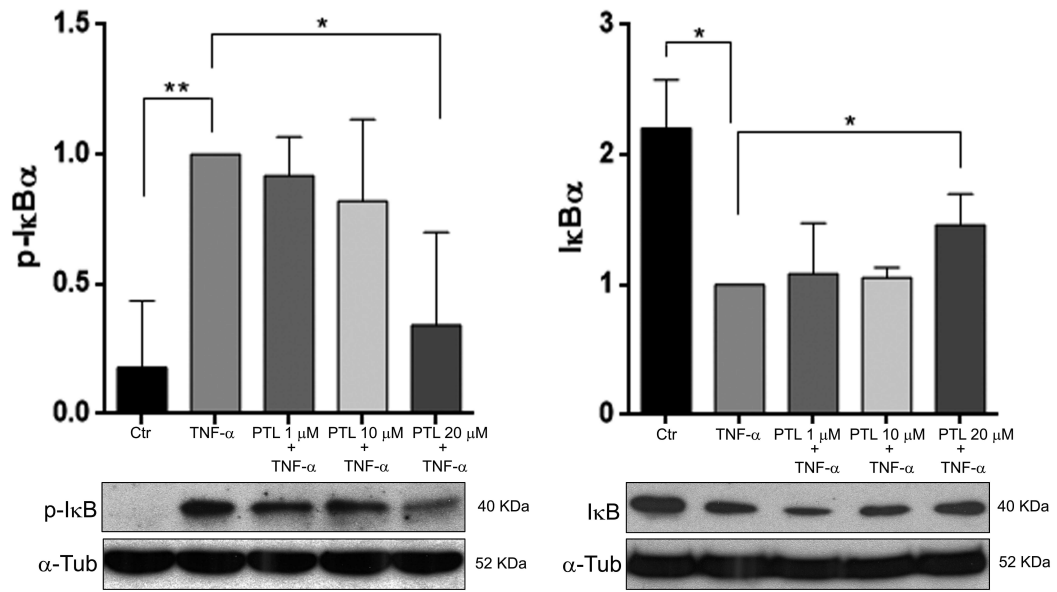


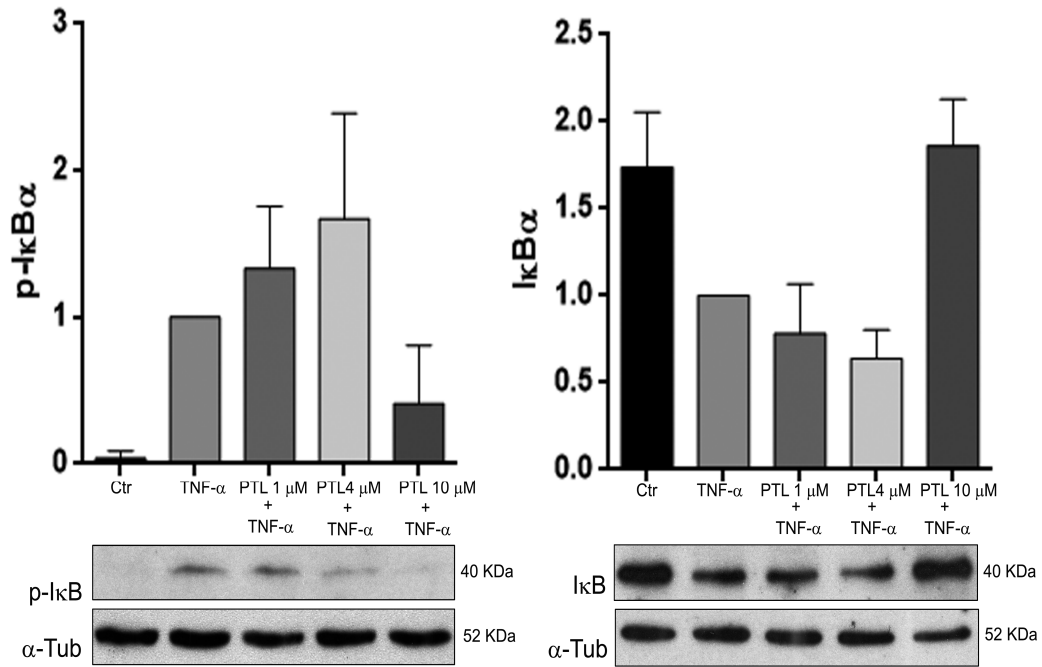
Figura 9. Análise da ativação da via-κB após estímulo com partenólídeo em células de câncer colorretal. As células Caco-2, HT-29 e HCT-116 foram cultivadas até a semi-confluência e tratadas com diferentes doses de PTL correspondentes ao IC₁, IC₂₀ e IC₅₀ para cada linhagem celular, como indicado, por 1 h. Depois, os lisados totais foram obtidos e analisados por imunoblotting para p-IκBα e IκBα total. A ativação da via NF-κB foi quantificada através da razão entre p-IκBα e α-tubulina, a qual foi usada como controle da quantidade de proteína aplicada por lane.

Em seguida, as células foram submetidas ao tratamento conjunto de PTL e TNF-α para verificar o poder inibitório do PTL sobre o ativador clássico da via NF-κB. Nossos resultados mostram que as doses elevadas de PTL foram capazes de reduzir a fosforilação do IκBα. As Células Caco-2 e HT-29 reduziram os níveis de p-IκBα e aumentaram os níveis de IκBα total sob o tratamento com PTL na dose de 20 μM e 10 μM (IC₅₀), respectivamente, impedindo assim parcialmente a ativação da via NF-κB promovida pelo TNF-α. Entretanto, as células HCT-116 apresentaram redução nos níveis de p-IκB, mas não apresentaram aumento nos níveis de IκBα total, quando tratadas com a dose de 8 μM (IC₅₀) de PTL (Fig. 10), indicando que, apesar da redução de p-IκBα, o NF-κB permaneceu livre de seu inibidor, IκBα total, podendo translocar para o núcleo e exercer sua função transcritora.

Caco-2



HT-29



HCT-116

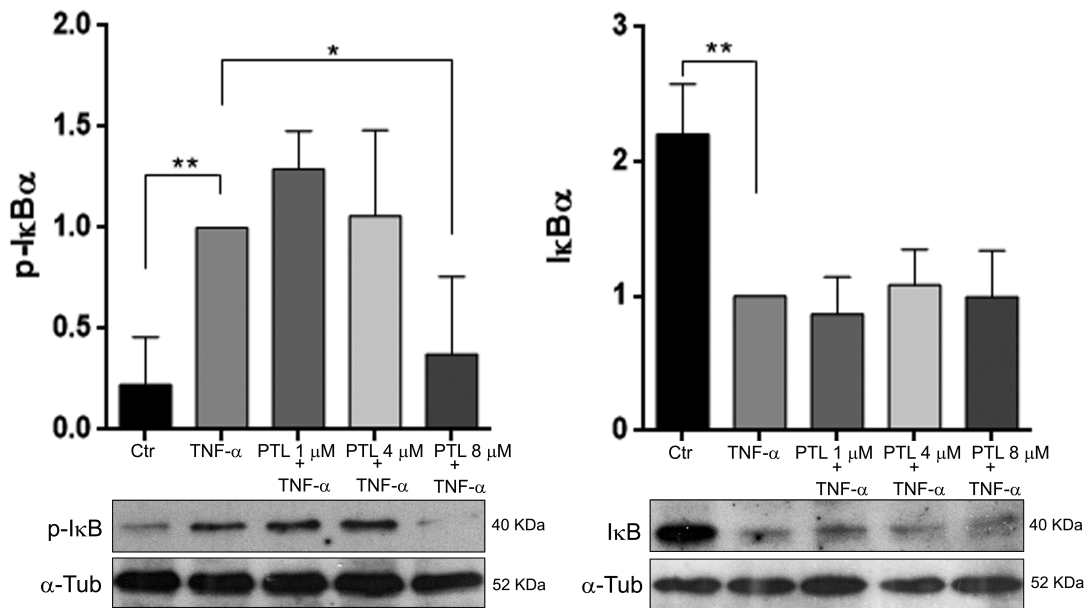


Figura 10. Análise dos níveis de p-IκB e IκB total após tratamento com TNF-α e diferentes doses de partenólídeo. Gráficos representativos dos níveis de fosforilação e totais de IκB em células Caco-2, HT-29 e HCT-116 após tratamento com TNF-α na presença ou não de PTL em diferentes concentrações. As células foram cultivadas até semi-confluência e então foram tratadas com TNF-α (20 ng/mL) por 15 minutos nas células Caco-2 e 30 minutos nas células HT-29 e HCT-116. As células que receberam tratamento conjunto com partenólídeo foram pré-tratadas por 1h com este composto em diferentes doses, como indicado, e então foi acrescentado TNF-α, após este período foram obtidos os lisados totais para análise dos níveis fosforilados e totais da proteína IκBα, os valores foram obtidos pela razão entre p-IκBα e α-tubulina e entre IκBα total e α-tubulina. Normalização: TNF-α=1. Dados obtidos de três experimentos independentes para as células Caco-2 e HCT-116 e de dois experimentos independentes para HT-29. Análise estatística realizada pelo teste-t de Student *p<0,05; **p<0,001. PTL: partenólídeo; α-tub: α-tubulina.

5.4 Partenólídeo é capaz de diminuir a translocação nuclear do NF-κB induzida por TNF-α nas células HT-29

A proteína p65 é uma das subunidades de NF-κB mais abundante em mamíferos (PAHL, 1999). Desta forma, para confirmar a translocação de NF-κB para o núcleo sob o tratamento com TNF-α e se o PTL é hábil para induzir a reversão deste efeito quando em tratamento conjugado com TNF-α, foi realizada imunofluorescência para determinar a localização subcelular da proteína p65 nas células HT-29 e HCT-116. Como esperado, ambas linhagens celulares mostraram aumento de marcação nuclear da p65 quando tratadas com TNF-α. No entanto, quando tratadas na presença do PTL, as células HT-29, mas não as células HCT-116, apresentaram redução da localização nuclear desta proteína (Fig. 11 e Fig. 12, respectivamente). Esses resultados sugerem

que o PTL em dose elevada é capaz de reduzir parcialmente a localização subcelular da p65 em células HT-29, mas não reduz a localização subcelular em células HCT-116.

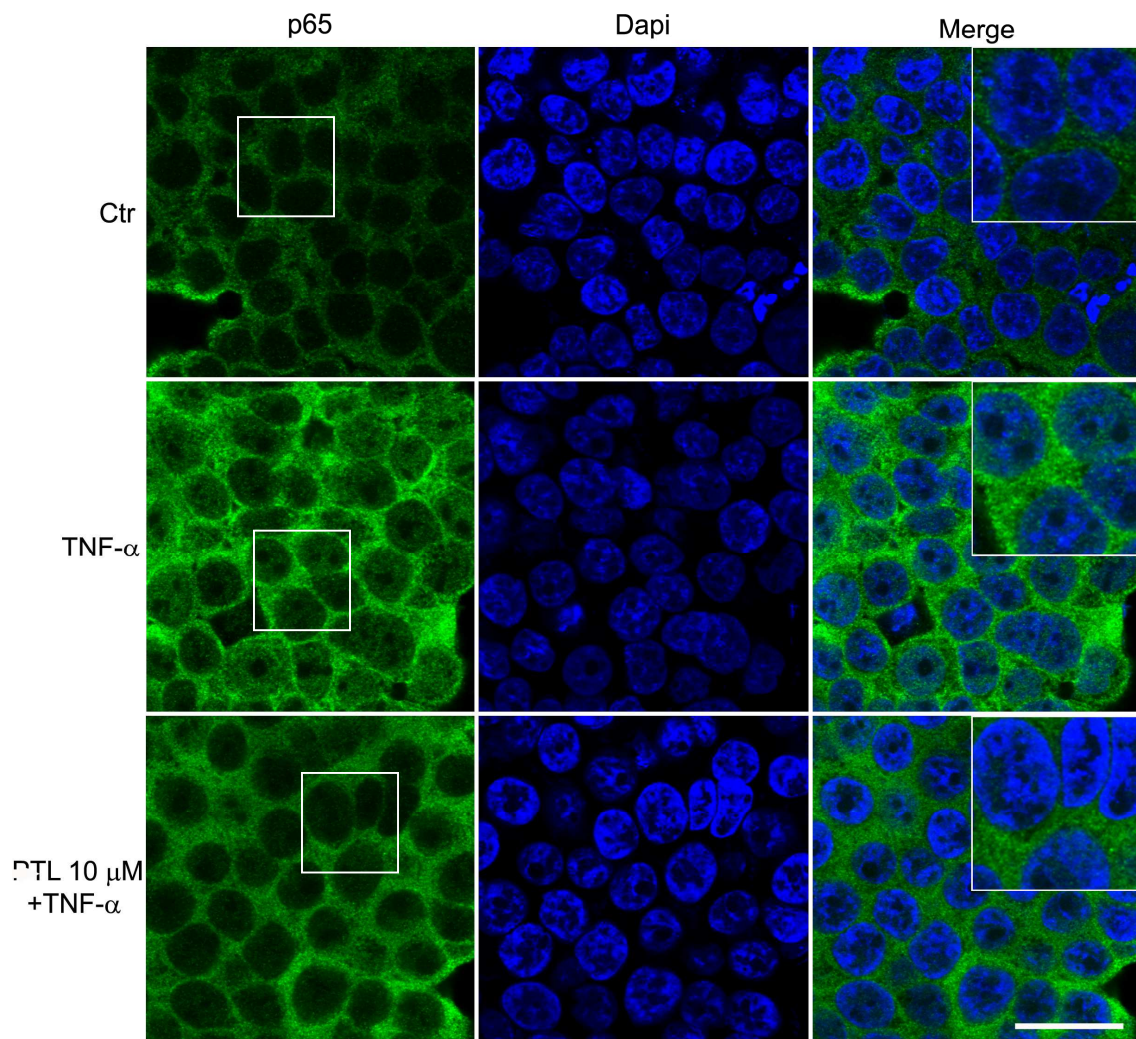


Figura 11. Análise da localização subcelular do NF-κB em células HT-29 após tratamento com TNF-α e partenolideo. As células HT-29 foram cultivadas até semi-confluência. Posteriormente, foram pré-tratadas por uma hora com partenolideo (10 μM) e logo em seguida por 40 minutos com TNF-α (20ng/mL). Após este período, as células foram fixadas e marcadas com anticorpo anti-p65, e analisadas por microscopia confocal. Núcleo marcado com DAPI. Imagens representativas de dois experimentos independentes. Barra: 20 μm. Os quadrantes destacam a localização nuclear da proteína p65.

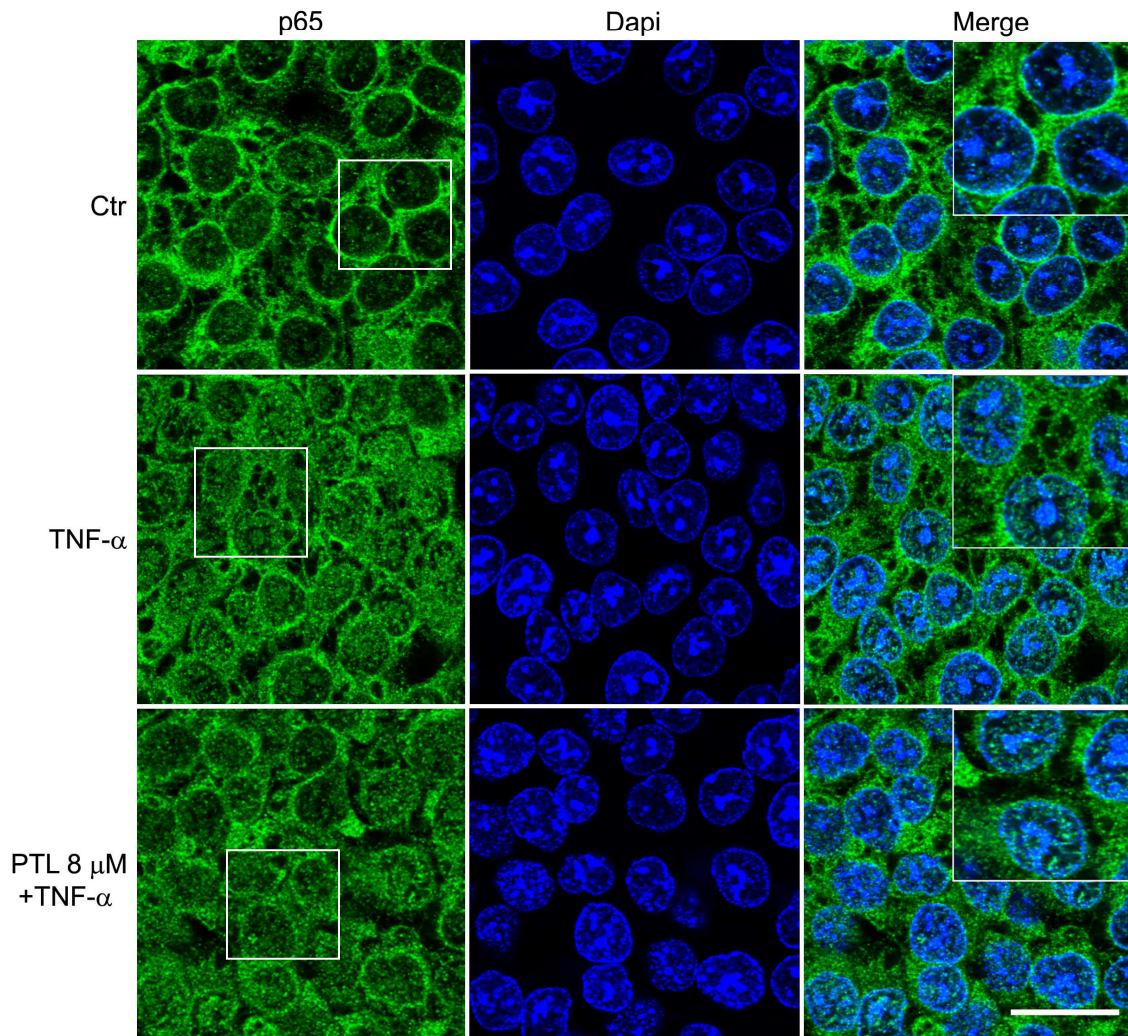


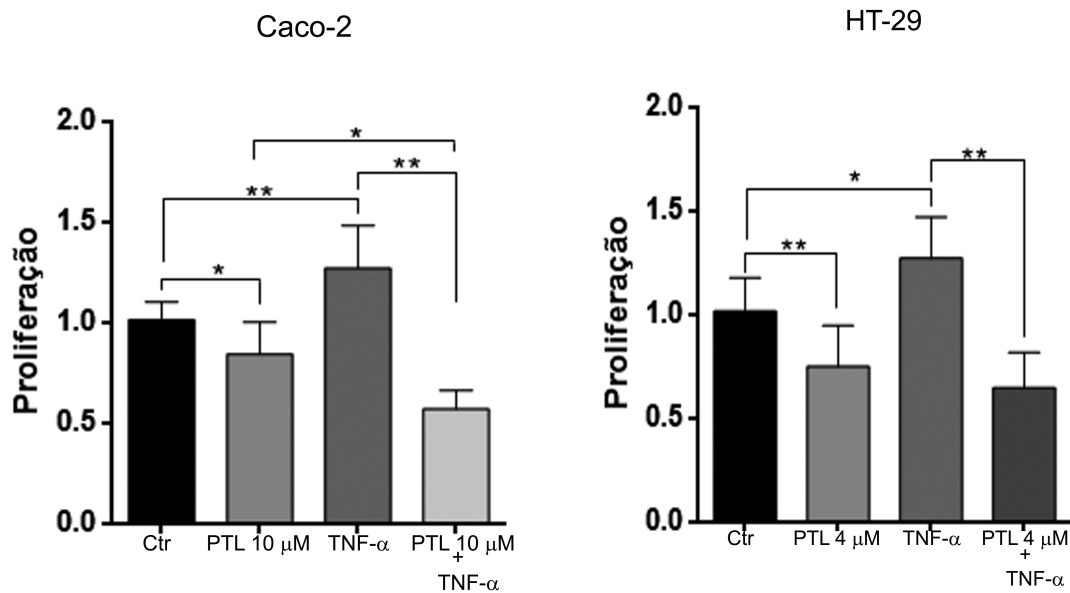
Figura 12. Análise da localização subcelular do NF- κ B em células HCT-116 após tratamento com TNF- α e partenolídeo. As células HCT-116 foram cultivadas até semi-confluência. Depois, foram pré-tratadas por uma hora com partenolídeo (8 μ M) e logo em seguida por 40 minutos com TNF- α (20ng/mL). Após este período, as células foram fixadas e marcadas com anticorpo anti-p65 e analisadas por microscopia confocal. Núcleo marcado com DAPI. Imagens representativas de dois experimentos independentes. Barra: 20 μ m. Os quadrantes destacam a localização nuclear da proteína p65.

