



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

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

Papel da Anexina A2 na progressão do câncer colorretal

MURILO RAMOS ROCHA

Orientador: Prof. Dr. Jose Andres Morgado Diaz

Rio de Janeiro

2017



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

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

Papel da Anexina A2 na progressão do câncer colorretal

MURILO RAMOS ROCHA

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

Orientador: Jose Andres Morgado Diaz

**Rio de Janeiro
2017**



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

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

Papel da Anexina A2 na progressão do câncer colorretal

MURILO RAMOS ROCHA

Orientador: Jose Andres Morgado Diaz

Aprovado em: 11 / dezembro / 2018

Banca Examinadora:

Prof Dr Leonardo Karam Teixeira

Prof Dr Miguel Angelo Martins Moreira

Profa Dra Verônica Maria Morandi da Silva

Prof Dr André Luiz Mencialha

Profa Dra Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay

Prof Dr Leonardo Rodrigues Andrade

Rio de Janeiro

2017

R672p Rocha, Murilo Ramos.

Papel da anexina A2 na progressão do câncer colorretal / Murilo Ramos
Rocha. – Rio de Janeiro, 2017.
79 f.: il. color.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José
Alencar Gomes da Silva, 2017.

Orientador: Jose Andres Morgado Diaz.

1. Anexicina A2. 2. Progressão da Doença. 3. Neoplasias Colorretais.
I. Diaz, Jose Andres Morgado (Orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José
Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.99435

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao meu avô Dilson e a minha avó Eunice, que sempre foram um modelo da busca pelo conhecimento e da importância da educação

AGRADECIMENTOS

Quero em primeiro lugar agradecer a Deus pela provisão e o sustento, por cada instante nessa larga caminhada que me trouxe até este momento da defesa de minha tese e seguramente por todos os dias da minha vida.

Quero agradecer aos meus pais e familiares, por sempre me apoiarem e estimularem a seguir adiante e por terem movidos céus e terra para que eu pudesse buscar o melhor e vivenciar oportunidades inestimáveis na minha carreira científica e pessoal.

Quero agradecer aos meus amigos mais próximos. Bruno Giordano Neto e Melina Urquiza Contador que apesar da distância sempre mostraram o valor e o significado de uma verdadeira amizade. E a Fiorella Morgado em especial, que esteve todo o tempo ao meu lado de forma inestimável, me ajudando nos momentos difíceis, comemorando os momentos alegres, me apoiando sempre. Sem ela, essa tese não teria se concretizado.

Agradeço muito ao meu orientador Dr Jose Andres Morgado Diaz, por ter acreditado naquele aluno perdido em busca de oportunidades em Washington e por ter me apresentado com mais profundidade ao mundo da microscopia, que é hoje além de nosso objeto de estudo, a minha paixão.

Agradeço a todos os colegas do Programa de Oncobiologia Celular e Molecular, pelo convívio e ajuda de cada dia. E em especial ao grupo da transição epitélio mesênquima, a Renata Ivo, Josiane Webber e a Luciana Bueno.

Quero agradecer a todo corpo técnico e administrativo do INCA por tornarem possível o trabalho que executamos a cada dia.



PAPEL DA ANEXINA A2 NA PROGRESSÃO DO CÂNCER COLORRETAL

RESUMO – TESE DE DOUTORADO

Anexinas são proteínas ligantes de fosfolipídeos dependente de cálcio que exercem funções celulares como organização do citoesqueleto, transporte de íons e sinalização celular. Por estarem relacionadas com a organização de actina e com a proliferação celular; alterações na sua expressão podem ser implicadas na tumorigênese de diferentes tipos de câncer. A anexina A2 (ANXA2), promove a proliferação, migração e invasão celular quando superexpressa. Em estudo recente, sugeriu-se a utilização da anexina A2 como biomarcador do desenvolvimento do câncer colorretal (CCR). Contudo, existem poucas evidências sobre como a ANXA2 é regulada e seu papel na modulação de vias de sinalização é pouco conhecido. O objetivo desse estudo foi a elucidação do papel da ANXA2 em eventos relacionados com a progressão do CCR. Análise da expressão de ANXA2 em amostras de pacientes de CCR revelou aumento da expressão no tecido tumoral, corroborados pela análise do banco de dados do TCGA e por nossos resultados de IHC indicando relação da ANXA2 com estadios mais avançados e marcação diferencial na metástase. Foram realizados ensaios *in vitro* para avaliar os níveis de expressão e fosforilação (resíduo Y23) da proteína anexina A2, em linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon (Caco-2, HT-29 e HCT-116), através de imunoblotting. Para a avaliação do papel da ANXA2 na progressão tumoral, submetemos células HT-29, silenciada ou não para a ANXA2, ao tratamento com TGF- β , avaliando o potencial proliferativo, migratório e invasivo destas células. Os resultados mostram que as células Caco-2 apresentam um nível de fosforilação da ANXA2 menor do que os níveis observados nas células HT-29 e HCT-116, as quais apresentaram níveis similares de fosforilação desta proteína. Para avaliação de eventos relacionados com a EMT, foram analisados marcadores epiteliais e mesenquimas por meio de imunoblotting e imunofluorescência. Mediante tratamento com TGF- β , a linhagem HT-29 exibiu alterações morfológicas características com o desenvolvimento da EMT, assim como redução de E-caderina e aumento na expressão de marcadores mesenquimais como a vimentina. Houve aumento de expressão total de ANXA2, da sua forma fosforilada e realocização da superfície celular para o citoplasma na linhagem HT-29. Concomitantemente ao tratamento com TGF- β observou-se a perda dos contatos intercelulares mediada pela internalização da E-caderina e ANXA2. A análise de microscopia de iluminação estruturada confirmou a colocalização de ambas proteínas intracelularmente, assim como a transfecção de mutantes sítios específicos para a ANXA2 provou a sua interação com E-caderina. O ensaio de proliferação mostrou que o TGF- β e o silenciamento de ANXA2 são anti-proliferativos. O silenciamento causou redução na migração (*Wound Healing*), independente do aumento migratório causado pelo TGF- β . A indução da EMT por TGF- β levou ao aumento na capacidade invasiva destas células, aumento que não ocorreu nas células silenciadas para a ANXA2 ou tratadas com STA21 (inibidor de STAT3). O uso deste inibidor, STA21 e de PP2 (inibidor de Src) impediram a EMT nas células tratadas com TGF- β . Concluimos que a ANXA2 atua na manutenção das junções celulares mediadas pela E-caderina; do aumento da capacidade invasiva, características do processo de EMT, via Src/ANXA2/STAT3 e também na proliferação e migração celular.



ANNEXIN A2 ROLE IN COLORECTAL CANCER PROGRESSION

ABSTRACT –DOCTORAL DEGREE

Annexins are phospholipid calcium dependent binding proteins that play cellular roles like cytoskeleton organization, ion transport and cell signalling. Due to its relation to actin and cell proliferation, it's no wonder expression changes might be implicated in distinct cancer types. Annexin A2 promotes proliferation, migration and invasion when overexpressed. Recent studies suggested its use as a diagnostic and prognostic biomarker for colorectal cancer (CRC). However, there is still much to be understood on ANXA2 regulation and cell signalling modulation. This work's goal was unraveling ANXA2 role in events related to CRC progression. ANXA2 expression analysis in CRC patient samples revealed overexpression. These results were confirmed with in silico analysis (TCGA data bank) and through IHC analysis, that indicated ANXA2 correlation to the more invasive stages and metastasis itself. In vitro assays were performed to assess expression and phosphorylation levels of ANXA2 in three CRC cell lines (Caco-2, HT-29 and HCT-116). Proliferation, migration and invasion were evaluated in siRNA ANXA2 silenced cells, treated or not with TGF- β . Among the three cell lines, Caco-2 show the smaller expression and phosphorylation of ANXA2, while HT-29 and HCT-116 had similar levels. To evaluate epithelial-mesenchymal transition (EMT) in these cells, vimentin and e-cadherin (respectively a mesenchymal and one epithelial markers) expression and localization were assessed by immunoblotting and immunofluorescence. Upon TGF- β induction, HT-29 cells showed characteristic phenotype, loss of cell-cell contacts and e-cadherin and ANXA2 internalization. Structural Illumination Microscopy (SIM) confirmed both proteins colocalization, just as the transfection of site-specific mutated ANXA2 in CACo-2 cells did. Proliferation assay showed inhibition both by TGF- β treatment and siANXA2. Silencing caused reduced migration however it did not hinder migration increases induced by TGF β . EMT induction led to increased invasiveness, except when ANXA2 was silenced or STAT3 selectively inhibited (STA21). The use of STA21 or PP2 (Src inhibitor) prevented from EMT changes when cells were treated with TGF- β . Hecenforth we conclude that ANXA2 acts on cell junctions maintenance through E-cadherin, on invasive potential; EMT characteristics through Src/ANXA2/STAT3, and also affects proliferation and migration.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-1 - MODELO MORFOGENÉTICO DA PROGRESSÃO DO CÂNCER COLORRETAL	4
FIGURA 1-2 - DIVISÃO MOLECULAR CONSENSUAL DO CCR APRESENTA 4 SUBTIPOS BIOLÓGICAMENTE E CLINICAMENTE DISTINTOS	5
FIGURA 1-3 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DO DESENVOLVIMENTO DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO MESENQUIMA E SUA PLASTIIDADE	7
FIGURA 1-4 - CASCATAS METASTÁTICAS E A CONTRIBUIÇÃO DOS DISTINTOS ESTÁGIOS CELULARES DA EMT NA FORMAÇÃO DE METÁSTASES	8
FIGURA 1-5 – ESQUEMA DAS PRINCIPAIS VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA INDUÇÃO DA EMT PELO TGF β	10
FIGURA 1-6 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DOS COMPONENTES DAS JUNÇÕES INTERCELULARES EM UM TECIDO EPITELIAL.....	11
FIGURA 1-7 ORGANIZAÇÃO E ESTRUTURA DA ANXA2	13
FIGURA 1-8 - DIAGRAMA DE FUNÇÕES DA ANXA2	18
FIGURA 4-1 – ANÁLISE POR IMMUNOBLOTTING DA EXPRESSÃO DE ANXA2 EM AMOSTRAS DE PACIENTES DE CCR.....	28
FIGURA 4-2. IMUNOHISTOQUÍMICA DE TUMORES PRIMÁRIOS DE CÔLON PARA ANXA2 E E-CADERINA.	30
FIGURA 4-3. IMUNOHISTOQUÍMICA DE TUMORES HEPÁTICOS (SECUNDÁRIOS PROVENIENTES DE CCR).....	31
FIGURA 4-4. QUANTIFICAÇÃO DOS SCORES DE ANXA2 E E-CADERINA NAS IHCs ANALISADAS.	32
FIGURA 4-5 - EXPRESSÃO E ORGANIZAÇÃO DA ANXA2 EM TRÊS LINHAGENS CELULARES DE CCR.....	34
FIGURA 4-6 – PADRONIZAÇÃO DE SILENCIAMENTO DA ANXA2.....	35
FIGURA 4-7 - CURVA DE PROLIFERAÇÃO (EM DMEM 10% SFB) POR CRISTAL VIOLETA PARA O SILENCIAMENTO DA ANXA2.	35
FIGURA 4-8 – ENSAIO DE WOUND HEALING DE CÉLULAS HT-29 SILENCIADAS PARA ANXA2.	36
FIGURA 4-9 - ENSAIO DE INVASÃO EM MATRIGEL DE CÉLULAS HT-29 SILENCIADAS PARA ANXA2.....	37
FIGURA 4-10 –INDUÇÃO VIA TGF-B DA EMT NA LINHAGEM HT-29.....	39
FIGURA 4-11 - INDUÇÃO VIA TGF-B DA EMT NA LINHAGEM HCT-116	40
FIGURA 4-12 – EXPRESSÃO E DISTRIBUIÇÃO CELULAR DA ANXA2 EM CÉLULAS HT-29	42
FIGURA 4-13 - EXPRESSÃO E DISTRIBUIÇÃO CELULAR DA ANXA2 EM CÉLULAS HCT-116	43
FIGURA 4-14 – CURVA DE ATIVAÇÃO DE ANXA2 E SRC FRENTE A TRATAMENTO COM TGF-B EM ATÉ 6 HORAS	44
FIGURA 4-15. AVALIAÇÃO DA COLOCALIZAÇÃO ENTRE PSTAT3 E DAPI PARA INDICAÇÃO DE TRANSLOCAÇÃO NUCLEAR DE STAT3.	45
FIGURA 4-16. ANÁLISE DO EIXO SAGITAL (XZ) PARA A LOCALIZAÇÃO DE PANXA2, E-CADERINA E F-ACTINA EM CÉLULAS HT-29 CONTROLE OU TRATADAS COM TGF- β	46
FIGURA 4-17. MICROGRAFIA DE CONTRASTE DE FASE DO FENÓTIPO DE CÉLULAS HT-29 SOB PRÉ-TRATAMENTO COM INIBIDORES DE SRC (PP2) E STAT3 (STA21) E TRATAMENTO COM TGF- β	47
FIGURA 4-18 - CURVA DE PROLIFERAÇÃO POR CRISTAL VIOLETA PARA O SILENCIAMENTO DA ANXA2 ASSOCIADO AO TRATAMENTO COM TGF-B	48
FIGURA 4-19 - ENSAIO DE WOUND HEALING DE CÉLULAS HT-29 SILENCIADAS PARA ANXA2 COM OU SEM TRATAMENTO COM TGF-B	49

FIGURA 4-20 - ENSAIO DE INVASÃO DE MATRIGEL EM TRANSWELL DE CÉLULAS HT-29 SILENCIADAS PARA ANXA2, INIBIDAS PARA STAT3 E TRATADAS COM TGF-B	50
FIGURA 4-21. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE ANXA2 E CDH1 A PARTIR DE DADOS DE RNASEQ ARMAZENADOS NO TCGA DE PACIENTES COM CCR.....	51
FIGURA 4-22. CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DO MRNA DE CDH1 E ANXA2 EM PACIENTES DO TCGA.....	52
FIGURA 4-23 – COLOCALIZAÇÃO DE ANXA2 E E-CADERINA FRENTE AO TRATAMENTO COM TGF-B	53
FIGURA 4-24 – AVALIAÇÃO DA COLOCALIZAÇÃO ENTRE ANXA2 E E-CADERINA POR MEIO DE MICROSCOPIA DE ILUMINAÇÃO ESTRUTURADA.....	54
FIGURA 4-25 - AVALIAÇÃO DA COLOCALIZAÇÃO ENTRE ANXA2 E E-CADERINA POR MEIO DE MICROSCOPIA DE ILUMINAÇÃO ESTRUTURADA.....	56
FIGURA 4-26. ANÁLISE MORFOLÓGICA DA FORMAÇÃO DE ESFERÓIDES EM MATRIGEL® PELA LINHAGEM HT-29	57
FIGURA 4-27. MÁXIMA PROJEÇÃO DA IMUNOFLUORESCÊNCIA DE CULTURA TRIDIMENSIONAL DE CÉLULAS HT-29 MARCADAS PARA E-CADERINA E ANXA2	58
FIGURA 4-28. INTERAÇÃO DA ANXA2-GFP (SELVAGEM, Y23E OU Y23F) COM A E-CADERINA EM CÉLULAS DA LINHAGEM CACO-2.	59
FIGURA 4-29. E-CADERINA É INTERNALIZADA COM O RECEPTOR EPHA4 EM CÉLULAS EM PROCESSO DE EMT INDUZIDA PELA IRRADIAÇÃO	60
FIGURA 4-30. IMMUNOBLOTTING DE EPHA4 E ANXA2 (FORMAS TOTAIS E FOSFORILADAS) NO MODELO DE IRRADIAÇÃO E COM PRÉ-TRATAMENTO DO PEPTÍDEO ANTAGONISTA DO RECEPTOR EPHA4.....	61
FIGURA 5-1. ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PAPEL EXERCIDO PELA ANXA2 FRENTE AO TRATAMENTO COM TGF-B NESTE MODELO EXPERIMENTAL.....	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-1 - DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2016 (EXCETO PELE NÃO-MELANOMA) NO BRASIL. FONTE: MS/INCA/ESTIMATIVA DE CÂNCER NO BRASIL, 2016	2
TABELA 4-1. CARACTERÍSTICAS CLINICO-PATOLÓGICAS DOS PACIENTES ANALISADOS E SUA CORRELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE ANXA2 (ALTA/BAIXA)	33

LISTA DE ABREVIATURAS

AF – Adesões focais
ANXA2 – Anexina A2
APC – Do inglês, *Adenomatous polyposis coli*
BRAF – Do inglês, *v-rafmurine sarcoma viral oncogene homolog B*
CAF – *Fibroblastos associados ao câncer*
CCR – Câncer Colorretal
Cdc42 – Do inglês, *Cell division control protein 42 homolog*
Cdk – Do inglês, *Cyclin-dependent kinases*
CFL1- Cofilina-1
CIMP – Do inglês, *CpG Island Methylator Phenotype*
CIN – Do inglês, *Chromosomal Instability*
CJA – Complexo Juncional Apical
CMSx – Do inglês *Consensus Molecular Subtype x*
DCC – Do inglês, *Deleted in Colorectal Cancer*
EGF – Do inglês, *Epidermal growth factor*
EMT – Do inglês, *Epithelial Mesenchymal Transition*
ERK1/2 – Do inglês, *Extracellular-signal-regulated kinase 1/2*
FAK – Do inglês, *Focal Adhesion Kinase*
FAP – Do inglês, *Familial Adenomatous Polyposis*
FGF – Fator de crescimento fibroblástico
FGFR – Do inglês, *Fibroblast growth factor receptors*
G0, G1 – Fase gap (0 ou 1) do ciclo celular
GSK3 β – Do inglês, *Glycogen synthase kinase 3*
HNPCC – Do inglês, *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*
IARC – *Internacional Agency for Research on Cancer*
IDH – Índice de Desenvolvimento Humano
IGF – Do inglês, *Insulin growth factor*
IL-6 – Interleucina 6
JA/JAs – Junção aderente/Junções aderentes
JAK – *Janus kinase*
JNK – Do inglês, *c-Jun N-terminal kinase*
K-Ras – Do inglês, *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homologue*
LIMK – LIM kinase

MAPK – Do inglês, *Mitogen-activated protein kinases*
MDCK – Do inglês, *Madin-darby canine kidney*
MET – Do inglês, *Mesenchymal Epithelial Transition*
MLH1 – Do inglês, *MutL protein homolog 1*
MMP – Metaloproteinase de matriz
MMR – Do inglês, *Mismatch Repair*
MSH2/6 – Do inglês, *MutS protein homolog 2/6*
MUTYH ou MYH – Do inglês, *Mut Y homolog*
NFkB – Do inglês, *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas
PI3K – Do inglês, *Phosphatidylinositol- 4,5- Biphosphate3-kinase*
Rho – Do inglês, *ras homolog family member*
ROCK – Do inglês, *rho-associated, coiled-coil containing protein kinase*
S – Fase da síntese de DNA do ciclo celular
SPS – Do inglês, *Serrated Polyposis Syndrome*
STAT – *Signal transducer and activator of transcription*
TGF- β – Do inglês, *Transforming growth factor β*
VEGF – Do inglês, *Vascular endothelial growth factor*
Wnt – Do inglês, *Wingless*
Y23 – Tirosina 23
ZO's – *Zonula occludens*

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CÂNCER: UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA.....	1
1.1.1. Câncer Colorretal.....	2
1.2. TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMA.....	5
1.2.1. TGF- β e a indução da EMT.....	8
1.3. COMPLEXO JUNCIONAL APICAL.....	10
1.4. ANEXINAS	12
1.4.1. Anexina A2	13
1.4.2. ANXA2 e suas Funções.....	14
1.5. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO.....	19
2. OBJETIVOS	20
2.1. OBJETIVO GERAL	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Reagentes.....	20
3.2. Cultura de células	21
3.3. Tratamento com TGF- β e inibidores.....	22
3.4. Amostras de pacientes.....	22
3.5. Obtenção do listado proteico	22
3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida usando sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE), Immunoblotting e análise densitométrica.....	22
3.7. Imunohistoquímica e análise patológica.....	23
3.8. Imunofluorescência.....	24
3.9. Silenciamento por siRNA.....	25
3.10. Transfecção com mutantes sítio específicos para ANXA2	25
3.11. Proliferação celular.....	26
3.12. Ensaio de migração celular por Wound healing	26
3.13. Ensaio de invasão celular	26
3.14. Análise de expressão de mRNA utilizando banco de dados do TCGA.....	27
3.15. Análise estatística.....	27
4. RESULTADOS	27
4.1. Amostras tumorais de pacientes apresentam elevada expressão protéica de ANXA2.....	27

4.2.	<i>Análise imunohistoquímica de tumores coloretais revela aumento de marcação em estadios mais avançados.....</i>	28
4.3.	<i>Linhagens celulares de CCR apresentam distintos níveis de expressão de ANXA2.....</i>	33
4.4.	<i>Silenciamento da ANXA2 por meio de siRNA na linhagem HT-29</i>	34
4.5.	<i>Silenciamento da ANXA2 na linhagem HT-29 reduz seu potencial proliferativo. Análise do potencial migratório em células HT-29 silenciadas para ANXA2.....</i>	35
4.6.	<i>Silenciamento da ANXA2 não altera a capacidade invasiva da linhagem HT-29</i>	36
4.7.	<i>Indução de EMT via TGF-β nas linhagens HT-29 e HCT-116.....</i>	37
4.8.	<i>Tratamento com TGF-β altera a expressão de ANXA2 de forma linhagem específica</i>	41
4.9.	<i>TGF-β induz a fosforilação de ANXA2 em Y23 via Src na linhagem HT-29 e translocação de STAT3 para o núcleo</i>	43
4.10.	<i>ANXA2 é redistribuída intracelularmente após indução da EMT por meio de TGF-β</i>	45
4.11.	<i>Inibição farmacológica de Src e STAT3 previne a indução da EMT induzida por TGF-β</i>	46
4.12.	<i>Inibição da proliferação celular pelo silenciamento de ANXA2 não é cumulativa ao efeito antiproliferativo do TGF-β</i>	47
4.13.	<i>Silenciamento de ANXA2 não impede o aumento do potencial migratório induzido por TGF-β</i>	48
4.14.	<i>Tratamento com TGF-β induz aumento de invasão celular de forma ANXA2-dependente.....</i>	49
4.15.	<i>Análise in silico confirma super-expressão de ANXA2 em pacientes de CCR e envolvimento com grupos de pior prognóstico.....</i>	50
4.16.	<i>ANXA2 participa do processo de desmontagem das junções intercelulares de E-caderina na indução da EMT</i>	52
4.17.	<i>Em cultura tridimensional, ANXA2 e E-caderina apresentam dinâmica semelhante a organização em monocamadas.....</i>	57
4.18.	<i>Super-expressão de ANXA2 na linhagem Caco-2 confirma interação com E-caderina</i>	58
4.19.	<i>Resultados de colaboração durante o doutorado:.....</i>	59
a)	<i>O modelo de EMT na progênie de células irradiadas, internalização de E-caderina e ativação de ANXA2.....</i>	59
5.	DISCUSSÃO	61

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer: um problema de saúde pública

Como a principal causa de morte em países desenvolvidos e segunda em países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos; o câncer se destaca como um proeminente problema de saúde pública global (Jemal *et al.*, 2008). De acordo com levantamento feito pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC): em 2012 houveram 14,1 milhões de novos casos de câncer, 8,2 milhões de mortes e 32,6 milhões de pessoas vivendo com câncer (em intervalo de 5 anos após o diagnóstico). A estimativa para 2035 é que a incidência salte para 24 milhões de novos casos, um aumento de aproximadamente 70% (Ferlay *et al.*, 2015). Fatores como a maior expectativa de vida, tabagismo, sedentarismo e a “ocidentalização” (adoção de dietas ricas em gorduras e produtos industrializados) explicam os altos índices em países desenvolvidos e o aumento principalmente em países em desenvolvimento (Jemal *et al.*, 2011). Em contraposto ao aumento em países em desenvolvimento, países com alta renda *per capita* passam por uma manutenção ou queda na taxa de mortalidade para a maioria dos tipos de câncer graças ao maior conhecimento de fatores de risco, a detecção precoce e melhores tratamentos (Torre *et al.*, 2016). Essa correlação entre incidência e o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) é particularmente alta em alguns tumores como o câncer colorretal (CCR), para qual 55% de novos casos no mundo provem de países com IDH elevado (Bray *et al.*, 2012; Ministério Da Saúde, 2016).

O CCR se enquadra como o terceiro tipo de câncer mais incidente no mundo com uma estimativa de 1,36 milhão de novos casos em 2012. No Brasil, o CCR segue a mesma tendência como o terceiro mais incidente entre homens e o segundo entre mulheres. Estima-se que em 2016 haverá 34,22 mil novos casos na população brasileira (Ministério Da Saúde, 2016) (Tabela 1-1).

Tabela 1-1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 (exceto pele não-melanoma) no Brasil. Fonte: MS/INCA/Estimativa de Câncer no Brasil, 2016

Localização primária	casos novos	%			Localização primária	casos novos	%
Próstata	61.200	28,6%	Homens 	Mulheres 	Mama Feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do Útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do Útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

1.1.1. Câncer Colorretal

Muito incidente em países com alto IDH, o câncer colorretal está fortemente associado ao “estilo de vida”. Hábitos como o consumo excessivo de carnes vermelhas ou processadas, dieta rica em gorduras, baixa ingestão de legumes, frutas e verduras, alta prevalência de obesidade, sedentarismo, consumo de álcool e tabagismo são fatores de risco para o desenvolvimento do CCR. Além destes e da idade; o histórico familiar, existência de doenças inflamatórias do intestino como retocolite ulcerativa e doença de Crohn e a predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino como a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP, do inglês *Familial Adenomatous Polyposis*) e a Síndrome de Lynch ou câncer colorretal hereditário não poliposo (HNPCC, do inglês *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*) são fatores determinantes no desenvolvimento de tumores colorretais.

Estes componentes são relacionados a três formas distintas de manifestação da doença: esporádica, hereditária e familiar. O CCR esporádico, mais comum em indivíduos acima de 50 anos, corresponde a 75% dos casos sendo resultado da ação gradativa dos fatores acima citados (Fearon, 2011; Ministério Da Saúde, 2013). As síndromes hereditárias são provenientes de mutações na linhagem germinativa, com manifestação fenotípica dependente do gene específico que é mutado, e são subdivididas em poliposas e não poliposas. Dentre as poliposas destacam-se a FAP clássica (presença de mais de 100 adenomas) e a atenuada (10 a 100 adenomas) que correspondem a 1% dos diagnósticos de CCR. Uma mutação germinativa do gene APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) induz a formação de pólipos adenomatosos (Jasperson et al., 2010). Além destas, a Síndrome Polipose Serrátil (SPS, do inglês *Serrated Polyposis Syndrome*) tem por característica a presença de múltiplos pólipos hiperplásicos, formados por uma mutação em BRAF (do inglês *v-rafmurine sarcoma*

viral oncogene homolog B) e hipermetilação de um conjunto de genes via CIMP (do inglês *CpG Island Methylator Phenotype*).

A síndrome de Lynch (ou HNPCC) é uma das síndromes não poliposas com incidência de aproximadamente 4% dentro do conjunto de casos de CCR. Uma mutação germinativa em genes de reparo de pareamento incorreto do DNA (MMR, do inglês *Mismatch Repair*), como o MSH2 e MLH1 (90%), MSH6 (10%) e PMS2 (raro) foi identificada como sua base molecular. Apesar de indivíduos acometidos por HNPCC apresentarem a formação de poucos pólipos, estes são altamente susceptíveis à progressão maligna. Se iniciando com mutação em genes MMR, o aparecimento de mutações concomitantes em APC, levam a rápida transformação por meio de um fenômeno conhecido como “tumorigênese acelerada”. Este fenômeno torna o HNPCC uma síndrome com alto índice (risco maior que 85%) de desenvolvimento de câncer em indivíduos acometidos (Fodde e Brabletz, 2007).

Apesar das síndromes acima descritas corresponderem a 5% dos casos de CCR, existem evidências de que por volta de 30% de todos os casos de CCR possuam algum componente hereditário. FAP, SPS e HNPCC apresentam manifestações clínicas bem descritas e etiologia baseada na herança de mutações de alta penetrância. O mesmo não ocorre com os outros 25% de casos que ocorrem em famílias com grande número de casos familiares com graus de parentesco de primeiro e segundo grau. A etiologia destes não segue um padrão uniforme, com provável causa em genes regulados por fatores ambientais ou alterações genéticas como polimorfismos regulando o metabolismo celular (Jasperson *et al.*, 2010; Fearon, 2011).