5.5 - Partenolídeo reduz o potencial proliferativo em células de câncer colorretal ativadas com TNF- α

A transativação do NF- κ B ativa genes associados a proliferação celular por regular positivamente a expressão de ciclina D1 e inibir a expressão de p21. A inibição de NF- κ B leva a parada de ciclo celular e inibe a proliferação de células de câncer de mama e útero (BRANTLEY et al., 2001; KALTSCHMIDT et al., 1999). O estímulo do TNF- α sobre eventos celulares pode ter caráter pró e anti-tumoral (MIN et al., 2010; RADEFF-HUANG et al., 2007). Então investigamos o efeito da ativação da via NF- κ B

por TNF- α sobre a proliferação de células de câncer colorretal e o efeito do tratamento combinado deste ativador com um inibidor desta via, o PTL.

Nossos resultados mostram que o PTL sozinho induz uma diminuição na taxa proliferativa nas 3 linhagens celulares testadas, e a ativação da via NF- κ B por TNF- α aumenta o potencial proliferativo das células Caco-2 e HT-29, mas não interfere na taxa proliferativa das células HCT-116, a qual apresentou discreta redução, sem mudança significativamente estatística. Entretanto, quando submetidas ao tratamento conjunto de TNF- α com PTL as células Caco-2 e HCT-116 apresentaram maior efeito anti-proliferativo. Já as células HT-29 apresentam uma tendência semelhante, porém sem redução significativamente estatística entre o tratamento de PTL sozinho ou combinado com TNF- α , todavia pode-se observar que o PTL inibe o efeito proliferativo do TNF- α nesta linhagem (Fig. 13).



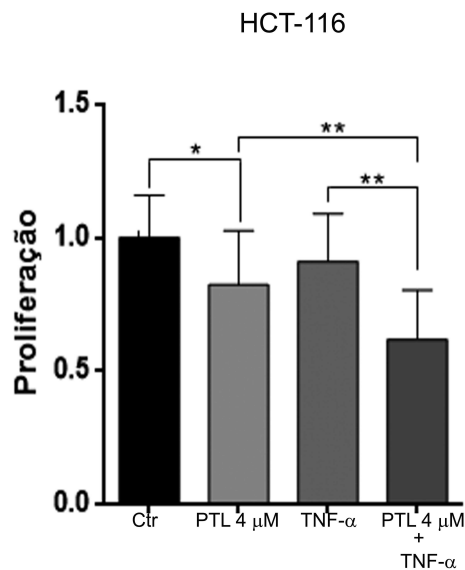


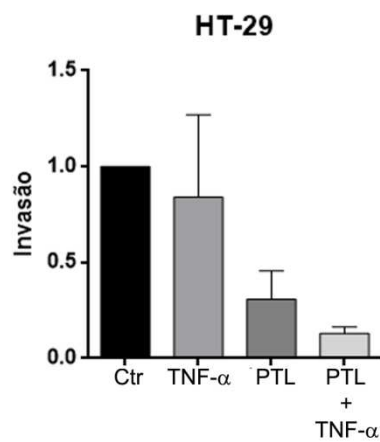
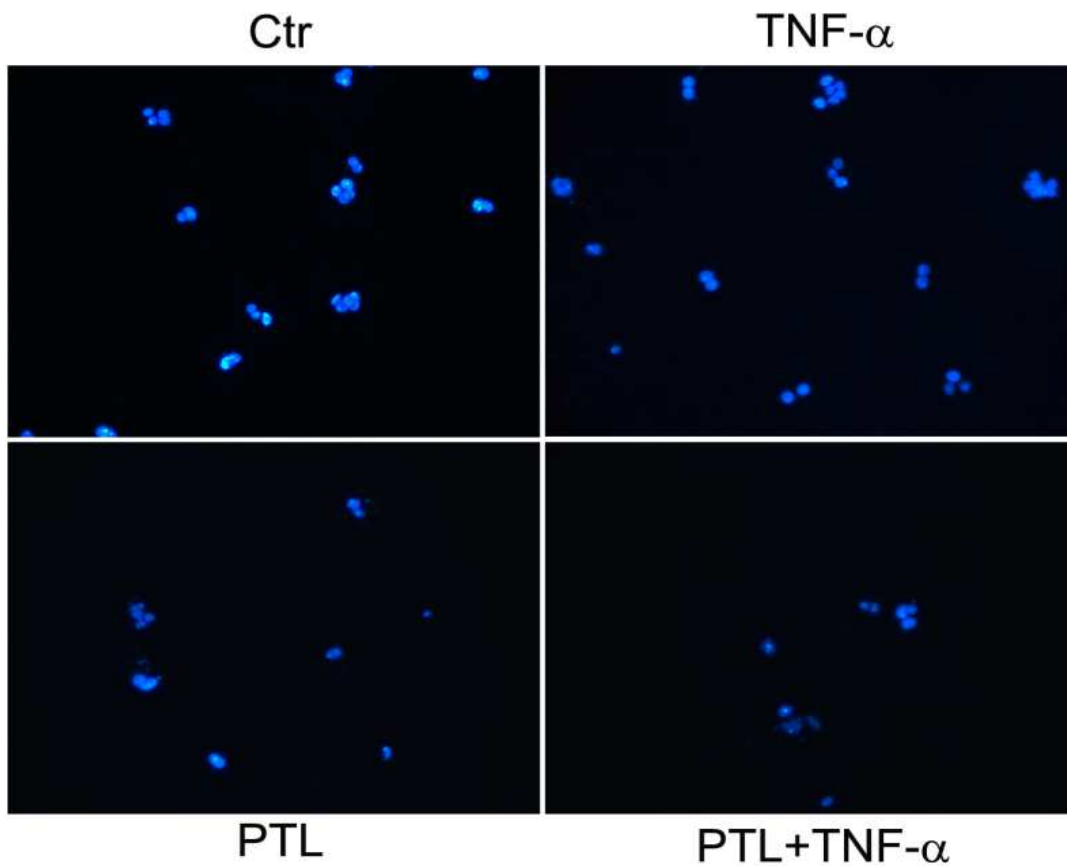
Figura 13. Análise do potencial proliferativo de células de câncer colorretal sob o tratamento com TNF- α isolado ou em conjunto com o partenolídeo. As células foram semeadas em placa de 96 poços, e após 24h foram tratadas com partenolídeo (IC₂₀), TNF- α (20ng/mL) e tratamento combinado entre esses dois agentes. A proliferação foi analisada pelo método do cristal violeta. Os gráficos representam o potencial proliferativo das células Caco-2 após 24h de tratamento com TNF- α com e sem partenolídeo (10 μ M), HT-29 após 48h de tratamento com TNF- α com e sem partenolídeo (4 μ M) e HCT-116 após 24h de tratamento com TNF- α com e sem partenolídeo (4 μ M). Dados obtidos de três experimentos independentes. Análise estatística utilizada: teste-t de Student. *p<0,05; **p<0,001.

5.6 - Partenolídeo reduz a capacidade invasiva das células HT-29 e HCT-116 e quando associado ao TNF- α este efeito é acentuado nas células HT-29.

Segundo estudo de Whipple et al. (2013), o PTL reduz a formação de microtentáculos celulares e adesão celular de maneira independente da inibição de NF- κ B, acarretando em uma diminuição da migração de células de câncer de mama. Entretanto, o aumento da atividade de NF- κ B pode regular positivamente a expressão de MMP9 e fibronectina, proteínas importantes para aumento do potencial invasivo de células de câncer (WU; ZHOU, 2010). Em contrapartida, tem sido observado o papel do PTL na redução do potencial invasivo de células de melanoma por regulação negativa da expressão de MMP9, além de reverter o aumento do potencial invasivo destas células provocadas pelo TNF- α (CZYZ et al., 2010).

Para investigar o papel do partenolídeo no processo invasivo em nossos modelos celulares, as células HT-29 e HCT-116 foram submetidas ao tratamento com uma dose não citotóxica de PTL (1 μ M), TNF- α (20 ng/mL) e ao tratamento combinado com esses agentes. Podemos observar que o tratamento com TNF- α sozinho parece não

aumentar o potencial invasivo das células HT-29, e o PTL sozinho já é capaz de diminuir o potencial invasivo destas células. Porém, o tratamento associado entre essas duas substâncias reduz expressivamente a capacidade invasiva dessas células. Por outro lado, os resultados nas células HCT-116 sob o tratamento com $TNF-\alpha$ parecer ter promovido aumento no potencial invasivo e o tratamento com PTL combinado com o $TNF-\alpha$ foi capaz de reverter este efeito (Fig. 14).



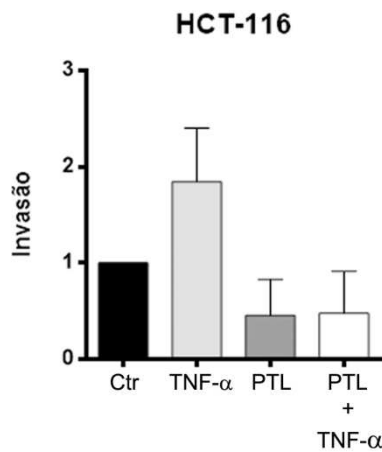
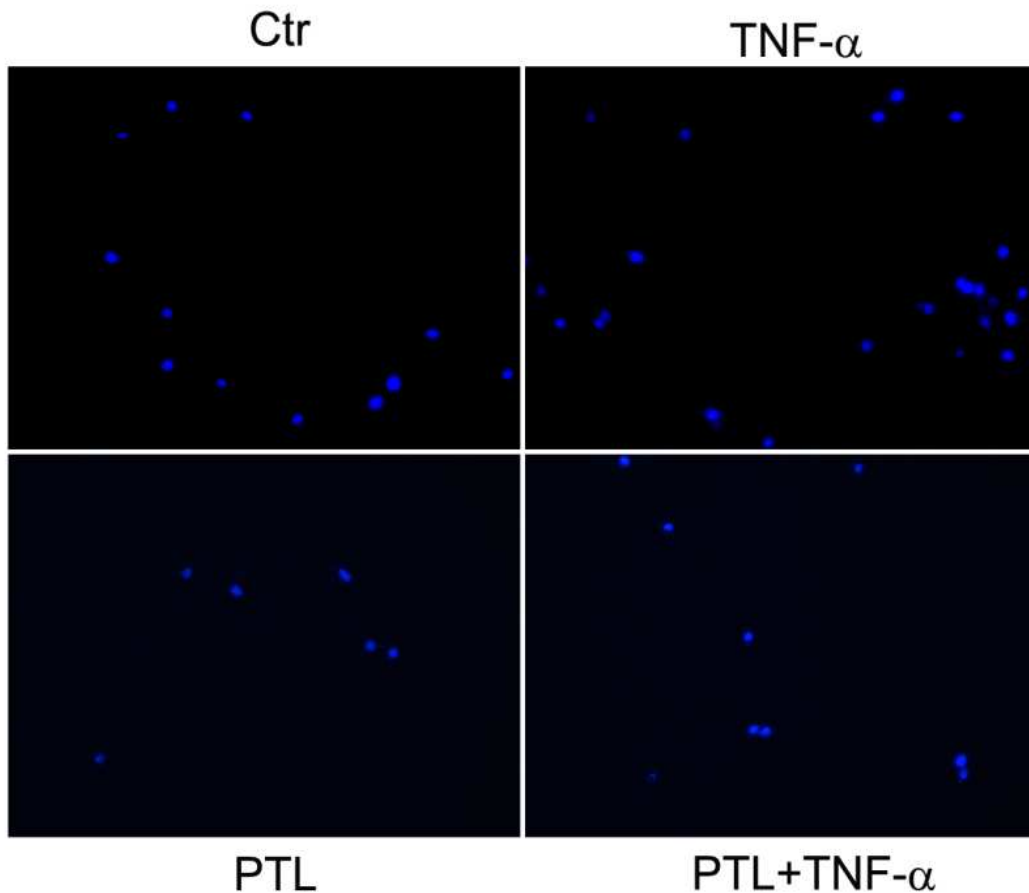


Figura 14. Análise do potencial invasivo de células de câncer colorretal sob o tratamento com TNF- α isolado ou em conjunto com partenolídeo. As células foram cultivadas em insertos Transwell® que continham poros de 8 μ m, revestidos com Matrigel® e submetidas ao ensaio de invasão sob tratamento com TNF- α 20ng/mL, partenolídeo 1 μ M e tratamento combinado com esses dois agentes. Imagens correspondem ao núcleo de células que invadiram através do matrigel. Núcleo marcado com DAPI. Os gráficos representam a quantificação do potencial invasivo das células HT-29 após 48 horas de tratamento e HCT1-16, após 24 horas de tratamento. Normalização Ctr=1. Dados de dois experimentos independentes. Aumento 20X.

5.7 - TNF- α desorganiza a localização de E-Caderina nos contatos intercelulares das células HT-29 e HCT-116 e partenólido impede este efeito

Estudos em células epiteliais demonstraram que a atividade de NF- κ B regula negativamente a expressão de E-caderina ao aumentar a atividade de promotores tumorais tais como Snail2, ZEB1 e ZEB2. Entretanto, também tem sido identificada a regulação negativa da atividade transcricional de NF- κ B e aumento da expressão de E-caderina (CHUA et al., 2006; SOLANAS et al., 2008). Além disso, já está bem definido que alterações da localização desta proteína poderia induzir sinais relacionados com a progressão tumoral ou o potencial tumorigênico (HUELS et al., 2015; NELSON, 2008). Desta forma, investigamos por imunofluorescência se o tratamento com TNF- α era capaz de desregular a localização da E-caderina nos contatos celulares e qual seria o efeito deste tratamento na presença do PTL.

A figura 15 mostra que as células HT-29 sem tratamento apresentam localização da E-caderina mais organizada nos contatos célula-célula, porém, após tratamento por 48h com TNF- α , ocorre uma discreta alteração morfológica, acompanhada de redução de E-caderina nos contatos célula-célula e aumento de sua localização no citoplasma. Todavia, este efeito foi revertido sob o tratamento com a dose de 1 μ M de PTL, e o mesmo efeito também pode ser observado quando as células foram submetidas a dose de 10 μ M de PTL. As células HCT-116 sem o tratamento com TNF- α , apresentam uma morfologia mais espalhada do que as células HT-29, no entanto podemos observar a presença de E-caderina em seus contatos celulares. Após o tratamento por 48 h com TNF- α , as células se tornaram mais esticadas e ocorreu uma redução da E-caderina nos contatos célula-célula. Entretanto, o PTL nas dose de 1 μ M reverteu este efeito sobre a localização da E-caderina, assim como na morfologia celular. Já o tratamento na dose de 8 μ M do PTL, apesar da morfologia celular permanecer mais esticada, a E-caderina se mantém nos contatos célula-célula (Fig. 16).

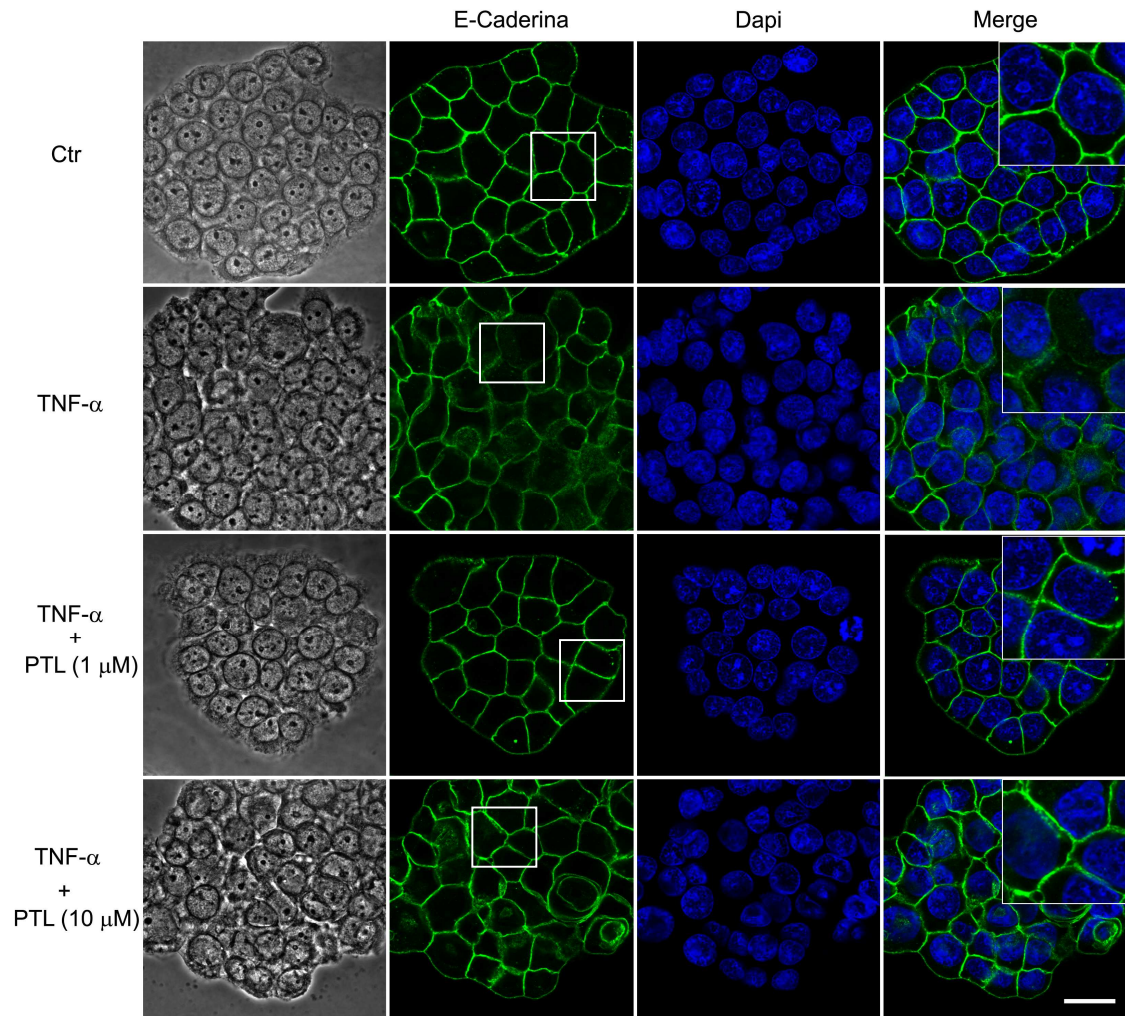


Figura 15. Análise da localização celular da proteína E-caderina em células HT-29. As células foram semeadas e cultivadas sobre uma lamínula de vidro até semi-confluência, então foram tratadas com TNF- α 20ng/mL e com partenolídeo nas doses do IC₁ (1 uM) e IC₅₀ (10 uM) por 48h. Após este período as células foram fixadas e processadas para marcação de E-caderina. O núcleo foi marcado com DAPI. Barra: 10 μ m. Os quadrantes destacam a localização da proteína E-caderina nos contatos intercelulares.

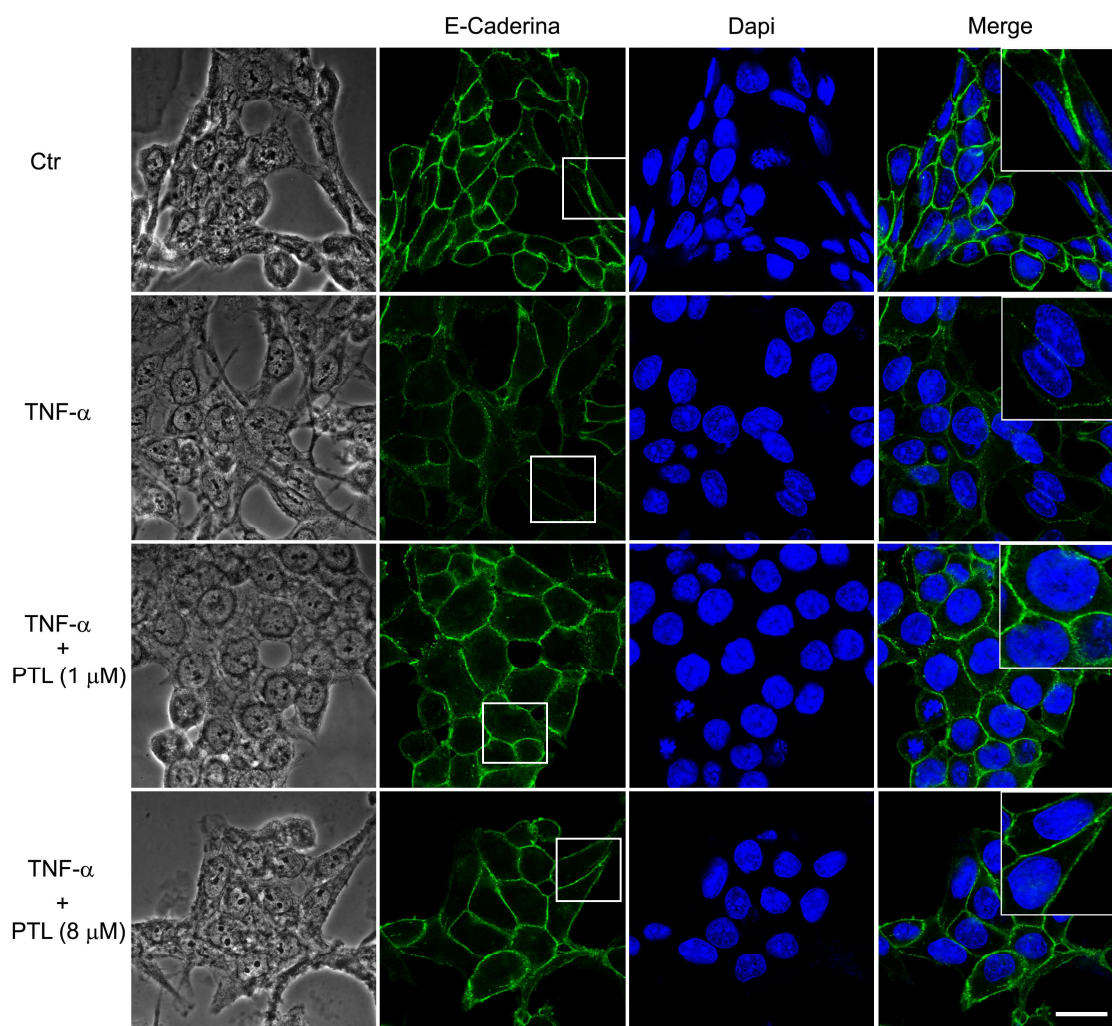


Figura 16. Análise da localização celular da proteína E-caderina em células HCT-116. As células foram semeadas e cultivadas sobre uma lamínula de vidro até semi-confluência, então foram tratadas com TNF- α 20ng/mL e com partenolídeo nas doses do IC1 (1 μ M) e IC50 (8 μ M) por 48h. Após este período as células foram fixadas e processadas para marcação de E-caderina. O núcleo foi marcado com DAPI. Barra: 10 μ m. Os quadrantes destacam a localização da proteína E-caderina nos contatos intercelulares.

6 - DISCUSSÃO

A inflamação crônica é reconhecida como a sétima característica (*Hallmark*) necessária para desenvolver a capacidade de sobrevivência, crescimento e metástases em células tumorais. Isto porque a inflamação fornece ao microambiente moléculas bioativas; tais como fatores de crescimento, que sustentam a proliferação; fatores de sobrevivência, que limitam a morte celular; fatores pró-angiogênicos; assim como enzimas de modificação da matriz extracelular, que contribuem para a formação de neovasos, invasão e metástases, podendo induzir a ativação da EMT (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Neste contexto, a via NF- κ B é uma importante via pró-inflamatória que vem sendo cada vez mais descrita como uma via importante no desenvolvimento e progressão do CCR (HORST et al., 2009; SHAKED et al., 2012). A ativação constitutiva desta via foi observada em 40% dos CCRs e em 67% das linhagens celulares deste tipo de câncer (SAKAMOTO et al., 2009). Um dos fatores associados a isso é o aumento de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , um dos principais mediadores químicos implicados na inflamação associada ao câncer graças a sua capacidade de ativar a via NF- κ B (BALKWILL, 2006). O NF- κ B tem sido identificado como uma molécula crítica na progressão tumoral mediada pela ativação do TNF- α . Por exemplo, em células hepáticas, que expressavam o I κ B-super-repressor, no qual os resíduos 32 e 36 de serina são mutados para resíduos de alanina mantendo o I κ B inibindo o NF- κ B de forma constitutiva, tem se observado que a ativação por TNF- α induz morte celular programada (PIKARSKY et al., 2004). A via NF- κ B tem também sido associada à iniciação, promoção e progressão de tumores colorretais associados a inflamação e esporádicos (COOKS et al., 2013; HUBER et al., 2004; SHAKED et al., 2012). Com efeito, a inibição desta via apresenta-se como uma alternativa no combate a este tipo de câncer. Atualmente, vários estudos têm apontado para o uso do PTL como um inibidor da via NF- κ B, relacionando seu efeito, principalmente, sobre a morte celular por apoptose (LIU et al., 2010; YUN et al., 2010; ZHAO; XU; LI, 2009). Diante do exposto, destaca-se também a necessidade em verificar qual o papel do PTL na inibição desta via e como essa inibição pode afetar outros eventos relacionados com a progressão do CCR, tais como proliferação, invasão e expressão de marcadores epiteliais.

Inicialmente, para identificar em nossos modelos celulares o nível de ativação basal desta via, investigamos o nível de fosforilação do I κ B α e observamos que as linhagens celulares utilizadas no estudo apresentam a via NF- κ B diferencialmente ativa entre elas, sendo as células Caco-2 com o menor nível, a HT-29 com um nível intermediário, e a HCT-116 apresentando o maior nível de ativação (Fig. 8A). Além disso, verificamos que as células com maior atividade da via NF- κ B apresentam também maior citotoxicidade ao tratamento com PTL (Fig. 8B), indicando que a via NF- κ B pode ser importante para a sobrevivência destas células quando submetidas a condições citotóxicas. Portanto, o efeito inibitório do PTL sobre esta via acentua seus efeitos citotóxicos e também aponta para a especificidade de seus efeitos sobre linhagens celulares que apresentam a atividade exacerbada desta via.

O perfil de expressão da p53 também pode, conjuntamente com a atividade de NF- κ B, explicar as diferentes respostas celulares frente o tratamento com o PTL. A p53 é uma proteína importante para o controle do ciclo celular e indução de morte celular, e apresenta um perfil de expressão diferente entre os modelos estudados. Nas células HCT-116, encontra-se normalmente expressa com o gene selvagem da *TP53* e desta forma a atividade basal da via NF- κ B aumentada pode representar vantagem adaptativa nesta linhagem celular. Já as linhagens Caco-2 e HT-29 apresentam mutação no gene *TP53* e menor atividade basal da via NF- κ B o que explicaria a maior resistência ao tratamento com PTL. É importante notar que, mutações em *TP53* ocorrem em aproximadamente 50% dos CCRs e apresenta maior relação com tumores MSI e CIMP (IACOPETTA, 2003). Em um contexto inflamatório, a mutação em *TP53* aumenta a estabilidade de NF- κ B associado ao DNA, aumentando a transcrição de genes alvo de NF- κ B, promovendo inflamação crônica e inflamação associada ao câncer, através da ativação sustentada desta via (COOKS et al., 2013).

No microambiente tumoral, o TNF- α atua como um promotor tumoral endógeno e sua deleção/inibição reduz a incidência de cânceres em modelos experimentais (BALKWILL, 2006). Deste modo, submetemos nossos modelos a este estímulo para identificar seus efeitos sobre a via NF- κ B e observamos que o pico de ativação desta via por TNF- α nas células Caco-2 ocorre em tempos mais curtos do que o tempo de ativação das demais linhagens, indicando que células com a via menos ativa são mais sensíveis ao estímulo, como visto pelo rápido pico de fosforilação de I κ B. Já as demais células com a via mais ativa dependem de um período maior de tempo para efetivamente apresentarem aumento na fosforilação de I κ B, sob estímulo com TNF- α .

No entanto, o pico de fosforilação de I κ B parece se manter por um período mais prolongado nestas linhagens (Fig. 9).

O PTL apresenta seu efeito biológico principal na inibição da via NF- κ B, porém seu principal alvo de inibição dentro desta via permanece sendo foco de investigações, com estudos apontando para dois principais alvos, a fosforilação do I κ B α e a ligação da p65 a fita de DNA (GARCÍA-PIÑERES et al., 2001; LI-WEBER et al., 2002). Neste estudo, observamos que o PTL em altas doses (IC₅₀) é capaz de reduzir a fosforilação do I κ B α nas três linhagens celulares, e aumentar os níveis de I κ B α total nas células Caco-2 e HT-29 (Fig. 11). Desta forma, nossos achados sugerem que o PTL em altas doses é capaz de inibir a ativação da via NF- κ B, por impedir a fosforilação de I κ B α e assim sua degradação. Nas células HT-29 a inibição da ativação da via NF- κ B por PTL (IC₅₀), também foi confirmada por análise da localização subcelular da p65, como visto, sob o tratamento com PTL, a translocação nuclear da p65 que foi quase completamente inibida (Fig. 12).

Estes achados estão de acordo com resultados descritos por García-Piñeres e colaboradores (2001), onde foi verificado que altas doses de PTL (40 μ M) atrasa a degradação de I κ B α em células de linfoma de células T, Jukart. Ainda, tendo sido observado uma importante inibição da via NF- κ B a partir da dose de 10 μ M de PTL, responsável por inibir a atividade do complexo IKK em células de câncer cervical (HEHNER et al., 1999). A atuação do PTL em outros parceiros da cascata de sinalização da via NF- κ B, tais como as IKKs, TRAFs e TAK1, também tem sido descrita. Sendo assim, podemos pressupor que a atuação do PTL na inibição da via NF- κ B pode variar em diferentes linhagens celulares, e que seu alvo pode ser em proteínas com funções anteriores a fosforilação de I κ B α na cascata de sinalização da via NF- κ B, tais como as IKKs e TRAFs, ou ainda no recrutamento destes fatores. Shanmugam e colaboradores (2011) têm observado que o PTL reduz a expressão de TRAF2 em células W256 (células de carcinossarcoma) a partir de 6 h de tratamento, porém ainda não foi descrito se PTL interfere diretamente na atividade desta proteína. Além disso, tem sido relatado que o tratamento com PTL reduz a fosforilação de IKK $\alpha\beta$, porém não reduz a fosforilação de TAK1, responsável por fosforilar resíduos de IKK β (IDRIS et al., 2009).

Nas células HCT-116, apesar do PTL reduzir os níveis de fosforilação I κ B α , não houve aumento nos níveis de I κ B α total, sugerindo uma degradação mais rápida de p-I κ B α sob altas doses de PTL (8 μ M) (Fig. 11). Além disso, a localização subcelular da

p65 manteve-se nuclear após o tratamento com PTL, mostrando que o PTL não foi capaz de inibir a translocação nuclear da p65 nesta linhagem (Fig. 13). Contudo, podemos deduzir, baseados nos ensaios funcionais posteriores, que a transativação do NF- κ B foi afetada. No entanto, outros ensaios são necessários para confirmar a inibição de sua transativação, por meio, por exemplo, de análise de sua ligação ao DNA por EMSA ou imunoprecipitação da cromatina, ou através da análise da atividade transcricional do NF- κ B através do ensaio de atividade da luciferase. Todavia, podemos atribuir este resultado àquela que parece ser a principal função anti-inflamatória do PTL: sua capacidade de impedir a ligação da p65 ao DNA através, principalmente, da alquilação desta proteína na cisteína 38 (GARCÍA-PIÑERES et al., 2001). Perkins (2012), explica que esta cisteína interage com o fosfato principal na ligação do NF- κ B/p65 ao DNA, e a oxidação ou nitrosilação desta cisteína são conhecidos por impedir a ligação do NF- κ B/p65 ao DNA e as lactonas sesquiterpênicas, como o PTL, são conhecidas por esta função.

No entanto, convém destacar que as células HCT-116 apresentam elevada expressão de β -catenina, e estudos recentes identificaram uma possível repressão da atividade transcricional da β -catenina por meio de uma interação proteína-proteína com o NF- κ B no sítio TBE0, sítio promotor da ciclina D1 e alvo transcricional de ambos fatores. Desta forma, o acúmulo nuclear de p65 inibe a transcrição dependente de β -catenina, da ciclina D1 e assim a proliferação celular em células de câncer colorretal (ABE et al., 2014; HWANG et al., 2010). Logo, torna-se importante investigarmos a interação de NF- κ B com β -catenina, comparando se o PTL é capaz de aumentar esta interação, amplificando assim o efeito antitumoral da ativação de NF- κ B em células com alta expressão de β -catenina.

O aumento proliferativo de células epiteliais tem sido relacionada a uma ativação continuada da via NF- κ B, por exemplo, em células de câncer de mama com ativação constitutiva de NF- κ B a taxa proliferativa foi aumentada acompanhada pela redução de apoptose nestas células (BRANTLEY et al., 2001). O aumento da expressão de I κ B α , diminui a proliferação de células HeLa, retarda a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular e aumenta a expressão da p21 (KALTSCHMIDT et al., 1999). Neste sentido, o TNF- α parece influenciar no crescimento de células intestinais em ratos, estimulando a proliferação celular em doses fisiológicas através dos receptores TNFR2, e aumenta a proliferação de células tronco neurais por regular positivamente a expressão de ciclina D1, através da ativação de NF- κ B (KAISER; POLK, 1997;

WIDERA et al., 2006). No presente estudo, foi observado que o TNF- α aumenta o potencial proliferativo das células Caco-2 e HT-29, mas não das células HCT-116 e que o partenólídeo reduz o potencial proliferativo de todas as células em estudo. (Fig. 14). De maneira surpreendente, o PTL apresentou uma maior redução do potencial proliferativo quando combinado ao TNF- α , nas células Caco-2 e HCT-116.

Tem sido descrito o efeito antiproliferativo do PTL em células do músculo liso vascular, onde foi observado parada na fase G0/G1 do ciclo celular, efeito atribuído a capacidade do PTL em regular positivamente a expressão de p21 e p27. Neste mesmo estudo foi observado maior expressão de I κ B α , e inibição NF- κ B, atribuindo a isto o efeito antiproliferativo nestas células (WENG et al., 2009). A inibição da via NF- κ B por PTL em células endometriais também foi capaz de inibir a inflamação e proliferação destas células em um modelo de endometriose (TAKAI et al., 2013). Ghantous e colaboradores (2012), também têm observado o efeito antiproliferativo de PTL em células PKM (queratinócitos de rato) a partir da redução da atividade da HDAC1 especificamente, sendo a primeira pequena molécula descrita com ação alvo-específica em HDAC1. Neste estudo houve aumento da transcrição de p21 por afrouxamento da cromatina, permitindo acesso de fatores transcricionais ao gene da p21, e assim aumento na expressão desta proteína, células HCT-116 aumentaram a expressão de p21 após 6 h de tratamento com PTL. Ainda neste estudo, ensaios *in vivo*, em modelo de promoção tumoral com uso da células JB6P, o PTL também foi capaz de reduzir a proliferação, e assim reduzir o volume do tumor e aumentar expressão p21 e reduzir a expressão de p65. Embora o PTL tenha reduzido a taxa proliferativa das células de CCR em nosso estudo, é necessário uma investigação mais minuciosa que nos aponte o mecanismo de inibição em nossos modelos. Análise do ciclo celular bem como do perfil da expressão das ciclinas sob o tratamento com TNF- α e PTL, assim como correlacionar o efeito do PTL na regulação da proteína p21, e compreender a importante interrelação da ativação do NF- κ B e a proteína p53 poderá indicar os mecanismos pelos quais o PTL estaria mediando seus efeitos inibitórios sobre a proliferação em CCR. O efeito antiproliferativo do PTL aumentado quando combinado ao tratamento com TNF- α nas células Caco-2 e HCT-116 pode ser explicado pelo efeito dual de TNF- α , de ativação de via de morte e de sobrevivência em resposta ao estresse. Evidências apontam que NF- κ B atua como um protetor a ativação de morte através do TNF- α : em camundongos com deleção de p65, o tratamento com TNF- α levou a apoptose em diversos tecidos (BEG et al., 1995; WANG; LIN, 2008). Desta forma, podemos sugerir que o efeito

antiproliferativo mais acentuado do tratamento do PTL conjugado ao TNF- α é devido aos efeitos antiproliferativos inerentes ao PTL e a inibição da p65, levando a uma intensificação da ativação da via de morte pelo TNF- α . Para confirmar este evento seria necessário submeter estas células a análise de morte celular através de ensaios como Anexina-Pi e clivagem das caspases por *imunoblotting*.

Investigamos ainda o papel da via NF- κ B na modulação do potencial invasivo, importante evento associado a progressão tumoral, nas células HT-29 e HCT-116. Os resultados obtidos sugerem que o tratamento com PTL reduz o potencial invasivo de ambas as linhagens (Fig. 15). Nas células HT-29, apesar do TNF- α não alterar o potencial invasivo, o efeito inibitório do PTL no potencial invasivo foi maior quando conjugado ao TNF- α . Já nas células HCT-116, o TNF- α aumentou o potencial invasivo e o tratamento em conjunto com o PTL parece prevenir completamente este efeito (Fig. 15). Estudos *in vivo* demonstram que o PTL reduz eventos metastáticos, com redução expressão de MMP9 e VEGF (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*) em modelos de câncer de mama e osteossarcoma, sem identificar precisamente os mecanismos celulares regulados (D'ANNEO et al., 2013; KISHIDA; YOSHIKAWA; MYOUI, 2007). Já em modelos celulares de câncer renal e melanoma, foi identificado que PTL regula a capacidade invasiva destas células, por inibir a via NF- κ B e diminuir a expressão de MMP9 (OKA et al., 2007). Além disso, em células de câncer de ovário, o PTL inibe a invasão mediada por FAK (do inglês, *Focal Adhesion Kinase*) (KWAK; PARK; LEE, 2013).

Durante a progressão do câncer, a célula tumoral epitelial pode ativar um programa de transcrição gênica que a possibilite degradar e remodelar a matriz extracelular, assim como estabelecer contatos celulares dinâmicos que as permitam sair do sítio tumoral primário, alcançar a circulação e se estabelecer em um sítio secundário. Nesse sentido, o ponto inicial é a perda da polaridade ápico-basolateral, através da dissolução das JT, seguida pela perda das JA (MICALIZZI; FARABAUGH; FORD, 2010). Diversos estudos têm descrito a importância da atividade da via NF- κ B na obtenção deste perfil de transcrição gênica, com perda de marcadores epiteliais e aumento de marcadores mesenquimais (HORST et al., 2009; HUBER et al., 2004). Por exemplo, em células epiteliais de câncer de mama, a atividade constitutiva de NF- κ B promoveu uma desorganização na arquitetura epitelial destas células (BRANTLEY et al., 2001). Tendo em vista que o TNF- α aumentou a proliferação das células HT-29 e aumentou a invasão das células HCT-116, fomos investigar se o tratamento por tempo

mais prolongado, com esta citocina ativadora de NF- κ B, era capaz de provocar alterações na localização de uma importante proteína marcadora de diferenciação celular em células epiteliais, a E-caderina. Nossos resultados mostraram que o TNF- α desorganiza a localização da E-caderina nas células HT-29 e HCT-116, após uma exposição de 48h. A dose de 1 μ M de PTL foi capaz de reverter a desorganização da E-caderina em ambas as linhagens celulares, mantendo-a estável nos contatos (Fig. 16 e 17), indicando um possível mecanismo de regulação do potencial invasivo, através da regulação desta importante proteína, que atua na manutenção da integridade dos contatos intercelulares e diferenciação celular.

O PTL pode estar regulando positivamente a E-caderina nos contatos por sua ação inibitória ao NF- κ B, pois NF- κ B/p65 aumenta a atividade do promotor de ZEB1 e expressão de Snail, repressores transcricionais da E-caderina (CHUA et al., 2006; ZHANG et al., 2011). A E-caderina, estável nos contatos intercelulares, mantém sua interação com NF- κ B e aumenta sua localização citoplasmática, logo, a presença da E-caderina nos contatos, em conjunto com o efeito do PTL, preveniria a translocação do NF- κ B (SOLANAS et al., 2008). Desta forma, podemos sugerir que a interconexão entre E-caderina e NF- κ B está sendo regulada pelo PTL, de forma a reduzir características pró-tumorais das células de CCR. Além disso, já foi observado atuação do PTL na regulação da E-caderina de forma independente da inibição do NF- κ B, onde foi constatado efeito citotóxico maior em células A549 que apresentam silenciamento do gene CDH1, evento foi atribuído a uma seletividade às células-tronco tumorais, demonstrado por sua seletividade a células com baixa expressão de E-caderina (ZHAO; LIU; SU, 2014). O PTL também pode regular positivamente a E-caderina através da regulação negativa que promove em MDM2, por promover sua ubiquitinação. A proteína MDM2 parece aumentar a invasão e migração celular por regular a degradação da E-caderina (GOPAL; CHANCHORN; DYKE, 2009; YANG et al., 2006). Entretanto, MDM2 atua como um pró-inflamatório por aumentar a atividade de NF- κ B, podendo regular indiretamente a desestabilização da E-caderina nos contatos como discutido anteriormente (THOMASOVA et al., 2012).

7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conjunto, nossos resultados mostram uma importante ação antitumoral do PTL em linhagens celulares de CCR, com distintos graus de diferenciação e atividade basal da via NF- κ B. Diante disso, destacamos a ampla gama de atuação desta pequena molécula que apresenta além de inibição da via NF- κ B a partir das proteínas do complexo IKK, a capacidade de inibir esta via por ação direta e mais específica a proteína p65, podendo ser dependente da dose de PTL ou do tipo celular. Esta especificidade merece destaque, uma vez que é útil o desenvolvimento de uma molécula alvo-específica que apresente a menor toxicidade ao paciente, e neste sentido o PTL potencialmente inibiria esta via tão importante de maneira mais branda, tendo como alvo mais específico a subunidade p65, a qual desempenha um importante papel na transcrição de genes relacionados a progressão tumoral. Não obstante, este trabalho não esgota as ferramentas que comprovem esta ação direta de PTL na p65 e assim faz-se necessária maior investigação, como a análise da dose de inibição da ligação da p65 ao DNA em cada linhagem, assim como sua interação com a β -catenina em células que superexpressam esta proteína, tendo em vista que esta interação é um importante regulador negativo da atividade pró-tumoral de ambos fatores transcricionais.