Levando em conta as graduais alterações genéticas envolvidas na etiologia do CCR e os indícios fornecidos pela elucidação das bases moleculares de cada síndrome envolvida, foi proposto um modelo genético para sumarizar a progressão do CCR (Figura 1-1). Em um momento inicial, mutações no gene APC levam a perda da função de sua proteína e conseqüente desregulação na via Wnt/ β -catenina. O acúmulo nuclear de β -catenina leva a um aumento na proliferação celular que propicia a progressão do tecido normal em um epitélio colônico displásico e aberrante (Klaus e Birchmeier, 2008). Após a formação da cripta displásica, mutações no gene K-Ras (do inglês *Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homologue*) levam a sua ativação constitutiva e a progressão da lesão displásica em um adenoma inicial (Arends, 2013). K-Ras pertence a superfamília RAS de pequenas GTPases e está associada a transdução de sinais disparados pela ativação de receptores tirosina quinase. Sua hiperativação leva a fosforilação da via ERK1/2 e conseqüente aumento de

proliferação via ciclina D1 (Wicki *et al.*, 2010). Instabilidade cromossômica, perda da atividade de DCC (do inglês *Deleted in Colorectal Cancer*) e do receptor de TGF- β e posterior inativação de p53 comporiam a progressão adenoma-carcinoma clássica para o CCR.

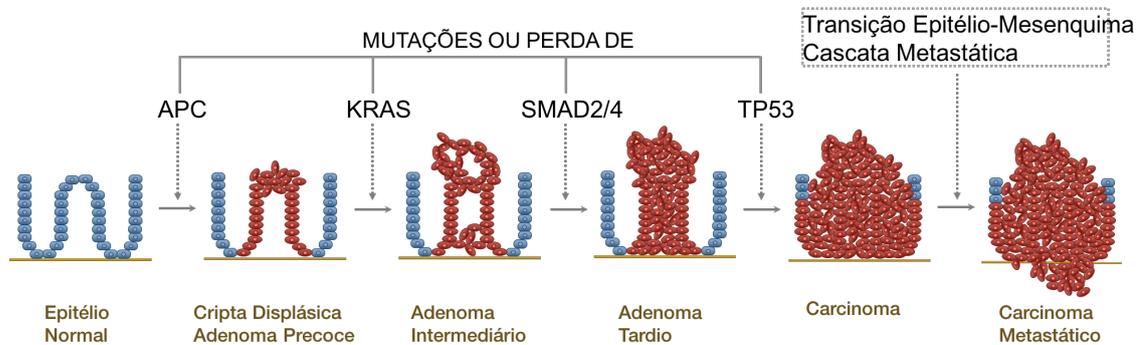


Figura 1-1 - Modelo morfológico da progressão do câncer colorretal. Adaptado de Davies *et al*005

Apesar desse modelo, a heterogeneidade dos casos de CCR com relação a etiologia, prognóstico e resposta a terapia, levou a seis grupos de pesquisa se unirem para uniformizar uma classificação molecular que separasse o CCR em subtipos, englobando o maior número de casos possíveis. Para isso foi analisada a expressão gênica de mais de 4150 pacientes até a chegada em um consenso de quatro subtipos moleculares (Figura 1-2). O primeiro subtipo (CMS1, do inglês *Consensus Molecular Subtype 1*) denominado de Instabilidade de Microssatélites Imune representa 14% dos casos e é caracterizado por hipermutação, instabilidade de microssatélites, fenótipo metilador de ilhas CpG (CIMP), mutação em BRAF e forte ativação imune. Apesar de apresentar bom prognóstico inicial, pacientes enquadrados no subtipo CMS1 apresentam prognóstico muito ruim após recorrência do tumor. O segundo grupo (CMS2) denominado de Canônico apresenta expressão gênica similar ao modelo genético descrito anteriormente para a progressão do CCR, com alteração inicial na via WNT e instabilidade cromossômica. O CMS3 foi chamado de Metabólico, por sua morfologia epitelial com extensa desregulação metabólica, mutações em K-Ras e baixa presença do fenótipo metilador de ilhas CpG (CIMP^{low}). O subtipo 4 (CMS4) recebeu a denominação de Mesenquimal. A análise gênica revelou uma alta atividade da via de TGF- β , VEGF, e Integrina- β 3: fatores que contribuiriam para a indução do processo de Transição Epitélio-Mesenquimal, da angiogênese e remodelação de matriz extracelular respectivamente. A grande densidade de células

estromais como os fibroblastos associados ao câncer (CAFs) associada a alteração nestas vias compõe o subtipo com o pior prognóstico dentre os anteriores.

	CMS1	CMS2	CMS3	CMS4
Porcentagem do Total de casos				
Potencial Lesão Precursora	 Adenoma Serrátil	 Adenoma Tubular	 Adenoma Tubular	 Adenoma Serrátil
Vias e Programas Celulares	JAK/STAT — Evasão Imune	Epiteliai SRC WNT — MYC	Epiteliai Desregulação Metabólica	TGFβ — EMT VEGF — Angiogênese Integrina β3 — Remodelamento de Matriz
Características moleculares destacadas	MSI+ CIMP+ BRAF ^{V600E}	CIN+	Mutações em KRAS CIMP ^{low}	CIN+
Microambiente	Infiltrado Imune (ex: linfócitos T citotóxicos)			Alta densidade de células estromais (ex: fibroblastos associados ao câncer - CAFs)
Características Clínicas	 Bom Prognóstico Mal Prognóstico após recorrência			 Pior Prognóstico
	Instabilidade de Microsatélites / Imune	Canônico	Metabólico	Mesenquimal

Figura 1-2 - Divisão Molecular Consensual do CCR apresenta 4 subtipos biologicamente e clinicamente distintos. Fonte: Fessler e Medema, 2016

1.2. Transição Epitélio-Mesenquima

A transição epitélio-mesenquima (EMT, do inglês *Epithelial-Mesenchymal Transition*), característica principal do subtipo Mesenquimal (CMS4) da nova subdivisão molecular do CCR, é um importante processo fisiológico (desenvolvimento embrionário e reparo tecidual) e patológico (fibrose e na progressão carcinoma-metástase de tumores epiteliais) (Thiery *et al.*, 2009). Este é um evento dinâmico em que as células modificam a expressão de suas proteínas de adesão para adquirir um fenótipo migratório e invasivo. Essa modificação gradual começa pela perda de parte das junções célula-célula e da polaridade apical-basal das células. Subsequentemente, as células assumem um fenótipo pouco proliferativo, achatado, em forma de fuso com polaridade antero-posterior e possíveis resquícios juncionais. Após extensa reprogramação de sua expressão proteica a célula perde seus contatos

célula-célula epiteliais e assume morfologia mesenquimal com aumentada interação com a matriz extracelular e grande capacidade migratória e invasiva (Figura 1-3) (Diepenbruck e Christofori, 2016; Nieto *et al.*, 2016). Contudo, a concepção da EMT estritamente como a redução de marcadores epiteliais (ex: E-caderina, ZO-1, claudinas, ocludinas e citoqueratinas em alguns casos) (Thiery e Sleeman, 2006) e o aumento na expressão de marcadores mesenquimais (como N-caderina, vimentina e α -actina de músculo liso) (Thiery *et al.*, 2009) levou a muita confusão e ceticismo quanto ao seu papel na cascata metastática ou sua existência *in vivo* (Tarin *et al.*, 2005). Trabalhos recentes, no entanto, trouxeram evidências de que não é necessário que haja esta transformação total de um estado epitelial em um estado mesenquimal. As células podem oscilar entre os estágios epiteliais e mesenquimais, adquirindo uma série de fenótipos intermediários, como ilustrado na Figura 1-3 (Nieto *et al.*, 2016). Este processo de EMT parcial já foi evidenciado no desenvolvimento, reparo tecidual, fibrose e na carcinogênese (Arnoux *et al.*, 2008; Blanco *et al.*, 2007; Fetterman *et al.*, 2011; Grande *et al.*, 2015; Leroy and Mostov, 2007; Lovisa *et al.*, 2015; Grigore *et al.*, 2016) assim como a presença de fenótipos híbridos epitelial/mesenquimal (Abell *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013; Jordan *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2013).

Transição Epitélio-Mesênquima

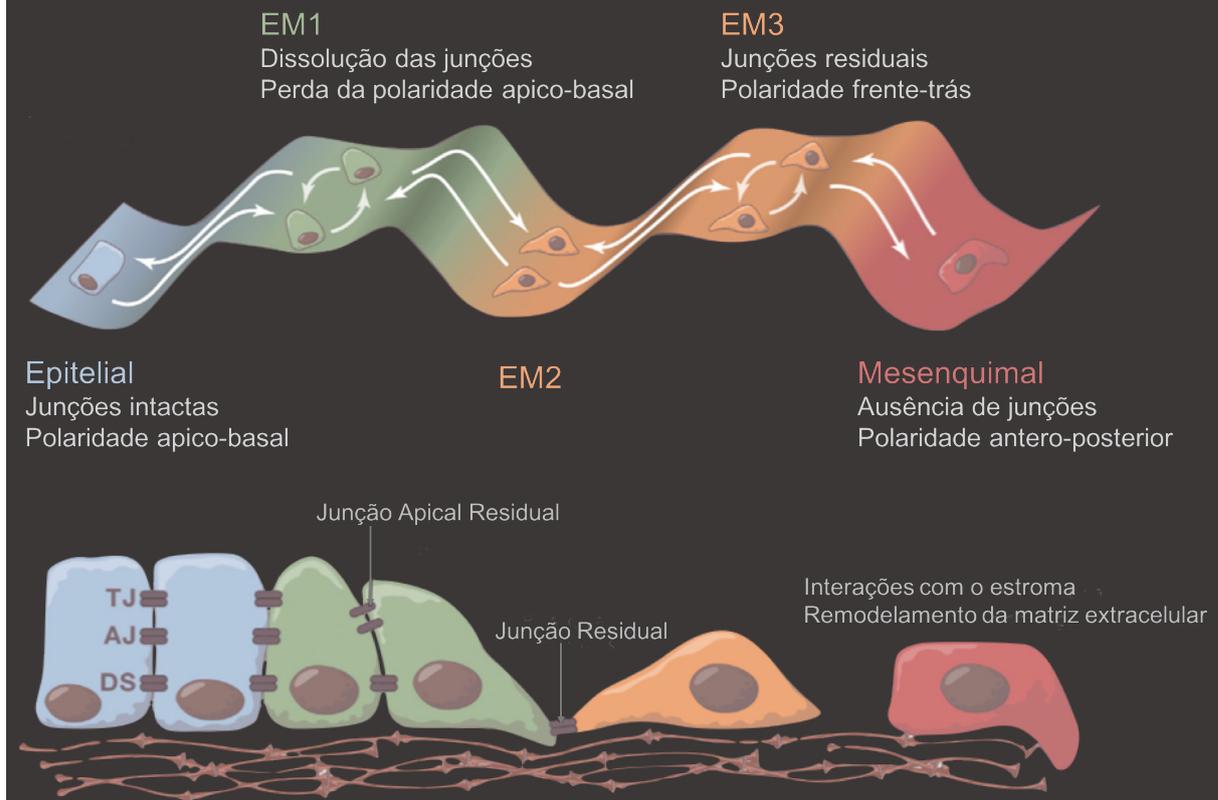


Figura 1-3 - Esquema ilustrativo do desenvolvimento da Transição Epitélio Mesenquima e sua plasticidade. Adaptado de Nieto *et al.*, 2016

Considerando a plasticidade da EMT e a sequência de eventos na cascata metastática supõe-se que uma parcela de células no tumor primário sofra desorganização ou perda de seu complexo juncional ganhando capacidade de deixar o tumor primário e migrar para o tecido circundante. Posteriormente estas células, de maneira individual ou coletiva (associadas a células que ainda preservem resquícios juncionais), intravasarão para a corrente sanguínea ou linfática. Na circulação as células devem sobreviver a condições hostis como o “shear stress”, anoikis e a vigilância imune. Nessas condições, células com fenótipo mesenquimal ou intermediário tem maior capacidade sobreviver aos estressores dentre outros fatores, por meio de uma maior adaptabilidade a deformação celular. No sítio secundário, as células em EMT aderem ao endotélio tecidual, extravasarão e migrarão para o parênquima do órgão. Ao atingir esse local, ocorre a colonização e formação do tumor secundário (metástase) através da recuperação de características mais epiteliais (o processo de Transição Mesenquima-Epitélio, MET) (Figura 1-4) (Acloque *et al.*, 2009; Thiery *et al.*, 2009; Nieto, 2013; Massague e Obenauf, 2016; Nieto *et al.*, 2016).

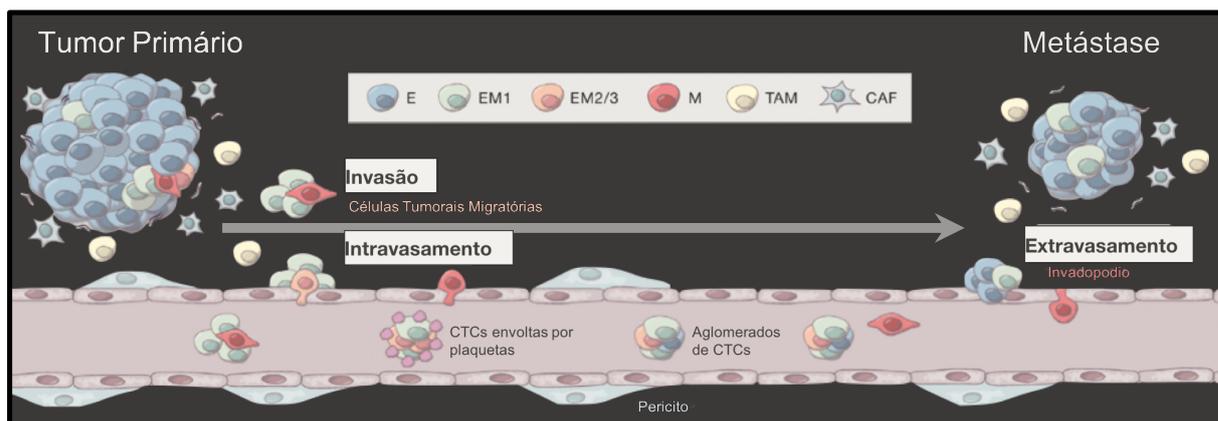


Figura 1-4 - Cascata Metastática e a contribuição dos distintos estágios celulares da EMT na formação de metástases. Fonte: Nieto *et al.*, 2016

Distintos estímulos extracelulares e fatores de crescimento podem induzir a EMT de forma contexto dependente (ex: TGF- β , IL-6, IGF-I, hipóxia tecidual, estresse metabólico, radiação e rigidez de matriz)(Lamouille *et al.*, 2014). Liberados seja pelas próprias células tumorais ou pelas células do estroma, estes fatores levam a ativação de vias como Wnt, Notch, Hedgehog, JAK-STAT, AP-1, NF κ b e Hippo que regulam a expressão e atividade de fatores de transcrição indutores de EMT (EMT-TFs)(Nieto e Cano, 2012). Estes fatores, como Snai1 (Snail), Snai2 (Slug), Twist1 e Zeb1, atuam primariamente como repressores transcricionais de genes epiteliais como CDH1 (E-caderina) e como ativadores de genes mesenquimais como a CDH2 (N-caderina) e a Vimentina (Peinado *et al.*, 2007; Nieto e Cano, 2012).

Além desses fatores de transcrição a EMT é regulada por distintos mecanismos não transcricionais, como pequenos RNAs não codificantes; por *splicing* alternativo e controles traducionais e pós traducionais. Estes mecanismos alteram a estabilidade, localização e expressão de proteínas do complexo juncional durante o processo mas também exercem controle sobre a motilidade celular, proliferação, diferenciação e apoptose (Lamouille *et al.*, 2014).

1.2.1. TGF- β e a indução da EMT

Dentre os distintos fatores de crescimento capazes de induzir a EMT, o TGF- β é o mais conhecido e utilizado para este fim em modelos experimentais. A expressão deste fator exerce um papel no desenvolvimento, mas também no reparo tecidual, fibrose e no câncer. Em carcinomas, o TGF- β promove plasticidade tecidual por meio de sua via de sinalização, o que conduz ao desenvolvimento da EMT, como descrito em carcinomas escamosos.

Para ativação da via, o TGF β deve se ligar a complexos tetraméricos de seus receptores de superfície. A ligação do fator de crescimento leva a ativação de T β RII, que fosforila T β RI, que uma vez ativado, leva a fosforilação de proteínas ligadas a sua região C-terminal. Associadas ao T β RI, SMAD2 e SMAD3 são fosforiladas e se juntam a SMAD4 para formar um complexo trimérico SMAD2/3-SMAD4. Este complexo então é translocado para o núcleo onde interage com ativadores e repressores da transcrição gênica para indução da expressão dos fatores de transcrição envolvidos na EMT (SNAI1, SNAI2, ZEB1, TWIST, entre outros). Porém, a via canônica de TGF- β não somente leva a expressão desses fatores como pode também regular sua atividade. SMAD3 além de induzir a expressão de Snail1, coopera junto de SMAD4 para a ação repressora de Snail1 na expressão de E-caderina e Ocludina. O mesmo ocorre com ZEB1, que tem sua expressão aumentada por SMAD3-SMAD4 e uma vez produzido, interage com o mesmo complexo para exercer seu controle transcricional.

A parte de sua via canônica de ativação, TGF- β pode ativar as vias de RHO GTPases, PI3K e MAPK (Derynck e Zhang, 2003; Moustakas e Heldin, 2005). A ativação de Rho, Rac e Cdc42 promove um remodelamento no citoesqueleto de actina e a formação de lamelipódios e filopódios (Ridley, 2011). Em estágios iniciais da EMT, a proteína PAR6 interage com os receptores de TGF- β nas junções tight (JTs). Uma vez estimulado, T β RII fosforila PAR6 e recruta a *E3 ubiquitin ligase SMAD ubiquitylation regulatory factor 1* (SMURF1), para promover a dissolução das JTs e a ubiquitinação e degradação de RhoA no local (Ozdamar *et al.*, 2005). Outra forma pela qual TGF β leva a ativação de RhoA (Bhowmick *et al.*, 2001) é por meio da expressão de GEFs (Shen *et al.*, 2001) e ativação de ROCK e LIMK (Vardouli *et al.*, 2005). A regulação de RhoA pode levar a alterações na expressão gênica e interferências em sua atividade revelaram a inibição da reorganização do citoesqueleto de actina (Tavares *et al.*, 2006) e da expressão de α -actina de músculo liso (α SMA) (Tsapara *et al.*, 2010) em resposta ao TGF β .

Outra via ativada por TGF β é a via de AKT. A ativação de PI3K pelo TGF β leva a subseqüentes ativações de AKT e mTORC1 e mTORC2 (do inglês, *Mammalian TOR complex*) (Bakin *et al.*, 2000; Lamouille e Derynck, 2007; Lamouille *et al.*, 2012). A inibição farmacológica de PI3K é capaz de impedir a indução da EMT pelo TGF β (Bakin *et al.*, 2000). Dentre as alterações características da EMT, o tamanho celular, síntese proteica, motilidade e invasão são reguladas por mTORC1 (Figura 1-5) (Lamouille e Derynck, 2007); enquanto mTORC2 é necessária para a alteração de

fenótipo de epitelial para mesenquimal (Lamouille *et al.*, 2012). Quando, no entanto, ocorre uma inibição de AKT especificamente, há menor expressão de SNAIL1. Essa redução atenua a repressão transcricional a E-caderina e reduz a expressão de MMP. A inibição de mTORC2 leva a ausência do comportamento invasivo e potencial metastático (Lamouille *et al.*, 2012). AKT pode também regular a estabilidade de SNAIL1 fosforilando GSK3 β aumentando sua capacidade de reprimir genes como da E-caderina (Zhou *et al.*, 2004).

Por meio de uma especificidade dual na atividade das kinases do receptor de TGF β (Kang *et al.*, 2009), ocorre a ativação da via ERK, p38, JUN N-terminal kinase (JNK) e MAPK. JNK ativa c-JUN, um dos componentes do complexo ativador de proteína 1 (AP-1). AP-1 por sua vez irá modular a transcrição induzida TGF β em cooperação SMAD3–SMAD4 (Santibanez, 2006).

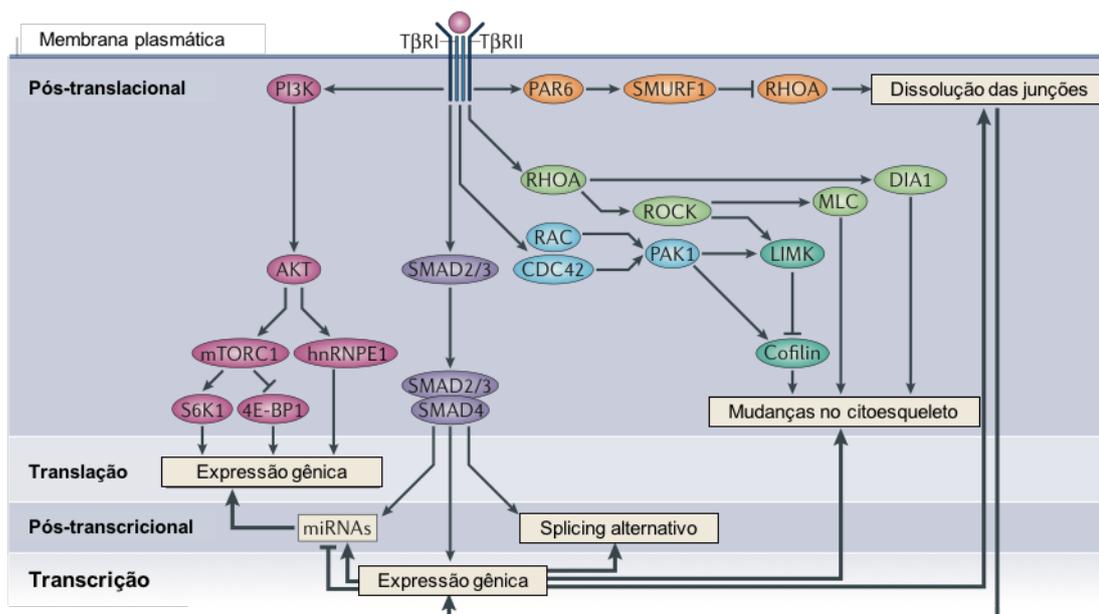


Figura 1-5 – Esquema das principais vias de sinalização envolvidas na indução da EMT pelo TGF β . Fonte: Lamouille *et al.*, 2014

1.3. Complexo Juncional Apical

As proteínas do complexo juncional apical (CJA) e sua organização são essenciais para a manutenção da integridade epitelial, sendo a sua desregulação o primeiro passo no processo de EMT. Essa integridade tecidual é mantida principalmente pelas junções intercelulares, organizadas em junções tight (JT), junções aderentes (JA), desmossomos, junções comunicantes e complexo de adesão célula-matriz (Figura 1-6). A região que engloba JT e JA compõe o CJA formando

domínios funcionais lípido-protéicos na membrana plasmática. Esta organização permite que a célula adquira uma polaridade ápico-basolateral, característica essencial na organogênese e na fisiologia dos tecidos epiteliais e endoteliais (Niessen e Gottardi, 2008; Giepmans e Van Ijzendoorn, 2009).

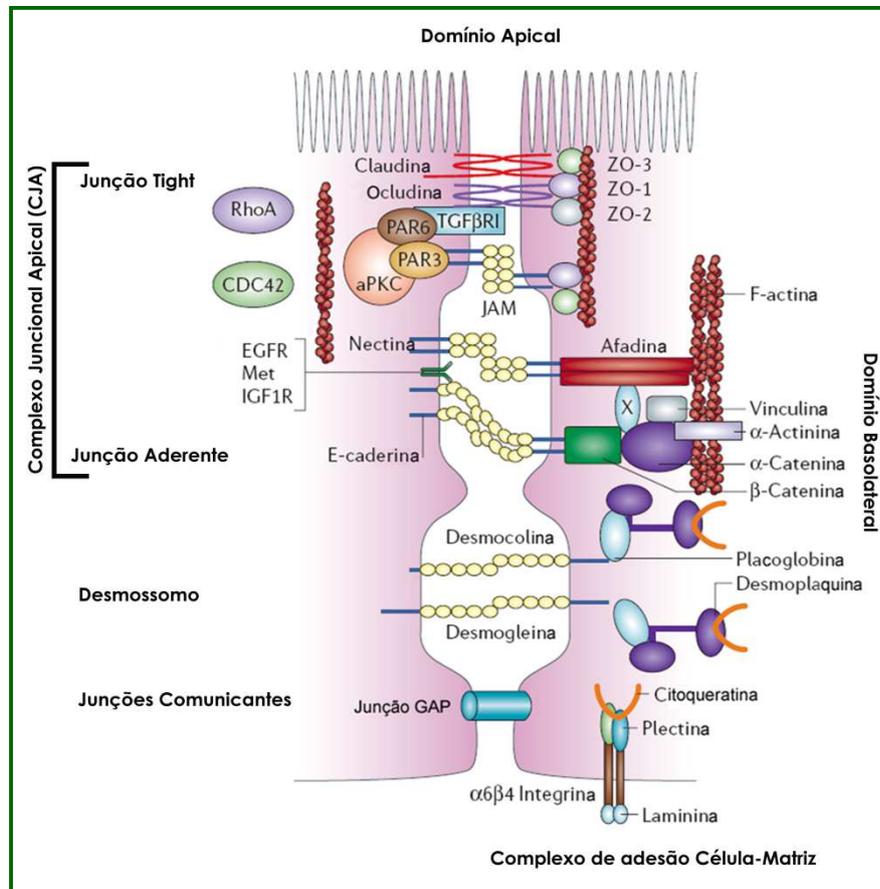


Figura 1-6 – Esquema ilustrativo dos componentes das junções intercelulares em um tecido epitelial. Adaptado de Thierry e Sleeman, 2006

Como esquematizado na Figura 1-6 acima, em sua base as células formam um complexo de adesão célula matriz por meio da interação de integrinas com sítos de ligação na lâmina basal (Miyoshi e Takai, 2008). Acima deste complexo estão organizadas as junções GAP e os desmossomos, que promovem comunicação e adesão entre as células respectivamente. Em uma região mais apical se encontra o CJA. As junções tight são compostas pelas proteínas integrais de membrana Claudina, Ocludina e JAM-A que se ligam por meio de um sítio PDZ as proteínas da zonula occludens (ZO1, ZO2, ZO3). Estas proteínas realizam a ponte entre as claudinas e ocludinas com os filamentos de actina, organizando assim as TJ.

Na região lateral entre TJs e desmossomos está a junção aderente (JA). Seus componentes essenciais são as proteínas integrais de membrana: E-caderina e nectina (Capaldo *et al.*, 2014). Essas proteínas se associam a membros da família

das cateninas, formando um elo com o citoesqueleto de actomiosina (Nelson *et al.*, 2013). A β -catenina se associa a E-caderina no retículo endoplasmático e é necessária para o efetivo transporte da mesma a membrana plasmática (Chen *et al.*, 1999). Uma vez na membrana, E-caderina/ β -catenina recrutam α -catenina que é essencial para a montagem das AJ.

Basicamente, as junções tight são um complexo protéico cujas proteínas transmembrana claudinas, ocludina e JAM se ancoram ao citoesqueleto de actina através de proteínas denominadas ZO's (Zonula Occludens). Já as junções aderentes que também são complexos protéicos formados neste caso por proteínas transmembrana caderinas e nectinas que se ancoram ao citoesqueleto de actina através das proteínas cateninas e afadina são as principais responsáveis pela adesão física entre células adjacentes, participando também na manutenção da polaridade celular e controle da proliferação celular (Wang *et al.*, 2011; Quiros e Nusrat, 2014).

Mais de 100 proteínas já foram identificadas como parte da composição das AJ, auxiliando no papel de manutenção da integridade tecidual, manutenção da polaridade e também controle da proliferação celular. Dentre estas proteínas destacamos a função da Anexina A2 (ANXA2). Já foram encontradas evidências de que esta proteína ligante de fosfolípidos, de forma dependente a íons cálcio, é importante no processo de montagem e desmontagem das AJ. Células silenciadas para a expressão de ANXA2 foram incapazes de remontar suas AJs baseadas em E-caderina em experimentos de "switch de cálcio" (Okamoto *et al.*, 2005).

1.4. Anexinas

As anexinas são uma família de proteínas multifuncionais, ligantes de fosfolípidos de forma dependente de íons Ca^{2+} . No entanto, características de sua estrutura as tornam distintas de outras proteínas ligantes dependentes de cálcio. As anexinas podem se ligar de forma superficial e reversível aos fosfolípidos. A região ligante ao cálcio e a membranas é constituída por 4 porções conservadas de 70 resíduos cada nomeada de "*annexin repeats*". Sua conformação compacta e em α -hélice formam uma estrutura com um lado convexo (onde se encontram os sítios para ligação de cálcio e membranas) e um lado côncavo com orientação oposta ao anterior. A região N-terminal varia entre os membros da família e está relacionada a interações e funções particulares de cada um (Figura 1-7a e b). Essa mesma região parece estar exposta para interações somente quando há ligação da porção C-terminal a íons cálcio. Grande número de proteínas citosólicas podem interagir com o N-terminal das anexinas, mas as principais são as proteínas da superfamília das EF-hand (estrutura

composta por duas α -hélices ligadas por um loop, criando uma região de interação com íons cálcio). Dentre elas, a proteína S100A10 (também conhecida com p11) interage com a anexina A2 (ANXA2), em que duas unidades de p11 se ligam e unem duas unidades de ANXA2, formando um heterotetrâmero ANXA2₍₂₎p11₍₂₎. Nessa conformação a ANXA2 ganha a capacidade de ligar duas membranas entre si, como está esquematizado na Figura 1-7c.