Outro ponto que requer nossa atenção é o mecanismo pelo qual ocorre a inibição do potencial invasivo, pois uma dose muito baixa de PTL, que a princípio não apresentou atividade biológica, foi capaz de reduzir expressivamente este potencial, assim como sua atuação na reorganização da localização da E-caderina nos contatos intercelulares. Desta forma, além do mecanismo de inibição da via NF- κ B, a atuação do PTL na regulação epigenética pode explicar a ação de pequenas doses na reversão do potencial invasivo e a reorganização da E-caderina, através da regulação da HDAC1 ou DNMT, favorecendo ou impedindo a transcrição de genes implicados na regulação da E-caderina. Finalmente, a potencialização do efeito inibitório de PTL quando conjugado ao TNF- α , aponta para um importante sinergismo que também merece a nossa atenção, uma vez que esta citocina se encontra aumentada em pacientes oncológicos (WANG; LIN, 2008), confirmando-se este efeito, o PTL favoreceria o efeito pró-apoptótico do TNF- α , sendo mais um agente atuando contra a progressão tumoral, podendo ser futuramente aplicado no tratamento alvo-específico de pacientes com câncer colorretal que apresentem ativação aumentada na via de sinalização NF- κ B.

8 - CONCLUSÕES

- As células de CCR apresentam níveis basais da via NF- κ B diferencialmente ativos, com a Caco-2 apresentando níveis menores, a HT-29 níveis intermediários e HCT-116 níveis maiores de ativação;
- O PTL apresenta efeito célula-específico, sendo mais citotóxico nas células tumorais HCT-116, que apresentam a via NF- κ B mais ativa;
- O PTL previne a ativação da via NF- κ B induzida por TNF- α , através da redução da fosforilação de I κ B α e aumento I κ B α total, em células Caco-2 e HT-29;
- O PTL possui ação anti-tumoral, atuando na redução do potencial proliferativo de todas as linhagens, na redução do potencial invasivo e no restabelecimento da E-caderina nos contatos intercelulares das células HT-29 e HCT-116;
- O PTL apresenta efeito anti-tumoral potencializado na presença de TNF- α .

REFERÊNCIAS

- ABE, N. et al. Nuclear factor-kappaB sensitizes to benzyl isothiocyanate-induced antiproliferation in p53-deficient colorectal cancer cells. **Cell Death & Disease**, v. 5, n. 11, p. e1534, 20 nov. 2014.
- ADHIKARI, A.; XU, M.; CHEN, Z. J. Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3214–3226, 2007.
- ARVELO, F. Biology of colorectal cancer. **ecancermedicalsecience**, v. 9, 9 abr. 2015.
- BALKWILL, F. TNF- α in promotion and progression of cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, n. 3, p. 409–416, 2 set. 2006.
- BEG, A. A. et al. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- κ B. **Nature**, v. 376, n. 6536, p. 167–170, 13 jul. 1995.
- BEN-NERIAH, Y.; KARIN, M. Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. **Nature Immunology**, v. 12, n. 8, p. 715–723, ago. 2011.
- BISHEHSARI, F. et al. Epidemiological transition of colorectal cancer in developing countries: Environmental factors, molecular pathways, and opportunities for prevention. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 20, n. 20, p. 6055–6072, 28 maio 2014.
- BISWAS, D. K. et al. NF- κ B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 27, p. 10137–10142, 6 jul. 2004.
- BORK, P. M. et al. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF- κ B. **FEBS Letters**, v. 402, n. 1, p. 85–90, 3 fev. 1997.
- BRANTLEY, D. M. et al. Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) Regulates Proliferation and Branching in Mouse Mammary Epithelium. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, n. 5, p. 1445–1455, maio 2001.
- BRUECKNER, B.; LYKO, F. DNA methyltransferase inhibitors: old and new drugs for an epigenetic cancer therapy. **Trends in pharmacological sciences**, v. 25, n. 11, p. 551–554, 2004.
- CARLISI, D. et al. Parthenolide sensitizes hepatocellular carcinoma cells to trail by inducing the expression of death receptors through inhibition of STAT3 activation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 226, n. 6, p. 1632–1641, 1 jun. 2011.
- CHEN, Z. et al. β -catenin Overexpression in the Nucleus Predicts Progress Disease and Unfavourable Survival in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e63854, 24 maio 2013.
- CHUA, H. L. et al. NF- κ B represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. **Oncogene**, v. 26, n. 5, p. 711–724, 24 jul. 2006.
- COOKS, T. et al. Mutant p53 Prolongs NF- κ B Activation and Promotes Chronic Inflammation and Inflammation-Associated Colorectal Cancer. **Cancer Cell**, v. 23, n. 5, p. 634–646, 13 maio 2013.

CZYŻ, M. et al. Cell context-dependent activities of parthenolide in primary and metastatic melanoma cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 5, p. 1144–1157, 1 jul. 2010.

CZYŻ, M.; KOPROWSKA, K.; SZTILLER-SIKORSKA, M. Parthenolide reduces the frequency of ABCB5-positive cells and clonogenic capacity of melanoma cells from anchorage independent melanospheres. **Cancer Biology & Therapy**, v. 14, n. 2, p. 135–145, fev. 2013.

DAI, Y. et al. The NF (Nuclear factor)- κ B inhibitor parthenolide interacts with histone deacetylase inhibitors to induce MKK7/JNK1-dependent apoptosis in human acute myeloid leukaemia cells: Parthenolide Potentiates HDAC Inhibitor Lethality in AML. **British Journal of Haematology**, v. 151, n. 1, p. 70–83, 4 ago. 2010.

D'ANNEO, A. et al. Parthenolide generates reactive oxygen species and autophagy in MDA-MB231 cells. A soluble parthenolide analogue inhibits tumour growth and metastasis in a xenograft model of breast cancer. **Cell Death & Disease**, v. 4, n. 10, p. e891, 31 out. 2013.

DESANTIS, C. E. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014: Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2014. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 64, n. 4, p. 252–271, jul. 2014.

DE SOUZA, W.F. et al. Claudin-3 Overexpression increases the malignant potential of colorectal cancer cells: Roles of ERK 1/2 and PI3K-Akt as modulators of EGFR signaling. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 19 set. 2013.

DUNN, E. F. et al. Dasatinib sensitizes KRAS mutant colorectal tumors to cetuximab. **Oncogene**, v. 30, n. 5, p. 561–574, 3 fev. 2011.

EDWARDS, M. S. et al. A systematic review of treatment guidelines for metastatic colorectal cancer. **Colorectal Disease**, v. 14, n. 2, p. e31–e47, fev. 2012.

ESPLIN, E. D. Genomic era diagnosis and management of hereditary and sporadic colon cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 5, p. 1036, 2014.

GARCÍA-PIÑERES, A. J. et al. Cysteine 38 in p53/NF- κ B Plays a Crucial Role in DNA Binding Inhibition by Sesquiterpene Lactones. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 43, p. 39713–39720, 26 out. 2001.

GEHREN, A. S. et al. Alterations of the apical junctional complex and actin cytoskeleton and their role in colorectal cancer progression. **Tissue and Barriers**, v. 3, n. 3, e1017688, jul/ago/set. 2015.

GHANTOUS, A. et al. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 15–16, p. 668–678, ago. 2010.

GHANTOUS, A. et al. Inhibition of Tumor Promotion by Parthenolide: Epigenetic Modulation of p21. **Cancer Prevention Research**, v. 5, n. 11, p. 1298–1309, 1 nov. 2012.

GHANTOUS, A. et al. Parthenolide: from plant shoots to cancer roots. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 17–18, p. 894–905, set. 2013.

GOPAL, Y. N. V.; CHANCHORN, E.; DYKE, M. W. V. Parthenolide promotes the ubiquitination of MDM2 and activates p53 cellular functions. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, n. 3, p. 552–562, 1 mar. 2009.

GLOBOCAN. Estimated cancer incidence: mortality and prevalence worldwide in 2012. **International Agency for Research on Cancer**. World Health Organization. Acesso em: http://globocan.iarc.fr/Pages/facts_sheets_cancer.aspx

HAGGAR, F.; BOUSHEY, R. Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. **Clinics in Colon and Rectal Surgery**, v. 22, n. 04, p. 191–197, nov. 2009.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 3 abr. 2011.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Signaling to NF- κ B. **Genes & Development**, v. 18, n. 18, p. 2195–2224, 15 set. 2004.

HEHNER, S. P. et al. The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF- κ B by targeting the I κ B kinase complex. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 10, p. 5617–5623, 1999.

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **Molecular Cancer**, v. 12, p. 86, 2 ago. 2013.

HORST, D. et al. Invasion associated up-regulation of nuclear factor κ B target genes in colorectal cancer. **Cancer**, v. 115, n. 21, p. 4946–4958, 1 nov. 2009.

HUBER, M. A. et al. NF- κ B is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 4, p. 569–581, 16 ago. 2004.

HUELS, D. J. et al. E-cadherin can limit the transforming properties of activating β -catenin mutations. **The EMBO Journal**, 3 ago. 2015.

HWANG, I. et al. NF- κ B p65 represses β -catenin-activated transcription of cyclin D1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 403, n. 1, p. 79–84, 3 dez. 2010.

IACOPETTA, B. TP53 mutation in colorectal cancer. **Human Mutation**, v. 21, n. 3, p. 271–276, 1 mar. 2003.

IDRIS, A. I. et al. Pharmacologic inhibitors of I κ B kinase suppress growth and migration of mammary carcinosarcoma cells in vitro and prevent osteolytic bone metastasis in vivo. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, n. 8, p. 2339–2347, 1 ago. 2009.

ILYAS, M. et al. β -Catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 19, p. 10330–10334, 16 set. 1997.

JANG, A.-S. The Apical Junctional Complex in Respiratory Diseases. **Chonnam Medical Journal**, v. 50, n. 1, p. 1, 2014.

JASPERSON, K. W. et al. Hereditary and Familial Colon Cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2044–2058, jun. 2010.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69–90, 1 mar. 2011.

JIN, R. et al. Activation of NF-kappa B Signaling Promotes Growth of Prostate Cancer Cells in Bone. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 5 abr. 2013.

- KAISER, G. C.; POLK, D. B. Tumor necrosis factor alpha regulates proliferation in a mouse intestinal cell line. **Gastroenterology**, v. 112, n. 4, p. 1231–1240, abr. 1997.
- KALTSCHMIDT, B. et al. Repression of NF- κ B impairs HeLa cell proliferation by functional interference with cell cycle checkpoint regulators. **Oncogene**, v. 18, n. 21, p. 3213–3225, 1999.
- KE, T.-W. et al. MicroRNA-224 Suppresses Colorectal Cancer Cell Migration by Targeting Cdc42. **Disease Markers**, v. 2014, p. e617150, 10 abr. 2014.
- KIM et al. Parthenolide enhances sensitivity of colorectal cancer cells to TRAIL by inducing death receptor 5 and promotes TRAIL-induced apoptosis. **International Journal of Oncology**, v. 46, n. 3, p. 1121–1130, 1 jan. 2015a.
- KIM, H.-Y. et al. Balsalazide Potentiates Parthenolide-Mediated Inhibition of Nuclear Factor- κ B Signaling in HCT116 Human Colorectal Cancer Cells. **Intestinal Research**, v. 13, n. 3, p. 233–241, jul. 2015b.
- KIM, S. L. et al. Parthenolide induces apoptosis in colitis-associated colon cancer, inhibiting NF- κ B signaling. **Oncology Letters**, v. 9, n. 5, p. 2135–2142, maio 2015c.
- KISHIDA, Y.; YOSHIKAWA, H.; MYOUI, A. Parthenolide, a Natural Inhibitor of Nuclear Factor- κ B, Inhibits Lung Colonization of Murine Osteosarcoma Cells. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 1, p. 59–67, 1 jan. 2007.
- KWAK, S. W.; PARK, E. S.; LEE, C. S. Parthenolide induces apoptosis by activating the mitochondrial and death receptor pathways and inhibits FAK-mediated cell invasion. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 385, n. 1-2, p. 133–144, 25 set. 2013.
- LIU, J.-W. et al. Parthenolide induces proliferation inhibition and apoptosis of pancreatic cancer cells in vitro. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 29, n. 1, p. 108, 10 ago. 2010.
- LI-WEBER, M. et al. The anti-inflammatory sesquiterpene lactone parthenolide suppresses CD95-mediated activation-induced-cell-death in T-cells. **Cell Death and Differentiation**, v. 9, n. 11, p. 1256–1265, nov. 2002.
- LUEDDE, T.; SCHWABE, R. F. NF- κ B in the liver—linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 8, n. 2, p. 108–118, fev. 2011.
- MAGUDIA, K.; LAHOZ, A.; HALL, A. K-Ras and B-Raf oncogenes inhibit colon epithelial polarity establishment through up-regulation of c-myc. **The Journal of Cell Biology**, v. 198, n. 2, p. 185–194, 23 jul. 2012.
- MATHEMA, V. B. et al. Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone, Expresses Multiple Anti-cancer and Anti-inflammatory Activities. **Inflammation**, v. 35, n. 2, p. 560–565, abr. 2012.
- MCCAFFREY, L. M.; MACARA, I. G. Epithelial organization, cell polarity and tumorigenesis. **Trends in Cell Biology**, v. 21, n. 12, p. 727–735, dez. 2011.
- MEIRA, L. B. et al. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. **Journal of Clinical Investigation**, 1 jun. 2008.
- MICALIZZI, D. S.; FARABAUGH, S. M.; FORD, H. L. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 15, n. 2, p. 117–134, jun. 2010a.

MICALIZZI, D. S.; FARABAUGH, S. M.; FORD, H. L. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 15, n. 2, p. 117–134, jun. 2010b.

MIN, H.-Y. et al. Inhibition of cell growth and potentiation of tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced apoptosis by a phenanthroindolizidine alkaloid antofine in human colon cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 9, p. 1356–1364, nov. 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa 2014 - Incidência de câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva**. Brasil 2014.

MIYOSHI, J.; TAKAI, Y. Structural and functional associations of apical junctions with cytoskeleton. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, Apical Junctional Complexes Part I. v. 1778, n. 3, p. 670–691, mar. 2008.

MORIN, P. J. β -catenin signaling and cancer. **BioEssays**, v. 21, n. 12, p. 1021–1030, 1 dez. 1999.

MUNDADE, R. et al. Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. **Oncoscience**, v. 1, n. 6, p. 400, 2014.

NAKABAYASHI, H.; SHIMIZU, K. Involvement of Akt/NF- κ B pathway in antitumor effects of parthenolide on glioblastoma cells in vitro and in vivo. **BMC cancer**, v. 12, n. 1, p. 453, 2012.

NAPETSCHNIG, J.; WU, H. Molecular Basis of NF- κ B Signaling. **Annual review of biophysics**, v. 42, p. 443–468, 6 maio 2013.

NELSON, W. J. Regulation of cell–cell adhesion by the cadherin–catenin complex. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, n. 2, p. 149, 1 abr. 2008.

NEUNLIST, M. et al. The digestive neuronal–glial–epithelial unit: a new actor in gut health and disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, n. 2, p. 90–100, 20 nov. 2012.

OECKINGHAUS, A.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. **Nature Immunology**, v. 12, n. 8, p. 695–708, 19 jul. 2011.

OKA, D. et al. Sesquiterpene lactone parthenolide suppresses tumor growth in a xenograft model of renal cell carcinoma by inhibiting the activation of NF- κ B. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 12, p. 2576–2581, 15 jun. 2007.

PAHL, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6853–6866, 22 nov. 1999.

PEDDAREDDIGARI, V. G.; WANG, D.; DUBOIS, R. N. The Tumor Microenvironment in Colorectal Carcinogenesis. **Cancer Microenvironment**, v. 3, n. 1, p. 149–166, 5 mar. 2010.

PERKINS, N. D. Cysteine 38 Holds the Key to NF- κ B Activation. **Molecular Cell**, v. 45, n. 1, p. 1–3, 13 jan. 2012.

PERTZ, O. et al. A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. **The EMBO journal**, v. 18, n. 7, p. 1738–1747, 1999.

- PIKARSKY, E. et al. NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. **Nature**, v. 431, n. 7007, p. 461–466, set. 2004.
- RADEFF-HUANG, J. et al. Tumor Necrosis Factor- α -stimulated Cell Proliferation Is Mediated through Sphingosine Kinase-dependent Akt Activation and Cyclin D Expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 2, p. 863–870, 12 jan. 2007.
- SAKAMOTO, K. et al. Constitutive NF- κ B Activation in Colorectal Carcinoma Plays a Key Role in Angiogenesis, Promoting Tumor Growth. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 7, p. 2248–2258, 1 abr. 2009.
- SAKAMOTO, K.; MAEDA, S. Targeting NF-kappaB for colorectal cancer. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 14, n. 6, p. 593–601, jun. 2010.
- SEN, R.; BALTIMORE, D. Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. **Cell**, v. 47, n. 6, p. 921–928, 26 dez. 1986.
- SEN, R.; SMALE, S. T. Selectivity of the NF- κ B Response. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 4, abr. 2010.
- SEUFERT, B. L. et al. I κ BK β and NF κ B1, NSAID use and risk of colorectal cancer in the Colon Cancer Family Registry. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 1, p. 79–85, jan. 2013.
- SHAKED, H. et al. Chronic epithelial NF- κ B activation accelerates APC loss and intestinal tumor initiation through iNOS up-regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 35, p. 14007–14012, 28 ago. 2012.
- SHANMUGAM, R. et al. A water soluble parthenolide analog suppresses in vivo tumor growth of two tobacco-associated cancers, lung and bladder cancer, by targeting NF- κ B and generating reactive oxygen species. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 10, p. 2481–2494, 15 maio 2011.
- SILLA, I. O. Early-onset colorectal cancer: A separate subset of colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 46, p. 17288, 2014.
- SOLANAS, G. et al. E-cadherin controls β -catenin and NF- κ B transcriptional activity in mesenchymal gene expression. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 13, p. 2224–2234, 1 jul. 2008.
- STEPNIAK, E.; RADICE, G. L.; VASIOUKHIN, V. Adhesive and Signaling Functions of Cadherins and Catenins in Vertebrate Development. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 5, p. a002949–a002949, 1 nov. 2009.
- SUN, Y. et al. The radiosensitization effect of parthenolide in prostate cancer cells is mediated by nuclear factor- κ B inhibition and enhanced by the presence of PTEN. **Molecular cancer therapeutics**, v. 6, n. 9, p. 2477–2486, set. 2007.
- SUN, Z.; ANDERSSON, R. NF-kappaB activation and inhibition: a review. **Shock (Augusta, Ga)**, v. 18, n. 2, p. 99–106, ago. 2002.
- TAKAI, E. et al. Parthenolide reduces cell proliferation and prostaglandin estradiol synthesis in human endometriotic stromal cells and inhibits development of endometriosis in the murine model. **Fertility and Sterility**, v. 100, n. 4, p. 1170–1178, 1 out. 2013.

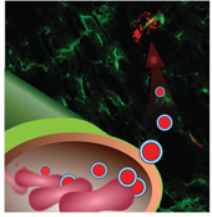
- TAKEICHI, M. Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 397–410, 14 maio 2014.
- TARRAGA; ALBERO, J.; MONTES, J. Primary and Secondary Prevention of Colorectal Cancer. **Clinical Medicine Insights: Gastroenterology**, p. 33, jul. 2014.
- THOMASOVA, D. et al. p53-Independent Roles of MDM2 in NF- κ B Signaling: Implications for Cancer Therapy, Wound Healing, and Autoimmune Diseases. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 14, n. 12, p. 1097–1101, dez. 2012.
- VOGELMANN, R.; NELSON, W. J. Fractionation of the epithelial apical junctional complex: reassessment of protein distributions in different substructures. **Molecular biology of the cell**, v. 16, n. 2, p. 701–716, 2005.
- WANG, H. et al. Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) Induced by TNF- α Requires AKT/GSK-3 β -Mediated Stabilization of Snail in Colorectal Cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e56664, 19 fev. 2013.
- WANG, X.; LIN, Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 29, n. 11, p. 1275–1288, nov. 2008.
- WENG, S. et al. Parthenolide inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells through induction of G0/G1 phase cell cycle arrest*. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 10, n. 7, p. 528–535, jul. 2009.
- WHIPPLE, R. A. et al. Parthenolide and costunolide reduce microtentacles and tumor cell attachment by selectively targeting deetyrosinated tubulin independent from NF- κ B inhibition. **Breast Cancer Research : BCR**, v. 15, n. 5, p. R83, 2013.
- WIDERA, D. et al. Tumor necrosis factor α triggers proliferation of adult neural stem cells via IKK/NF- κ B signaling. **BMC Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 64, 20 set. 2006.
- WU, Y.; ZHOU, B. P. TNF- α /NF- κ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. **British Journal of Cancer**, v. 102, n. 4, p. 639–644, 19 jan. 2010.
- XIAO, G.; FU, J. NF- κ B and cancer: a paradigm of Yin-Yang. **American Journal of Cancer Research**, v. 1, n. 2, p. 192–221, 6 dez. 2010.
- XIN, Y. et al. Parthenolide reverses doxorubicin resistance in human lung carcinoma A549 cells by attenuating NF- κ B activation and HSP70 up-regulation. **Toxicology Letters**, v. 221, n. 2, p. 73–82, 14 ago. 2013.
- XU, Y. et al. KEAP1 is a redox sensitive target that arbitrates the opposing radiosensitive effects of parthenolide in normal and cancer cells. **Cancer Research**, v. 73, n. 14, p. 4406–4417, 15 jul. 2013.
- YANG, J.-Y. et al. MDM2 Promotes Cell Motility and Invasiveness by Regulating E-Cadherin Degradation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 19, p. 7269–7282, out. 2006.
- YUN, B.-R. et al. Enhancement of parthenolide-induced apoptosis by a PKC- α inhibition through heme oxygenase-1 blockage in cholangiocarcinoma cells. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 42, n. 11, p. 787–797, 30 nov. 2010.
- ZHANG, K. et al. Activation of NF- κ B upregulates Snail and consequent repression of E-cadherin in cholangiocarcinoma cell invasion. **Hepato-Gastroenterology**, v. 58, n. 105, p. 1–7, fev. 2011.

ZHAO, L. J.; XU, Y. H.; LI, Y. Effect of parthenolide on proliferation and apoptosis in gastric cancer cell line SGC7901. **Journal of Digestive Diseases**, v. 10, n. 3, p. 172–180, 1 ago. 2009.

ZHAO, X.; LIU, X.; SU, L. Parthenolide induces apoptosis via TNFRSF10B and PMAIP1 pathways in human lung cancer cells. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR**, v. 33, n. 1, p. 3, 6 jan. 2014.

ZUCH, D. et al. Targeting Radioresistant Osteosarcoma Cells with Parthenolide. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 4, p. 1282–1291, abr. 2012.

ANEXO



Alterations of the apical junctional complex and actin cytoskeleton and their role in colorectal cancer progression

Adriana Sartorio Gehren, Murilo Ramos Rocha, Waldemir Fernandes de Souza & José Andrés Morgado-Díaz

To cite this article: Adriana Sartorio Gehren, Murilo Ramos Rocha, Waldemir Fernandes de Souza & José Andrés Morgado-Díaz (2015) Alterations of the apical junctional complex and actin cytoskeleton and their role in colorectal cancer progression, Tissue Barriers, 3:3, e1017688, DOI: [10.1080/21688370.2015.1017688](https://doi.org/10.1080/21688370.2015.1017688)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/21688370.2015.1017688>



Accepted online: 23 Feb 2015. Published online: 23 Feb 2015.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 59



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Alterations of the apical junctional complex and actin cytoskeleton and their role in colorectal cancer progression

Adriana Sartorio Gehren, Murilo Ramos Rocha, Waldemir Fernandes de Souza, and José Andrés Morgado-Díaz*

Program of Cellular Biology; Brazilian National Cancer Institute (INCA); Rio de Janeiro, Brazil

Keywords: actin cytoskeleton, adherens junction, apical junctional complex, colorectal cancer, epithelial mesenchymal transition, invasiveness, metastasis, migration, tight junction

Abbreviations: AJC, apical junctional complex; TJ, tight junctions; AJ, adherens junction; ZO, zonula occludens; ERK, extracellular signal-regulated kinase; PI3K, phosphoinositide-3 kinase; CRC, colorectal cancer; Cav-1, caveolin-1; JAMs, junctional adhesion molecules; MAGUK, membrane associated guanylate kinase homolog; EGFR, epidermal growth factor receptor; CD1, cyclin D1; ZONAB, transcription factor zonula occludens 1 (ZO-1)-associated nucleic acid binding protein; MARVEL, MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link; MAGI 1, membrane associated guanylate kinase inverted; EMT, epithelial mesenchymal transition; NF- κ B, factor nuclear kappa B; APC, adenomatous polyposis coli; CTNNB1, catenin (cadherin-associated protein), β 1; ARP2/3, actin-related proteins 2 and 3; ROCK, Rho-associated protein kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; Rap1, Ras-related protein 1; N-WASP, neuronal Wiskott–Aldrich Syndrome protein; VASP, vasodilator-stimulated phospho-protein; GSK-3 β , glycogen synthase kinase 3 β ; NM II, non-muscle myosin class II; MLCK, myosin light-chain kinase; PGE₂, prostaglandin E₂; LPA, lysophosphatidic acid; FAK, focal adhesion kinase; TGF- β , transforming growth factor β ; CTX, thymocyte marker for *Xenopus*

Colorectal cancer represents the fourth highest mortality rate among cancer types worldwide. An understanding of the molecular mechanisms that regulate their progression can prevent or reduce mortality due to this disease. Epithelial cells present an apical junctional complex connected to the actin cytoskeleton, which maintains the dynamic properties of this complex, tissue architecture and cell homeostasis. Several studies have indicated that apical junctional complex alterations and actin cytoskeleton disorganization play a critical role in epithelial cancer progression. However, few studies have examined the existence of an interrelation between these 2 components, particularly in colorectal cancer. **This review discusses the recent progress toward elucidating the role of alterations of apical junctional complex constituents and of modifications of actin cytoskeleton organization and discusses how these events are interlinked to modulate cellular responses related to colorectal cancer progression toward successful metastasis.**

Introduction

The intestinal mucosa plays a critical role in forming a barrier that separates luminal contents from the underlying interstitium. The primary structure that regulates this intestinal barrier is the apical junctional complex (AJC), which is formed by the tight junctions (TJs) and adherens junctions (AJs) that contribute to

apical-basal cell polarity maintenance and to cell signaling events.^{1,2} TJs and AJs are highly organized structures that are composed of transmembrane proteins, which are associated with cytoplasmic proteins that are directly or indirectly connected to the actin cytoskeleton. Transmembrane proteins and their cytoplasmic adaptor proteins work both individually and in combination as a functional module to establish and to maintain the AJC. Additionally, the proteins present in the AJC act together with the apical actin cytoskeleton to confer dynamic properties to this complex and to maintain many cellular functions.

Currently, the loss of epithelial organization is a hallmark of cancer, with neoplastic cells frequently exhibiting structural and functional deficiencies in the AJC.³ This notion has been supported by the following findings: (a) TJ proteins play critical roles in the neoplastic process as couplers of the extracellular milieu to intracellular signaling pathways and to the cytoskeleton,^{4,5} (b) alterations in TJ integrity can lead to the increased diffusion of nutrients and other factors critical for tumor growth and survival and may be an important step in developing a metastatic phenotype,^{6,7} and (c) the overall down-regulation of E-cadherin, which is an important AJ protein, is related to carcinoma development.⁸ However, only a few studies have shown the interrelation between the disorganization of the AJC and the actin cytoskeleton in the development of human malignancies. In the present review, we will discuss the recent progress in elucidating the roles of altered proteins that constitute the AJC and of modifications of actin organization and how these 2 events are interlinked to modulate cellular responses related to the progression of colorectal cancer (CRC), which is the fourth most common cause of cancer mortality worldwide.⁹

*Correspondence to: José Andrés Morgado-Díaz; Email: jmorgado@inca.gov.br
Submitted: 12/01/2014; Revised: 01/31/2015; Accepted: 02/06/2015
<http://dx.doi.org/10.1080/21688370.2015.1017688>

Altered Expression of AJC Proteins in CRC

Previous studies in animal models and cell culture have defined essential components of apical junction formation and cell polarity and have revealed biochemical interactions among more than 40 transmembrane and cytoplasmic proteins.¹⁰ The identified AJC proteins include integral transmembrane proteins, scaffold proteins, kinases, phosphatases, small GTPases, transcription factors, and actin binding proteins. A list of AJC proteins is provided in a recent review by Quiros and Nusrat.¹¹

Many studies have described the deregulation of AJC proteins in samples of human cancers and in cell lines; this deregulation can be the result of up-regulated and down-regulated expression, epigenetic changes, and protein activation and location changes. Thus, we will discuss the causes of deregulation and their contributions to events related to CRC progression in this section.

Integral Membrane Proteins in TJs

Claudins

Claudins are primary proteins involved in TJ formation and paracellular barrier function. These proteins are composed of 4 transmembrane domains and 2 extracellular loops, with N- and C-terminal tails facing the cytoplasm. Claudins act in cell adhesion through interactions between claudins in adjacent cell membranes and between claudins within the same cell membrane.^{12,13} Furthermore, these proteins can connect to other TJ transmembrane proteins, such as occludin.¹⁴ Claudins also play important roles in cytoskeletal organization, signaling pathways, and vesicle transport. Claudins are directly associated with scaffold proteins, such as ZO1/2, during these processes.¹³ The claudin family has 27 members that exhibit distinct expression patterns for each function. Alterations in the expression and localization of these proteins have been correlated to the disturbance of homeostasis, contributing to many diseases, including various types of cancer.¹⁵ Table 1 summarizes the apical junctional proteins that are differentially expressed or mislocalized in CRC and associates this event with a functional response.

Resnick and co-workers demonstrated that low claudin-1 expression is directly associated with a higher grade of colorectal tumor. In this study, multivariate analysis indicated that lymphovascular invasion and low levels of claudin-1 expression were independent predictors of recurrence, which were also associated with poor survival of patients with colon cancer.¹⁶ Controversially, other authors observed increased claudin-1 and decreased claudin-7 expression in SW620 colon cells, which are derived from a metastatic site. Moreover, claudin-1 redistribution of the cell-cell contacts to the nucleus was observed as compared normal mucosa with adenoma in ApcMin/+ mice.¹⁷ Additionally, the increased expression of claudin-1, -3, and -4, which correlated with TJ disorganization and with increased cell permeability in human colon cancer samples.¹⁸

Significant claudin-8 downregulation and claudin-1 and -12 up-regulation were found in microdissected human colon cancer specimens compared with normal tissue, indicating that these

proteins may represent potential molecular targets in colon cancer.¹⁹ Martin and Jiang demonstrated that Smad4 inhibits claudin-1 expression and that this event contributes to inhibit the invasiveness of colon cancer cells.²⁰

Darido and coworkers showed that claudin-7 was negatively regulated by the Wnt pathway in normal colon tissue and that this regulation was lost in tumor cells, possibly due to decreased Sox-9 activity leading to claudin-7 overexpression, cell polarity disruption, increased proliferation and tumorigenicity.²¹ Furthermore, increased claudin-2 expression in colon cancer cells has been related to 5-FU resistance, increased cell proliferation, anchorage-independent growth, and tumor growth *in vivo*.²² Claudin-1 expression modulates anoikis in colon cancer in a Src-Akt-Bcl 2-dependent manner, which influences invasion and metastasis.²³ Recently, claudin-1 expression was able to induce colonic epithelial proliferation in a Notch-dependent manner in transgenic mice with specific overexpression of claudin-1 in the intestinal epithelium.²⁴ We have shown that EGF-induced claudin-3 overexpression is associated with the increased malignant potential of HT-29 cells and that the ERK1/2 and PI3K-Akt pathways are important regulators of this event. Importantly, the impaired paracellular flux of macromolecules in HT-29 cells that overexpress claudin-3 confirms the correlation between impaired epithelial barrier function and colorectal tumorigenesis.²⁵ Additionally, α - and β -Na,K-ATPase down-regulation and ERK1/2 activation induced by ouabain was able to increase claudin-3 levels, impairing the TJ barrier function and increasing cell viability and proliferation.²⁶ The presented studies show that altered expression of claudins is acting to favor initial steps of CRC progression, such as disturbed cell polarity, increased paracellular permeability, and enhanced cell migration. The mechanisms that regulate these molecular events are yet poorly understood, and future studies are needed to define the pathological relevance of claudins and exploit these proteins as potential therapeutic targets either for drug delivery or as diagnostic/prognostic markers in colorectal cancer.

Occludin

Occludin belongs to the tetramembrane-spanning TAMP family. Occludin appears to be unessential for TJ barrier formation because occludin knock-out mice showed normal TJ strand formation.²⁷ However, occludin, which is recruited by claudins, participates in TJ formation and in paracellular flux regulation.²⁸ An early study using Caco-2 cells demonstrated that oxidative stress induced by c-Src kinase caused TJ disassembly with the loss of occludin expression at the intracellular contacts.²⁹ Samples of hepatic metastasis from colon cancer presented downregulated occludin compared with normal liver tissue.³⁰ Generally, existing data show that human CRC tissues present decreased occludin expression compared with normal controls. Furthermore, this decrease also correlates with tumor grade because more advanced lesions show progressively less occludin expression compared to less advanced lesions.³¹ Recently, hypoxic tumors displayed increased Cav-1 expression in Caco-2 cells, which may lead to decreased occludin expression and to increased paracellular permeability.³²

Table 1. Altered expression/localization of AJC proteins and their roles in functional responses in CRC

Junctional Protein	Expression/localization	Colon cancer model	Cellular function response	Reference
Claudin-1	down	Human tissue	Higher tumor grade/ predictors of tumor recurrence and poor survival	23
	up	Human tissue	Carcinoma progression and metastasis/disorganization and increased cell permeability	17–19
	up	Transgenic mouse	Colonic epithelial proliferation	24
	up	SW480 and SW620 cells	Cell differentiation inhibition and resistance to anoikis	23
Claudin-2	up	Caco-2 cells, Mouse	Resistance to 5-FU, increased cell proliferation, anchorage independent growth and tumor growth <i>in vivo</i>	22
Claudin-3	up	HT-29 cells	Increased malignant potential, cell viability and proliferation, and impaired TJ barrier function	25,26
Claudin-7	up	HT-29, SW480 cells and metastatic human tissue	Cell polarity disruption, proliferation and tumorigenicity increased	21
Claudin-8	down	Human tissue	Tumoral progression	19
Claudin-12	up	Human tissue	Tumoral progression	19
Occludin	down	Human tissue	Progression of colon lesions	31
	down	Hepatic metastasis from colon cancer	Tumoral progression	30
JAM-A	down	Caco-2 cells	Increased permeability	29,32
	down	Mouse	Permeability and proliferation increased	35
ZO-1	down	Human tissue	Tumoral progression	39–41
Symplekin	down	HT-29 cells	Decrease proliferation and down regulation of Claudin-2 cell differentiation	42,44
E-cadherin	down	Human tissue	Increase SNAIL and TWIST activity, metastasis and invasiveness	51–53
	down	HT-29 cells	Cell-cell adhesion loss/cell migration and invasion increased	26,56
β-Catenin	up	Human tissue	Tumor progression	54
	Nuclear localization	Human tissue	Tumor progression and worse prognosis/worse overall survival	59–61
p-120 catenin	up	Human tissue/Caco-2 cells	Poor overall survival/ Increased proliferation	66,144
	Nuclear localization	Human tissue	Increased proliferation/ adherens junctions loss	71
	up	Human tissue/ HT-29 cells	Proliferative cancer tissue/aberrant mitosis and polyploidy	70,145
Afadin	Cytosolic localization	HCT-116 cells	Increased migration/Rho activity increased	75
	Cytosolic localization	LIM1863 cells	EMT phenotype induction	72
	down	Mouse	Increased paracellular permeability/mislocalization of nectin-2 and -3	146

JAM

TJs include junctional adhesion molecules (JAMs) that belong to the cortical thymocyte marker for *Xenopus* (CTX) family of proteins. The JAM family encompasses 3 classical members (JAM-A, JAM-B, and JAM-C) and related molecules. Current evidence indicates that only JAM-A is expressed on mucosal epithelial cells and is directly involved in TJ formation and maintenance.³³ However, the JAM-A function is not restricted to TJ formation because the expression of this protein often correlates with functional changes such as reduced paracellular permeability and enhanced electrical resistance in colon cancer cells.³⁴ For instance, JAM-A deficiency enhanced colonic inflammation, permeability and epithelial cell proliferation in mice.³⁵ Additionally, the loss of JAM-A together with Afadin or PDZ-GEF2 lead to decreased level of activated Rap1, β1 integrin, and cell migration in human colonic epithelial cells, suggesting that JAM-A dimerization facilitates the formation of a complex Afadin/PDZ-GEF2, which activates Rap1A and in turn regulates the levels of β1 integrin and cell migration.³⁶ However, although the molecular mechanisms by which JAM-A controls the epithelial barrier

are beginning to be understood, its role in CCR progression remains unknown.

TJ Adaptor Proteins

Zona occludens-1, -2 and -3

Zona occludens-1, -2 and -3 form a group of proteins that belongs to the MAGUK (membrane-associated guanylate kinase homolog) protein family. These proteins present a conserved modular organization of domains with homology to functionally defined signaling molecules such as a Src homology region 3 (SH3 domain), a region homologous to guanylate kinases, and PDZ domains.³⁷ TJ formation was delayed in ZO-1-deficient epithelial Eph4 cells, whereas deficiencies of ZO-2 and/or ZO-3 did not delay TJ formation, suggesting that ZO-1 plays a major role in the formation of belt-like TJs, unlike ZO-2 and ZO-3.³⁸ ZO-1 and occludin showed the same expression profile in normal epithelium of the digestive tract; however, the expression of these 2 proteins was reduced in poorly differentiated adenocarcinomas,

indicating a significant correlation between tumor differentiation and ZO-1 and occludin protein expression.³⁹

In a study by using primary tumors of colorectal cancer with liver metastasis it was showed that the levels of expression of ZO-1 and E-cadherin were decreased, indicating that the decreased level of these proteins correlates with liver metastasis in this cancer type.⁴⁰ In addition, another study showed that primary colon tumors display an undifferentiated phenotype because ZO-1 was down-regulated by its association with epidermal growth factor receptor (EGFR). EGFR associated with ZO-1 was highly tyrosine-phosphorylated only in the primary CRC but was dephosphorylated in liver-metastasized cancer where cell redifferentiation occurs.⁴¹ The importance of both ZO-2 and -3 proteins in colon cancer have not been reported.

Symplekin

Symplekin is a ubiquitously expressed protein that is enriched in the nucleus and that associates with TJs in polarized epithelial cells. At the TJ, the function of symplekin is not defined, however several studies have shown that it is involved in RNA polyadenylation and transcriptional regulation mechanisms. This protein also interacts directly with transcription factors such as, HSF1 and ZONAB/DbpA to promote the transcription of genes related to stress response or epithelial cell proliferation.⁴²

A few studies have found correlations between symplekin and CRC progression. Its depletion in HT-29 cells correlates with the reduced transcription of *CD1*, which is a ZONAB target gene.⁴² Buchert et al. showed that symplekin was strongly expressed in human colon cancer and that its downregulation reduced tumor growth in *in vivo* and *in vitro* models.⁴³ Symplekin and ZONAB silencing cooperates to down-regulate claudin-2 mRNA expression, cell proliferation and cyclin D1 expression in HT-29 CRC cells. Furthermore, the symplekin/ZONAB complex inhibits goblet cell differentiation by repressing the AML1/Runx1 transcription factor.^{43,44}

Other relevant proteins that are important for tricellular contact formation, including the TJ proteins tricellulin and MARVEL D3 and the adaptor proteins MAGI 1, cingulin/paracingulin and ubinuclein, were not discussed in this review because the roles of these proteins in colon cancer have not yet been described.

AJ Proteins

The epithelial AJ core includes interactions among transmembrane glycoproteins that consist of 2 basic adhesive units: (a) the E-cadherin/catenin family and (b) nectin/afadin complexes.^{10,45} Adherens junctions perform multiple functions, including the initiation and stabilization of cell-cell adhesion, as well as cell signaling.