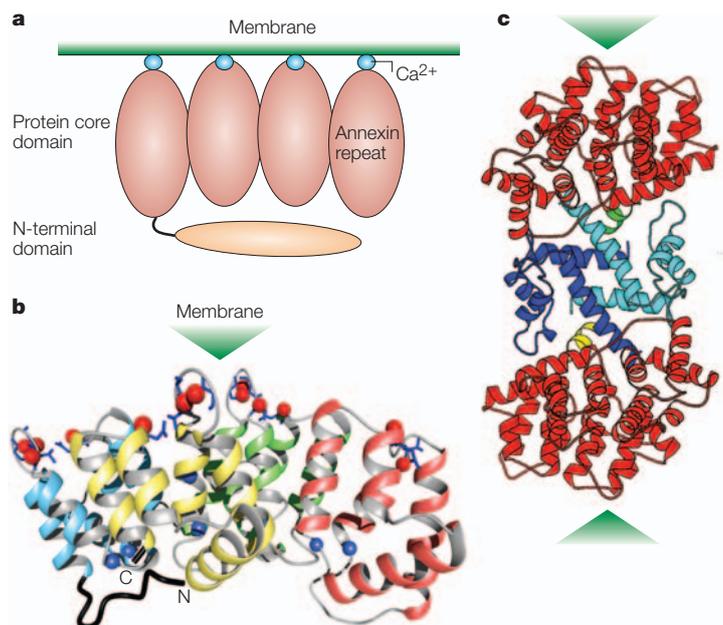


Figura 1-7 Organização e Estrutura da Anexina A2 (A) Diagrama da estrutura dos membros da família das anexinas. (B) Estrutura da Anexina A2. (C) Esquema da estrutura de um heterotetrâmero de ANXA2 (ANXA2₍₂₎S100A10₍₂₎). Local de interação com membranas estão indicados em verde. Fonte: Gerke e Moss 2002

1.4.1. Anexina A2

A ANXA2 é um destacado membro da família da anexinas, por já ter sido associada a distintas patologias como: autoimunes (Bastian, 1997), síndromes hemorrágicas (Menell et al., 1999), e mais particularmente o câncer (Shiozawa et al., 2008; Zhong et al., 2009; Lokman et al., 2011). Com peso molecular de 36 kDa, a ANXA2 segue a estrutura padrão dos membros da família; contudo sua região C-terminal é capaz de interagir com actina filamentosa (F-actina) (Filipenko e Waisman, 2001) e com fosfolipídios aniônicos, preferencialmente fosfatidilinositol-(4,5)-bifosfato (PtdIns(4,5)P2) de forma dependente de colesterol (Rescher et al., 2004).

Sua distribuição pela célula pode se apresentar sob duas formas: monomérica ou heterotetramérica. O heterotetrâmero (ANXA2₍₂₎p11₍₂₎) é composto por duas unidades de ANXA2 ligadas em um dímero de S100A10 sob forma de ponte entre

membranas, como visto na Figura 1-7c. A simetria estrutural de Allt permite com que o heterotetrâmero interaja de forma simultânea com o citoesqueleto de actina, membranas plasmáticas e matriz extracelular; concedendo-lhe grande valor para organização e transdução de sinais intracelulares (Gerke e Moss, 2002; Gerke *et al.*, 2005). A ANXA2 monomérica, por outro lado, tem baixa afinidade por fosfolipídeos, restando poucos indícios de que possa interagir com o citoesqueleto de actina. Essa forma está geralmente distribuída pelo citoplasma e núcleo, onde já se demonstrou capacidade de interação com mRNAs e o DNA (Hollas *et al.*, 2006).

1.4.2. ANXA2 e suas Funções

Sob sua forma monomérica, a ANXA2 pode ser encontrada em maior proporção no núcleo celular. Frente a presença de agentes danosos (como espécies reativas de oxigênio, ROS) ao DNA, as células respondem por meio de um acúmulo de ANXA2 no núcleo. Esse acúmulo pode ser impedido por meio de tratamento com N-acetilcisteína, o que sugere um caráter redox sensível da ANXA2 e que o acúmulo nuclear ocorre em resposta ao estresse oxidativo. O silenciamento da proteína revelou uma maior susceptibilidade a dano genômico, confirmando o provável papel da ANXA2 na proteção do DNA de agentes genotóxicos (Madureira *et al.*, 2012).

Outra função adicional dos monômeros de ANXA2 no núcleo está no controle da transcrição e translação. Em resposta a tratamento com IL-4 (citocina pró-inflamatória) ANXA2 citoplasmática se ligou a STAT6, causando sua fosforilação e translocação para o núcleo de forma ANXA2-dependente (Das *et al.*, 2010). Interagindo com filamentos de actina, mRNA e hnRNPs (pequenas proteínas ligantes de RNA envolvidas no processo de pré processamento do RNA e transporte), a ANXA2 facilita o transporte de uma série de mRNAs do núcleo para serem traduzidos no retículo endoplasmático rugoso (Hollas *et al.*, 2006). Dentre eles está c-myc (Mickleburgh *et al.*, 2005) e a própria AnxaA2 (Hollas *et al.*, 2006). Esse *loop* positivo de regulação da ANXA2 pode sugerir uma forma de proteção contra dano ao DNA, em especial no caso de carcinomas que apresentam uma superexpressão “protetora” de ANXA2 e podem apresentar maior resistência a drogas quimioterápicas de efeito genotóxico. (Hitchcock *et al.*, 2014).

No citoplasma, ambas as formas heterotetramérica ou monomérica podem ser encontradas. Gokhale e colaboradores avaliaram a afinidade de ambas as formas a vesículas artificiais e ao PtdIns(4,5)P₂, encontrando uma afinidade 10 vezes maior da forma heterotetramérica. Essa diferença sugere que funções relacionadas a ligação com membranas sejam executadas principalmente pela ANXA2 (Gokhale *et al.*, 2005).

Devido a sua afinidade por PtdIns(4,5)P2 e a capacidade de se ligar a F-actina, ANXA2 se mostrou forte candidata a organizadora dos sítios de membrana chamados de “lipid rafts”. *Lipid rafts* são pequenas (10nm) regiões de membrana enriquecidas de esfingolípídios e colesterol que servem como plataforma para a sinalização celular, essenciais para a formação de vesículas (Simons e Sampaio, 2011) e para a polaridade celular ao gerarem uma organização assimétrica de proteínas pela membrana(Cao *et al.*, 2012). A ANXA2 se mostrou capaz de induzir a agregação lateral de PtdIns(4,5)P2 em microdomínios distintos(Gokhale *et al.*, 2005), e a capacidade de estabilizá-los por meio do recrutamento de F-actina para a região(Hayes *et al.*, 2006; Chichili e Rodgers, 2007).

Como abordado anteriormente, evidências apontam para um papel importante na montagem das junções celulares pela ANXA2. Distintos experimentos usando a técnica de “calcium switch” (um quelante de cálcio é inserido no meio de cultura induzindo a desmontagem das junções celulares, e a reestruturação das mesmas é avaliada após a reinserção de íons Ca^{2+} no meio) indicaram que a ANXA2 é necessária para o reestabelecimento das AJs recrutando a E-caderina para as novas AJs a serem formadas (Yamada *et al.*, 2005). Papel semelhante no reestabelecimento das TJs já foi mostrado (Lee *et al.*, 2004), contudo em outro trabalho utilizando células *knock-out* para a ANXA2 não houve prejuízo na formação de TJs (Yamada *et al.*, 2006). Além do recrutamento da E-caderina para as junções nascentes, a ANXA2 pode recrutar as formas ativas de Rac1 e Cdc42, facilitando assim a sinalização celular necessária para a formação das novas junções e sua estabilização com o citoesqueleto de actina(Hall e Nobes, 2000; Hansen *et al.*, 2002).

Outro papel exercido pela ANXA2 no citoplasma celular é a participação na endocitose e exocitose. O tráfego de vesículas e a sinalização celular tem íntima relação na regulação de como as células respondem aos estímulos extracelulares. A endocitose de receptores de membrana facilita a separação ligante-receptor seguida de degradação lisossomal ou reciclagem dos receptores para a membrana. Esse processo permite uma atenuação de estímulos, assim como pode redirecionar a resposta celular por meio da reciclagem de receptores e redirecionamento para outras regiões de membrana(Scita e Di Fiore, 2010). Devido a suas características, a ANXA2 está relacionada com distintas etapas dos processos de endocitose e exocitose. A ANXA2 realiza o agregamento de receptores a serem endocitados em *lipid rafts* (Valapala e Vishwanatha, 2011). Participa da formação de curvatura na membrana destes rafts iniciando o processo de endocitose (Drucker *et al.*, 2013). Mais adiante

no processo, a ANXA2 presente nos endossomos iniciais auxilia na nucleação de filamentos de actina para a propulsão das vesículas (Morel e Gruenberg, 2009; Morel *et al.*, 2009), além de recrutar/ativa Cdc42 com similar finalidade (Merrifield *et al.*, 2001). Exemplo destes papéis foi demonstrado por de Graauw e colaboradores ao modular a endocitose do receptor EGFR por meio da depleção de ANXA2 celular (De Graauw *et al.*, 2014).

Durante a migração celular, uma rápida desmontagem e remontagem de adesões focais é necessária. Constituídas principalmente por integrinas e quinases (como a FAK, *focal adhesion kinase*) que fazem o elo entre o citoesqueleto e componentes da matriz extracelular, as adesões focais na parte posterior de células em migração precisam ser endocitadas, direcionadas e recicladas para a região anterior da célula. Nessa região serão formadas novas adesões focais que forneceram tração para a motilidade celular. O silenciamento da ANXA2, causou um aumento do número de adesões focais e a imobilização celular, sugerindo um papel importante na reciclagem endossomal de integrinas (Rankin *et al.*, 2013).

A contribuição da ANXA2 no processo de exocitose vem sendo relacionado com a etapa de fusão de membranas (vesicular e citoplasmática). Estudos indicam que a ANXA2 pode interagir diretamente com SNAP-23, membro da superfamília de proteínas SNARE, essenciais para a exocitose. A ANXA2 estaria organizando SNAP-23 em microdomínios específicos de membrana para a exocitose, assim atuando como um “sensor” para os níveis de cálcio intracelular (que favorecem a exocitose e induziriam a ligação entre ANXA2 e SNAP-23). O tratamento de células com anticorpos anti-ANXA2 ou anti-SNAP23 levou a ausência de exocitose, o que indicaria a necessidade de ambas as proteínas para que esse processo possa ocorrer (Wang *et al.*, 2007).

Na porção extracelular da membrana citoplasmática, a ANXA2 auxilia no processo inicial de adesão célula-célula. A estrutura simétrica de ANXA2, esquematizada na Figura 1-7c, permite com que sua forma heterotetramérica forme como que uma ponte de aproximação entre duas células. Estudos já demonstraram o papel da ANXA2 extracelular no direcionamento e adesão célula-célula de células-tronco hematopoiéticas por osteoblastos e endotélio vascular da medula óssea (Jung *et al.*, 2007); assim como em células de câncer de mama e o endotélio microvascular (Myrvang *et al.*, 2013). Esse tipo de interação somente ocorreu em células que expressavam grande quantidade de ANXA2 extracelular, sendo inibido por meio do

silenciamento da ANXA2. A superexpressão da mesma, no entanto, reforçou as interações entre as células(Jung *et al.*, 2007).

Outra função, ainda melhor descrita, da ANXA2 na porção extracelular da membrana citoplasmática é a de facilitador da degradação da matriz extracelular. Sua característica de estabelecer um elo entre membranas, proteínas e matriz permite uma aproximação na porção extracelular de enzimas proteolíticas e os componentes da matriz(Roda *et al.*, 2003). A translocação da ANXA2, usualmente localizada na face citoplasmática da membrana celular, para a face extracelular não é por vias clássicas de secreção. Ela pode ocorrer frente a estresse celular, ou alterações nos níveis de cálcio induzidos por injúria (Deora *et al.*, 2004). A principal forma de degradação mediada por ANXA2 consiste na interação entre as subunidades p11 do heterotetrâmero com os ativadores de plasminogênio (tPa e uPA) e o plasminogênio, o que catalisa sua conversão em plasmina e o início das cascatas proteolíticas (Brownstein *et al.*, 2004; Dassah *et al.*, 2009). Elevados níveis de ANXA2 extracelular podem ter importante papel no processo de invasão que ocorre na cascata metastática, facilitando a migração e invasão das células tumorais por meio da degradação de matriz mediada por plasmina (Myrvang *et al.*, 2013).

In vivo o aumento na conversão de plasminogênio em plasmina induzido pela alta de expressão proteica de ANXA2 pode resultar em um elo de ativação positivo com o TGF- β , uma vez que a plasmina é capaz de clivar o TGF- β latente secretado pelas células tumorais para a matriz extracelular (Pepper, 2001). Krishnan e colaboradores já relataram a existência de tal elo em um caso específico do desenvolvimento do coração de aves. TGF- β 3, mediador estabelecido do desenvolvimento da EMT necessária para a formação do canal atrioventricular de aves, é secretado como complexo latente na matriz extracelular. Mostraram então que a plasmina seria capaz de converter esse complexo latente em TGF- β 3 ativo, e que a conversão de plasminogênio em plasmina era realizada por meio da ANXA2 expressa pelas células cardíacas. A administração de anticorpos anti-ANXA2 ou de um inibidor fisiológico de plasmina bloquearam o desenvolvimento da EMT em cultura de explantes de células cardíacas de galinha.

1.5. Justificativa do Trabalho

Existe grande número de relatos de expressão proteica alterada de ANXA2 em distintos tipos de câncer: tumores vasculares (Syed *et al.*, 2007), gliomas (Reeves *et al.*, 1992), câncer renal (Zimmermann *et al.*, 2004), pancreático (Esposito *et al.*, 2006), de mama (Sharma *et al.*, 2006), gástrico (Emoto, Sawada, *et al.*, 2001) e colorretal (Emoto, Yamada, *et al.*, 2001; Duncan *et al.*, 2008) apresentam super-expressão de ANXA2; enquanto em metástases pulmonares de osteosarcomas (Gillette *et al.*, 2004) e adenocarcinomas prostáticos (Kang *et al.*, 2002) foi observado redução de sua expressão global.

Já se demonstrou que a expressão da ANXA2 está aumentada no processo de proliferação ou regeneração de hepatócitos (Masaki *et al.*, 1994) assim como sua inibição em células de câncer de mama, por meio de RNA de interferência, foi capaz de bloquear a proliferação celular mantendo as células nas fases G0/G1 (Zhang *et al.*, 2010). A ANXA2 também foi identificada como uma das responsáveis pela adesão celular entre as células RAW117 de linfoma e células endoteliais de microvasculatura hepática. Neste trabalho foi encontrada a presença da ANXA2 na superfície extracelular das células RAW117 e que a administração de anticorpos anti-ANXA2 foram capazes de reduzir a adesão das mesmas às células endoteliais em até 50% (Tressler *et al.*, 1993). Em outro estudo usando um modelo de células renais de hamster expressando o receptor humano de insulina (BHK-IR) foi demonstrado que a fosforilação da tirosina da ANXA2 levou a um acúmulo periférico de actina e a deassociação celular; eventos que foram inibidos mediante depleção da ANXA2 (Rescher *et al.*, 2008). Com relação a migração e invasividade celular, o silenciamento do gene ANXA2 em uma linhagem invasiva de células de câncer de mama humano (MDA-MB231) mostrou-se capaz de reduzir esses parâmetros, assim como a utilização de siRNA para reduzir a expressão da ANXA2 em células de carcinoma hepatocelular humano foi capaz de prejudicar o rearranjo do citoesqueleto dessas células, sua migração e o potencial invasivo (Zhao *et al.*, 2010).

No entanto, apesar do crescente número de artigos explorando as implicações da ANXA2 nos processos de tumorigênese, existem poucos abordando o papel dessa molécula na tumorigênese do câncer colorretal. Há evidências de sua super-expressão (Alfonso *et al.*, 2008; Duncan *et al.*, 2008), co-localização com proteínas como tenascina-C (Emoto, Yamada, *et al.*, 2001), catepsina-B (Cavallo-Medved *et al.*, 2003) e um estudo que sugere a ANXA2 como potencial biomarcador para diagnóstico e prognóstico do câncer colorretal (Yang *et al.*, 2013). Contudo, o mecanismo pelo

qual ocorre a super-expressão dessa proteína, como ela pode modular eventos relacionados com a progressão deste tipo de câncer, e quais vias de sinalização estão envolvidas, ainda permanecem por ser esclarecidos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Elucidar o papel da ANXA2 identificando mecanismos celulares e moleculares mediados pela mesma durante a progressão do câncer colorretal.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar a relação entre o aumento de expressão de ANXA2 e o desenvolvimento do CCR em pacientes do INCA
- Avaliar o papel da ANXA2 em etapas importantes da progressão tumoral
 - Proliferação
 - Migração
 - Invasão
 - Transição Epitélio-Mesênquima (EMT)
- Elucidar por meio de quais vias de sinalização a ANXA2 atua e/ou é regulada

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

O anticorpo monoclonal mouse anti-ANXA2 e mouse anti-tubulina foi adquirido da Invitrogen Inc. (Carlsbad, CA, EUA). O anticorpo monoclonal mouse anti-pANXA2 (Tyr23) foi adquirido da R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA). O anticorpo monoclonal mouse anti-E-caderina (clone 36) foi adquirido da BD Biosciences (San Diego, CA, EUA). Os anticorpos anti-pSrc e anti-Src foram adquiridos da Cell Signaling (Danvers, MA, EUA). O anticorpo mouse anti-GAPDH e anti-claudina 3, e os rabbit anti-STAT3 e anti-pSTAT3 da Santa Cruz (Santa Cruz Biotech, Dallas, Texas, EUA). Os anticorpos Alexa Fluor[®] 488 IgG-goat-anti-mouse e anti rabbit, Alexa Fluor[®] 546 IgG-goat-anti-mouse foram obtidos da Molecular Probes (Eugene, OR, EUA). O 4-dicloridrato de 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O inibidor seletivo de STAT3 (STA-21) e o inibidor de Src (PP2) (Santa Cruz Biotech, Dallas, Texas, EUA) foram dissolvidos em DMSO na

concentração estoque de 10 mM, mantidos a -20°C e utilizados na concentração final de 10 µM. O siRNA para ANXA2 “Annexin II siRNA (m)” (Cat. Sc-29683) foi obtido da Santa Cruz (Santa Cruz Biotech, Dallas TX, EUA). O Scramble utilizado foi o “Silencer® Select Negative Control siRNA” (Cat. 4390844) obtido da Ambion (Life Technologies, Carlsbad, CA, US). O TGF-β utilizado no tratamento foi comprado da Gibco (Chagrin Falls, Ohio, EUA) e foi solubilizado em água de injeção 0,1% BSA filtrada para uso na concentração final de 10 ng/mL.

3.2. Cultura de células

Linhagens derivadas de adenocarcinoma colorretal utilizadas neste estudo: Caco-2 (catálogo ATCC: HTB-37), diferenciada, com potencial invasivo moderado e com mutação em P53; HCT-116 (catálogo CCL-247), indiferenciada, invasiva e com mutação em RAS; HT-29 (catálogo HTB-38), pouco diferenciada, muito invasiva, e com mutação em P53. As linhagens celulares foram cultivadas rotineiramente em 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em meio DMEM suplementado com: 10% de soro fetal bovino inativado; penicilina G (60 mg/L); e streptomicina (100 mg/L) (Invitrogen Corp., EUA). Para os experimentos as células foram cultivadas em placas de cultura (6, 12, 24 ou 96 poços), garrafas, ou em filtros de policarbonato do tipo transwell, com poros de 8 µm (Corning Inc., EUA). Para o acompanhamento da morfologia celular ao longo do cultivo, bem como para comparar a morfologia entre as linhagens celulares após os tratamentos, as células foram observadas em um microscópio Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss Inc., Alemanha).

Para o ensaio de cultura tridimensional, lamínulas de vidro foram cobertas com 50µl de MATRIGEL® (1:1) e colocadas individualmente em placa de 12 poços. As lamínulas foram deixadas na estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ para completa polimerização do MATRIGEL. Após 24h, células da linhagem HT-29 foram contadas para o preparo de uma solução de MATRIGEL 50% em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado; penicilina G (60 mg/L); e streptomicina (100 mg/L) (Invitrogen Corp., EUA), contendo 200 células em um volume final de 200µl para cada lamínula a ser preparada. Após pipetar lentamente os 200µl sobre a lamínula, completar o volume do poço para 600µl com DMEM nas mesmas condições. Neste trabalho as células foram cultivadas por três dias prévias ao tratamento ou não com TGF-β e mantidas por mais três dias após o tratamento.

3.3. Tratamento com TGF- β e inibidores

O tratamento com TGF- β , na concentração de 10 ng/ml foi realizado após 12 horas de cultivo com DMEM 1% SFB. Para inibir a quinase Src e o fator de transcrição STAT-3, foram utilizados os inibidores PP2 e STA-21 respectivamente, na concentração final de 10 μ M. O tratamento com os inibidores foi realizado sempre uma hora antes da adição de TGF- β ao meio de cultura.

3.4. Amostras de pacientes

As amostras frescas de tecido normal adjacente (ao menos 5cm distante do tumor) e tumoral, do sitio primário de pacientes com câncer colorretal, foram obtidas do centro cirúrgico do Hospital do Câncer I – INCA. O estadiamento das amostras tumorais utilizadas no estudo foi realizado de acordo com as diretrizes contidas na sétima edição do manual de estadiamento do câncer editado pelo *American Joint Committee on Cancer* (Edge et al., 2010). Para o estadiamento; foram utilizadas as informações contidas nos laudos de anatomia patológica, feitos por especialistas da Divisão de Patologia – INCA (DIPAT – INCA), e de exames de imagem realizados pelos pacientes, disponíveis na Intranet – INCA. Para análise molecular e bioquímica, as amostras foram congeladas diretamente a -80°C. O projeto foi aprovado pelo Comitê em Pesquisa sob número 84/04 e atualizado em 17/09/2015.

3.5. Obtenção do listado proteico

As células foram lavadas em PBS (Solução salina, do inglês Phosphate Buffered Saline) e homogeneizadas a 4°C em tampão de lise contendo: Triton X-100 1% (Sigma-Aldrich Co.); deoxicalato de sódio 0,5% (Reagen – Quimibrás Ind., Brasil); SDS 0,2% (Invitroen Corp.); cloreto de sódio 150 mM (Merk&Co. Inc., Alemanha); EDTA 2 mM (Sigma-Aldrich Co.); Hepes 10 mM (Sigma-Aldrich Co.), pH7,4; fluoreto de sódio 20mM; ortovanadato de sódio de 1 mM (Sigma-Aldrich Co.); e um coquetel de inibidores de proteases (PMSF 1 mM, aprotinina 1 μ g/mL, fenantrolina 2,5 μ M, leupeptina 10 μ M e pepstatina 5 μ g/mL – Sigma-Aldrich Co.). Após centrifugação a 10000 g por 10 min, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C. A obtenção do lisado proteico de amostras tumorais foi realizada macerando o fragmento da ressecção cirúrgica destinada ao procedimento e homogenização com o tampão de lise seguindo o procedimento acima descrito.

3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida usando sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE), Immunoblotting e análise densitométrica

O conteúdo protéico dos lisados totais foi estimado utilizando-se um kit comercial para dosagem de proteína (Bio-Rad Laboratories Inc., EUA). A proteína

BSA (albumina sérica bovina) (Sigma-Aldrich Co.) foi utilizada como padrão. Quantidades iguais de proteínas (30 µg) foram separadas eletroforéticamente por SDS-PAGE usando géis na concentração de 10 e 13%, e transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando-se o aparelho de eletrotransferência semi-seco (Bio-Rad Laboratories Inc.) a 10 V por 60 min. As membranas foram mantidas em tampão de bloqueio TBS-T (Tris-HCl, 20 mM, pH 7,6, NaCl 137 mM e Tween 20 0,1% - Sigma Co.) contendo leite desnatado 5%, durante 60 min em agitador orbital. Em seguida, foram incubadas com o anticorpo primário por 2 horas ou overnight. Após 5 lavagens com TBS-T, as membranas foram incubadas com anticorpos secundário conjugados a peroxidase por 60 min. Finalmente as membranas foram lavadas 5 vezes em TBS-T e a reatividade para as proteínas em estudo foi determinada utilizando-se um kit comercial de quimioluminescência (Amersham Biosciences GE healthcare, Reino Unido).

3.7. Imunohistoquímica e análise patológica

Foram selecionados 47 pacientes (39 com tumores primários e 8 com metástase) que já haviam passado por cirurgia de ressecção do cólon e com blocos parafinizados armazenados na Divisão de Patologia - INCA (DIPAT). O estadiamento das amostras tumorais utilizadas no estudo foi realizado de acordo com as diretrizes contidas na sétima edição do manual de estadiamento do câncer editado pelo *American Joint Committee on Cancer* (Edge et al., 2010). Para o estadiamento; foram utilizadas as informações contidas nos laudos de anatomia patológica, feitos por especialistas da DIPAT, e disponíveis na Intranet – INCA.

A técnica de Imunohistoquímica (IHQ) utilizando secções dos blocos selecionados foi realizada em dois dias consecutivos. As lâminas comerciais, previamente tratadas com cargas (immunoSlide- Easy Path) contendo cortes de 3 micras foram imersas em 3 banhos de 5 minutos em xilol, seguidos de banhos rápidos em álcool 100%, 90%, 80% e 70%. O excesso de álcool foi retirado em água corrente por 3 minutos.

A recuperação antigênica foi em Tampão Trilogy (Cell Marque), à temperatura de 98°C, utilizando-se o processo a vapor, por 30 minutos. O bloqueio de peroxidase e o bloqueio de proteína foi feito utilizando-se o kit NovoLink Max Polymer Detection, (Leica Microsystems), por 5 minutos cada. A incubação com o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-E-caderina à diluição de 1:1200 e anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-Anexina A2 à diluição de 1:50 foi realizada *overnight*, a 4°C.

No segundo dia de técnica, as lâminas foram incubadas com o anticorpo pós-primário e com o polímero (Novolink), ambos por 30 minutos. Para a revelação da reação utilizou-se o cromógeno DAB, por 3 minutos. A contra coloração foi feita com a hematoxilina, por 30 segundos. Utilizou-se o DAB e do kit Novolink e a Hematoxilina de Haris. Após a retirada do excesso de hematoxilina em água corrente, as lâminas foram imersas em banhos de 70%, 80%, 90%, 100% e xilol. Utilizou-se o bálsamo, para a montagem das lâminas, que foram analisadas ao microscópio óptico, observando-se uma marcação nuclear.

As lâminas foram então enviadas a uma patologista (que desconhecia os grupos experimentais) para avaliação da intensidade (+ a +++) e porcentagem (0 a 100%) de marcação para cada anticorpo em cada lâmina. Os resultados foram então agrupados e, para fins quantitativos, definimos um score de marcação constituído da multiplicação do número de cruces atribuído a intensidade de marcação pela porcentagem de marcação na lâmina. A média do score dentre todos os pacientes foi utilizada para separação entre alta e baixa expressão.

3.8. Imunofluorescência

As células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro inseridas em placas de 24 poços até atingirem a subconfluência. Posteriormente, foram cultivadas em DMEM com SFB 1% por 12 horas e então tratadas com TGF- β durante 48 para avaliar a localização dos marcadores epiteliais e mesenquimais da EMT. Após tratamento, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído 16% a temperatura ambiente durante 20 minutos. Logo, as células foram re-hidratadas com PBS (pH 8.0) por 15 minutos e bloqueadas com BSA 0,2% em PBS (pH 8.0) durante 60 minutos. Posteriormente, foram incubadas overnight com os anticorpos primários anti-E caderina (1:250), anti-Claudina-3 (1:50), anti-ANXA2 (1:50), anti-Y23pANXA2 (1:100) em BSA 0,2% contendo Triton X-100 0,1% em PBS (pH 8.0). Em seguida, foram realizadas novas lavagens com PBS (pH 8.0) e incubadas com anticorpos secundários conjugados a Alexa 488 ou Alexa 546 por 1 hora. Para marcação de vimentina, foi utilizada anti-vimentina conjugado a Cy3 1:500 por 30 minutos. Para marcação do núcleo, foi utilizado 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:1000) por 1 minuto. Posteriormente a lâminas foram montadas com reagente Antifade Gold ProLong (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), e observadas em microscópio confocal a laser (Fluoview FV10i Overview, Olympus, EUA) acoplado a um programa de processamento de imagens (Olympus Fluoview FV1000). Para

análise das lâminas por meio de Microscopia de Iluminação Estruturada (SIM) foi utilizado microscópio de superresolução Zeiss LSM 710 GE microscope (Carl Zeiss, Alemanha) equipado com câmera PCO Edge sCMOS (PCP AG, Alemanha) usando lente Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil DIC M27; e o *software* Zeiss ZEN 2012 SP1 (black edition – version 8.1.5.484) para aquisição, reconstrução, alinhamento das imagens. Cores e contraste foram ajustados utilizando o software ICY bioimage analysis (Institut Pasteur, França).