E-cadherin

E-cadherin is a single-pass transmembrane glycoprotein that mediates Ca^{2+} -dependent intercellular adhesion with a conserved cytoplasmic tail and with an extracellular domain formed of 5 cadherin repeats that mediate homophilic binding between

cadherins of neighbor cells.^{46,47} On their cytosolic tail, cadherins interact with a protein complex that is composed of α -, β - and p120-catenin, which links to the actin cytoskeleton and to several signaling pathways in a highly dynamic manner.^{48,49}

E-cadherin dysregulation has been classically associated with tumor progression in several epithelial cancers, including CRC. E-cadherin down-regulation has been associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT), as well as with the upregulation of genes such as *SNAIL* and *TWIST* during the development of colorectal adenomas in patients.⁵⁰ Immunohistochemical analysis of human colon cancer samples showed that the loss of E-cadherin (70%) was frequently observed in association with tumor progression and was considered a crucial event that favors metastasis and invasiveness.^{51,52} *cKIT* gene suppression by NF- κ B caused an increase in Slug activity and consequently decreased E-cadherin expression in colon cancer cells, contributing to liver metastasis.⁵³ However, one tissue screening study correlated increased E-cadherin expression with Rab11 expression, which was associated with colon cancer progression.⁵⁴ Our group verified that the inhibition of post-translational modifications in E-cadherin, such as *N*-linked glycosylation, induced cell-cell adhesion and decreased proliferation in CRC cells.⁵⁵ Furthermore, we found that ouabain induced both α - and β -Na,K-ATPase downregulation and ERK1/2 activation, which are interlinked events that play important roles in the cellular redistribution of E-cadherin, inducing cell-cell adhesion loss, an important step during CRC progression.²⁶ Recently, we also demonstrated that CRC cell progenies that are resistant to irradiation can generate more aggressive cellular progeny with a EMT-like phenotype, as well as with reduced E-cadherin expression and β -catenin overexpression.⁵⁶

α -, β - and p-120 Catenin

The two primary functions of β -catenin are to provide dynamic adhesive connection between epithelial cells and the involvement in gene regulation interacting with transcriptional machinery in the nucleus acting as transcriptional co-factors. When β -catenin interacts with E-cadherin, AJs form and stabilize; however, when β -catenin is free in the cytoplasm, this protein may then translocate into the nucleus. Once in the nucleus, β -catenin can activate the transcription of Wnt/ β -catenin target genes.⁵⁷ In CRC, 90% of all tumors have a mutation in a key regulatory factor of the Wnt/ β -catenin pathway, most often in *APC* or *CTNNB*, which is the gene that encodes the β -catenin protein, resulting in the activation of the Wnt/ β -catenin pathway. *CTNNB1* mutations are found more often in small colorectal adenomas than in invasive carcinomas, whereas other studies have found that *CTNNB1* mutations are associated with CRC in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome.⁵⁸ The dysfunction of the Wnt/ β -catenin signaling pathway is important in CRC progression and results in the nuclear accumulation of β -catenin. β -catenin, which is an EMT-associated marker, plays a key role in CRC progression; however, the prognostic significance of β -catenin expression in patients with CRC remains controversial. For instance, some studies have shown that nuclear β -catenin expression is directly associated with high tumor budding and with a poor prognosis.⁵⁹⁻⁶¹ However, in other studies,

this association depends on other factors beyond β -catenin.⁶²⁻⁶⁴ Additionally, a recent study revealed that β -catenin overexpression correlated with a favorable outcome to treatment but not with a predictive factor.⁶⁵ Recently, changes in β -catenin expression levels were also associated with aggressive morphological features, EMT and a poor prognosis in patients with CRC, as analyzed by immunohistochemistry.⁶⁶ Additional large-scale prospective studies will be necessary to determine the accurate prognostic significance of β -catenin.

In vitro studies using epithelial cells have shown that α -catenin is a key linker between F-actin and the AJ. α -catenin recruits actin regulatory proteins including vinculin, zyxin, Ena/VASP proteins, formins and ARP2/3 complex members. Actin polymerizing proteins control F-actin polymerization by themselves and frequently in Rho-associated protein kinase (ROCK)-independent fashion.⁶⁷ In a study using colorectal cancer cells, HCT-116 it was shown that α -catenin seems to facilitate the interaction between β -catenin and the APC complex, leading to the degradation of β -catenin. A point mutation in α -catenin prevented binding to β -catenin, which, in turn, also prevented β -catenin ubiquitylation, proteolysis and promoted β -catenin nuclear translocation. In addition, binding to APC might affect α -catenin-mediated cell adhesion and reorganization of the actin cytoskeleton leading to the misregulation of these events in cancer.⁶⁸

p120 catenin binds to the juxtamembrane domain of E-cadherins. This protein stabilizes E-cadherin to the cell membrane and suppresses cadherin internalization, enhancing the surface abundance of this protein. The removal of p120 catenin greatly increases E-cadherin internalization in mammalian cells,⁴⁹ which could therefore result in tumor-and/or metastasis-promoting activities similar to those caused by E-cadherin down-regulation.⁶⁹

The initial studies analyzing colon tissue samples to determine p120 expression in normal and tumor mucosa verified the correlation between p120 overexpression and high cell proliferation.⁷⁰ Subsequent studies showed the importance of the subcellular localization of p120 with AJ loss.⁷¹ Bellocin et al. observed reduced p120-catenin-E-cadherin coprecipitation during EMT, which correlates with the formation of a p120/RhoA complex in colon cancer cells.⁷² This p120/RhoA interaction seems to correlate with p120-catenin tyrosine phosphorylation in colon cancer cells.⁷³ K-ras gene mutation in Caco-2 cells stimulated cell migration, decreasing E-cadherin/ β -catenin/p120 complex formation via MAPK signaling and increasing Rho activity.⁷⁴ p120 catenin phosphorylation in HCT-116 cells was associated with its increased internalization and with cell migration, as well as with altered Rho GTPase activity via an interaction with VAV2, which is an oncogene that controls actin cytoskeleton dynamics.⁷⁵

AF-6/Afadin

AF-6, or afadin, is a novel intracellular AJ protein that interacts with the cytoplasmic region of nectins, which are immunoglobulin-like cell adhesion molecules at AJs, and linking nectins to the actin cytoskeleton.⁷⁶ AF-6/afadin expression level has been recently found to be adversely correlated with the prognosis and

disease-free survival of breast cancer patients. Also, the loss of AF-6/afadin expression induced metastatic phenotype in breast cancer cells via activation of ERK pathway.⁷⁷ Recently, a study showed that exist an interaction between CTRF, a cAMP-activated chloride channel localized at the apical membrane of epithelial cells, and AF-6/Afadin involved in the pathogenesis of colon cancer indicating the 2 proteins as potential novel markers of metastasis and prognostic predictors for human colon cancer.⁷⁸

GTPases

A series of studies have suggested that the E-cadherin-catenin, nectin-afadin, and claudin-ZO systems act not only as a mechanical complex to connect the actin cytoskeleton but also as a scaffold for cell signaling. Thus, the temporal and spatial regulation of contractility via Rho family protein activities is necessary for epithelial homeostasis and morphogenesis.¹⁰ In the next section, we will discuss the interrelation between Rho GTPase members and AJC components and how alterations in this balance could be crucial in events related to cancer progression.

As discussed in this section, an understanding of the molecular structure, action mechanism and AJC component functions are potentially important targets for anti-cancer research and possible areas for future therapeutics.

Cross-Talk Between the AJC and the Actin Cytoskeleton

The correct assembly and maintenance of the AJC and its above-mentioned related proteins are essential for the preservation of tissue integrity. However, epithelial sheets are not a static unit; they constantly face different conditions and remodeling due to several cellular functions.⁷⁹ The driver of these changes is the actomyosin cytoskeleton, which provides structure and which generates force. Cellular processes require the quick and efficient reorganization of actin filaments, which is achieved by structural and regulatory proteins. The effectiveness of cell adhesion is not only determined by the strength of the connection between intercellular junction proteins but also by the intracellular links between the AJC proteins and AJC adaptors to the actin cytoskeleton.¹⁰ The cytoskeleton, which consists of a dense and ever-changing network of filaments, is responsible for preserving cell morphology and for orchestrating processes such as cell proliferation and migration, all which, when deregulated, may trigger or favor the development of tumorigenesis. The interlink between the AJC components and the actin cytoskeleton to mediate important cellular events will be briefly discussed in the next section.

Interlink between TJ proteins and the actin cytoskeleton

The correct assembly of the 3 primary transmembrane components of TJs, claudins, occludin and JAMs, and of the cytoskeleton proteins, including actin,⁸⁰ non-muscle myosin 2A, 2B,

2C⁸¹ and microtubules, is essential for preserving the barrier established by TJs in the epithelial sheet.⁸² This linkage occurs via the adaptor proteins ZO-1, -2 and -3^{83,83,84} and via certain scaffolding proteins, such as cingulin and afadin.⁸⁵ Cingulin binds directly to ZO-1 and is involved in junction formation, GTPase regulatory protein recruitment^{86,87} and microtubule association.⁸⁸ Afadin is present in both TJs and AJs.^{89,90} Afadin links with JAM-A and ZO-1, playing an important role in the formation and remodeling of junctions once this protein interacts with the membrane junction proteins and binds to actin filaments.⁹¹ Actin-polymerizing proteins, such as Arp2/3,⁹² N-WASP,⁹³ VASP⁹⁴ and cortactin,⁹⁵ have been described in close interaction to TJs.

One example of such interactions is the complex formed by JAM-A/ZO-2/Afadin/PDZ-GEF1, which regulates paracellular permeability by activating the small GTPase Rap2c. The downregulation of each of these components results in increased cell permeability. JAM-A also influences RhoA activity and non-muscle myosin phosphorylation, affecting actomyosin contraction.⁹⁶ Several actin-binding proteins also interact with ZO proteins. Inhibiting the binding between α -catenin and ZO-1 causes a disruption in the epithelial integrity, which affects ZO-1 and actin filament organization.⁹⁷ Changes in the expression levels of the tension-sensing protein vinculin⁹⁸ and α -actinin-4⁹⁹ also affect the stabilization of cell-cell junctions. Another protein, Shroom, has been shown to regulate the actomyosin cytoskeleton through an interaction with the ROCK protein¹⁰⁰ and with actin, myosin and microtubules, altering cell shape and junction formation.¹⁰¹

Interlink between AJs and the actin cytoskeleton

Alterations in the membrane proteins E-cadherin and nectin, which are major participants in the preservation of physical associations among cells, may lead to defective tissue organization. E-cadherin creates an adhesive force by the interaction of its extracellular domains.¹⁰² However, E-cadherin depends on Ca²⁺ concentrations and on its linkage to other intracellular proteins to maintain its structure and localization. The core complex of E-cadherin-based cell junctions is composed of one cadherin linked by its intracellular domain to p120 catenin and β -catenin, which binds to α -catenin.¹⁰³ The α -catenin interaction with F-actin through its carboxyl-domain was thought to be an essential step in stabilizing the AJ; however, α -catenin may be unable to bind to F-actin when associated with β -catenin.¹⁰⁴ Despite its inability to link to F-actin when associated with the core complex of AJ, the interaction between the tension-sensing molecule vinculin (VCL) and α -catenin has suggested a possible model of this interaction. The tension created by the actomyosin cytoskeleton linked to α -catenin causes a change in its conformation, causing the M1 domain to bind to VCL.¹⁰⁵ Once bound, these proteins reinforce the strength through which F-actin is connected to the AJ complex. Two other actin-related proteins, vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) and MENA, were found co-localized in the AJ with VCL, which is its dominant recruiting factor;¹⁰⁶ these proteins most likely cooperate with the E-cadherin/catenin/vinculin complex by enhancing actin polymerization.¹⁰⁷

Nectins co-localize with E-cadherin in the AJ.¹⁰⁸ The cytoplasmic domain of nectins, more specifically their PDZ-binding motif, links with afadin, which is a protein that has been already discussed above as an actin-binding protein.^{90,109} Interestingly, previous evidence indicates a direct interaction between afadin and α -catenin, suggesting the formation of a possible nectin-afadin/cadherin-catenin complex.¹¹⁰ During the early AJC formation process, nectins are the first to gather at cell contacts, followed by E-cadherins,¹¹¹ possibly converging to the aforementioned nectin-afadin/cadherin-catenin complex. E-cadherin localization at cell contact sites in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells is disrupted by lowering the Ca²⁺ concentration and returns to the contacts once the Ca²⁺ concentration is normalized. However, E-cadherin was unable to return to cell-cell contacts when annexin II expression was knocked down in this cell line, which suggests a novel and important role for this protein in the formation and regulation of the AJC.¹¹²

Annexin II and Rho GTPases: modulators of a multi-faceted system

Annexin II is a phospholipid-binding protein with affinity for Ca²⁺ or for charged phospholipids. This protein, which is present at cellular membranes, particularly those membranes rich in phosphoinositides and cholesterol, is involved in several cellular functions, such as cell signaling, fibrin homeostasis, calcium and pH sensing, vesicle trafficking and actin binding and regulation. Both monomeric and tetrameric forms of annexin II are able to bind to F-actin and to bundle those preformed filaments. Considering its roles in actin binding and in interacting with cellular membranes, primarily the cytoplasmic surface of the plasma membrane, annexin II may play an important role in controlling actin cytoskeleton rearrangements (for reviews, see¹¹³). This hypothesis has been strengthened by evidence that shows a consonant action between annexin and cofilin,¹¹⁴ which is a major actin rearrangement modulator, and a pathway leading from annexin phosphorylation to small GTPase activation, more specifically, RhoA.¹¹⁵ Although, annexin II is not a defined component of the AJC, it was proposed that this protein plays a role in TJ assembly possibly through linking juxtaposed exoplasmic leaflets to form a lipid platform across the intercellular space, indicating annexin II as a member of a new class of TJ proteins responsible for the long-observed convergence of adjacent exoplasmic lipid leaflets in TJ assembly.¹¹⁶ However, more studies are necessary to confirm the real role that annexin II plays in actin cytoskeleton regulation and, consequently, in AJC organization.

Rho GTPases are a subset of the small GTPase Ras superfamily, which is composed of 5 families: Ras, Rho, Rab, Ran and Arf.¹¹⁷ These proteins, which are responsible for the regulation of essential cellular processes (for a review see¹¹⁸), act in a wide array of mechanisms to stabilize and bundle actin filaments. The most prominent Rho GTPases related to actin regulation are members of the Rho family: RhoA (one of 3 isoforms), Rac and Cdc42. These three proteins, which are central modulators of actomyosin cytoskeleton, also play roles in microtubule dynamics, cell polarity, cell adhesion, membrane trafficking, cell proliferation, gene transcription, apoptosis, and cell survival.¹¹⁸

Although induced by the same catalysis, Rho, Rac and Cdc42 generate different effects on the cytoskeleton. When activated, Rho promotes the formation of basal F-actin stress fibers and focal adhesions, altering cell migration. When activated, Rac induces the development of lamellipodia and membrane ruffling, while Cdc42 helps to orchestrate cell polarity and filopodia formation.¹¹⁹ The regulation of AJC (for a recent review, see¹¹) by these 3 proteins relies on a balance between their active and inhibited states to preserve and maintain the TJ and AJ in such a manner that the epithelial barrier function is preserved.¹²⁰⁻¹²²

Taken together, these findings clearly indicate that changes in the expression of the AJC complex proteins and its adaptors and regulators of the actomyosin cytoskeleton may lead to disruptions of the epithelial function, such as higher proliferation, migration and invasion potentials and, more particularly, EMT, promoting pathogenic events such as tumorigenesis. For example, E-cadherin and p120 catenin under-expression is associated with a poor prognosis and with high invasive capacity of tumors.¹²³ Because of the low levels of E-cadherin, which are responsible for recruiting p120 catenin, p120 accumulates in the cytoplasm, favoring the invasive potential through Rho activation.^{124,125} Lower levels of junctional E-cadherin in breast epithelial cells enhanced migration through Rho signaling,¹²⁶ and ROCK inhibition led to disorganization of the AJC complex, favoring higher cell proliferation and migration.¹²⁷

A growing number of studies have examined the dysregulation of the AJC complex and the actin cytoskeleton in CRC, some of which will be discussed in the next section. However, the exact mechanisms by which these alterations and imbalances act still lack broader comprehension.

The Contributions of AJC and Actin Cytoskeleton Alterations in CRC Progression: Cell Signaling Involvement

Disturbances in the activities of various signaling pathways, which cause morphological and phenotypic alterations, have been observed during CRC progression. Among these alterations, we may highlight those alterations related to the loss of stability of the apical junctional complex and to the reorganization of the actin cytoskeleton, which both contribute to increased malignancy. In a recent review, Leve and Morgado-Diaz discussed the role that Rho GTPases, which are regulator proteins of the actin cytoskeleton, play in regulating both the assembly/disassembly and the function of the AJC and how subsequent cell-cell adhesion loss can trigger cell signaling pathways, leading to epithelial cancer progression.¹²⁸ However, few studies have linked alterations of AJC components and the actin cytoskeleton during CRC development, and most of these studies used *in vitro* methods, as discussed below.

The tension and contractility of actin filaments can be regulated by motor proteins of the myosin superfamily. Non-muscle myosin belonging to class II (NM-II) plays an important role in cell adhesion and cell migration and is present in non-muscle cells. NM-II activity has been related to modulating cell-cell

adhesion.¹²⁹ The inhibition of this protein class can cause the dysregulation of the organization and stability of the AJC, as well as changes in TJ-regulated barrier function, as reviewed by Liu and Cheney.⁸¹ NM-IIA knock-down in colon adenocarcinoma cell lines impairs AJC reorganization in the calcium switch assay, decreasing the presence of E-cadherin, β -catenin, occludin and ZO-1 in cell-cell contacts when the cell culture was switched from a low-calcium medium ($\sim 5 \mu\text{M}$ of Ca^{2+}) to a high-calcium medium ($\sim 1.8 \text{ mM}$ of Ca^{2+}). These events were accompanied by the disarrangement of the cortical and perijunctional F-actin protein, which was visualized after the calcium repletion, suggesting an important role of the actin cytoskeleton in these processes.¹³⁰ Babbitt and co-workers have yet reported that inhibition of NM-IIA reduces the planar migration of SK-CO15 colonic epithelial cells by increase the cell-matrix adhesion and decrease the stress fiber and mature focal adhesion formation, which are important to detachment and retraction of the cell during this process. In contrast, the NM-IIA downregulation increases the invasive potential these cells to increase in activation of the ERK1/2 pathway and calpain-2.¹³¹ Moreover, the phosphorylation of sites in regulatory light chains or heavy chain by kinase proteins can modulate NM-II activity.¹²⁹ The activation of the PKC/ROCK-II pathway in pancreatic epithelial cells induces the phosphorylation and activation of NM-II, which causes the reorganization of the actin cytoskeleton and the disassembly of the AJC.¹³² In addition, the differential regulation of myosin light chain phosphorylation, which is present in myosin class II, by MLCK and ROCK can modulate the dynamics of membrane protrusions and directional migration in fibroblasts.^{133,134} Furthermore, the treatment of Caco-2 colorectal adenocarcinoma cells with the inflammatory mediator prostaglandin E_2 (PGE_2) induces AJC disassembly, barrier function dysregulation and F-actin belt disorganization, which are events modulated by PKC and MLCK.^{135,136} Together, these data suggest the F-actin contractility can be modulated by expression and/or post-translational modifications of NM-II, which is involved with AJC organization and can regulate the malignant potential in colorectal cells. Specific inhibitors of these signaling pathways can be used as important tools to modulate the organization of cell adhesion and actin cytoskeleton during the development of carcinomas in an attempt to reduce the malignant potential.

Leve and coworkers have provided evidence that the PKA pathway may regulate the AJC and members of the Rho GTPase family differently in CRC cells, depending on the cell region: (1) In the basal region, PKA activation may inhibit RhoA, inducing the disruption of stress fibers, whose structures are composed of contractile bundles of actin. Furthermore, PKA activation or RhoA inhibition potentially could induce Rac activation, which would regulate the formation of lamellipodia-type membrane protrusion, which are composed of branched actin networks. (2) In the apical region, PKA activation induces AJC disassembly, causing the subcellular redistribution of AJ and TJ proteins, followed by RhoA activation and Rac inhibition. Furthermore, RhoA activation could lead to the recruitment of ROCK I or ROCK II effector proteins, which would regulate AJs or TJs and the actin cytoskeleton, respectively. Together, these events

Table 2. Signaling pathways that modulate expression/localization of apical junctional complex proteins and actin cytoskeleton regulators and their role in functional responses during tumor progression in CRC models

Signaling pathway	Apical junctional complex protein	Actin cytoskeleton regulators	Role in tumor progression	Reference
PI3K/Akt/ GSK-3 β	Claudin-3, E-cadherin, β -catenin, ZO-1	?	Cell differentiation, Proliferation, migration	147
	?	Rac	Migration	148
ERK1/2	Claudin-3	?	Impaired barrier function, Proliferation, migration	25,26
	E-cadherin, β -catenin	?	Proliferation, impaired barrier function,	26
	?	Cdc42	Proliferation, migration, invasion	143
PKA	E-cadherin	Rho, Rac	Impaired barrier function	137
Src/FAK	E-cadherin, β -catenin, p120 catenin	Rho/ROCK	Migration	138
Wnt	E-cadherin, β -catenin	?	Migration, invasion	56
	β -catenin	Tiam/Rac	Proliferation, invasion	149

?, Unidentified protein.

contribute to the increased migration of CRC cells.¹³⁷ The Rho-induced increase in the migratory potential of CRC cells can also be regulated through the activation of lysophosphatidic acid (LPA) receptors. *In vitro* studies demonstrated that LPA treatment causes the activation of the Rho/Rock and Src pathways, which modulate AJ disruption. Moreover, LPA treatment in the basal region induced the activation of the Src/FAK pathway, which acts in the recruitment of Rho/Rock to modulate stress fiber and focal adhesion formation.¹³⁸ The reorganization of the actin cytoskeleton can modulate the dynamics of cell-extracellular matrix adhesion and the stability of the AJC, suggesting that cross-talk among actin-related Rho GTPases and Src/FAK pathways plays an important role in the increase in cell migration during CRC progression.