3.9. Silenciamento por siRNA

O siRNA para ANXA2 “Annexin II siRNA (m)” (Cat. Sc-29683) foi obtido da Santa Cruz (Santa Cruz Biotech, Dallas TX, EUA). Como controle negativo (Scramble), foi utilizado o “Silencer[®] Select Negative Control siRNA” (Cat. 4390844) obtido da Ambion (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). As células HT-29 foram plaqueadas em placas de 6 poços em meio de cultura DMEM com SFB 10%. Após 24 h, essas células foram transfectadas utilizando meio especial para transfecção lipídica, OPTI-MEM[®] e delivery Lipofectamina[®] RNAiMAX (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Após a transfecção com 5nM de siRNA ANXA2 e de Scramble, as células foram incubadas por 36h e então os subsequentes experimentos foram realizados.

3.10. Transfecção com mutantes sítio específicos para ANXA2

Três plasmídeos contendo a sequência para a ANXA2 (um selvagem e dois mutados) atrelada a sequência codificadora para a *Green Fluorescent Protein* (GFP) foram cedidos pela Dr Ursula Rescher, da Universidade de Muenster, na Alemanha. Os constructos foram mutados na tirosina 23, trocando-a hora por ácido glutâmico (Y23E), hora por fenilalanina (Y23F) e clonados em vetor pEGFP-N3 baixo o controle de um promotor CMV. A troca de Y por E, adiciona uma carga negativa a proteína fazendo com que a mesma se torne fosfo-mímica. Já a troca de Y por F impossibilita a fosforilação da proteína por Src, conferindo a célula uma deficiência na fosforilação de ANXA2. As células da linhagem Caco-2 foram cultivadas em lamínulas de vidro até atingirem cerca de 50% de confluência. Então, foram transfectadas usando meio especial para transfecção lipídica, OPTI-MEM[®] e delivery Lipofectamina[®] RNAiMAX (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Após a transfecção com 2µg de DNA, as células foram incubadas por 36h, fixadas e processadas para imunofluorescência.

3.11. Proliferação celular

O número relativo de células viáveis foi determinado pelo ensaio de cristal violeta. Células HT-29 (3×10^3) após 24 horas do silenciamento foram plaqueadas por 4 h em placas de 96 poços, incubadas com meio de cultura com 1 ou 10% SFB e tratadas com TGF- β por 24 e 48 horas. O meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS, fixadas com etanol absoluto por 10 minutos, e coradas com cristal violeta por 10 minutos na concentração de 0,05% em etanol 20% à temperatura ambiente. Após lavagem em água e secagem ao ar, o corante foi sulubilizado com metanol e as densidades ópticas foram mensuradas em espectrofotômetro em 595 nm (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) e avaliadas utilizando o software Soft Max pro 4.3 LS.

3.12. Ensaio de migração celular por Wound healing

A migração celular foi avaliada através da técnica de wound healing. Células HT-29 na densidade de 4×10^4 células/cm² e, após atingirem confluência receberam meio de cultura com apenas 1% de SFB. Em seguida, um risco foi feito manualmente sobre a monocamada utilizando uma ponteira de micropipeta estéril. Para cada tratamento, foram feitos três riscos e três campos de cada risco foram selecionados e marcados. Após lavagem em PBS, meio de cultura contendo TGF- β , ou não, foi adicionado às células, que foram incubadas a 37°C. Células tratadas e não tratadas migraram para as áreas riscadas e foram fotografadas imediatamente (0 hora) e no final do experimento (24 horas), em microscópio invertido (Zeiss Observer.Z1) acoplado a um programa de processamento de imagens AxioVision Release 4.8.2 (Zeiss). A área entre as duas margens da monocamada celular riscada foi quantificada utilizando o programa Icy Bioimage Analysis.

3.13. Ensaio de invasão celular

A invasão celular foi avaliada utilizando membranas Transwell com poros de 8,0 μ m revestidos com Matrigel[®] (1:10), que contém os componentes de membrana basal (colágeno, laminina, proteoglicanos, enzimas e fatores de crescimento). As células HT-29 ($2,5 \times 10^4$ células) foram cultivadas (após 24 horas do silenciamento) na câmara superior sobre o matrigel em meio SFB 1% com ou sem tratamento com TGF- β . Na câmara inferior, foi utilizado meio contendo 10% de SFB como quimiotratante. Após 48 horas em 37°C, as células que invadiram o matrigel foram fixadas com etanol 100% coradas com DAPI (1:1000) por 1 minuto e fotografadas em microscópio invertido (Zeiss Observer Z.1) acoplado a um programa de processamento de imagens AxionVision Release 4.8.2 (Zeiss).

3.14. Análise de expressão de mRNA utilizando banco de dados do TCGA

Para a análise da expressão de ANXA2 e CDH1, foram utilizados os dados de RNAseq dos bancos de dado TCGA-COAD e TCGA-READ mantidos pelo *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (<https://cancergenome.nih.gov/>). Foram selecionados 633 amostras de RNAseq de tumores de cólon e reto depositados no banco de dados, assim como 51 amostras de cólon e reto normais. Para avaliar a presença de ANXA2 e CDH1 em cada estadio e também nos quatro subtipos molecular (CMS) de CCR foi utilizado um algoritmo classificador, que permitiu a classificação dos pacientes dentro de cada um dos subtipos. Este classificador se encontra disponível em (<https://github.com/Sage-Bionetworks/crcsc>) .

3.15. Análise estatística

Todos os dados quantitativos apresentados são médias \pm erro padrão de, pelo menos, três experimentos independentes. A análise estática e os gráficos foram realizados no programa GraphPadTMPrism, 7.0 (GraphPadTM Software, San Diego, CA, EUA). Foram utilizados a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias com pós teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Para os dados do TCGA, o teste estatístico utilizado foi Wilcoxon rank sum, com poshoc de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Amostras tumorais de pacientes apresentam elevada expressão protéica de ANXA2

Amostras de 20 pacientes de CCR, submetidos a ressecção cirúrgica, foram analisadas por *immunoblotting* para comparação da expressão protéica de ANXA2 no tecido tumoral em relação ao tecido normal adjacente. Buscou-se, da melhor maneira possível, a representação de todos os estádios da evolução do CCR em pacientes com idade de 67 ± 10 anos e ressecções de distintas porções do cólon (direito, esquerdo ou sigmóide).

Das 20 amostras analisadas, 15 apresentaram aumento na expressão de ANXA2 no tecido tumoral, em média 143,4% de aumento. Com exceção do estadio II, que não apresentou alteração na expressão de ANXA2, as amostras tumorais dos estádios I, III e IV revelaram aumentos na razão de expressão tumor/adjacente (Figura

4-1), contudo a amostragem respectiva a cada estágio ainda não é da magnitude necessária para permitir uma inferência estatística entre os mesmos.

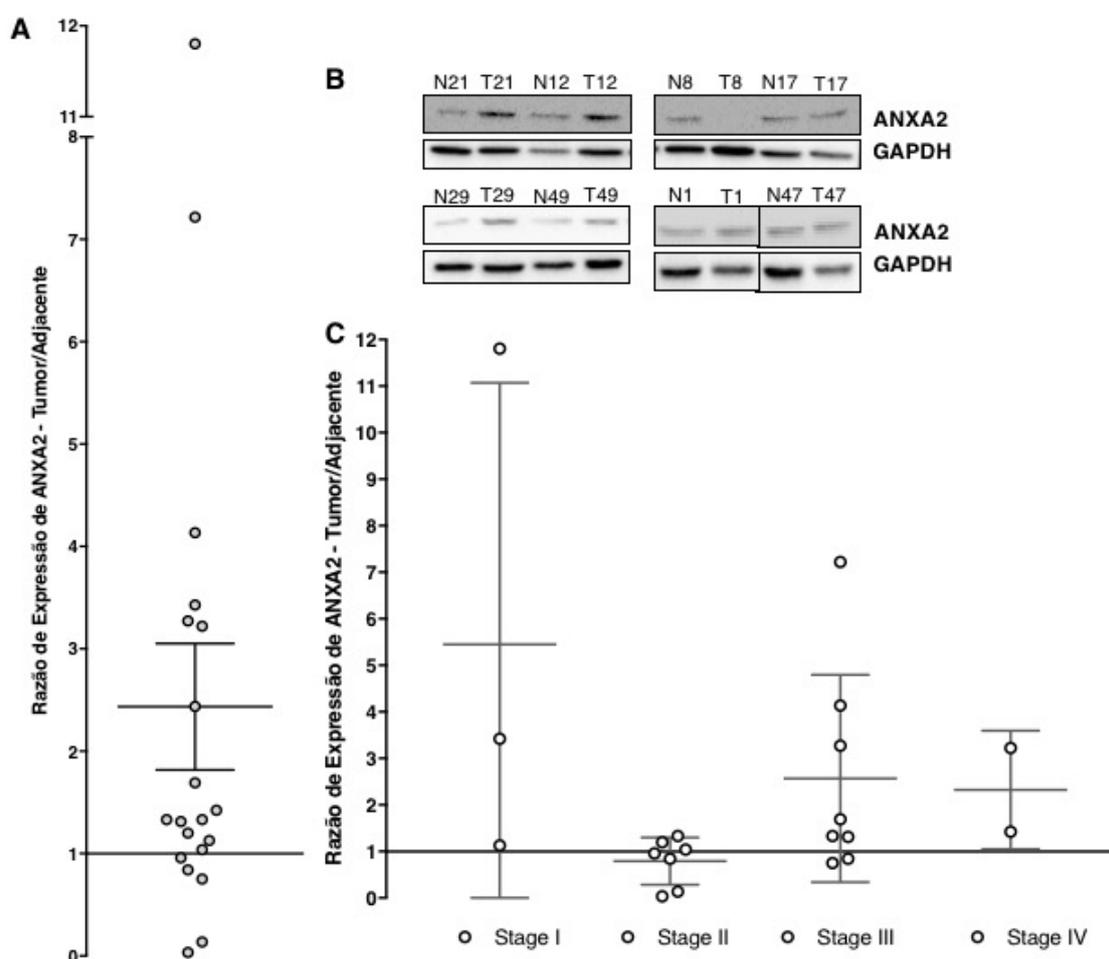


Figura 4-1 – Análise por imunoblotting da expressão de ANXA2 em amostras de pacientes de CCR. (A) Gráfico da razão de expressão tumor/adjacente em todas as amostras analisadas. (B). Imunoblotting representativo de 8 pacientes evidenciando alteração da expressão de ANXA2 no tecido tumoral. GAPDH foi utilizado como controle endógeno de expressão protéica (C) Razão de expressão separada por estádios. Linha central indicando a média associada a barra de erro padrão.

4.2. Análise imunohistoquímica de tumores coloretais revela aumento de marcação em estádios mais avançados

Para confirmação dos resultados da análise do extrato protéico total obtidos de amostras de pacientes submetidos a ressecção cirúrgica, optou-se pela realização de imunohistoquímica de blocos parafinizados de um número maior de pacientes (n=39) cobrindo distintos estádios do CCR assim como lesões metastáticas (n=8). Foram avaliadas a imuno marcação para ANXA2 e E-caderina (clássico marcador epitelial).

No tecido normal adjacente (distância do tumor maior que 5cm) há característica e forte marcação de E-caderina nas células epiteliais, com pouca e mais difusa marcação de ANXA2 tanto nas células epiteliais quanto do estroma. Nos tumores primários, houve um aumento progressivo da marcação de ANXA2 com a gravidade dos estádios analisados. Já a imuno marcação para E-caderina foi de

intensa e membranar no estadio I para uma redução pronunciada e realocização citoplasmática nos estadios II e III e IV (Figura 4-2). Nas lesões metastáticas analisadas, a marcação de E-caderina delimitou todo o tumor secundário com marcação intensa nas células epiteliais em meio ao parênquima hepático. A ANXA2 apresentou dois padrões de marcação. Em regiões menores de metástase, houve forte marcação na membrana das células tumorais e ligeira marcação no estroma. Contudo, em regiões mais extensas de metástase houve marcação somente nas bordas do tumor secundário com ausência ou baixa marcação na região central da metástase (Figura 4-3).

A partir da análise de um patologista, construiu-se um *score* de marcação constituído da porcentagem de marcação na lâmina multiplicada pela intensidade. Dessa forma, foi quantificado o padrão de marcação resultando em um aumento estatisticamente significativo de ANXA2 entre os estadios I, II e III em comparação com estadio IV e metástase (t-student; $p < 0,05$). Houve redução significativa da marcação de E-caderina nos estadios II e IV quando comparados ao estadio I (t-student; $p < 0,05$) (Figura 4-4).

Para avaliação da associação dos aspectos clínicos dos pacientes com a expressão de ANXA2, estabelecemos como linha de corte entre expressão baixa e alta o *score* médio de 0,81 (indicado com linha tracejada vermelha na figura 4-4). Idade, sexo, presença de invasão vascular, metástase linfática e metástase distante foram os caracteres escolhidos com tendência de diferença estatística na relação entre a baixa marcação de ANXA2 e a ausência de metástase distante ($\chi^2 = 3,678$; $p = 0,0551$) (Tabela 4-1).

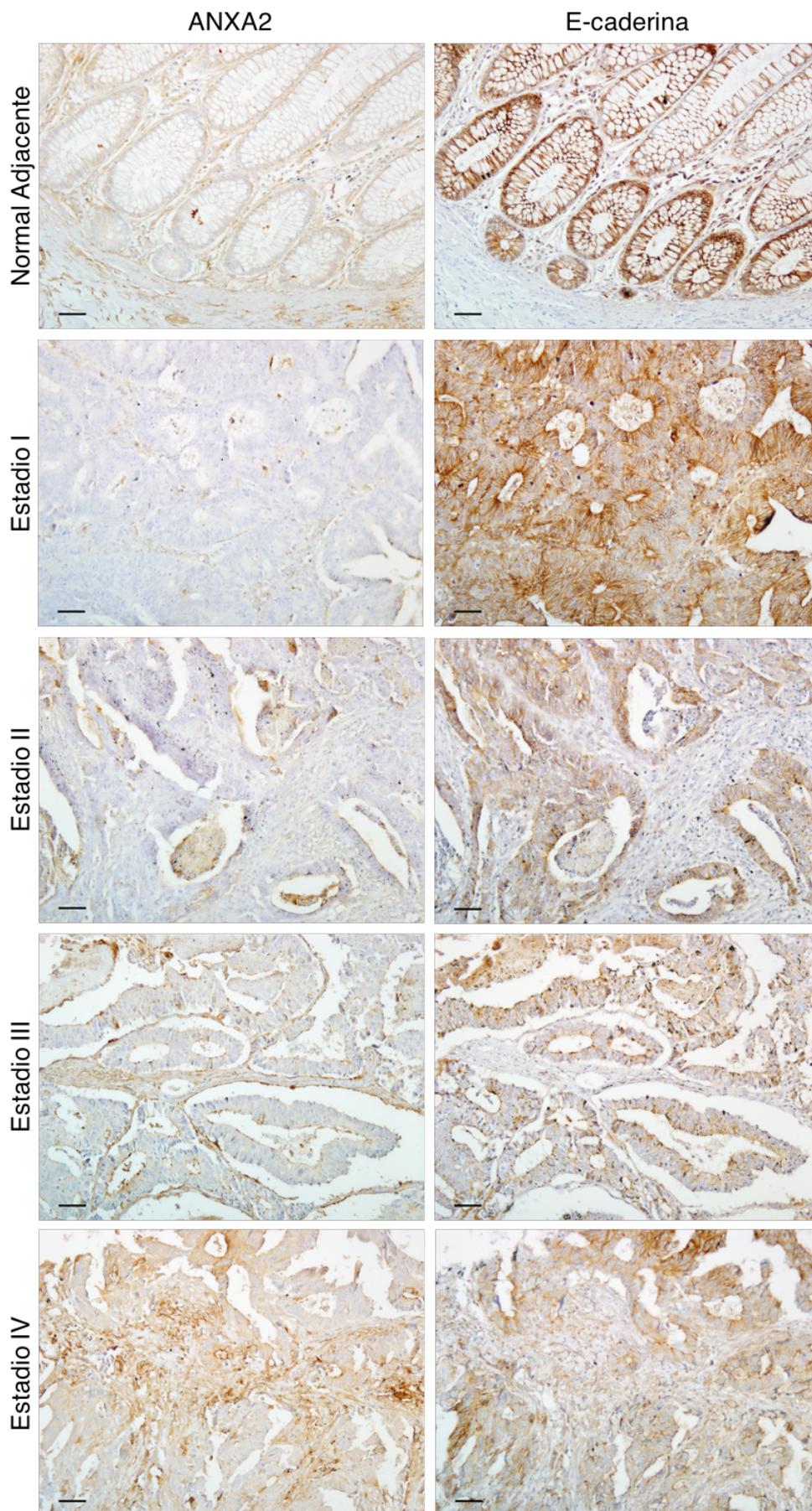


Figura 4-2. Imunohistoquímica de tumores primários de cólon para ANXA2 e E-caderina. Coluna da esquerda apresenta a marcação para ANXA2 e sua evolução a cada estadio do CCR. E-caderina está representada de forma semelhante na coluna direita. Escala = 50µm

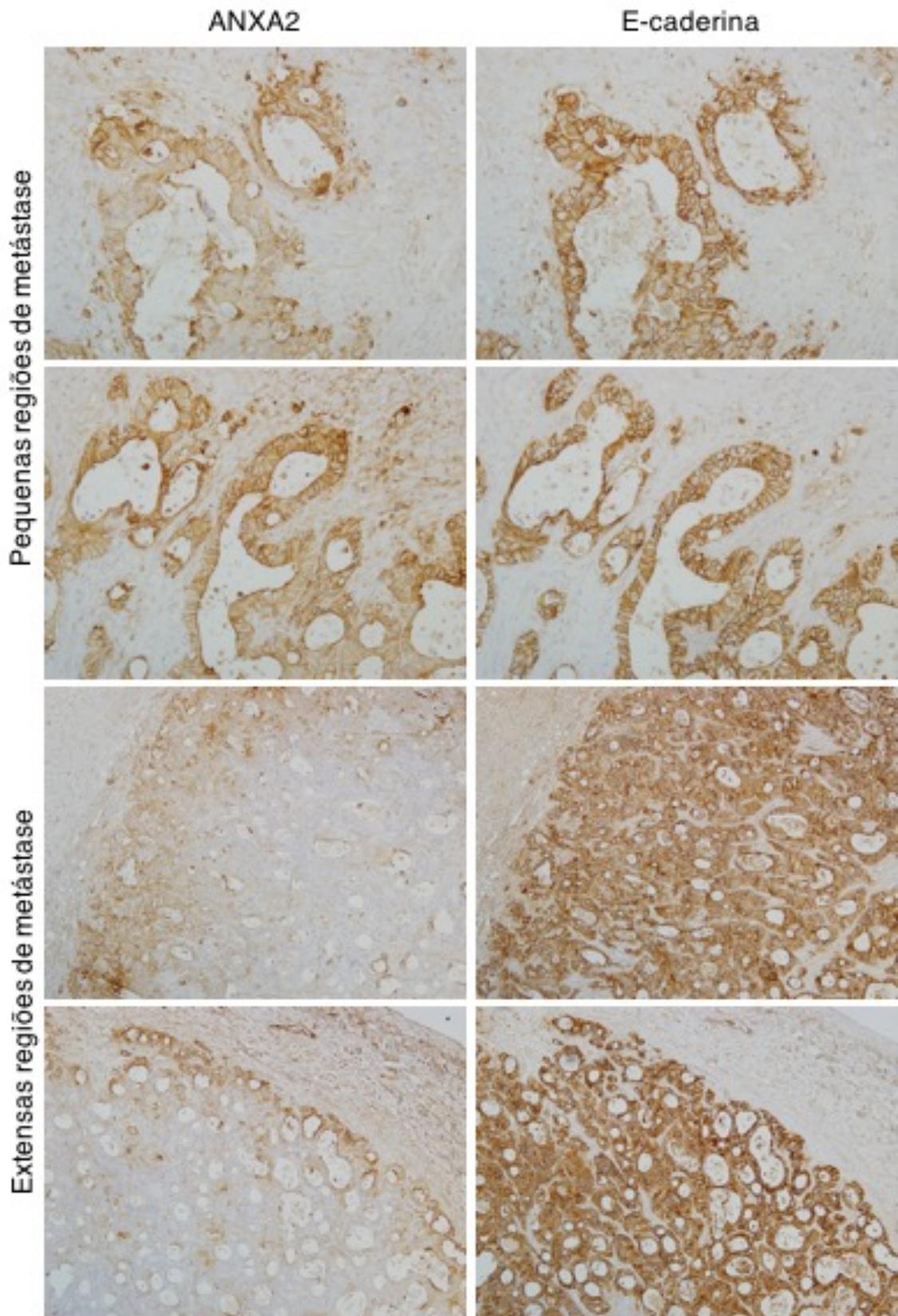


Figura 4-3. Imunohistoquímica de tumores hepáticos (secundários provenientes de CCR). (A) IHC de pequenos focos metastáticos mostrando padrão semelhante de marcação entre ANXA2 e E-caderina. Aumento de 20x. (B) IHC de regiões extensas de metástase indicando marcação consistente de E-caderina por todo o tumor enquanto ANXA2 tem maior intensidade na fronteira entre tumor e parênquima hepático. Aumento de 10x

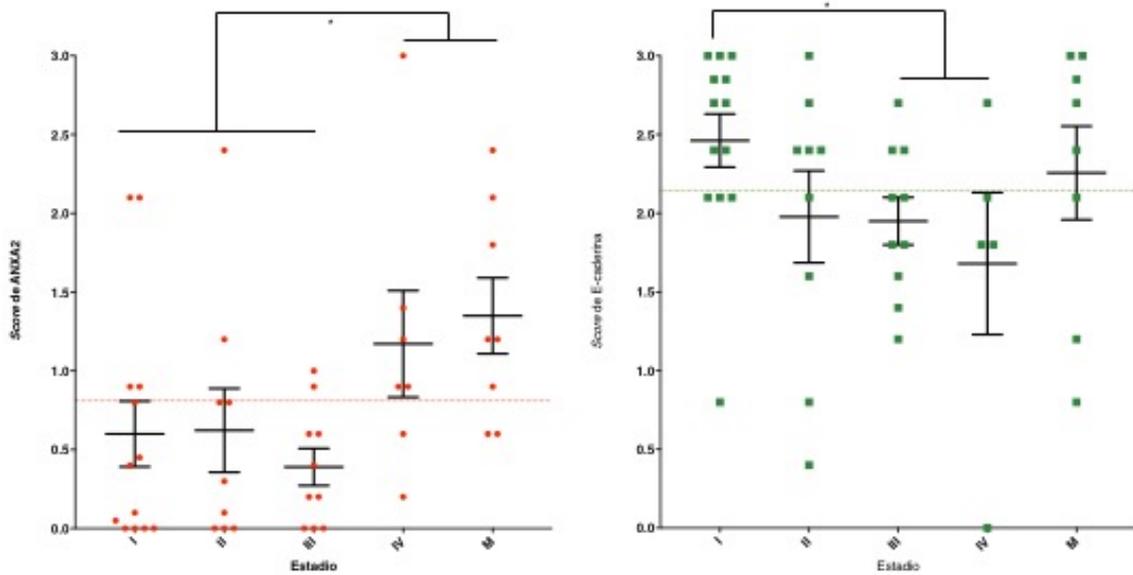


Figura 4-4. Quantificação dos scores de ANXA2 e E-caderina nas IHCs analisadas. Linha tracejada indica score médio. * $p < 0,05$

Tabela 4-1. Características clínico-patológicas dos pacientes analisados e sua correlação com a expressão de ANXA2 (alta/baixa)

Característica	Casos (n=39)	Expressão de ANXA2		χ^2	valor de p
		Alta (n=13)	Baixa (n=26)		
Idade (anos)					
>60	25	7	18	0,348	0,5551
≤60	14	6	8		
Sexo					
Masculino	12	4	8	0	1
Feminino	27	9	18		
Estadio TNM					
I	13	4	9		
II	9	2	7		
III	10	2	8		
IV	7	5	2		
Metástase	8	6	2		
Invasão Vascular					
Ausente	31	8	23	2,379	0,123
Presente	8	5	3		
Metástase Linfática					
Ausente	25	10	15	0,683	0,4087
Presente	14	3	11		
Metástase Distante					
Ausente	32	8	24	3,678	0,0551
Presente	7	5	2		

Casos de metástase (n=8) foram incluídos somente para o carácter Estadio TNM

4.3. Linhagens celulares de CCR apresentam distintos níveis de expressão de ANXA2

Considerando os altos níveis de expressão de ANXA2 em amostras tumorais, foram analisadas três linhagens celulares de CCR (Caco-2, HT-29, HCT-116) em prol da escolha do melhor modelo *in vitro* para o estudo das funções da ANXA2.

Dentre as linhagens utilizadas, Caco-2 (menor potencial tumorigênico, pouco migratória e não invasiva) apresentou a menor expressão de ANXA2 e de sua forma fosforilada em Y23. Mostrou-se também que a linhagem HT-29, dentre estas, apresenta o maior nível de expressão de ANXA2 e grande quantidade de proteína fosforilada. HCT-116 (com fenótipo mais próximo do mesenquimal) apresentou níveis

intermediários de ANXA2. Para verificar a influência do soro fetal bovino (SFB) utilizado no meio de cultura celular sobre a fosforilação e expressão de ANXA2, as células foram privadas de SFB por 24 horas antes de extração protéica. A ausência de SFB pareceu não alterar a expressão total de ANXA2, mas revelou uma tendência (não significativa) de aumento da fosforilação em Y23 (Figura 4-5a).

A marcação de ANXA2 por meio de imunofluorescência revelou que ela se organiza primariamente nos contatos célula-célula nas três linhagens avaliadas. Contudo, Caco-2 e HCT-116 apresentaram maior marcação citoplasmática quando comparadas com a marcação predominantemente cortical da linhagem HT-29 (Figura 4-5b).

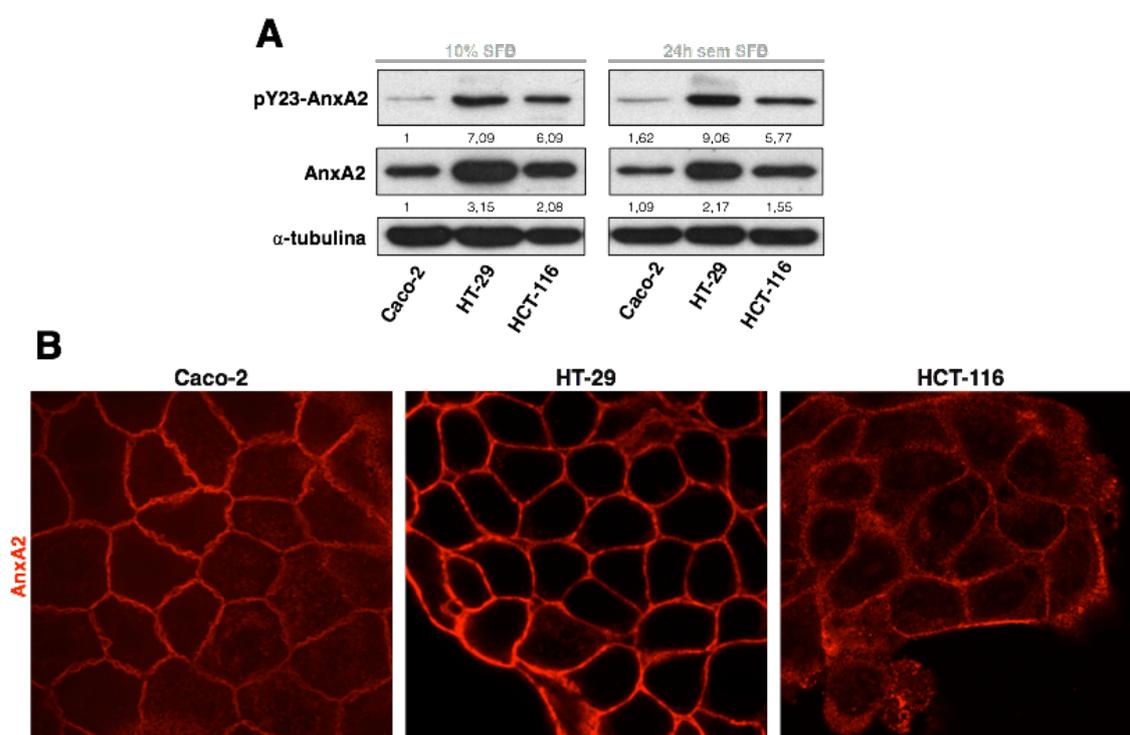


Figura 4-5 - Expressão e Organização da ANXA2 em três linhagens celulares de CCR. (A) Immunoblotting da ANXA2 e sua forma fosforilada em Y23, na presença ou ausência de soro fetal bovino no meio de cultura. α -tubulina foi utilizada como controle endógeno de expressão protéica. (B) Imunofluorescência para ANXA2 nas linhagens Caco-2; HT-29 e HCT-116. Imagens representativas de ao menos dois experimentos independentes

4.4. Silenciamento da ANXA2 por meio de siRNA na linhagem HT-29

Para avaliar o papel da ANXA2 em processos relacionados a progressão do CCR (como proliferação, indução da EMT, migração e invasão) optou-se por uma abordagem de perda de função: silenciar a linhagem que apresentou maior expressão de ANXA2 e avaliar seus testes funcionais. O silenciamento da ANXA2 na linhagem HT-29 por meio de siRNA apresentou eficiência gradativa com seu pico (silenciamento de 63%) em 72 horas (Figura 4-6).

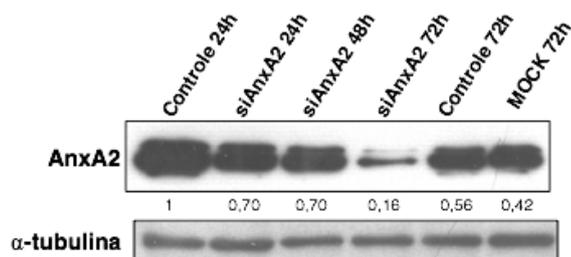


Figura 4-6 – Padronização de silenciamento da ANXA2. α -tubulina foi utilizada como controle endógeno de expressão protéica.

4.5. Silenciamento da ANXA2 na linhagem HT-29 reduz seu potencial proliferativo

O potencial proliferativo das células HT-29 silenciadas para ANXA2 foi avaliado pelo ensaio de proliferação por cristal violeta em meio de cultura DMEM com 10% de SFB. No tempo de 24 horas, não houve diferença significativa entre os grupos Mock, Scramble ou siANXA2. Contudo após 48 horas pode-se notar menor densidade óptica no grupo silenciado. Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com relação aos grupos Mock e Scramble, indicando que as células HT-29 silenciadas possuem menor taxa de proliferação que as controle (Figura 4-7).

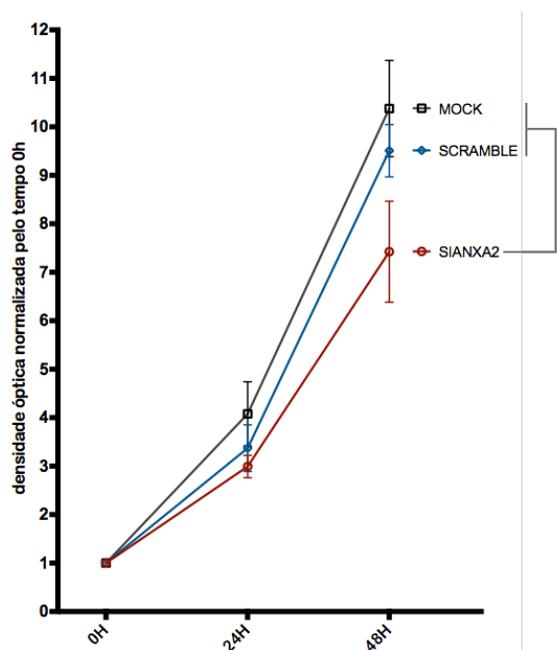


Figura 4-7 - Curva de proliferação (em DMEM 10% SFB) por cristal violeta para o silenciamento da ANXA2. Dados representativos da média \pm erro padrão (EP) de ensaios em duplicata em 4 experimentos independentes. ANOVA de duas vias; * $p < 0,05$

Análise do potencial migratório em células HT-29 silenciadas para ANXA2

Em vista da interação da ANXA2 com a organização do citoesqueleto de actina, foi analisado o potencial migratório em células HT-29 no ensaio de *Wound Healing*. Após um período de 24 horas, o grupo Mock apresentou $25,4\% \pm 3,3$ de migração;

similar ao grupo Scramble que migrou $24,5\% \pm 5,2$. As células silenciadas para a ANXA2 cobriram menor área ao longo do período, totalizando $15,9\% \pm 1,2$, o que indicaria uma redução do potencial migratório dessas células frente ao estímulo deste ensaio (Figura 4-8a e b). Para certificar que não houve diferença proliferativa entre os grupos deste experimento, realizou-se um ensaio de proliferação celular por cristal violeta nas condições de cultura do experimento (DMEM com 1% de SFB). Não houve diferença na densidade óptica entre os grupos, indicando semelhante taxa proliferativa entre eles (Figura 4-8c).

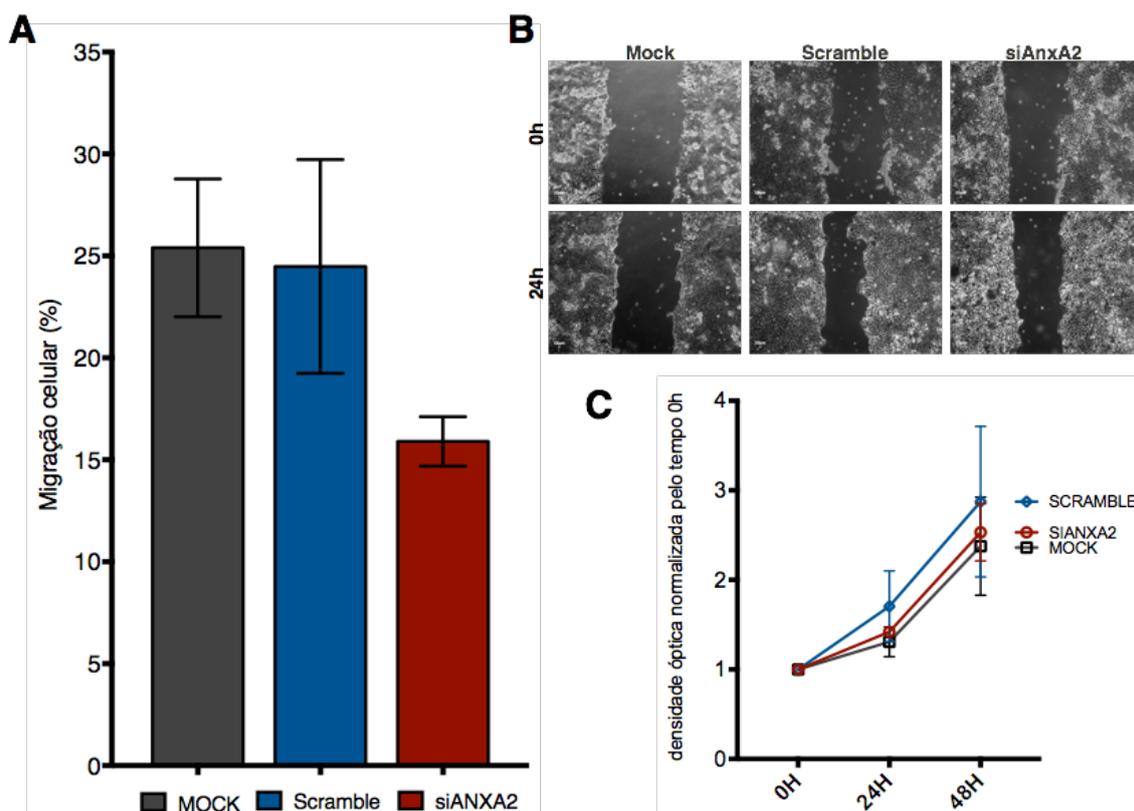


Figura 4-8 – Ensaio de Wound Healing de células HT-29 silenciadas para ANXA2. (A) Quantificação da porcentagem de área ocupada pelas células após 24 horas de migração. Dados representativos da média \pm erro padrão (EP) de ensaios em duplicata em 3 experimentos independentes. (B) Imagens representativas do ensaio de Wound Healing. (C) Ensaio de proliferação por cristal violeta (nas condições de cultura específicas do experimento: DMEM com 1% de SFB) demonstrando que não há diferença na proliferação entre os grupos interferindo no resultado do ensaio de Wound Healing. Ensaios realizados em meio de cultura DMEM 1% SFB.

4.6. Silenciamento da ANXA2 não altera a capacidade invasiva da linhagem HT-29

Posteriormente, avaliou-se a capacidade invasiva das células frente ao silenciamento para ANXA2. Após 48 horas de ensaio não houve diferença na quantidade de células que foram capazes de invadir o Matrigel para cada grupo. O grupo Mock apresentou em média $27,5 \pm 15,1$ células; o grupo Scramble $30,3 \pm 5,6$ e o grupo siANXA2 $39,5 \pm 14,9$ células (Figura 4-9).

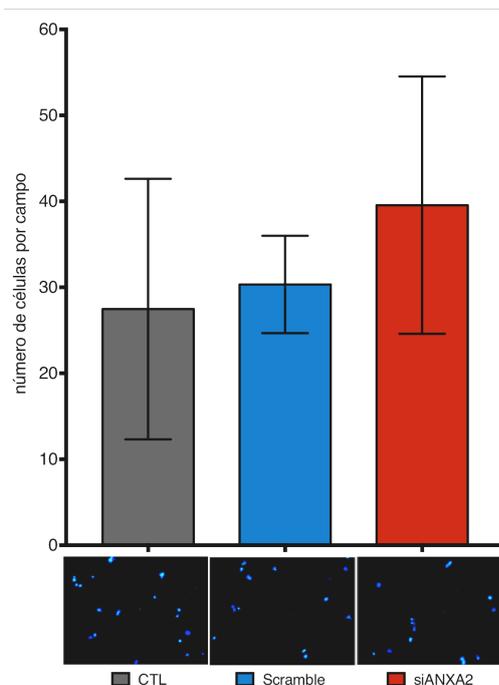


Figura 4-9 - Ensaio de Invasão em Matrigel de células HT-29 silenciadas para ANXA2. Quantificação do número de células por campo após 48 horas de invasão. Dados representativos da média \pm erro padrão (EP) de 4 experimentos independentes.

4.7. Indução de EMT via TGF- β nas linhagens HT-29 e HCT-116

Para poder avaliar o envolvimento da ANXA2 na transição epitélio-mesênquima (EMT), utilizou-se o TGF- β , um dos mais clássicos indutores da EMT. Primeiramente, submetemos as células das linhagens HT-29 e HCT-116 a tratamento de 48 horas com uma dose de TGF- β (10ng/ml) já utilizada em outros trabalhos da literatura. Então foram avaliados: o fenótipo celular, dois marcadores epiteliais (E-caderina e Claudina-3) e um marcador mesênquimal (Vimentina) através de imunofluorescência.

Nas células da linhagem HT-29 tratadas com TGF- β , uma análise da expressão proteica dessas células por meio de *immunoblotting* revelou ligeira redução na expressão de E-caderina principalmente em 48 horas. O mesmo ocorreu com o outro marcador epitelial utilizado, a claudina-3 apresenta queda na expressão em 48 horas. Já a vimentina, marcador mesênquimal utilizado, teve aumento de seu níveis de expressão tanto em 24 quanto como em 48 horas (Figura 4-10a).

Levando em conta a pequena redução dos marcadores epiteliais, foram realizadas imunofluorescências para averiguar a reorganização destas proteínas frente ao estímulo com TGF- β . As células tratadas tiveram aumento no volume celular, maior número de protusões de membrana e perda dos contatos célula-célula (alterações fenotípicas características da EMT). A marcação para E-caderina, que era uniforme e concentrada nas regiões de contato célula-célula, se tornou difusa pelo citoplasma com alguns resquícios nas junções entre células que estão perdendo seus contatos.

A claudina-3 apresentou marcação similar a de E-caderina, com a saída dos contatos célula-célula para o citoplasma. O aumento de expressão protéica de vimentina acompanha os resultados de sua imunofluorescência, onde nota-se uma maior intensidade da marcação, feixes mais espessos e alongados acompanham o fenótipo mais próximo do mesenquimal (Figura 4-10b).

O mesmo procedimento foi repetido para a linhagem HCT-116. Após 48 horas de tratamento com TGF- β , realizou-se a extração protéica total e subsequente análise por immunoblotting. Os resultados indicaram que há uma redução na expressão de E-caderina frente a este tratamento. Contudo, os marcadores claudina-3 e vimentina não apresentaram perfil de expressão constante dentre diferentes experimentos e até mesmo entre os tempos 24h ou 48h (Figura 4-11b). O fenótipo já um pouco mais alongado das células HCT-116 sofreu pequenas alterações enquanto E-caderina e Claudina-3 foram internalizadas, desmontando as junções intercelulares. Não houve notória alteração na organização e intensidade de marcação de vimentina (Figura 4-11a).

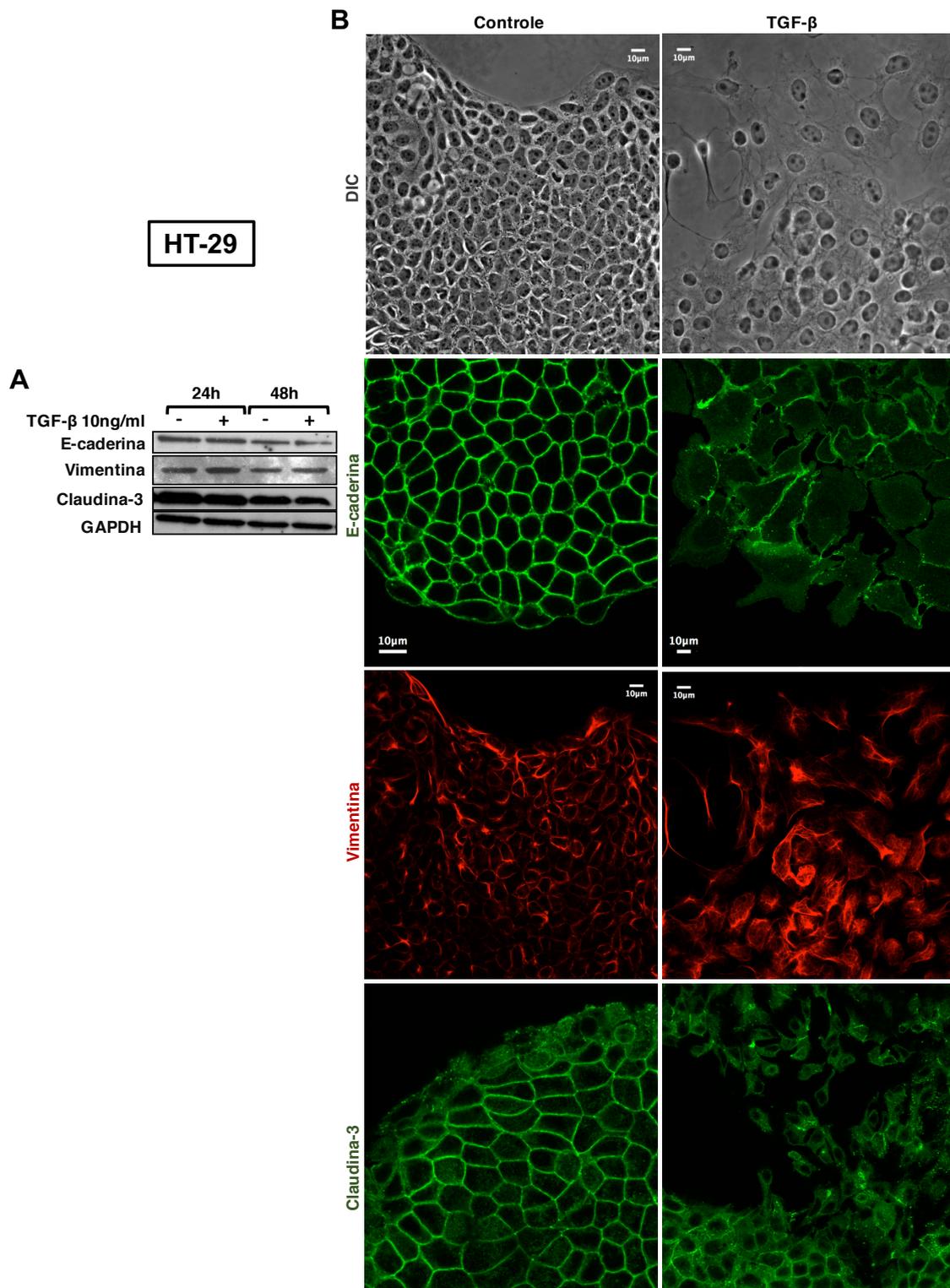


Figura 4-10 –Indução via TGF- β da EMT na linhagem HT-29. (A) Immunoblotting para os marcadores característicos da EMT (E-caderina, vimentina e claudina-3). GAPDH foi utilizado como controle endógeno de expressão protéica. (B) Imunofluorescências para o mesmos marcadores em células tratadas por 48 horas com TGF- β . Barra = 10 μ m.

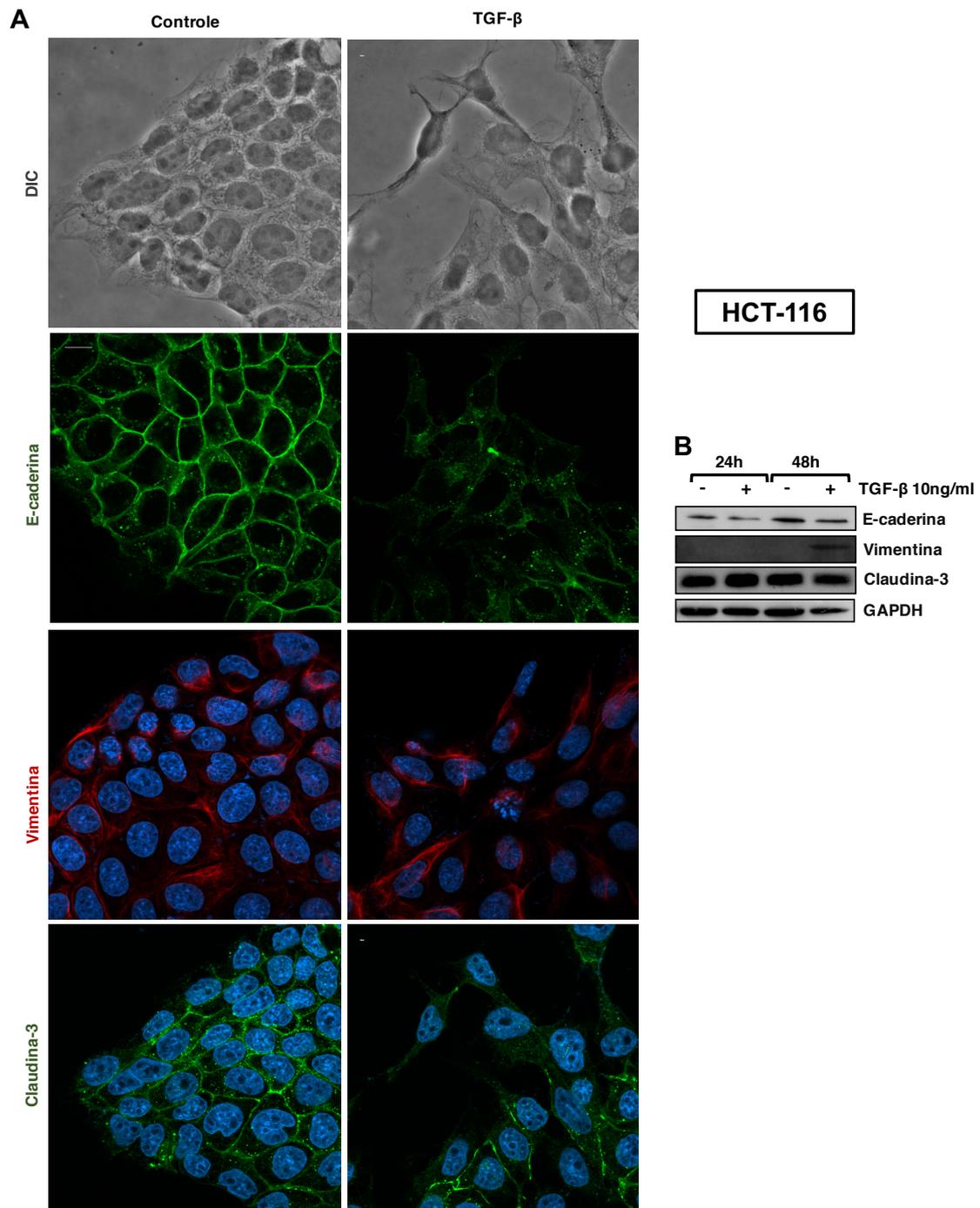


Figura 4-11 - Indução via TGF- β da EMT na linhagem HCT-116. (A) Imunofluorescências para os marcadores característicos da EMT (E-caderina, vimentina e claudina-3) em células tratadas por 48 horas com TGF- β . Barra = 10 μ m. (B) Immunoblotting para os mesmos marcadores no tempo de 24 e 48 horas. GAPDH foi utilizado como controle endógeno de expressão protéica.

4.8. Tratamento com TGF- β altera a expressão de ANXA2 de forma linhagem específica

Uma vez padronizados os parâmetros da EMT para cada linhagem celular, avaliou-se a expressão e organização subcelular de ANXA2 e sua forma fosforilada frente ao tratamento de 48 horas com TGF- β .

Como já descrito anteriormente, as células da linhagem HT-29 sem tratamento apresentam uma intensa marcação de ANXA2 em sua membrana citoplasmática delimitando os limites celulares. Y23-pANXA2 também está mais concentrada nas regiões de contato célula-célula, no entanto apresenta uma marcação mais pontilhada e difusa pelo citoplasma. Após 48 horas de tratamento com TGF- β , a ANXA2 total é encontrada com grande intensidade e organizada por todo o citoplasma das células em EMT, mas com ainda maior intensidade nas regiões de protrusão de membrana. A sua forma fosforilada (Y23) passa por similar reorganização. Y23-pANXA2 apresenta marcação pontilhada e com maior intensidade pelo citoplasma das células que já perderam seus contatos célula-célula e em especial nas regiões de protrusões de membrana (Figura 4-10a). A análise da expressão protéica por meio de immunoblotting revelou um aumento expressivo da expressão de ANXA2 e de Y23-pANXA2 já em 24 horas e se mantendo em 48 horas. Este aumento ocorreu mesmo após utilização de concentração mais baixa (5ng/ml) de TGF- β (Figura 4-10b).

A análise por meio de imunofluorescência das células da linhagem HCT-116 indicou uma marcação mais intensa na região de contatos intercelulares, pontilhada e difusa tanto para a ANXA2 quanto para Y23-pANXA2. O tratamento com TGF- β nestas células não causou extensas reorganizações da proteína pelo citoplasma. A marcação continua difusa e concentrada próxima aos limites celulares e em especial nas regiões de protrusão de membrana (Figura 4-11a). No entanto, a expressão protéica da ANXA2 é reduzida sob o efeito do tratamento com TGF- β . Tanto a ANXA2 total quanto sua forma fosforilada estão menos expressas após 48 horas de tratamento (Figura 4-11b).

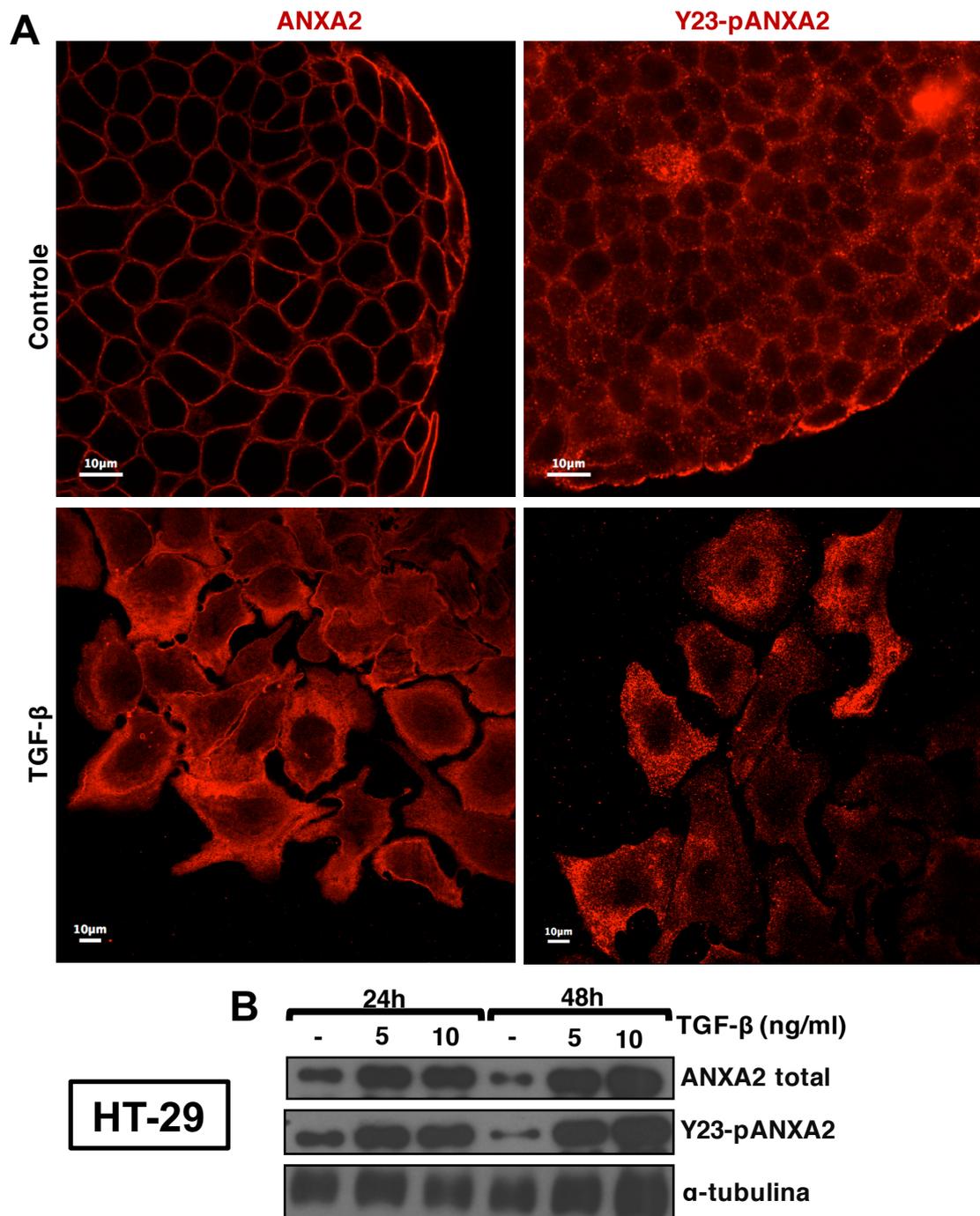


Figura 4-12 – Expressão e distribuição celular da ANXA2 em células HT-29. (A) Imunofluorescências para ANXA2 e Y23-pANXA2 em células controle ou tratadas por 48 horas com TGF- β 10ng/ml. Barra=10 μ m. (B) Análise da expressão proteica frente ao tratamento com duas concentrações distintas de TGF- β (5 ou 10ng/ml) em distintos tempos (24h e 48h). α -tubulina foi utilizada como controle endógeno de expressão protéica

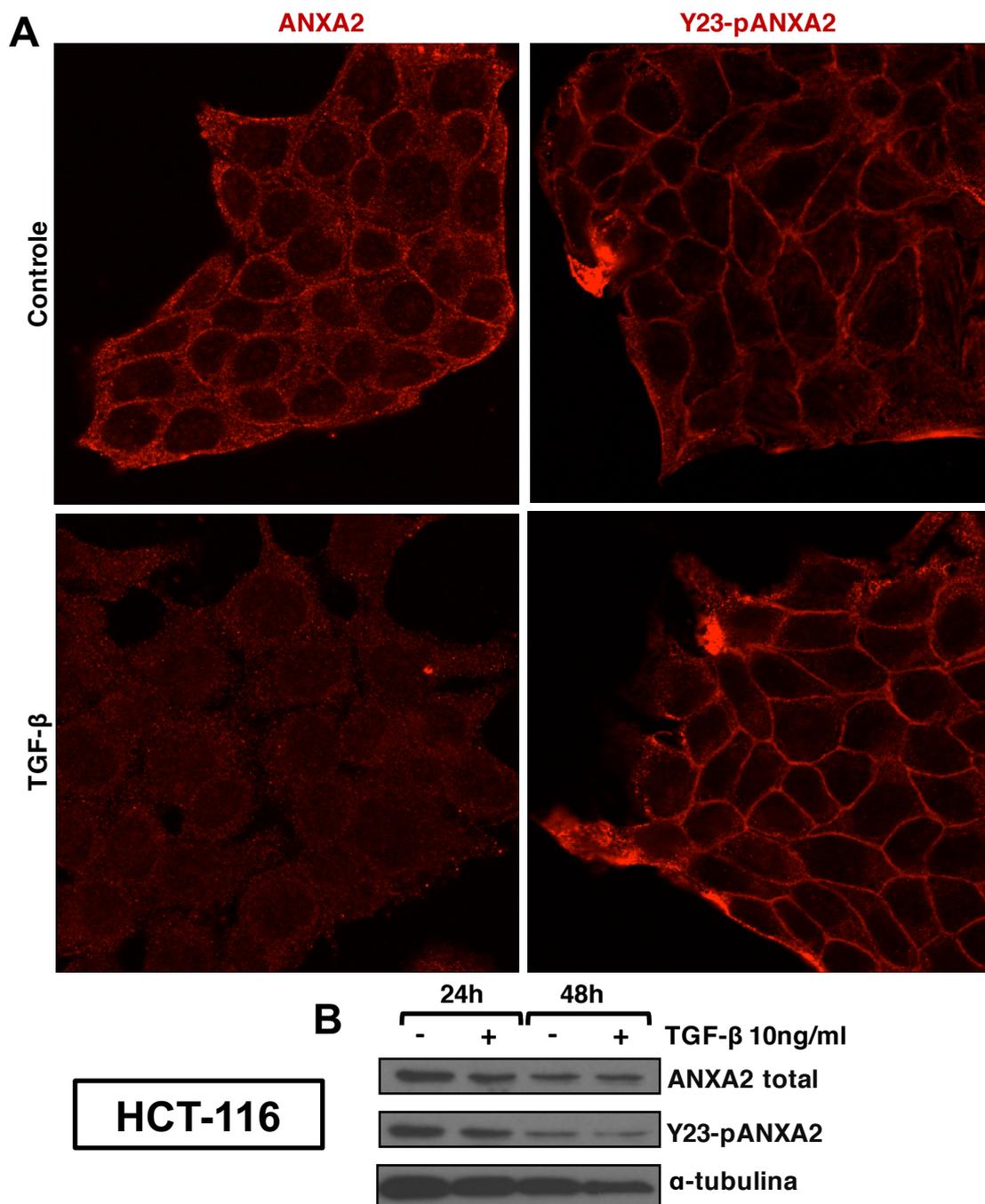


Figura 4-13 - Expressão e distribuição celular da ANXA2 em células HCT-116. (A) Imunofluorescências para ANXA2 e Y23-pANXA2 em células controle ou tratadas por 48 horas com TGF-β 10ng/ml. Barra=10 μm. (B) Análise da expressão proteica frente ao tratamento com TGF-β (10ng/ml) em distintos tempos (24h e 48h). α-tubulina foi utilizada como controle endógeno de expressão proteica.