The expression of Cdc42, which is another member of the Rho GTPase family, also correlates with increased cell migration by regulating the elongation of actin filaments, which drives lamellipodia protrusions.¹³⁹ Elbediwy and co-workers have shown that SH3BP1 complex-regulated Cdc42 activity in cell-cell contacts is required to establish the AJC and the junctional actin belt in epithelial cells.¹⁴⁰ In contrast, Cdc42 mediates the EGFR/Src pathway activation after Ca²⁺ depletion, which induces E-cadherin degradation in MCF-7 breast cancer cells.¹⁴¹ A decrease in miR-224 expression was observed in specimens of patients with CRC. This micro-RNA was able to induce the down-regulation of Cdc42 and SMAD4, which is an effector protein of the TGF- β signaling pathway, decreasing the migration of HCT-116 cells *in vitro*.¹⁴² The selective inhibition of Cdc42 using the small-molecule inhibitor AZA197 reduced PAK/ERK pathway activation, as well as cell proliferation, migration, invasion, and increased apoptosis. Furthermore, AZA197 treatment decreased tumor growth and increased mouse survival in a preclinical xenograft model of colon cancer and has been proposed as a treatment for patients with colon cancer that overexpress Cdc42 and that present mutations in the *KRAS* gene.¹⁴³ Studies attempting to develop molecules that target Cdc42 can be promising for the treatment of patients with advanced colon cancer. However, further studies are required to determine the role of this GTPase in the regulation of the molecular mechanisms involved in the development of this cancer.

Recent evidence has supported the notion that alterations in the cell-cell adhesion system and cytoskeleton organization may increase the malignant potential of radioresistant CRC cells. Progenies of ionizing radiation survivor HT-29 cells presented actin cytoskeleton reorganization and cell spreading. Furthermore, these cells showed a mesenchymal-like phenotype, which was accompanied by an increase in cell migration and invasiveness, and these events occurred concomitant to the activation of the Wnt/ β -catenin pathway. These findings suggest that CRC cells with intermediary resistance to ionizing radiation have a more aggressive phenotype than their parent cells.⁵⁶ However, the detailed molecular mechanisms that regulate the intercellular adhesion disturbance and alterations in the cytoskeleton of CRC cells surviving radiation remain to be established. Further studies in this area may identify possible targets to avoid the refractory effects of radiotherapy. The Table 2 summarizes cell signaling pathways that modulate expression/localization of AJC proteins and actin cytoskeleton regulators and the functional response during tumor progression in CRC models.

Together, these studies indicate that alterations of the organization of the AJC and the actin cytoskeleton, which are interlinked to maintain a functional cell-cell system in epithelia, may induce events related to colorectal progression, such as cell migration, proliferation and invasiveness. Thus, additional studies could contribute to define the molecular mechanisms that govern such disorganization *in vitro* and *in vivo* in this cancer type.

Conclusions

Many studies have established that the altered expression/localization of AJC proteins and actin cytoskeleton disorganization can contribute to human cancer development. Nevertheless, few studies have shown the interrelation between such events and their contribution in this context. In CRC, claudins, E-cadherin and β -catenin proteins are among the most-studied AJC constituents and have a vital role during CRC progression. However, understanding the functions of other important members of the AJC complex and their contributions to the development of this cancer type remains a major challenge for CRC researchers. On the other hand, despite great efforts to

understand the dynamics of the actin cytoskeleton during the events of migration and invasiveness, the key molecules that participate in the regulation of these events in cancer remain unclear. More importantly, the order in which these events occur also remains unclear. Does actin cytoskeleton reorganization cause the disruption of the AJC, or does the alteration in the expression/localization of AJC proteins lead to the reorganization of the actin cytoskeleton?. Regardless, the existing data suggest that controlling the regulation of these 2 mechanisms is crucial for preventing the metastatic process by the loss of the cell-cell adhesion system. Thus, large-scale prospective studies should provide answers that define the prognostic or diagnostic significance of the AJC components. Additionally, it is necessary to identify regulators of the actin cytoskeleton dynamics, as well as actin-binding proteins that link AJC components in CRC. We highlight the use of these components as possible therapeutic targets to prevent the increase in the malignancy of this disease. For instance, AJC proteins alone or in combination with actin cytoskeleton regulators, may represent useful biomarkers for the detection, diagnosis and prognosis of CRC, mainly through their pro-metastatic activity enhancing cell migration and invasiveness. **On the other hand, the studies here discussed highlight the possibility for**

a target-specific systematic therapy using these proteins as therapeutic targets, specifically those that present altered expression levels.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank the American Journal Experts for their review of our manuscript.

Funding

This study was sponsored by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Ministério da Saúde – Brasil, Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado de Rio de Janeiro (FAPERJ) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Câncer (573806/2008–0 and 170.026/2008).

References

- Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286:C1213-28; PMID:15151915; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00558.2003>
- Jang A-S. The apical junctional complex in respiratory diseases. *Chonnam Med J* 2014; 50:1; PMID:24855600; <http://dx.doi.org/10.4068/cmj.2014.50.1.1>
- Soler AP, Miller RD, Laughlin KV, Carp NZ, Klurfeld DM, Mullin JM. Increased tight junctional permeability is associated with the development of colon cancer. *Carcinogenesis* 1999; 20:1425-32; PMID:10426787; <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/20.8.1425>
- Mitic LL, Anderson JM. Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol* 1998; 60:121-42; PMID:9558457; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.121>
- Balda MS, Matter K. The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO J* 2000; 19:2024-33; PMID:10790369; <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/19.9.2024>
- Mullin JM. Potential interplay between luminal growth factors and increased tight junction permeability in epithelial carcinogenesis. *J Exp Zool* 1997; 279:484-9; PMID:9392870; [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19971201\)279:5%3c484::AID-JEZ11%3e3.0.CO;2-8](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19971201)279:5%3c484::AID-JEZ11%3e3.0.CO;2-8)
- Ren J, Hamada J, Takeichi N, Fujikawa S, Kobayashi H. Ultrastructural differences in junctional intercellular communication between highly and weakly metastatic clones derived from rat mammary carcinoma. *Cancer Res* 1990; 50:358-62; PMID:2295075
- Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* 2003; 94:575-81; PMID:12841864; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2003.tb01485.x>
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61:69-90; PMID:21296855; <http://dx.doi.org/10.3322/caac.20107>
- Miyoshi J, Takai Y. Structural and functional associations of apical junctions with cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta BBA – Biomembr* 2008; 1778:670-91; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.12.014>
- Quiros M, Nusrat A. RhoGTPases, actomyosin signaling and regulation of the epithelial apical junctional complex. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 36:194-203; PMID:25223584; <http://dx.doi.org/10.1016/j.semdb.2014.09.003>
- Suzuki H, Nishizawa T, Tani K, Yamazaki Y, Tamura A, Ishitani R, Dohmae N, Tsukita S, Nureki O, Fujiyoshi Y. Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science* 2014; 344:304-7; PMID:24744376; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1248571>
- Tamura A, Tsukita S. Paracellular barrier and channel functions of TJ claudins in organizing biological systems: advances in the field of barriology revealed in knockout mice. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 36:177-85; PMID:25305579; <http://dx.doi.org/10.1016/j.semdb.2014.09.019>
- Gunzel D, Yu ASL. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev* 2013; 93:525-69; PMID:23589827; <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00019.2012>
- Krug SM, Schulzke JD, Fromm M. Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 36:166-76; PMID:25220018; <http://dx.doi.org/10.1016/j.semdb.2014.09.002>
- Resnick MB, Konkin T, Routhier J, Sabo E, Pricolo VE. Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Mod Pathol* 2005; 18:511-8; PMID:15475928; <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.3800301>
- Dhawan P. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest* 2005; 115:1765-76; PMID:15965503; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI24543>
- De Oliveira SS, de Oliveira IM, De Souza W, Morgado-Díaz JA. Claudins upregulation in human colorectal cancer. *FEBS Lett* 2005; 579:6179-85; PMID:16253248; <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.091>
- Gröne J, Weber B, Staub E, Heinze M, Klamann I, Pilarsky C, Hermann K, Castanos-Velez E, Röpecke S, Mann B, et al. Differential expression of genes encoding tight junction proteins in colorectal cancer: frequent dysregulation of claudin-1, -8 and -12. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22:651-9; PMID:17047970; <http://dx.doi.org/10.1007/s00384-006-0197-3>
- Martin TA, Jiang WG. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochim Biophys Acta BBA – Biomembr* 2009; 1788:872-91; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.11.005>
- Darido C, Buchert M, Pannequin J, Bastide P, Zalzal H, Mantamadiotis T, Bourgaux J-F, Garambois V, Jay P, Blache P, et al. Defective claudin-7 regulation by Tcf-4 and Sox-9 disrupts the polarity and increases the tumorigenicity of colorectal cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68:4258-68; PMID:18519685; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5805>
- Dhawan P, Ahmad R, Chaturvedi R, Smith JJ, Midha R, Mittal MK, Krishnan M, Chen X, Eschrich S, Yeatman TJ, et al. Claudin-2 expression increases tumorigenicity of colon cancer cells: role of epidermal growth factor receptor activation. *Oncogene* 2011; 30:3234-47; PMID:21383692; <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.43>
- Singh AB, Sharma A, Dhawan P. Claudin-1 expression confers resistance to anoikis in colon cancer cells in a Src-dependent manner. *Carcinogenesis* 2012; 33:2538-47; PMID:22941059; <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgs275>
- Pope JL, Bhat AA, Sharma A, Ahmad R, Krishnan M, Washington MK, Beauchamp RD, Singh AB, Dhawan P. Claudin-1 regulates intestinal epithelial homeostasis through the modulation of Notch-signaling. *Gut* 2014; 63:622-34; PMID:23766441; <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2012-304241>
- De Souza WF, Fortunato-Miranda N, Robbs BK, de Araujo WM, de-Freitas-Junior JC, Bastos LG, Viola JPB, Morgado-Díaz JA. Claudin-3 Overexpression Increases the Malignant Potential of Colorectal Cancer Cells: Roles of ERK1/2 and PI3K-Akt as Modulators of EGFR signaling. *PLoS One* 2013; 8:e74994; PMID:24069372; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0074994>
- De Souza WF, Barbosa LA, Liu L, de Araujo WM, de-Freitas-Junior JCM, Fortunato-Miranda N, Fontes CFL, Morgado-Díaz JA. Ouabain-Induced alterations of the apical junctional complex involve $\alpha 1$ and $\beta 1$ Na,K-ATPase downregulation and ERK1/2 activation independent of caveolae in colorectal cancer cells. *J Membr Biol* 2014; 247:23-33; PMID:24186357; <http://dx.doi.org/10.1007/s00232-013-9607-y>

27. Dörfel MJ, Huber O. Modulation of Tight Junction structure and function by kinases and phosphatases targeting occludin. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012:1-14; PMID:21836813; <http://dx.doi.org/10.1155/2012/807356>
28. Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or-2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 1998; 143:391-401; PMID:9786950; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.143.2.391>
29. Basuroy S, Sheth P, Kuppaswamy D, Balasubramanian S, Ray RM, Rao RK. Expression of Kinase-inactive c-Src delays oxidative stress-induced disassembly and accelerates calcium-mediated reassembly of tight junctions in the caco-2 cell monolayer. *J Biol Chem* 2003; 278:11916-24; PMID:12547828; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M211710200>
30. Orbán E, Szabó E, Lotz G, Kupcsulik P, Páska C, Schaff Z, Kiss A. Different expression of occludin and ZO-1 in primary and metastatic liver tumors. *Pathol Oncol Res* 2008; 14:299-306; <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-008-9031-2>
31. Wang X, Tully O, Ngo B, Zitin M, Mullin JM. Epithelial tight junctional changes in colorectal cancer tissues. *Sci World J* 2011; 11:826-41; <http://dx.doi.org/10.1100/tsw.2011.86>
32. Xie L, Xue X, Taylor M, Ramakrishnan SK, Nagaoka K, Hao C, Gonzalez FJ, Shah YM. Hypoxia-inducible factor/MAZ-dependent induction of caveolin-1 regulates colon permeability through suppression of occludin, leading to hypoxia-induced inflammation. *Mol Cell Biol* 2014; 34:3013-23; PMID:24891620; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00324-14>
33. Luissint A-C, Nusrat A, Parkos CA. JAM-related proteins in mucosal homeostasis and inflammation. *Semin Immunopathol* 2014; 36:211-26; PMID:24667924; <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-014-0421-0>
34. Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, Reeves TA, Walsh S, Pochet M, Parkos CA. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 13):2363-74; PMID:10852816
35. Laukoetter MG, Nava P, Lee WY, Severson EA, Capaldo CT, Babbitt BA, Williams IR, Koval M, Peatman E, Campbell JA, et al. JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med* 2007; 204:3067-76; PMID:18039951; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20071416>
36. Severson EA, Lee WY, Capaldo CT, Nusrat A, Parkos CA. Junctional adhesion molecule A interacts with afadin and PDZ-GEF2 to activate Rap1A, regulate β 1 integrin levels, and enhance cell migration. *Mol Biol Cell* 2009; 20:1916-25; PMID:19176753; <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E08-10-1014>
37. González-Mariscal L, Domínguez-Calderón A, Raya-Sandino A, Ortega-Olvera JM, Vargas-Sierra O, Martínez-Revollar G. Tight junctions and the regulation of gene expression. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 36: 213-23; <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.08.009>
38. Tsukita S, Katsuno T, Yamazaki Y, Umeda K, Tamura A, Tsukita S. Roles of ZO-1 and ZO-2 in establishment of the belt-like adherens and tight junctions with paracellular permeable barrier function. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1165:44-52; PMID:19538286; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04056.x>
39. Kimura Y, Shiozaki H, Hirao M, Maeno Y, Doki Y, Inoue M, Monden T, Ando-Akatsuka Y, Furuse M, Tsukita S, et al. Expression of occludin, tight-junction-associated protein, in human digestive tract. *Am J Pathol* 1997; 151:45-54; PMID:9212730
40. Kaihara T, Kusaka T, Nishi M, Kawamata H, Imura J, Kitajima K, Itoh-Minami R, Aoyama N, Kasuga M, Oda Y, et al. Dedifferentiation and decreased expression of adhesion molecules, E-cadherin and ZO-1, in colorectal cancer are closely related to liver metastasis. *J Exp Clin Cancer Res* 2003; 22:117-23
41. Kaihara T, Kawamata H, Imura J, Fujii S, Kitajima K, Omotehara F, Maeda N, Nakamura T, Fujimori T. Redifferentiation and ZO-1 reexpression in liver-metastasized colorectal cancer: possible association with epidermal growth factor receptor-induced tyrosine phosphorylation of ZO-1. *Cancer Sci* 2003; 94:166-72; PMID:12708492; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2003.tb01414.x>
42. Kavanagh E, Buchert M, Tsapara A, Choquet A, Balda MS, Hollande F, Matter K. Functional interaction between the ZO-1-interacting transcription factor ZONAB/DbpA and the RNA processing factor symplekin. *J Cell Sci* 2006; 119:5098-105; PMID:17158914; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.03297>
43. Buchert M, Darido C, Lagerqvist E, Sedello A, Cazeville C, Buchholz F, Bourgaux J, Pannequin J, Joubert D, Hollande F. The Symplekin/ZONAB complex inhibits intestinal cell differentiation by the repression of AML1/Runx1. *Gastroenterology* 2009; 137:156-164.e3; PMID:19328795; <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.03.037>
44. Buchert M, Papin M, Bonnans C, Darido C, Raye WS, Garambois V, Pelegrin A, Bourgaux J-F, Pannequin J, Joubert D, et al. Symplekin promotes tumorigenicity by up-regulating claudin-2 expression. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107:2628-33; PMID:20133805; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0903747107>
45. Costa AM, Leite M, Seruca R, Figueiredo C. Adherens junctions as targets of microorganisms: a focus on *Helicobacter pylori*. *FEBS Lett* 2013; 587:259-65; PMID:23262219; <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.12.008>
46. Etienne-Manneville S. Control of polarized cell morphology and motility by adherens junctions. *Semin Cell Dev Biol* 2011; 22:850-7; PMID:21839846; <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.07.023>
47. Halbleib JM, Nelson WJ. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev* 2006; 20:3199-214; PMID:17158740; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1486806>
48. Hartssock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 2008; 1778:660-9; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.012>
49. Takeichi M. Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15:397-410; PMID:24824068; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3802>
50. Kroepil F, Fluegen G, Totikov Z, Baldus SE, Vay C, Schauer M, Topp SA, Esch JS, Knoefel WT, Stoecklein NH. Down-regulation of CDH1 is associated with expression of SNAI1 in colorectal adenomas. *PLoS ONE* 2012; 7:e46665; PMID:23029563; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0046665>
51. Alshenawy HA, Ali MA. Differential caveolin-1 expression in colon carcinoma and its relation to E-cadherin- β -catenin complex. *Ann Diagn Pathol* 2013; 17:476-82; PMID:23830349; <http://dx.doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2013.05.007>
52. Kroepil F, Fluegen G, Vallböhmer D, Baldus SE, Dizdar L, Raffel AM, Hafner D, Stoecklein NH, Knoefel WT. Snail1 expression in colorectal cancer and its correlation with clinical and pathological parameters. *BMC Cancer* 2013; 13:145; PMID:23522088; <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-13-145>
53. Gavert N, Shvab A, Sheffer M, Ben-Shmuel A, Haase G, Bakos E, Domany E, Ben-Ze'ev A. c-Kit is suppressed in human colon cancer tissue and contributes to LI-mediated metastasis. *Cancer Res* 2013; 73:5754-63; PMID:24008320; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0576>
54. Chung Y-C, Wei W-C, Huang S-H, Shih C-M, Hsu C-P, Chang K-J, Chao W-T. Rab11 regulates E-cadherin expression and induces cell transformation in colorectal carcinoma. *BMC Cancer* 2014; 14:587; PMID:25117932; <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-14-587>
55. De Freitas Junior JCM, Silva BDRD, de Souza WF, de Araújo WM, Abdelhay ESFW, Morgado-Díaz JA. Inhibition of N-linked glycosylation by tunicamycin induces E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and inhibits cell proliferation in undifferentiated human colon cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 68:227-38; PMID:20927523; <http://dx.doi.org/10.1007/s00280-010-1477-8>
56. Bastos LG dos R, de Marcondes PG, de-Freitas-Junior JCM, Leve F, Mencialha AL, de Souza WF, de Araujo WM, Tanaka MN, Abdelhay ESFW, Morgado-Díaz JA. Progeny from irradiated colorectal cancer cells acquire an EMT- Like phenotype and activate Wnt/ β -catenin pathway. *J Cell Biochem* 2014; 115:2175-87; PMID:25103643; <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.24896>
57. Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of β -catenin. *EMBO J* 2012; 31:2714-36; PMID:22617422; <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2012.150>
58. White BD, Chien AJ, Dawson DW. Dysregulation of Wnt/ β -catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology* 2012; 142:219-32; PMID:22155636; <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.001>
59. Baldus SE, Mönig SP, Huxel S, Landsberg S, Hanisch F-G, Engelmann K, Schneider PM, Thiele J, Höltscher AH, Dienes HP. MUC1 and nuclear β -catenin are coexpressed at the invasion front of colorectal carcinomas and are both correlated with tumor prognosis. *Clin Cancer Res* 2004; 10:2790-6; PMID:15102686; <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0163>
60. Chen Z, He X, Jia M, Liu Y, Qu D, Wu D, Wu P, Ni C, Zhang Z, Ye J, et al. β -catenin overexpression in the nucleus predicts progress disease and unfavourable survival in colorectal cancer: a meta-analysis. *PLoS ONE* 2013; 8: e63854; PMID:23717499; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0063854>
61. Mårtensson A, öberg äke, Jung A, Cederquist K, Stenling R, Palmqvist R. β -catenin expression in relation to genetic instability and prognosis in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2007; 17:447-52; PMID:17203186
62. Hörkkö TT, Klintrup K, Mäkinen JM, Näpänkangas JB, Tuominen HJ, Mäkelä J, Karttunen TJ, Mäkinen MJ. Budding invasive margin and prognosis in colorectal cancer – no direct association with β -catenin expression. *Eur J Cancer* 2006; 42:964-71; PMID:16563744; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2006.01.017>
63. Lee S-J, Choi SY, Kim W-J, Ji M, Lee T-G, Son B-R, Yoon SM, Sung R, Lee EJ, Youn SJ, et al. Combined aberrant expression of E-cadherin and S100A4, but not β -catenin is associated with disease-free survival and overall survival in colorectal cancer patients. *Diagn Pathol* 2013; 8:99; PMID:23783026; <http://dx.doi.org/10.1186/1746-1596-8-99>
64. Roca F, Mauro LV, Morandi A, Bonadeo F, Vaccaro C, Quintana GO, Specterman S, de Kier Joffé EB, Pallotta MG, Puricelli LI, et al. Prognostic value of E-cadherin, beta-catenin, MMPs (7 and 9), and TIMPs (1 and 2) in patients with colorectal carcinoma. *J Surg Oncol* 2006; 93:151-60; PMID:16425303; <http://dx.doi.org/10.1002/jso.20413>
65. Wangefjord S, Brandstedt J, Lindquist KE, Nodin B, Jirstrom K, Eberhard J. Associations of beta-catenin alterations and MSI screening status with expression of key cell cycle regulating proteins and survival from colorectal cancer. *Diagn Pathol* 2013; 8:10; PMID:23337059; <http://dx.doi.org/10.1186/1746-1596-8-10>
66. Gao Z-H, Lu C, Wang M-X, Han Y, Guo L-J. Differential β -catenin expression levels are associated with morphological features and prognosis of colorectal cancer. *Oncol Lett* 2014; 8:2069-76; PMID:25295092
67. Huveneers S, de Rooij J. Mechanosensitive systems at the cadherin-F-actin interface. *J Cell Sci* 2013; 126:403-13; PMID:23524998; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.109447>