4.9. TGF-β induz a fosforilação de ANXA2 em Y23 via Src na linhagem HT-29 e translocação de STAT3 para o núcleo

Uma vez determinado o efeito do tratamento a longo prazo com TGF-β sobre a expressão e fosforilação de ANXA2, foi investigado qual seria o efeito deste tratamento em períodos mais curtos de tempo, dado que trabalhos já mostraram que a ANXA2 pode ser fosforilada e redistribuída pela célula em questão de minutos

(Rescher *et al.*, 2008; Grindheim *et al.*, 2016). Foi avaliada também a expressão de Src total e Src fosforilada na tirosina 527. Src é a principal quinase responsável por fosforilar a ANXA2 em sua tirosina 23. Com tempos variando de 15 minutos a 6 horas, verificou-se que já em 15 minutos há um pico de ativação de Src (aumento de sua forma fosforilada), acompanhada de um ligeiro aumento de Y23-pANXA2. No tempo de 30 minutos, há uma queda na expressão de ANXA2 total que perdura até o tempo de 180 minutos. Essa queda é acompanhada por uma menor fosforilação de Src, e assim como a ANXA2, volta a exibir aumento de fosforilação em 180 até 360 minutos (Figura 4-14).

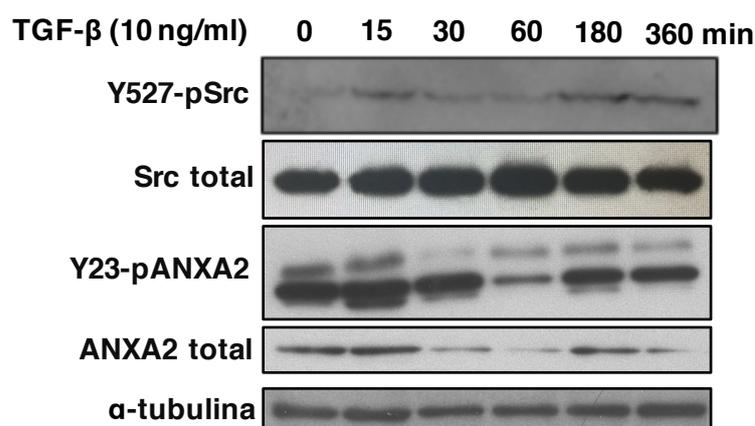


Figura 4-14 – Curva de ativação de ANXA2 e Src frente a tratamento com TGF-β em até 6 horas. Análise por imunoblotting da expressão protéica de ANXA2 total, Y23-pANXA2, Src total e Y527-pSrc. α-tubulina foi utilizada como controle endógeno de expressão protéica.

De acordo com recentes trabalhos publicados na literatura, a ANXA2 poderia ativar STAT3 para induzir as alterações decorrentes da TEM. Para avaliar se o tratamento com TGF-β induziu translocação de STAT3 fosforilada para o núcleo, realizou-se imunofluorescência para p-STAT3 e DAPI e a comparação do coeficiente de Manders de colocalização entre os dois marcadores. Após 3 horas de tratamento com TGF-beta, houve aumento da colocalização de p-STAT3 com o DAPI (Coeficiente de Manders: Controle=0,40 ; Tratado=0,76), indicando maior translocação da mesma para o núcleo (Figura 4-15).

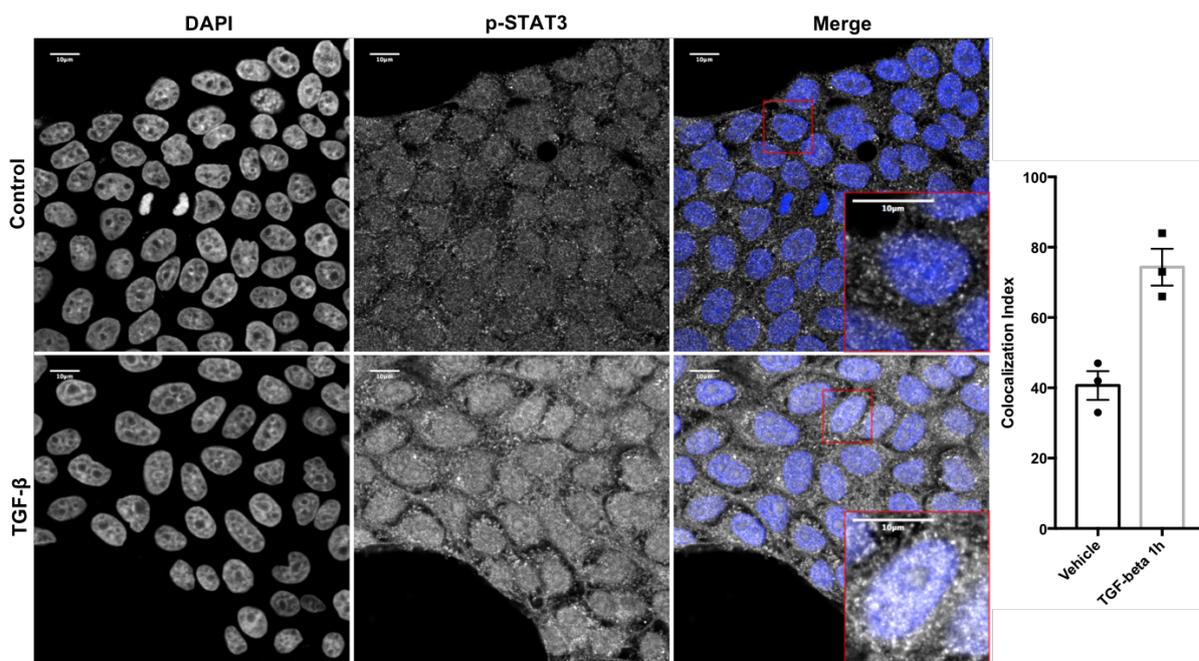


Figura 4-15. Avaliação da colocalização entre pSTAT3 e DAPI para indicação de translocação nuclear de STAT3. (A) Imunofluorescência para DAPI e pSTAT3. (B) Coeficiente de Manders da correlação entre a marcação de pSTAT3 e DAPI indicando maior translocação nuclear nas células tratadas.

Estabelecido o elo entre a indução por TGF- β da EMT e alterações na expressão de ANXA2; buscou-se avaliar novamente como a redução da expressão protéica de ANXA2 em processos da tumorigênese colorretal poderia afetar o efeito do tratamento com TGF- β . A linhagem celular escolhida para os seguintes experimentos foi a HT-29 por apresentar aumento a longo prazo na expressão de ANXA2 (da mesma forma como encontrado nas amostras de pacientes de CCR).

4.10. ANXA2 é redistribuída intracelularmente após indução da EMT por meio de TGF- β

Dado o aumento de expressão e realocização da ANXA2 na linhagem HT-29, analisou-se a localização e distribuição da proteína fosforilada no eixo XZ das células por meio de imunofluorescência para E-caderina/Y23p-ANXA2/F-actina/DAPI. Em células HT-29 controle há uma concentração de E-caderina somente nos contatos célula-célula, enquanto a Y23p-ANXA2 se restringe a porção apical das células. Após o tratamento com TGF- β pode-se notar a perda de polaridade apico-basal (aquisição de morfologia alongada) e a redistribuição de E-caderina e Y23p-ANXA2 por todo o citoplasma celular (Figura 4-16).

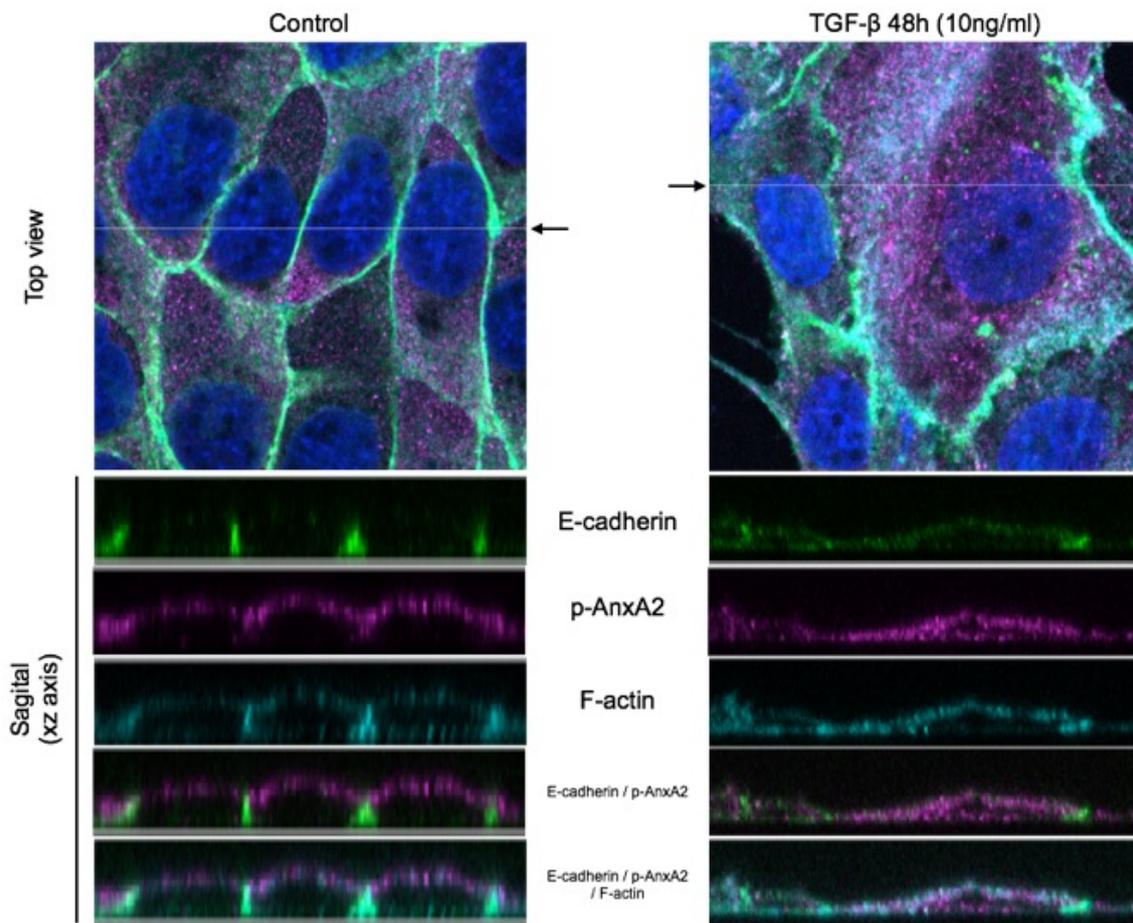


Figura 4-16. Análise do eixo sagital (xz) para a localização de pANXA2, E-caderina e F-actina em células HT-29 controle ou tratadas com TGF- β ,

4.11. Inibição farmacológica de Src e STAT3 previne a indução da EMT induzida por TGF- β

Com o intuito de confirmar a participação de Src e STAT3 na indução da EMT induzida pelo TGF-beta, utilizamos o PP2 (inibidor de Src) e o STA21 (inibidor seletivo de STAT3). Células da linhagem HT-29 foram pré-tratadas com os inibidores PP2 e STA21 nas respectivas concentrações ([100nM] e [20nM]) uma hora antes da administração do TGF-beta. O fenótipo destas células foi avaliado 48 horas depois, demonstrando a indução da TEM nas células controle tratadas com TGF-beta, com perda de contato célula-célula, morfologia alongada e maior volume celular. Nas células tratadas com PP2 não houve efeito do tratamento, permanecendo o fenótipo epitelial organizada em ilhas. O tratamento com STA21 foi capaz de inibir o alongamento das células e o espalhamento pela placa, mas não inibiu eficientemente a desestruturação dos contatos célula-célula (Figura 4-17).

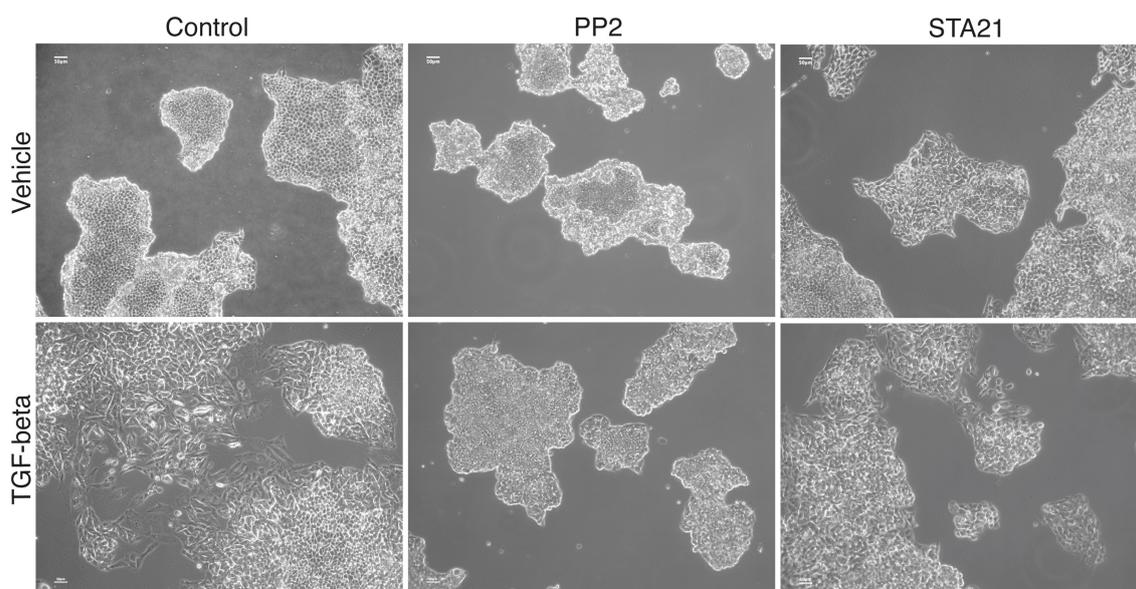


Figura 4-17. Micrografia de contraste de fase do fenótipo de células HT-29 sob pré-tratamento com inibidores de Src (PP2) e STAT3 (STA21) e tratamento com TGF- β ,

4.12. Inibição da proliferação celular pelo silenciamento de ANXA2 não é cumulativa ao efeito antiproliferativo do TGF- β

Primeiramente avaliou-se a proliferação celular. As variáveis foram a “Expressão de Anexina A2” e o “Tratamento com TGF- β ”; sendo os grupos: Mock, Scramble, siANXA2, Mock+TGF- β , Scramble+TGF- β e siANXA2+TGF- β . Nas primeiras 24 horas de tratamento, não há diferença estatística entre os grupos avaliados. Apesar de preservado o efeito de redução na proliferação pelo silenciamento da ANXA2, o tratamento com TGF- β em 48 horas levou a acentuada queda na taxa proliferativa para todos os grupos associados a ele, de forma independente da expressão ou não de ANXA2 ($F_{(1,18)}=57,34$ $p<0,0001$) (Figura 4-18a). Na Figura 4-18b, destaca-se somente a densidade óptica mensurada como medida de proliferação no momento de 48 horas. Os grupos Mock e Scramble após tratamento com TGF- β tiveram uma queda de aproximadamente 50% na proliferação, significativo com $p<0,001$ e $p<0,01$ respectivamente. O grupo silenciado para a ANXA2 não diferiu de forma estatística para o tratamento com TGF- β .

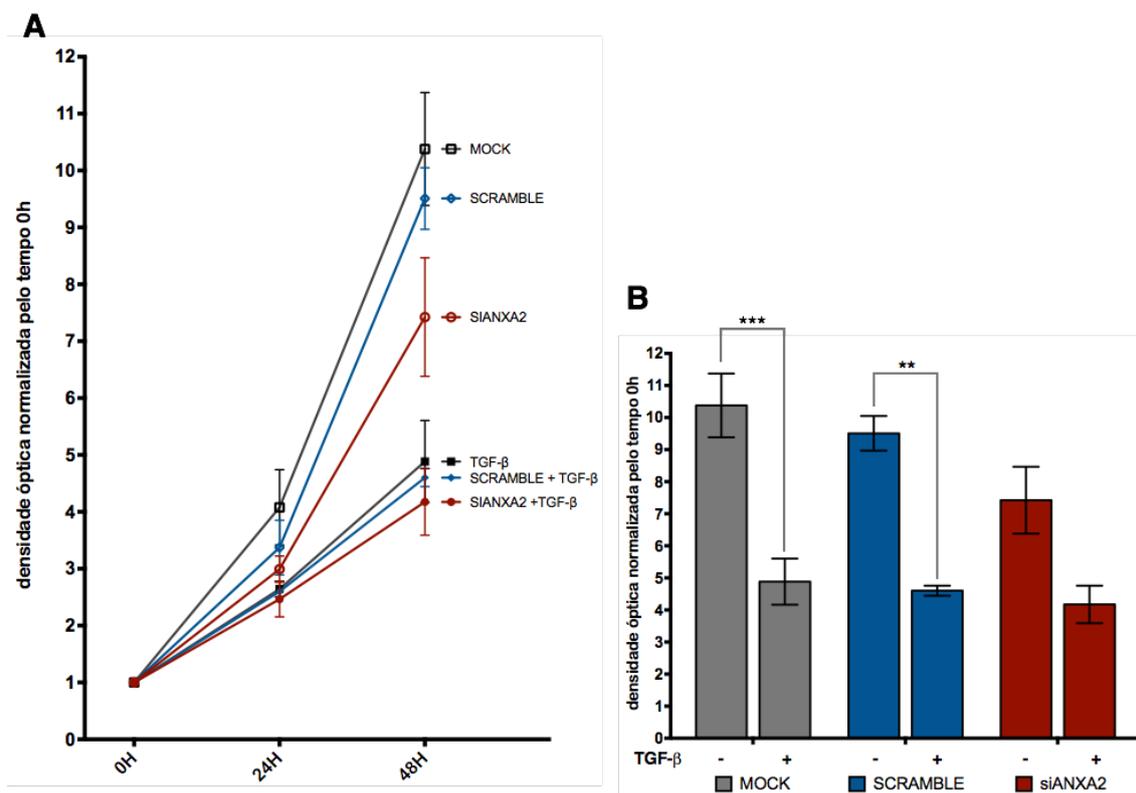


Figura 4-18 - Curva de proliferação por cristal violeta para o silenciamento da ANXA2 associado ao tratamento com TGF- β . Dados representativos da média \pm erro padrão (EP) de ensaios em duplicata em 4 experimentos independentes. ANOVA de duas vias para as variáveis: Expressão de ANXA2 e Tratamento com TGF- β . Não houve interação do efeito; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$

4.13. Silenciamento de ANXA2 não impede o aumento do potencial migratório induzido por TGF- β

Para avaliação da migração celular em ensaio de *Wound Healing* foi utilizado o mesmo desenho experimental do ensaio de proliferação: grupos Mock, Scramble e siANXA2; com ou sem tratamento com TGF- β . Essas duas variáveis permitiram inferir (ANOVA de duas vias), a despeito do reduzido n amostral ($n=3$), o significativo efeito do TGF- β na promoção da migração celular ($F_{(1,9)}=11,89$; $p=0,0073$). Não houve, no entanto efeito da expressão de ANXA2 ou interação dentre os fatores como pode-se notar na Figura 4-19.

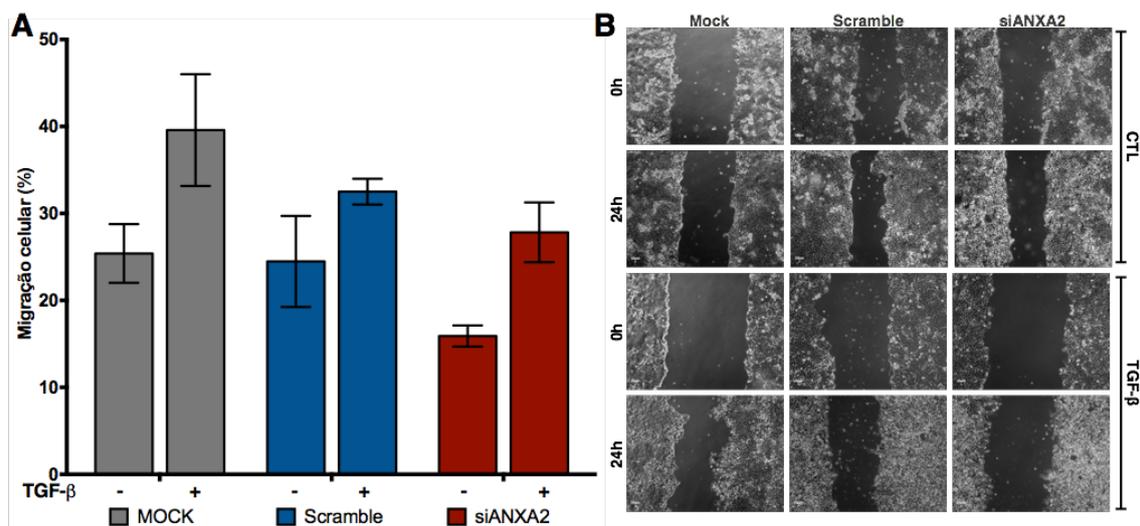


Figura 4-19 - Ensaio de Wound Healing de células HT-29 silenciadas para ANXA2 com ou sem tratamento com TGF-β . (A) Quantificação da porcentagem de área ocupada pelas células após 24 horas de migração. Dados representativos da média ± erro padrão (EP) de ensaios em duplicata em 3 experimentos independentes. (B) Imagens representativas do ensaio de Wound Healing.

4.14. Tratamento com TGF-β induz aumento de invasão celular de forma ANXA2-dependente

A invasão celular, processo essencial para o desenvolvimento da cascata metastática, também foi averiguada quanto ao silenciamento da ANXA2 e o tratamento com TGF-β . Contudo, frente a recentes dados da literatura vinculando a atividade de STAT-3, ANXA2 e a invasão celular (Wang *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015; Xiu *et al.*, 2016) utilizamos o inibidor seletivo de STAT-3 (STA21) para avaliar seu efeito sobre a invasão.

Dada a grande variabilidade inerente a técnica de invasão de matrigel em transwell, o n amostral (três experimentos independentes) não foi o suficiente para uma adequada inferência estatística quanto aos efeitos de cada variável. Pode-se porém ressaltar uma tendência estatística ao efeito do TGF-β em prol da invasão celular ($p=0,0595$) e também com relação a interação entre TGF-β e o silenciamento de ANXA2 ou inibição de STAT3 ($p=0,0914$) (Figura 4-20a).

Tendo ciência desse efeito, na Figura 4-20b foram expostas a razões para cada experimento entre a quantidade de células que migraram frente ao tratamento com TGF-β e o respectivo grupo controle. Desta forma pareada, reduziríamos a variabilidade inerente a técnica. O teste ANOVA de uma via mostrou forte efeito estatístico para o silenciamento de ANXA2 e inibição de STAT3 ($F_{(3,8)}=14,64$; $p=0,0013$). O teste *pos-hoc Sidak*, evidenciou que o silenciamento de ANXA2 foi capaz de impedir o aumento de invasão induzido pelo TGF-β ($p=0,0124$) assim como a inibição de STAT3 por meio de STA21 ($p=0,0075$).

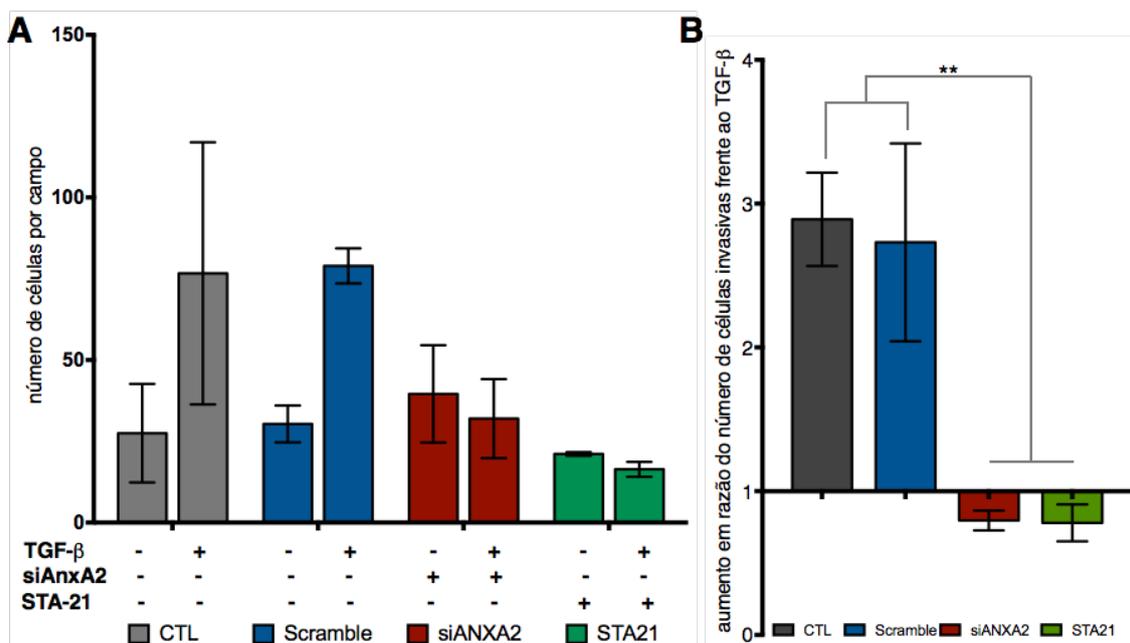


Figura 4-20 - Ensaio de Invasão de Matrigel em transwell de células HT-29 silenciadas para ANXA2, inibidas para STAT3 e tratadas com TGF-β . (A) Quantificação do número de células por campo após 48 horas de invasão. (B) Quantificação da razão entre grupos tratados e controle de forma pareada. ANOVA de uma via; $F_{(3,9)}=14,64$; $p=0,0013$. Dados representativos da média \pm erro padrão (EP) de 3 experimentos independentes. ** $p < 0,01$.

4.15. Análise *in silico* confirma super-expressão de ANXA2 em pacientes de CCR e envolvimento com grupos de pior prognóstico

Considerando os indícios (tanto *ex vivo* quanto *in vitro*) de que a super-expressão da ANXA2 está envolvida no potencial invasivo de células de CCR, buscou-se a validação dos mesmos resultados por meio de análise *in silico* da expressão do mRNA de ANXA2 e E-caderina nos bancos de dados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) para adenocarcinoma de cólon (TCGA-COAD; n=461) e adenocarcinoma de reto (TCGA-READ; n=172).

A princípio foram realizadas duas análises: expressão por estadio (normal, I, II, III, IV) e a expressão por subtipo consenso (CMS1 – MSI Imune; CMS2 – Canônico; CMS3 – Metabólico; CMS4 – Mesenquimal). A expressão do mRNA de ANXA2 se mostrou estatisticamente aumentada ($p < 0,001$) em todos os estadios quando comparados aos pacientes controle. Já a E-caderina exibiu expressão oposta, com redução ($p < 0,005$) em todos os estadios quando comparados ao controle (Figura 4-21a). Na comparação entre subtipos consenso, todos os grupos para ambos os genes (ANXA2 e CDH1) foram significativamente ($p < 0,005$) distintos entre si. A expressão de ANXA2 foi maior no subtipo CMS1, seguido de CMS3, CMS4, CMS2 e normal. A expressão do mRNA para a E-caderina seguiu ordem inversa com maiores valores no

grupo normal, seguido dos subtipos CMS2, CMS3, CMS4 e CMS1 respectivamente (Figura 4-21b).

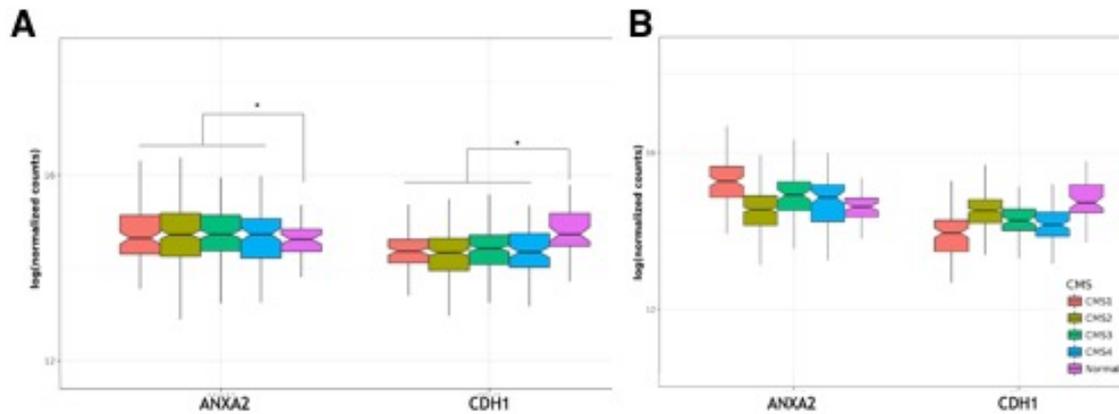


Figura 4-21. Análise da expressão de ANXA2 e CDH1 a partir de dados de RNAseq armazenados no TCGA de pacientes com CCR. (A) Análise por estadio com diferença estatística entre todos os estadios tumorais em comparação com o controle para ambos genes ($p < 0,05$). (B) Comparação dentre subtipos consenso do CCR. Todos os grupos diferem entre si com $p < 0,05$.

A possível associação inversa entre E-caderina e ANXA2 levou a hipótese de uma correlação inversa entre a expressão das mesmas nos pacientes. Contudo não houve correlação ($r^2=0,0181$) entre estas proteínas em uma análise global dos pacientes (figura 4-22). Destrinchando a análise de correlação, estadio por estadio, pode-se observar fraca correlação direta de ANXA2 e CDH1 no grupo controle ($r^2=0,163$) e correlações inversas nos estadios I, II e III.

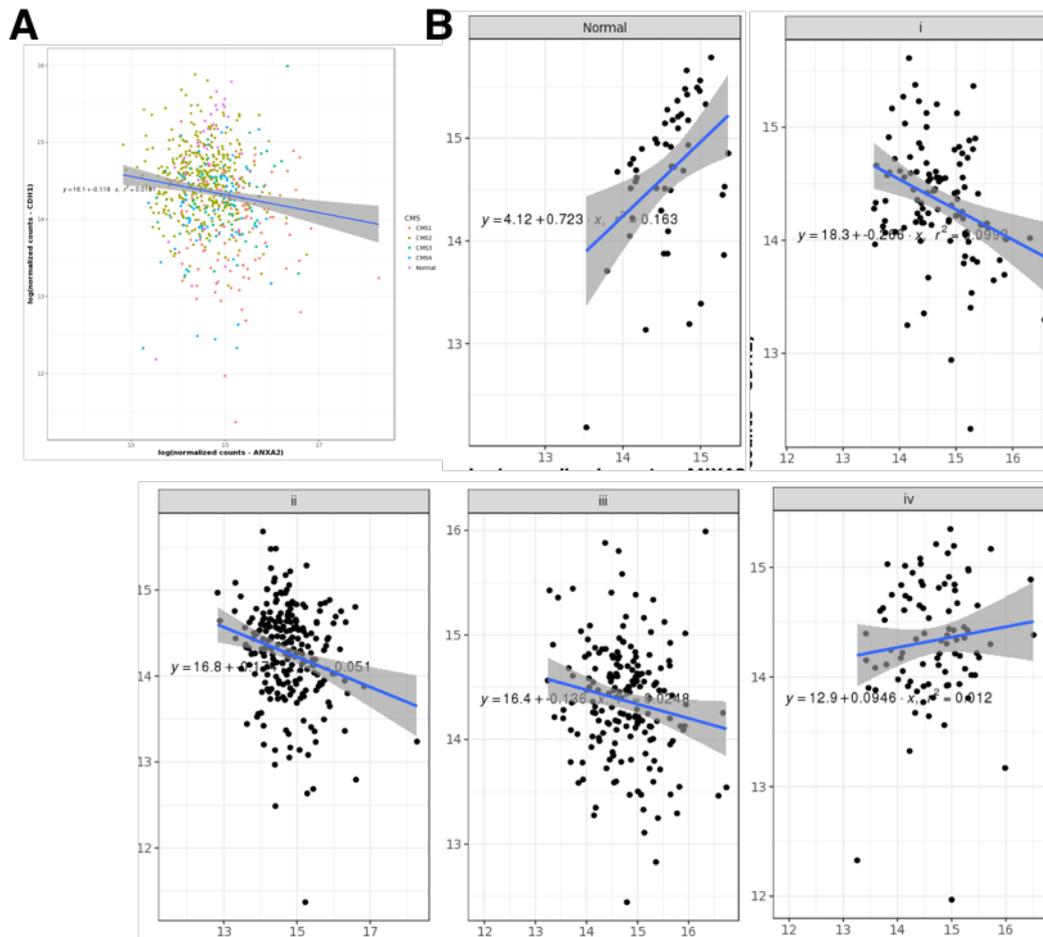


Figura 4-22. Correlação da expressão do mRNA de CDH1 e ANXA2 em pacientes do TCGA. (A) Correlação global com subtipos consenso indicados. (B) Correlação por estadio entre a expressão de CDH1 e ANXA2

4.16. ANXA2 participa do processo de desmontagem das junções intercelulares de E-caderina na indução da EMT

Existem evidências que a ANXA2 participe de forma ativa na processo de montagem e desmontagem das junções aderentes compostas por E-caderina (Yamada *et al.*, 2005). Tendo por base estes resultados e a re-distribuição da ANXA2 de uma marcação cortical para predominante no citoplasma, foi avaliada a colocalização entre estas duas proteínas. Na Figura 4-23 pode-se observar que em células controle a ANXA2 colocaliza com a E-caderina ao longo dos contatos intercelulares. Já nas células que passaram pelo tratamento de 48 horas com TGF- β , há uma gradativa dissolução dos contatos célula-célula. Ainda há regiões de colocalização em junções resquiciais, contudo não encontramos ANXA2 nas junções que já estão em estágio quase final de desmontagem. A alta expressão de ANXA2, levando a forte marcação citoplasmática prejudica a precisa colocalização entre as proteínas, apesar de haveram pontos de colocalização.

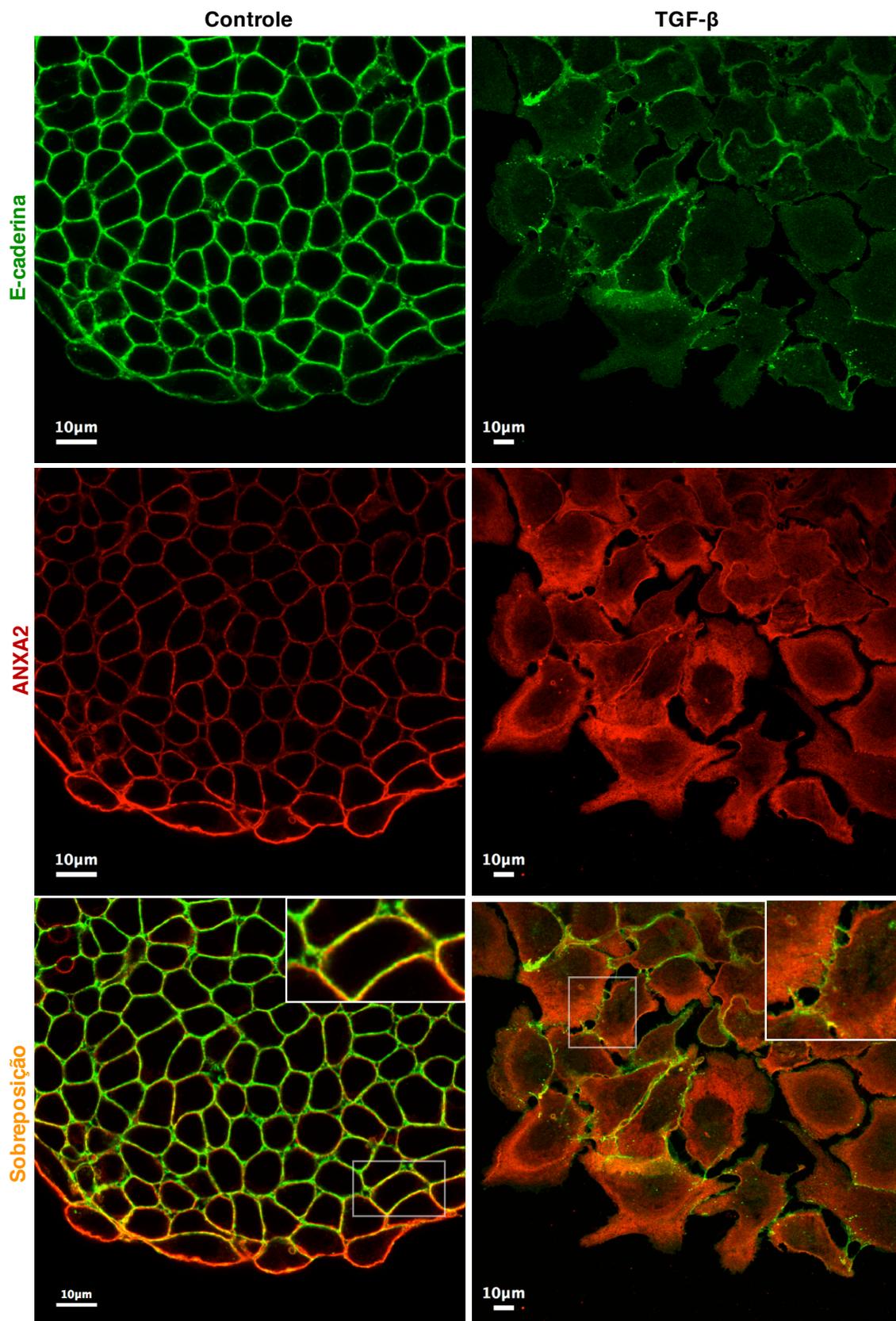


Figura 4-23 – Colocalização de ANXA2 e E-caderina frente ao tratamento com TGF- β . Imunofluorescências representativas de dois experimentos independentes. Em destaque estão as junções aderentes integras nas células controle e nas tratadas com TGF- β as mesmas junções sendo desmontadas.

Com o intuito de melhor precisar a interação entre E-caderina e ANXA2, foi utilizado um microscópio de superresolução com a metodologia de Microscopia por Iluminação Estruturada (SIM).

A análise da colocalização em células não tratadas, confirmou a presença de ambas proteínas nas junções intercelulares (Figura 4-24a). Na Figura 4-24b, destaca-se o perfil de intensidade de fluorescência de uma destas junções. É possível visualizar que E-caderina e ANXA2 se organizam ao longo da junção em regiões específicas (setas indicam colocalizações), provavelmente rafts lipídicos organizados pela ANXA2. Na Figura 4-24c a visão ortogonal dessa camada de células resalta a colocalização e organização de E-caderina e ANXA2 na região de contatos entre células.

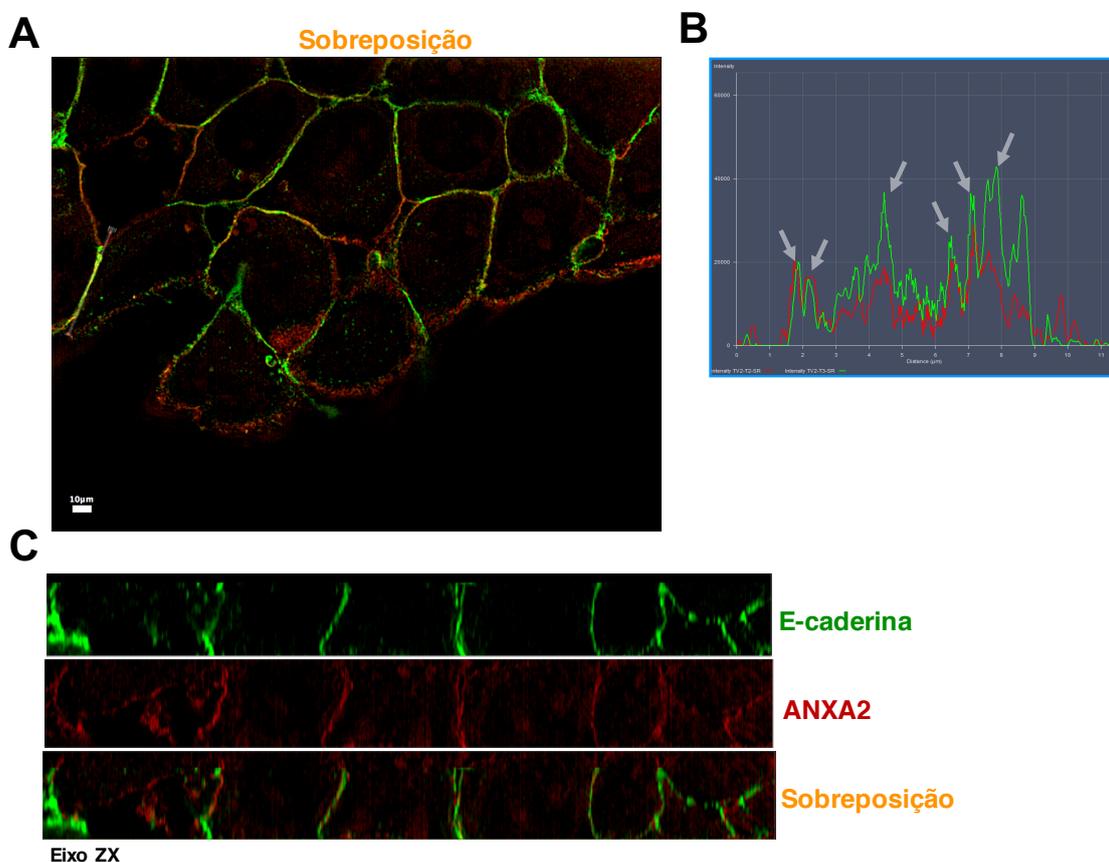


Figura 4-24 – Avaliação da colocalização entre ANXA2 e E-caderina por meio de Microscopia de Iluminação Estruturada. (A) Fatia de 110µm apresentando colocalização entre ANXA2 e E-caderina na região juncional. (B) Perfil de Intensidade de Fluorescência ao longo da secção de reta destacada em A. Setas indicam pontos de forte colocalização. (C) Visualização ortogonal de A permitindo avaliar a distribuição de E-caderina e ANXA2 ao longo do eixo ZX.

Após as 48 horas de tratamento com TGF- β , destacou-se a dissolução das junções intercelulares e a internalização de E-caderina (Figura 4-23). Na Figura 4-25, por meio da SIM, podemos precisar que a E-caderina é internalizada após a desmontagem das junções célula-célula e permanece no citoplasma das células. A

ANXA2 apresenta grande marcação ao longo do citoplasma e está em grande parte justaposta ou colocalizada com a E-caderina (destaques Figura 4-25). Isso sugere que a ANXA2 esteja envolvida na formação ou direcionamento das vesículas por onde a E-caderina foi internalizada. É possível também visualizar uma junção resquicial entre duas células, onde somente há marcação para a E-caderina, sem presença de marcação para a ANXA2.

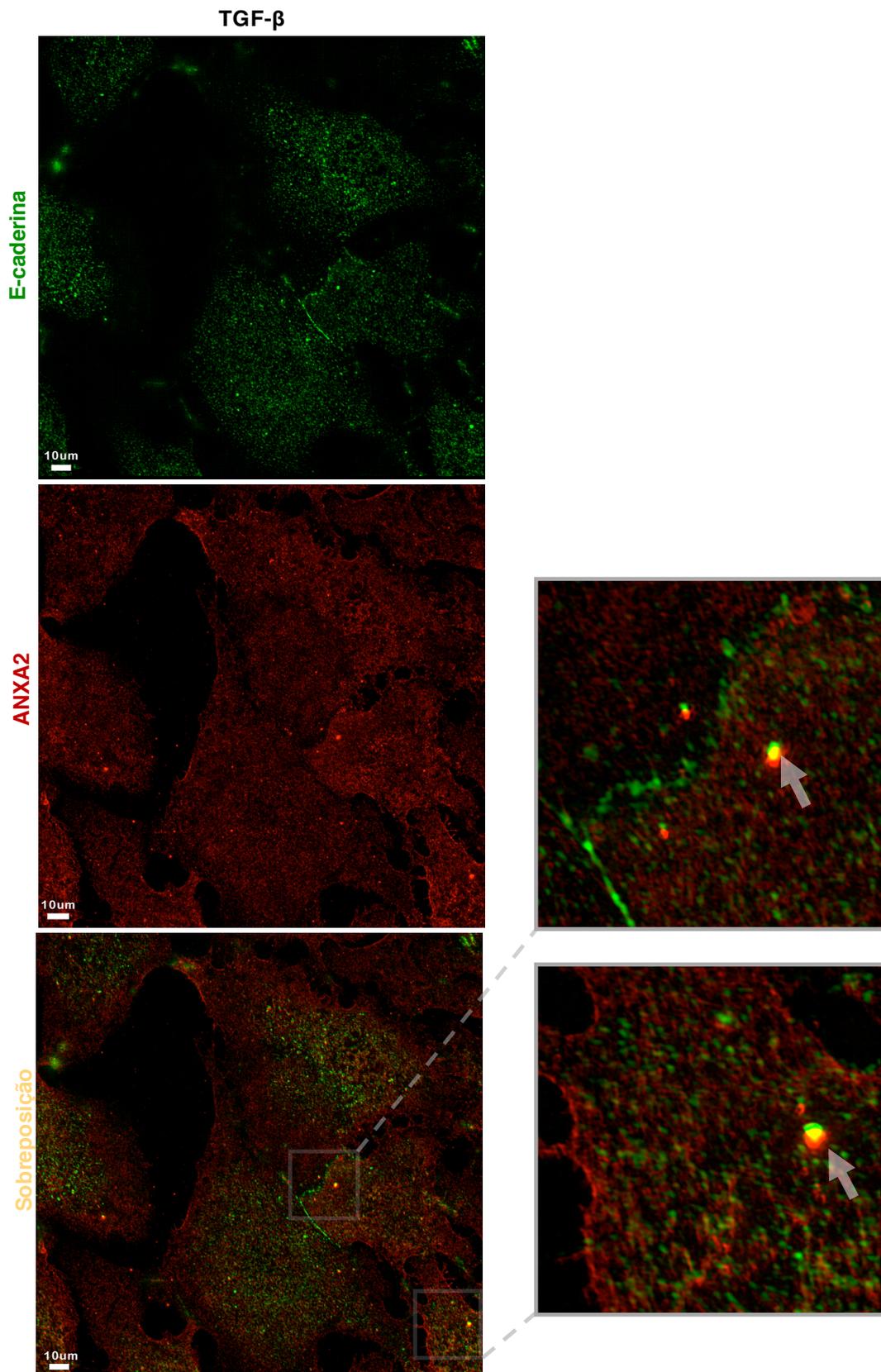


Figura 4-25 - Avaliação da colocalização entre ANXA2 e E-caderina por meio de Microscopia de Iluminação Estruturada. Máxima projeção de imunofluorescência para ANXA2 e E-caderina apresentando colocalização pontual entre ANXA2 e E-caderina no citoplasma, sugestiva de uma organização em vesículas endocitadas. Destaque superior amplia porção de junção resquicial no canto inferior esquerdo. Ambos destaques ressaltam a organização justaposta ou colocalizada (setas) de ANXA2 e E-caderina.

4.17. Em cultura tridimensional, ANXA2 e E-caderina apresentam dinâmica semelhante a organização em monocamadas

Foi realizada a cultura de células da linhagem HT-29 em lamínulas cobertas com MATRIGEL para a formação de esferóides e a avaliação do efeito do TGF- β sobre a localização de E-caderina e ANXA2 em cultura tridimensional (3D). A análise prévia a imunofluorescência indicou que as células tratadas com TGF- β formaram esferóides com menor circularidade e bordas menos regulares que as células controle (Figura 4-26).

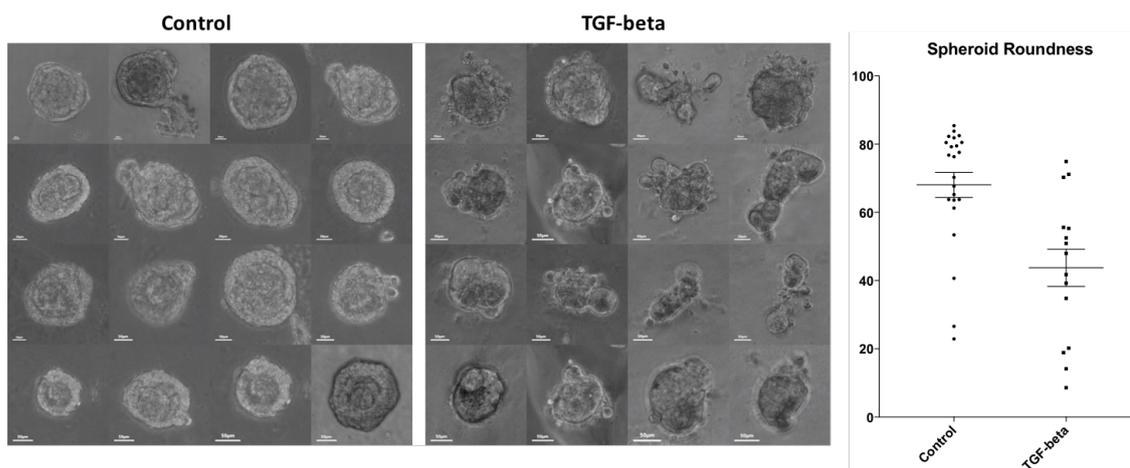


Figura 4-26. Análise morfológica da formação de esferóides em MATRIGEL® pela linhagem HT-29. (A) Micrografias de contraste de fase dos agregados celulares formados nas células controle ou tratadas com TGF- β . (B) Quantificação morfolométrica da circularidade dos agregados indicando menor organização nas células tratadas com TGF- β . Escala: variável para melhor visualização dos esferóides

Os esferóides controle exibiram marcação para E-caderina e ANXA2 nas regiões de contato intercelulares apresentando extensas regiões de colocalização. Com relação aos esferóides que passaram pelo tratamento com TGF-beta, da mesma forma que na cultura em monocamadas, a imuno marcação para E-caderina se encontra intensa no citoplasma celular com um padrão semelhante ao de vesículas. É possível visualizar uma organização primariamente cortical da ANXA2, tanto nas regiões de contato célula-célula como nas regiões célula-matriz. Uma fração das células do esferóide apresentaram forte marcação também citoplasmática, colocalizando com a E-caderina como pode ser visto no inserto da Figura 4-27.

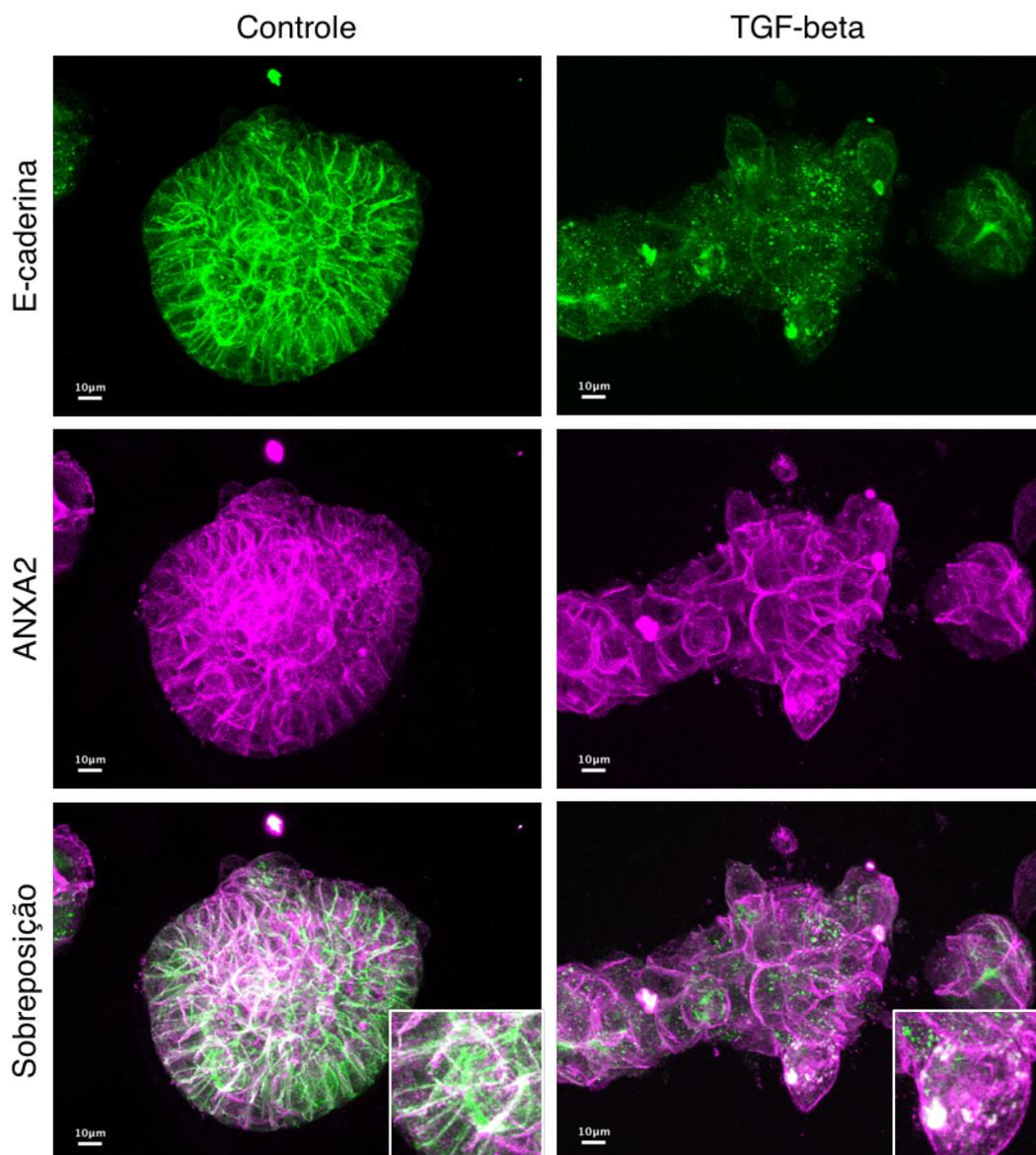


Figura 4-27. Máxima projeção da imunofluorescência de cultura tridimensional de células HT-29 marcadas para E-caderina e ANXA2. Escala: 10µm. Insertos com aumento de 2x

4.18. Super-expressão de ANXA2 na linhagem Caco-2 confirma interação com E-caderina

Para avaliar o papel da fosforilação de ANXA2 nas junções intercelulares, foi realizada a transfecção de três constructos da ANXA2 conjugada a proteína fluorescente e mutados no sítio de fosforilação por Src. A linhagem Caco-2 foi transfectada, devido a sua baixa expressão constitutiva de ANXA2, para evitar efeitos decorrentes da super-expressão de ANXA2 (como observado no tratamento das células HT-29 com TGF-beta). O mutante selvagem (WT-ANXA2-GFP) apresentou marcação citoplasmática e juncional colocalizando consistentemente com a E-caderina. O mutante fosfomímico (Y23E-ANXA2-GFP) localizou-se também no citoplasma e com marcação bem delimitada nas junções intercelulares, colocalizando

com a E-caderina assim como o mutante selvagem. Na célula transfectada com o mutante fosfo inibitório (Y23F-ANXA2-GFP) não houve marcação juncional para a ANXA2, somente citoplasmática. Pode-se observar também nessa célula um padrão mais fragmentado, menos contínuo de marcação da E-caderina nas junções da célula que expressa o mutante.