68. Choi SH, Estaras C, Moresco JJ, Yates JR, Jones KA. -Catenin interacts with APC to regulate -catenin proteolysis and transcriptional repression of Wnt target genes. *Genes Dev* 2013; 27:2473-88; PMID:24240237; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.229062.113>
69. Smalley-Freed WG, Efimov A, Short SP, Jia P, Zhao Z, Washington MK, Robine S, Coffey RJ, Reynolds AB. Adenoma formation following limited ablation of p120-catenin in the mouse intestine. *PLoS ONE* 2011; 6:e19880; PMID:21611205; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019880>
70. Ueki T, Nakayama Y, Sugao Y, Kohno K, Matsuo K, Sugimoto Y, Yamada Y, Kuwano M, Tsuneyoshi M. Significance of the expression of proliferation-associated nucleolar antigen p120 in human colorectal tumors. *Hum Pathol* 1997; 28:74-9; PMID:9013835; [http://dx.doi.org/10.1016/S0046-8177\(97\)90282-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0046-8177(97)90282-3)
71. Van Hengel J, Vanhoenacker P, Staes K, van Roy F. Nuclear localization of the p120ctn Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:7980-5; PMID:10393933; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.14.7980>
72. Bellovin DI, Bates RC, Muzikansky A, Rimm DL, Mercurio AM. Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease. *Cancer Res* 2005; 65:10938-45; PMID:16322241; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1947>
73. Ezaki T, Guo R-J, Li H, Reynolds AB, Lynch JP. The homeodomain transcription factors Cdx1 and Cdx2 induce E-cadherin adhesion activity by reducing β - and p120-catenin tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293:G54-G65; PMID:17463179; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00533.2006>
74. Li J, Li X, Qian J, Lu X, Yang H. [Effects of K-ras gene mutation on colon cancer cell line Caco-2 metastasis by regulating E-cadherin/beta-catenin/p120 protein complex formation and RhoA protein activity]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2010; 32:46-50; PMID:20236587
75. Espejo R, Jeng Y, Paulucci-Holthausen A, Rengifo-Cam W, Honkus K, Anastasiadis PZ, Sastry SK. PTP-PEST targets a novel tyrosine site in p120 catenin to control epithelial cell motility and Rho GTPase activity. *J Cell Sci* 2014; 127:497-508; PMID:24284071; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.120154>
76. Takai Y. Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J Cell Sci* 2003; 116:17-27; PMID:12456712; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00167>
77. Fournier G, Cabaud O, Josselin E, Chaix A, Adélaïde J, Isnardon D, Restouin A, Castellano R, Dubreuil P, Chaffanet M, et al. Loss of AF6/afadin, a marker of poor outcome in breast cancer, induces cell migration, invasiveness and tumor growth. *Oncogene* 2011; 30:3862-74; PMID:21478912; <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.106>
78. Sun TT, Wang Y, Cheng H, Xiao HZ, Xiang JJ, Zhang JT, Yu SBS, Martin TA, Ye L, Tsang LL, et al. Disrupted interaction between CFTR and AF-6/afadin aggravates malignant phenotypes of colon cancer. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1843:618-28; PMID:24373847; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamer.2013.12.013>
79. Harris TJC, Tepass U. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11:502-14; PMID:20571587; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2927>
80. Baranwal S, Naydenov NG, Harris G, Dugina V, Morgan KG, Chaponnier C, Ivanov AI. Nonredundant roles of cytoplasmic β - and γ -actin isoforms in regulation of epithelial apical junctions. *Mol Biol Cell* 2012; 23:3542-53; PMID:22855531; <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E12-02-0162>
81. Liu KC, Cheney RE. Myosins in cell junctions. *Bioarchitecture* 2012; 2:158-70; PMID:22954512; <http://dx.doi.org/10.4161/bioa.21791>
82. Glotfelty LG, Zahs A, Iancu C, Shen L, Hecht GA. Microtubules are required for efficient epithelial tight junction homeostasis and restoration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014; 307:C245-254; PMID:24920678; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00336.2013>
83. Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR. Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J Biol Chem* 1999; 274:35179-85; PMID:10575001; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.49.35179>
84. Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998; 273:29745-53; PMID:9792688; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.45.29745>
85. Fanning AS, Anderson JM. Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1165:113-20; PMID:19538295; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04440.x>
86. Aijaz S, D'Atri F, Citi S, Balda MS, Matter K. Binding of GEF-H1 to the tight junction-associated adaptor cingulin results in inhibition of Rho signaling and G1/S phase transition. *Dev Cell* 2005; 8:777-86; PMID:15866167; <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2005.03.003>
87. Guillemot L, Guerrero D, Spadaro D, Tapia R, Jond L, Citi S. GpcRacGAP interacts with cingulin and paracingulin to regulate Rac1 activation and development of the tight junction barrier during epithelial junction assembly. *Mol Biol Cell* 2014; 25:1995-2005; PMID:24807907; <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E13-11-0680>
88. Yano T, Matsui T, Tamura A, Uji M, Tsukita S. The association of microtubules with tight junctions is promoted by cingulin phosphorylation by AMPK. *J Cell Biol* 2013; 203:605-14; PMID:24385485; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201304194>
89. Yamamoto T, Harada N, Kano K, Taya S, Canaani E, Matsuura Y, Mizoguchi A, Ide C, Kaibuchi K. The Ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of tight junctions in epithelial cells. *J Cell Biol* 1997; 139:785-95; PMID:9348294; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.139.3.785>
90. Mandai K, Nakanishi H, Satoh A, Obaishi H, Wada M, Nishioka H, Itoh M, Mizoguchi A, Aoki T, Fujimoto T, et al. Afadin: A novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adherens junction. *J Cell Biol* 1997; 139:517-28; PMID:9334353; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.139.2.517>
91. Van Itallie CM, Anderson JM. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 36:157-65; PMID:25171873
92. Zhou K, Muroyama A, Underwood J, Leylek R, Ray S, Soderling SH, Lechler T. Actin-related protein2/3 complex regulates tight junctions and terminal differentiation to promote epidermal barrier formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:E3820-3829; PMID:24043783; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1308419110>
93. Ivanov AI, Hunt D, Utech M, Nusrat A, Parkos CA. Differential roles for actin polymerization and a myosin II motor in assembly of the epithelial apical junctional complex. *Mol Biol Cell* 2005; 16:2636-50; PMID:15800060; <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E05-01-0043>
94. Lawrence DW, Comerford KM, Colgan SP. Role of VASP in reestablishment of epithelial tight junction assembly after Ca^{2+} switch. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282:C1235-1245; PMID:11997237; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00288.2001>
95. Katsube T, Takahashi M, Ueda R, Hashimoto N, Kobayashi M, Togashi S. Cortactin associates with the cell-cell junction protein ZO-1 in both *Drosophila* and mouse. *J Biol Chem* 1998; 273:29672-7; PMID:9792678; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.45.29672>
96. Monteiro AC, Sumagin R, Rankin CR, Leoni G, Mina MJ, Reiter DM, Stehle T, Dermody TS, Schaefer SA, Hall RA, et al. JAM-A associates with ZO-2, afadin, and PDZ-GEF1 to activate Rap2c and regulate epithelial barrier function. *Mol Biol Cell* 2013; 24:2849-60; PMID:23885123; <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E13-06-0298>
97. Maiers JL, Peng X, Fanning AS, DeMali KA. ZO-1 recruitment to α -catenin—a novel mechanism for coupling the assembly of tight junctions to adherens junctions. *J Cell Sci* 2013; 126:3904-15; PMID:23813953; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.126565>
98. Zempljic-Harpf AE, Godoy JC, Platoshyn O, Asfaw EK, Busija AR, Domenighetti AA, Ross RS. Vinculin directly binds zonula occludens-1 and is essential for stabilizing connexin-43-containing gap junctions in cardiac myocytes. *J Cell Sci* 2014; 127:1104-16; PMID:24413171; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.143743>
99. Chen VC, Li X, Perreault H, Nagy JL. Interaction of zonula occludens-1 (ZO-1) with alpha-actinin-4: application of functional proteomics for identification of PDZ domain-associated proteins. *J Proteome Res* 2006; 5:2123-34; PMID:16944923; <http://dx.doi.org/10.1021/pr060216l>
100. Mohan S, Ritzaldy R, Das D, Bauer RJ, Heroux A, Trakselis MA, Hildebrand JD, VanDemark AP. Structure of Shroom domain 2 reveals a three-segmented coiled-coil required for dimerization, Rock binding, and apical constriction. *Mol Biol Cell* 2012; 23:2131-42; PMID:22493320; <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E11-11-0937>
101. Hildebrand JD. Shroom regulates epithelial cell shape via the apical positioning of an actomyosin network. *J Cell Sci* 2005; 118:5191-203; PMID:16249236; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.02626>
102. Meng W, Takeichi M. Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1:a002899; PMID:20457565; <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a002899>
103. Takeichi M. Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15:397-410; PMID:24824068; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3802>
104. Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI, Nelson WJ. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* 2005; 123:889-901; PMID:16325582; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.020>
105. Yonemura S, Wada Y, Watanabe T, Nagafuchi A, Shibata M. alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nat Cell Biol* 2010; 12:533-42; PMID:20453849; <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2055>
106. Leerberg JM, Gomez GA, Verma S, Moussa EJ, Wu SK, Priya R, Hoffman BD, Grashoff C, Schwartz MA, Yap AS. Tension-sensitive actin assembly supports contractility at the epithelial zonula adherens. *Curr Biol CB* 2014; 24:1689-99; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.028>
107. Vasioukhin V, Bauer C, Yin M, Fuchs E. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* 2000; 100:209-19; PMID:10660044; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81559-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81559-7)
108. Nakanishi H, Takai Y. Roles of nectins in cell adhesion, migration and polarization. *Biol Chem* 2004; 385:885-92; PMID:15551862; <http://dx.doi.org/10.1515/BC.2004.116>
109. Takahashi K, Nakanishi H, Miyahara M, Mandai K, Satoh K, Satoh A, Nishioka H, Aoki J, Nomoto A, Mizoguchi A, et al. Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein. *J Cell*

- Biol 1999; 145:539-49; PMID:10225955; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.145.3.539>
110. Tachibana K, Nakanishi H, Mandai K, Ozaki K, Ikeda W, Yamamoto Y, Nagafuchi A, Tsukita S, Takai Y. Two cell adhesion molecules, nectin and cadherin, interact through their cytoplasmic domain-associated proteins. *J Cell Biol* 2000; 150:1161-76; PMID:10974003; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.150.5.1161>
 111. Takai Y, Irie K, Shimizu K, Sakisaka T, Ikeda W. Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, migration, and polarization. *Cancer Sci* 2003; 94:655-67; PMID:12901789; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2003.tb01499.x>
 112. Yamada A, Irie K, Hirota T, Ooshio T, Fukuhara A, Takai Y. Involvement of the annexin II-S100A10 complex in the formation of E-cadherin-based adherens junctions in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 2005; 280:6016-27; PMID:15574423; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M408215200>
 113. Grieve AG, Moss SE, Hayes MJ. Annexin A2 at the interface of actin and membrane dynamics: a focus on its roles in endocytosis and cell polarization. *Int J Cell Biol* 2012; 2012:852430; PMID:22505935; <http://dx.doi.org/10.1155/2012/852430>
 114. De Graauw M, Cao L, Winkel L, van Miltenburg MH, le Dévédec SE, Klop M, Yan K, Pont C, Rogkoti V-M, Tijssma A, et al. Annexin A2 depletion delays EGFR endocytic trafficking via coflin activation and enhances EGFR signaling and metastasis formation. *Oncogene* 2014; 33:2610-9; PMID:23792445; <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2013.219>
 115. De Graauw M, Tijdsen I, Smeets MB, Hensbergen PJ, Deelder AM, van de Water B. Annexin A2 phosphorylation mediates cell scattering and branching morphogenesis via coflin Activation. *Mol Cell Biol* 2008; 28:1029-40; PMID:18070928; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01247-07>
 116. Lee DBN, Jamgotchian N, Allen SG, Kan FWK, Hale IL. Annexin A2 heterotetramer: role in tight junction assembly. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287:F481-491; PMID:15113748; <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00175.2003>
 117. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 2005; 118:843-6; PMID:15731001; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.01660>
 118. Vega FM, Ridley AJ. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett* 2008; 582:2093-101; PMID:18460342; <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2008.04.039>
 119. Hall A. Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans* 2012; 40:1378-82; PMID:23176484; <http://dx.doi.org/10.1042/BST20120103>
 120. Nusrat A, Giry M, Turner JR, Colgan SP, Parkos CA, Carnes D, Lemichez E, Boquet P, Madara JL. Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:10629-33; PMID:7479854; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.92.23.10629>
 121. Bruewer J, Hopkins AM, Hobert ME, Nusrat A, Madara JL. RhoA, Rac1, and Cdc42 exert distinct effects on epithelial barrier via selective structural and biochemical modulation of junctional proteins and F-actin. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287:C327-335; PMID:15044152; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00087.2004>
 122. Hopkins AM, Walsh SV, Verkade P, Boquet P, Nusrat A. Constitutive activation of Rho proteins by CNF-1 influences tight junction structure and epithelial barrier function. *J Cell Sci* 2003; 116:725-42; PMID:12538773; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00300>
 123. Kümpfer S, Ridley AJ. p120ctn and P-cadherin but not E-cadherin regulate cell motility and invasion of DU145 prostate cancer cells. *PLoS One* 2010; 5:e11801; PMID:20668551; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011801>
 124. Shibata T, Kokubu A, Sekine S, Kanai Y, Hirohashi S. Cytoplasmic p120ctn regulates the invasive phenotypes of E-cadherin-deficient breast cancer. *Am J Pathol* 2004; 164:2269-78; PMID:15161659; [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63783-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63783-2)
 125. Grosheva I, Shuttman M, Elbaum M, Bershadsky AD. p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *J Cell Sci* 2001; 114:695-707; PMID:11171375
 126. Kher SS, Struckhoff AP, Alberts AS, Worthylake RA. A novel role for p115RhoGEF in regulation of epithelial plasticity. *PLoS One* 2014; 9:e88409; PMID:24465552; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0085409>
 127. Yang S, Kim H-M. ROCK inhibition activates MCF-7 cells. *PLoS One* 2014; 9:e88489; PMID:24523903; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0088489>
 128. Leve F, Morgado-Díaz JA. Rho GTPase signaling in the development of colorectal cancer. *J Cell Biochem* 2012; 113:2549-59; PMID:22467564; <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.24153>
 129. Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10:778-90; PMID:19851336; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2786>
 130. Ivanov AI, Bachar M, Babbín BA, Adelstein RS, Nusrat A, Parkos CA. A unique role for nonmuscle myosin heavy chain IIA in regulation of epithelial apical junctions. *PLoS One* 2007; 2:e658; PMID:17668046; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000658>
 131. Babbín BA, Koch S, Bachar M, Conti M-A, Parkos CA, Adelstein RS, Nusrat A, Ivanov AI. Non-muscle myosin IIA differentially regulates intestinal epithelial cell restitution and matrix invasion. *Am J Pathol* 2009; 174:436-48; PMID:19147824; <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2009.080171>
 132. Ivanov AI, Samarín SN, Bachar M, Parkos CA, Nusrat A. Protein kinase C activation disrupts epithelial apical junctions via ROCK-II dependent stimulation of actomyosin contractility. *BMC Cell Biol* 2009; 10:36; PMID:19422706; <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2121-10-36>
 133. Totsukawa G, Yamakita Y, Yamashiro S, Hartshorne DJ, Sasaki Y, Matsumura F. Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* 2000; 150:797-806; PMID:10953004; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.150.4.797>
 134. Totsukawa G, Wu Y, Sasaki Y, Hartshorne DJ, Yamakita Y, Yamashiro S, Matsumura F. Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *J Cell Biol* 2004; 164:427-39; PMID:14757754; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200306172>
 135. Tanaka MN, Diaz BL, de Souza W, Morgado-Díaz JA. Prostaglandin E2-EP1 and EP2 receptor signaling promotes apical junctional complex disassembly of Caco-2 human colorectal cancer cells. *BMC Cell Biol* 2008; 9:63; PMID:19055708; <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2121-9-63>
 136. Rodríguez-Lagunas MJ, Martín-Venegas R, Moreno JJ, Ferrer R. PGE2 promotes Ca²⁺-mediated epithelial barrier disruption through EP1 and EP4 receptors in Caco-2 cell monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299:C324-34; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00397.2009>
 137. Leve F, de Souza W, Morgado-Díaz JA. A cross-link between protein kinase A and Rho-family GTPases signaling mediates cell-cell adhesion and actin cytoskeleton organization in epithelial cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 327:777-88; PMID:18791066; <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.108.140798>
 138. Leve F, Marcondes TGC, Bastos LGR, Rabello SV, Tanaka MN, Morgado-Díaz JA. Lysophosphatidic acid induces a migratory phenotype through a cross-talk between RhoA-Rock and Src-FAK signalling in colon cancer cells. *Eur J Pharmacol* 2011; 671:7-17; PMID:21968138; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.09.006>
 139. Block J, Breitsprecher D, Kühn S, Winterhoff M, Kage F, Geffers R, Duwe P, Rohn JL, Baum B, Brakebusch C, et al. FMNL2 drives actin-based protrusion and migration downstream of Cdc42. *Curr Biol CB* 2012; 22:1005-12; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.03.064>
 140. Elbediwy A, Zihni C, Terry SJ, Clark P, Matter K, Balda MS. Epithelial junction formation requires confinement of Cdc42 activity by a novel SH3BP1 complex. *J Cell Biol* 2012; 198:677-93; PMID:22891260; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201202094>
 141. Shen Y, Hirsch DS, Sasiela CA, Wu WJ. Cdc42 regulates E-cadherin ubiquitination and degradation through an epidermal growth factor receptor to Src-mediated pathway. *J Biol Chem* 2008; 283:5127-37; PMID:18057010; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M703300200>
 142. Ke T-W, Hsu H-L, Wu Y-H, Chen WT-L, Cheng Y-W, Cheng C-W. MicroRNA-224 suppresses colorectal cancer cell migration by targeting Cdc42. *Dis Markers* 2014; 2014:617150; PMID:24817781; <http://dx.doi.org/10.1155/2014/617150>
 143. Zins K, Gunawardhana S, Lucas T, Abraham D, Aharinejad S. Targeting Cdc42 with the small molecule drug AZA197 suppresses primary colon cancer growth and prolongs survival in a preclinical mouse xenograft model by downregulation of PAK1 activity. *J Transl Med* 2013; 11:295; PMID:24279335; <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-11-295>
 144. Gopalakrishnan N, Saravanakumar M, Madankumar P, Thyagu M, Devaraj H. Colocalization of β -catenin with Notch intracellular domain in colon cancer: a possible role of Notch1 signaling in activation of CyclinD1-mediated cell proliferation. *Mol Cell Biochem* 2014; 396:281-93; PMID:25073953; <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-014-2163-7>
 145. Chartier NT, Oddou CI, Lainé MG, Ducarouge B, Marie CA, Block MR, Jacquier-Sarlin MR. Cyclin-dependent kinase 2/Cyclin E complex is involved in p120 catenin (p120ctn)-dependent cell growth control: a new role for p120ctn in cancer. *Cancer Res* 2007; 67:9781-90; PMID:17942908; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0233>
 146. Tanaka-Okamoto M, Hori K, Ishizaki H, Itoh Y, Onishi S, Yonemura S, Takai Y, Miyoshi J. Involvement of afadin in barrier function and homeostasis of mouse intestinal epithelia. *J Cell Sci* 2011; 124:2231-40; PMID:21652626; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.081000>
 147. De Araújo WM, Vidal FCB, de Souza WF, de Freitas JCM, de Souza W, Morgado-Díaz JA. PI3K/Akt and GSK-3 β prevents in a differential fashion the malignant phenotype of colorectal cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136:1773-82; PMID:20204404; <http://dx.doi.org/10.1007/s00432-010-0836-5>
 148. Vaidya RJ, Ray RM, Johnson LR. Akt-mediated GSK-3 β inhibition prevents migration of polyamine-depleted intestinal epithelial cells via Rac1. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2006; 63:2871-9; <http://dx.doi.org/10.1007/s00180-006-6379-x>
 149. Malliri A, Rygiel TP, van der Kammen RA, Song J-Y, Engers R, Hurlstone AFL, Clevers H, Collard JG. The Rac activator Tiam1 is a Wnt-responsive gene that modifies intestinal tumor development. *J Biol Chem* 2006; 281:543-8; PMID:16249175; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M507582200>