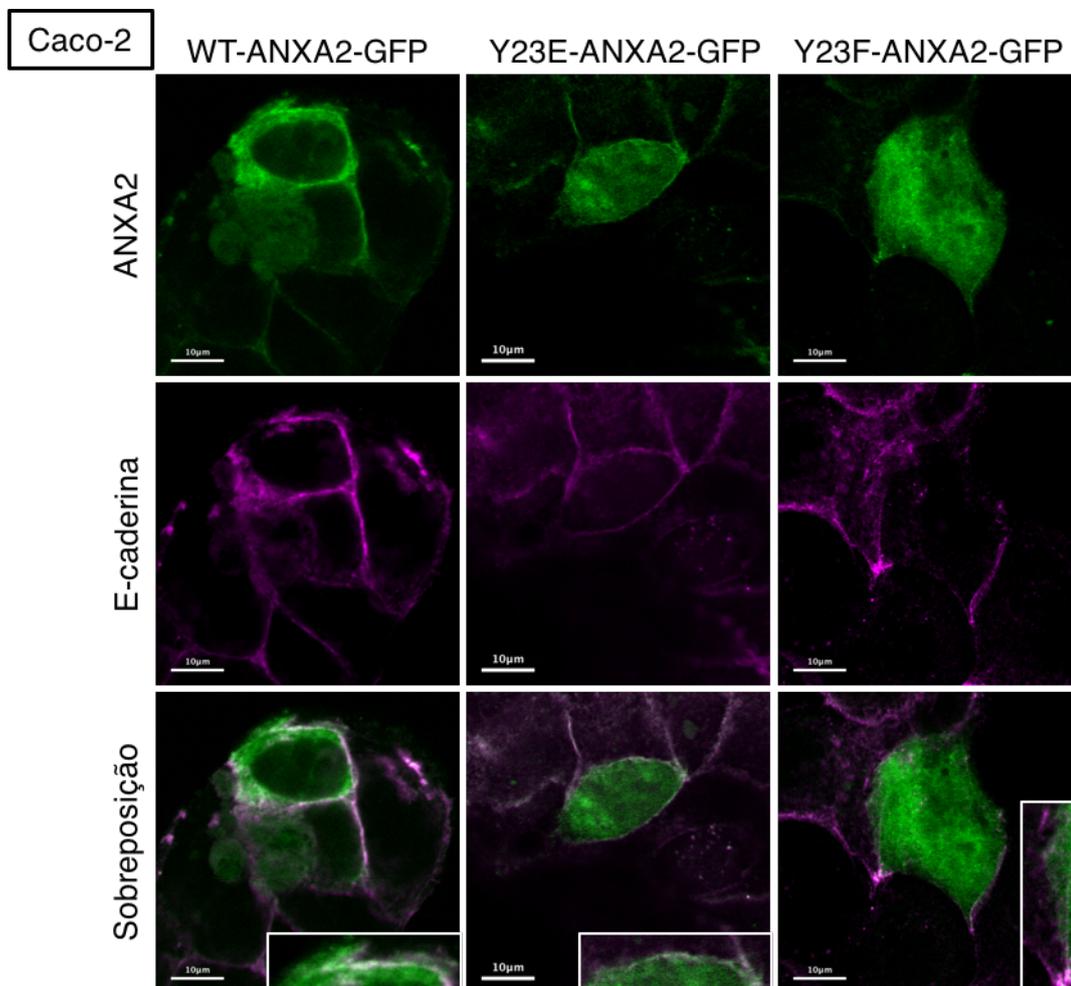


Figura 4-28. Interação da ANXA2-GFP (selvagem, Y23E ou Y23F) com a E-caderina em células da linhagem Caco-2. Escala: 10µm. Insetos com aumento de 1,5x.

4.19. Resultados de colaboração durante o doutorado:

O modelo de EMT na progênie de células irradiadas, internalização de E-caderina e ativação de ANXA2

Durante o período do doutorado tive a oportunidade de contribuir com dois artigos (já publicados, Anexo 1 e 2)) além do trabalho principal desta tese(submetido e em análise – Anexo 3). O primeiro é uma revisão sobre o papel das proteínas do complexo juncional apical (CJA) na progressão do câncer colorretal, onde discuto a função da ANXA2 e o provável papel na formação e manutenção do mesmo (Gehren

et al., 2015) (Anexo 1). O segundo trabalho (Marcondes et al., 2016) (Anexo 2) foi o desdobramento de trabalho previamente publicado (Bastos et al., 2014) onde abordou-se a ativação da via do receptor EphA4 e seu papel na indução de um fenótipo mesenquimal na progênie de células irradiadas. Pude demonstrar experimentalmente, por meio de microscopia de iluminação estruturada (SIM), que o receptor ativado nestas células é internalizado em conjunto com a E-caderina no grupo proveniente de irradiação.

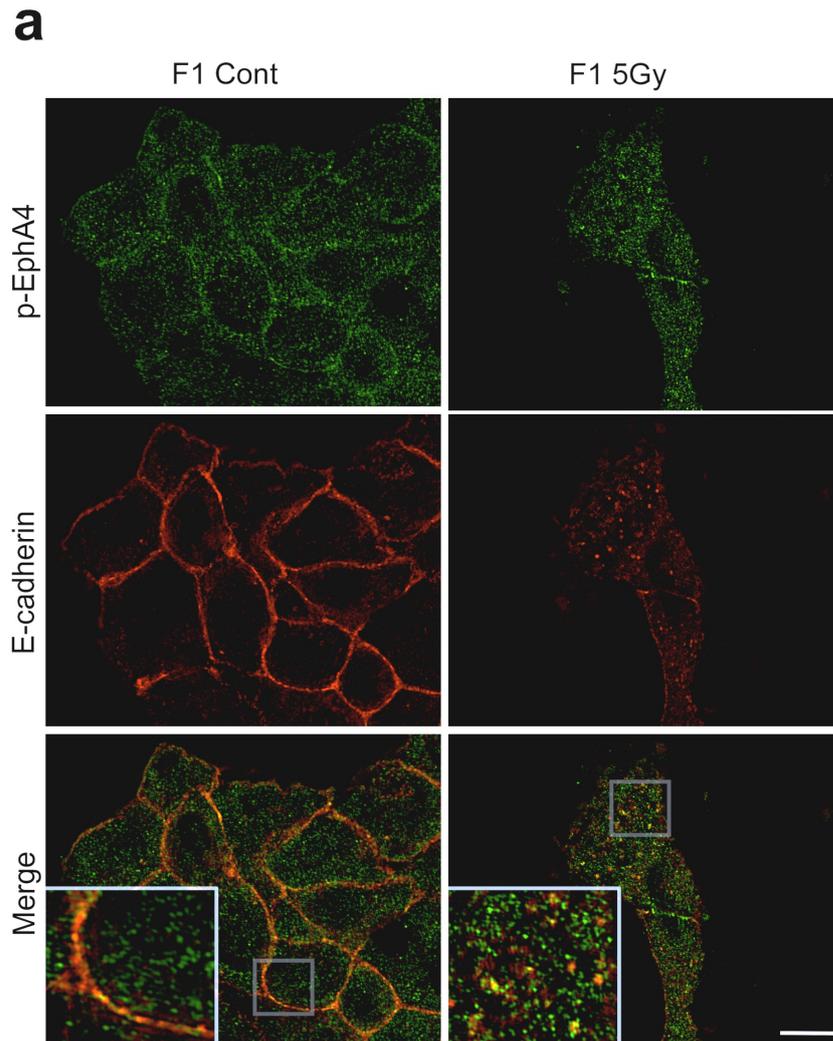


Figura 4-29. E-caderina é internalizada com o receptor EphA4 em células em processo de EMT induzida pela irradiação. (a) Imunofluorescência (por microscopia de super-resolução SIM) de células controle e progênie de células irradiadas (F1 5Gy) (b) Imunoprecipitação de EphA4 indicando associação as proteínas E-caderina e β -catenina. Fonte: Marcondes et al., 2016

Análises preliminares deste modelo revelam aumento de ANXA2 fosforilada em Y23 (em concordância com os resultados obtidos na indução de EMT via TGF- β) e

sua direta ligação a atividade do receptor EphA4, uma vez que o peptídeo antagonista (denominado KYL) impediu a maior expressão de pANXA2.

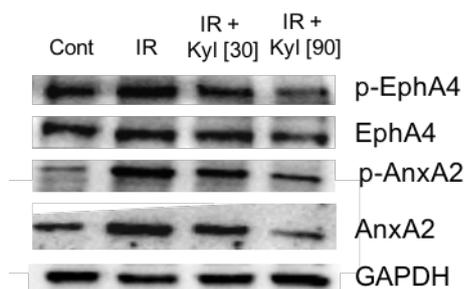


Figura 4-30. Immunoblotting de EphA4 e ANXA2 (formas totais e fosforiladas) no modelo de irradiação e com pré-tratamento do peptídeo antagonista do receptor EphA4.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos por meio da análise da expressão de ANXA2 no extrato protéico total de amostras de CCR corroboram com os achados de Yang e colaboradores em sua proposta de utilização da ANXA2 como ferramenta diagnóstica e prognóstica para CCR (Yang *et al.*, 2013). Desde estadios iniciais, há um aumento na expressão de ANXA2, favorecendo que esta possa ser considerada como marcador diagnóstico. Seu valor prognóstico com aumento gradativo ao longos da progressão tumoral no entanto, ainda não pode ser confirmado pelas limitações amostrais. O uso da técnica de imunohistoquímica para a análise de amostras parafinizadas permitiu uma maior compreensão do padrão de marcação da ANXA2 em tumores primários e secundários. Contudo, pudemos observar diferença significativa na expressão de ANXA2 somente no estadio IV (estadio avançado com presença de metástases) e no próprio tumor secundário. A queda na imuno marcação de E-caderina ao longo dos estadios é condizente com o modelo clássico de progressão tumoral por meio da transição epitélio mesenquimal. Houve, de fato, redução de E-caderina nos estadios mais avançados e níveis semelhantes aos do estadio I no tumor secundário (onde as células realizariam a transição mesenquima epitelial para a colonização de um sítio distante).

Apesar da maior marcação de ANXA2 nos tumores secundários, destaca-se os distintos padrões encontrados. Em pequenas regiões de metástase, a ANXA2 exibiu padrão semelhante a E-caderina: marcação predominante na membrana. Contudo, nas lâminas analisadas onde haviam grandes regiões metastáticas (facilmente

identificadas pela marcação epitelial de E-caderina), os limites do tumor secundário apresentaram intensa marcação para ANXA2 com baixa expressão ou ausência na região central. Wang e colaboradores em 2009, notaram que a inoculação subcutânea de células da linhagem A549 (adenocarcinoma de pulmão) geravam tumores com marcação periférica para a ANXA2 com ausência na região central. Esse padrão foi explicado pela marcação com Ki67 para células proliferativas na região positiva para a ANXA2 e a presença de marcadores de apoptose e necrose na região onde não havia marcação. Por ser uma proteína associada a interação entre as células e o estroma (Rucki et al., 2017), e a atividade de metaloproteínases (Zhang et al., 2013) a ANXA2 pode ter maior marcação nas células do limite do tumor secundário, justamente por exercer papel na interação das células epiteliais provenientes do cólon com as células do parênquima hepático.

Dentre as linhagens celulares, publicações abordaram o comportamento da Caco-2 frente a manipulações de sua expressão de ANXA2. Guzmán-Aránguez e colaboradores mostraram que a expressão de ANXA2 está de alguma forma associada a diferenciação celular. Células Caco-2 mantidas em monocamada para se diferenciarem exibem aumento de expressão de ANXA2. Já a indução de diferenciação por meio de butirato na linhagem HT-29 resulta em perda de expressão (Guzman-Aranguez et al., 2005). Também já foi mostrado que o silenciamento de ANXA2 causou o rearranjo do citoesqueleto (Xing et al., 2013), por via de sinalização relacionada a RhoA (Babbin et al., 2007). Com relação as linhagens HT-29 e HCT-116 poucos trabalhos investigaram o papel da ANXA2: associando-a a resistência a quimioterápicos (Suzuki e Tanigawara, 2014), a interação com catepsina B (Cavallo-Medved et al., 2003) e a progastina (Singh et al., 2007), mas não a sua relação com a progressão do CCR.

No presente estudo, a escolha da linhagem celular para a avaliação do papel na tumorigênese da ANXA2 partiu do nível basal de expressão da proteína. O baixo número de trabalhos investigando a funcionalidade da ANXA2 em HT-29 e a sua maior expressão protéica basal quando comparada as linhagens Caco-2 e HCT-116 foram as principais razões para sua escolha.

Por meio da avaliação de proliferação, migração, invasão e o desenvolvimento da transição epitélio mesênquima, mostrou-se que a ANXA2 exerce papel importante na progressão tumoral com ainda maior ênfase na cascata metastática. O ensaio de proliferação por cristal violeta confirmou a importância da ANXA2 para a proliferação em células HT-29, assim como um marcante efeito antiproliferativo do TGF-beta. Tal

papel para a ANXA2 já havia sido descrito em distintos tipos tumorais como linhagens de carcinoma de mama (Zhang et al., 2015, Chiang et al., 1999), glioblastoma (Maule et al., 2016), adenocarcinoma de pâncreas (Keklikoglou et al., 2015), carcinoma hepático (Wang et al., 2015^a), entre outros. Zhang e colaboradores observaram que a inibição da proliferação celular em linhagens celulares de câncer de mama estariam associadas a redução dos níveis de ciclina D1, via STAT3. Ocorreria um retardo na progressão do ciclo celular, em especial na transição entre as fases G1 e S (Zhang et al., 2015) Essa regulação de ciclina D1 também foi descrita em células de carcinoma hepático (Wang et al., 2015^a). Sabe-se também que a ANXA2 pode promover a expressão do fator de transcrição promotor de crescimento c-MYC através da ligação com o seu mRNA, dentre outros mecanismos (Hollas et al., 2006; Wu et al., 2012). Os efeitos inibitórios ao crescimento celular pelo TGF- β são bem descritos na literatura, podendo ocorrer de forma direta com a ativação de inibidores de quinases dependentes de ciclina (CDKN2B, codificando INK β ; e CDKN1A, codificando WAF1) e a repressão de fatores de transcrição promotores de crescimento como c-MYC, ID1, ID2 e ID3 (Siegel e Massague, 2003) ou indireta a partir da inibição da via de fatores promotores de crescimento como EGF e PDGF (Morikawa et al., 2016). Regulando a proliferação celular através de mecanismos complementares, poderia se esperar uma redução ainda maior quando o tratamento com TGF- β fosse associado ao silenciamento de ANXA2. Ao menos até o tempo de 48 horas não houve diferença entre o efeito inibitório do TGF- β e sua associação com o silenciamento de ANXA2.

Com relação a migração celular, a análise por meio do ensaio de Wound Healing sugeriu que TGF- β e ANXA2 teriam efeitos independentes. A ação do TGF- β sobre a migração celular está associada: ao remodelamento do citoesqueleto, por meio da ativação da GTPase Rho, ROCK, LIMK1 e finalmente a fosforilação da cofilina 1 (CFL1), proteína responsável por cortar filamentos de actina e que exerce papel importante na dinâmica do citoesqueleto (Ridley, 2011); ou a indução da EMT, levando a perda da polaridade celular e a aquisição de características mais mesenquimais favorecendo a motilidade celular (Kalluri e Weinberg, 2009). A ANXA2 agiria sobre a migração celular por vias muito similares. Babbini e colaboradores demonstraram que a ANXA2 pode se associar a Rho, direcioná-la a membranas e levar a sua ativação, modulando a dinâmica do citoesqueleto em processos como o espraiamento celular e a migração em ensaios como o *Wound Healing*. A transfecção de uma forma de RhoA constitutivamente ativa foi capaz de reverter a redução na migração celular causada pelo silenciamento de ANXA2 neste ensaio (Babbini et al., 2007). De Graauw

e colaboradores descreveram a mesma via (RHO-ROCK-LIMK1-CFL1) como a responsável pelo espraiamento celular após a fosforilação de ANXA2 por Src (de Graauw et al., 2008). Apesar das evidências indicando a regulação do citoesqueleto por ANXA2 através de Rho, existem indícios de que a ANXA2 poderia atuar sobre a motilidade celular através de via pANXA2-DOCK3-Rac1-WAVE; uma via Rac dependente. A ANXA2, uma vez fosforilada por Src na tirosina 23, levaria a ativação de DOCK3 e posterior ativação de Rac1. Rac1 então levaria a formação do complexo WAVE que atua sobre a formação de lamelipódios e promovendo a migração celular (Wang et al., 2015b, Cui et al., 2016). Outro mecanismo pelo qual a ANXA2 poderia influenciar na migração celular seria por meio da endocitose da integrina $\beta 1$. Esse processo é essencial para que a célula possa interagir com a matriz extracelular realizando um processo de desmontagem e montagem de adesões focais promovendo a migração. O silenciamento da ANXA2 impede este processo, “imobilizando” as células (Rankin et al., 2013). Nossos resultados mostram que a promoção da migração celular causada pelo TGF-beta, de forma independente a redução causada pelo silenciamento da ANXA2 sugere sua ação por vias distintas. Logo, é possível argumentar que a ativação da via RHO através de TGF- β não seja exclusivamente dependente da ação da ANXA2 em direcionar Rho para a ativação; e que a redução da migração pela ANXA2 possa ocorrer através da ação de Rac, ou pela redução na dinamicidade de formação de novas adesões focais. Cabe ressaltar também que o silenciamento por siRNA obtido neste trabalho não foi total (63% de silenciamento) deixando margem para a possibilidade de a ANXA2 remanescente ter sido suficiente para a ativação de Rho via ativação de TGF- β .

O silenciamento da ANXA2 neste estudo não foi capaz de reduzir a invasão de células HT-29 na ausência de tratamento com TGF- β . Contudo, o silenciamento de ANXA2 e a inibição de STAT3 foram capazes de impedir por completo o aumento de invasividade induzido pelo tratamento com este fator de crescimento. Dessa forma, infere-se que a EMT induzida pelo tratamento com TGF- β seria a principal responsável pelo ganho de invasividade nas células tratadas. A indução da EMT via TGF- β na linhagem HT-29 levou a um grande aumento da expressão de ANXA2 total e fosforilada após 24 e 48 horas; assim como uma maior presença de STAT3 fosforilada no núcleo de células HT-29 3 horas após o tratamento. Considerando que não houve aumento de invasividade nas células tratadas, especula-se que o ganho de expressão de ANXA2 não seja uma consequência somente da EMT, mas uma etapa necessária para o desenvolvimento da mesma. E, que a ação da ANXA2 ocorra via STAT3

considerando os recentes dados da literatura. Xiu e colaboradores descreveram, utilizando-se do silenciamento para STAT3 e ANXA2, a regulação por meio destas duas proteínas sobre a proliferação, migração e invasão em células Caco-2 (Xiu et al., 2016). Essa relação foi melhor explorada por Wang e colaboradores, que mostraram a necessidade da fosforilação de STAT3 por meio de interação direta com a Y23-pANXA2 para que ocorra a EMT induzida por EGF em células de câncer de mama (Wang et al., 2015c).

As imagens de imunofluorescência para a ANXA2 mostram que há uma maior marcação nas protrusões de membrana das células que estão “liderando” a transição na borda das ilhas de células. Essa reorganização pode ocorrer pelo fato de que além de atuar sobre a motilidade celular e a reorganização do citoesqueleto de actina, a ANXA2 favorece a invasão promovendo a degradação da matriz extracelular e da membrana basal. A ANXA2 em sua forma heterotetramérica interage com o fator tecidual ativador de plasminogênio (tPA) catalisando a conversão de plasminogênio em plasmina. A plasmina ativa levaria então a degradação da matriz extracelular, a ativação de metaloproteinases (MMPs) (Hajjar et al., 1994). Esse mecanismo ocorre quando a ANXA2 está presente na superfície celular, translocada após fosforilação de seu resíduo 23 de tirosina por Src. O aumento de expressão induzido por TGF- β e seguinte ativação de Src, provavelmente ocasionaram a translocação de uma fração da ANXA2 citoplasmática para o lado externo da membrana celular, onde dispararia a catálise da conversão de plasminogênio em plasmina. Decorrente destes eventos, estas células liderariam a degradação e posterior invasão da membrana basal pelas células tumorais.

A indução da EMT via TGF-beta, neste modelo experimental, resultou em alterações linhagem específicas para a expressão de ANXA2. Na linhagem HT-29, houve ganho de expressão a partir de 24 horas do tratamento com TGF- β . Uma possível explicação para esse aumento seria a regulação negativa exercida por TGF- β sobre o miR-206 (Winbanks et al., 2011). Este microRNA controla de maneira direta a expressão de proteínas K-Ras e ANXA2, agindo como supressor tumoral (Keklikoglou et al., 2015). Portanto, sua inibição via TGF- β permitiria um aumento significativo na expressão de ANXA2.

A linhagem HCT-116 não exibiu o mesmo expressivo aumento na expressão de ANXA2. Ao contrário, houve uma redução de sua expressão total e, em menor grau, da forma fosforilada. A manutenção de uma determinada quantidade de Y23-pANXA2 pode, no entanto, ter sido suficiente para a indução de um fenótipo

intermediário de EMT nestas células. Em um estudo com células de câncer pancreático, a utilização de ANXA2 mutada especificamente no resíduo 23 permitiu mostrar que a simples presença de ANXA2 não seria suficiente para o desenvolvimento de EMT. Seria necessária sua fosforilação para que a mesma ocorra, uma vez que a transfecção de células com ANXA2-Y23A (resíduo de tirosina trocado por alanina impossibilitando a fosforilação do mesmo) impediu mudanças no mRNA de E-caderina, vimentina e Slug frente ao tratamento com TGF- β (Zheng et al., 2011).

A análise por meio de immunoblotting da fosforilação de ANXA2 e Src frente ao tratamento com TGF- β em tempos mais curtos (15, 30, 60, 180 e 360 minutos) indicou dois picos de ativação de Src e de fosforilação e expressão de ANXA2 (aos 15 e 180 minutos). Essa dinâmica de aumento de fosforilação, posterior queda na quantidade de proteína total e retorno aos níveis normais ocorre de forma similar em células expostas a espécies reativas de oxigênio (ROS). O tratamento de células PC12 (pheocromocitoma de rato) com H₂O₂, induziu rápida fosforilação via Src de ANXA2 (15 minutos) no córtex celular e posterior exocitose (30-60 minutos) retornando aos níveis normais de ANXA2 após esse período (Grindheim et al., 2016). A similitude entre a resposta ao TGF- β neste estudo e as ROS no trabalho publicado por Grindheim e colaboradores fornece indícios do que pode estar acontecendo nos momentos iniciais de ativação das células HT-29 pelo TGF-beta. Os resultados do pré-tratamento com os inibidores PP2 e STA21 (para Src e STAT3, respectivamente) em associação ao TGF- β dão maior robustez a hipótese de que a via Src/ANXA2/STAT3 esteja regulando a EMT e o potencial invasivo destas células. Houve completa inibição de qualquer mudança morfológica induzida por TGF- β nas células tratados com PP2, ressaltando a importância da atividade de Src sobre este processo. Enquanto o pré-tratamento com PP2 resultou fenotípicamente em células semelhantes as controle, o pré-tratamento com STA21 impediu de forma mais sutil a dissociação das ilhas de células formadas e o alongamento celular.

Considerando as evidências *in vitro* e *ex vivo*, obtidas neste trabalho, partiu-se para a análise *in silico* em busca da confirmação dos achados celulares. Em dados de pacientes de adenocarcinoma de cólon e reto armazenados pelo TCGA, todos os estádios (I, II, III e IV) em comparação com pacientes controle apresentaram aumento de expressão do mRNA de ANXA2 e redução do mRNA de CDH1. Quando reclassificados dentro dos subtipos consenso para o CCR, os pacientes do subtipo 1 (MSI – imune), seguidos por subtipo 3 (metabólico) e subtipo 4 (mesenquimal) tiveram

aumento de ANXA2 em comparação com o controle. Este resultado inesperado (CMS1 com maior expressão de ANXA2 em comparação com CMS4) pode ser explicado em parte pelo papel da ANXA2 sugerido neste trabalho com a ativação de STAT3, uma vez que a via JAK/STAT é uma das características centrais de CMS1. Por serem dados obtidos do tecido como um todo, a maior expressão no subtipo 1 também pode ser reflexo da forte presença de infiltrado imune nestes tumores. Maji e colaboradores descreveram a ativação de STAT3 em macrófagos via ANXA2 em sítios de metástase (Maji et al., 2016). A maior expressão no subtipo metabólico (CMS3) pode também ser explicada pela co-regulação entre ANXA2 e K-Ras exercida pelo microRNA-206 (Keklikoglou et al., 2015) considerando a importância de K-Ras na caracterização do subtipo.

A expressão de marcadores epiteliais (E-caderina e claudina-3) sofreu pequena redução frente ao tratamento com TGF- β por 48 horas. Contudo, a análise das imagens de imunofluorescência para estes marcadores mostra que, acompanhando a alteração fenotípica das células de uma forma mais arredondada para mais alongada, há uma completa redistribuição dos mesmos em direção ao citoplasma. As evidências na literatura de que a ANXA2 participa no processo de montagem e desmontagem das junções aderentes, levaram a hipótese de que as alterações na expressão e localização da ANXA2 poderiam ser determinantes nesta dissolução dos complexos juncionais (característica da EMT) frente ao tratamento com TGF-beta. Utilizando o microscópio confocal, foi possível visualizar que E-caderina e ANXA2 colocalizavam nas junções intercelulares de células controle. Esta colocalização no entanto, não ficava clara em células tratadas com TGF-beta, dado o expressivo aumento na marcação de ANXA2 (colocalizando-se com a E-caderina apenas em alguns pontos no citoplasma).

Portanto, foi utilizado o microscópio de super resolução ELYRA para que por meio de Microscopia de Iluminação Estruturada (SIM) fosse possível analisar a marcação pontual citoplasmática de ambas as proteínas e determinar sua efetiva colocalização. A análise do perfil de intensidade de fluorescência das junções intercelulares nas células controle mostrou que há uma organização conjunta de ANXA2 e E-caderina em regiões específicas da membrana. Esse padrão pode ser explicado pela capacidade da ANXA2 de organizar *rafts* lipídicos de membrana, estabelecendo uma ponte entre proteínas como a E-caderina e os filamentos de actina que se ligariam a própria ANXA2 (Hayes et al., 2006). Já nas células tratadas com TGF-beta, a marcação para E-caderina foi predominantemente pontual por todo o

citoplasma com a presença de somente uma junção residual. A ANXA2 seguiu o mesmo padrão de marcação com pontos justapostos ou colocalizados ao longo do citoplasma. Esse padrão indica que ocorre a internalização da E-caderina e que esse processo de endocitose pode ser regulado pela ANXA2.

Dado o importante papel da polaridade celular no estabelecimento dos complexos juncionais e no processo de EMT, investigamos a indução da EMT em cultura tridimensional e o padrão de marcação de E-caderina e ANXA2. De acordo com o esperado, houve notável diferença entre os esferóides controle e os tratados com TGF- β . As células controle formaram esferóides com morfologia mais circular e notada polaridade. As células tratadas com TGF- β , no entanto, não tiveram polaridade definida e invadiram a matriz de MATRIGEL. A imunofluorescência para ambos os marcadores (E-caderina e ANXA2) confirmou os achados em cultura em monocamada ao evidenciar colocalização nas junções das células controle. Essa interação já foi recentemente descrita também em células endoteliais (Luo et al., 2017). Nas células tratadas, colocalização em regiões próximas as extremidades celulares. Essa colocalização pode sugerir um papel da ANXA2 na endocitose da E-caderina da membrana celular uma vez disparado o programa de EMT. O papel da ANXA2 na formação de endossomos e seu direcionamento para reciclagem ou degradação tem sido explicado pela interação da proteína com os filamentos de actina e a capacidade de fissão das membranas vesiculares (Delevoe et al., 2016).

Para avaliar essa associação, transfectamos a linhagem celular Caco-2 (com menor expressão de ANXA2 dentre as três linhagens analisadas) com plasmídeos para a expressão de ANXA2 (com ou sem mutação na tirosina 23) conjugada a proteína GFP. As células transfectadas com o plasmídeo com a forma selvagem (WT-ANXA2-GFP) da ANXA2 e a forma fosfo mímica (Y23E-ANXA2-GFP) exibiram colocalização entre ANXA2 e E-caderina, fato que não foi observado nas células com o constructo fosfo inibitório (Y23F-ANXA2-GFP). A marcação para E-caderina também se mostra pontilhada e menos continua nas células Y23F-ANXA2-GFP, indício de problemas na estruturação das junções aderentes. Estes resultados corroboram a hipótese de que a ANXA2 e sua fosforilação seriam responsáveis pela reciclagem e manutenção da E-caderina no complexo juncional apical. Morel e colaboradores descreveram utilizando de semelhante desenho experimental (constructos para ANXA2 com mutação sítio específica) que a fosforilação na tirosina 23 seria fundamental para adesão aos endossomos e o transporte entre endossomo inicial e tardio (Morel e Gruenberg 2009). Acreditamos que este mecanismo ocorra de

maneira fisiológica e que, uma vez que o TGF- β leva ao aumento da expressão e fosforilação de ANXA2, o mesmo estaria exacerbado levando a remoção da E-caderina dos contatos e consequente desmontagem do complexo juncional apical característico da EMT.

Na figura (última), descrevemos de forma concisa os achados deste trabalho e as possíveis vias influenciadas. O tratamento com TGF- β nas células de linhagem HT-29 leva a redução da proliferação; e por meio do aumento de expressão de ANXA2 e de sua fosforilação por Src, leva a dissolução dos complexos juncionais apicais com a internalização da E-caderina, e altera o potencial migratório e o potencial invasivo por meio de transição epitélio-mesenquima via Src/ANXA2/STAT3.

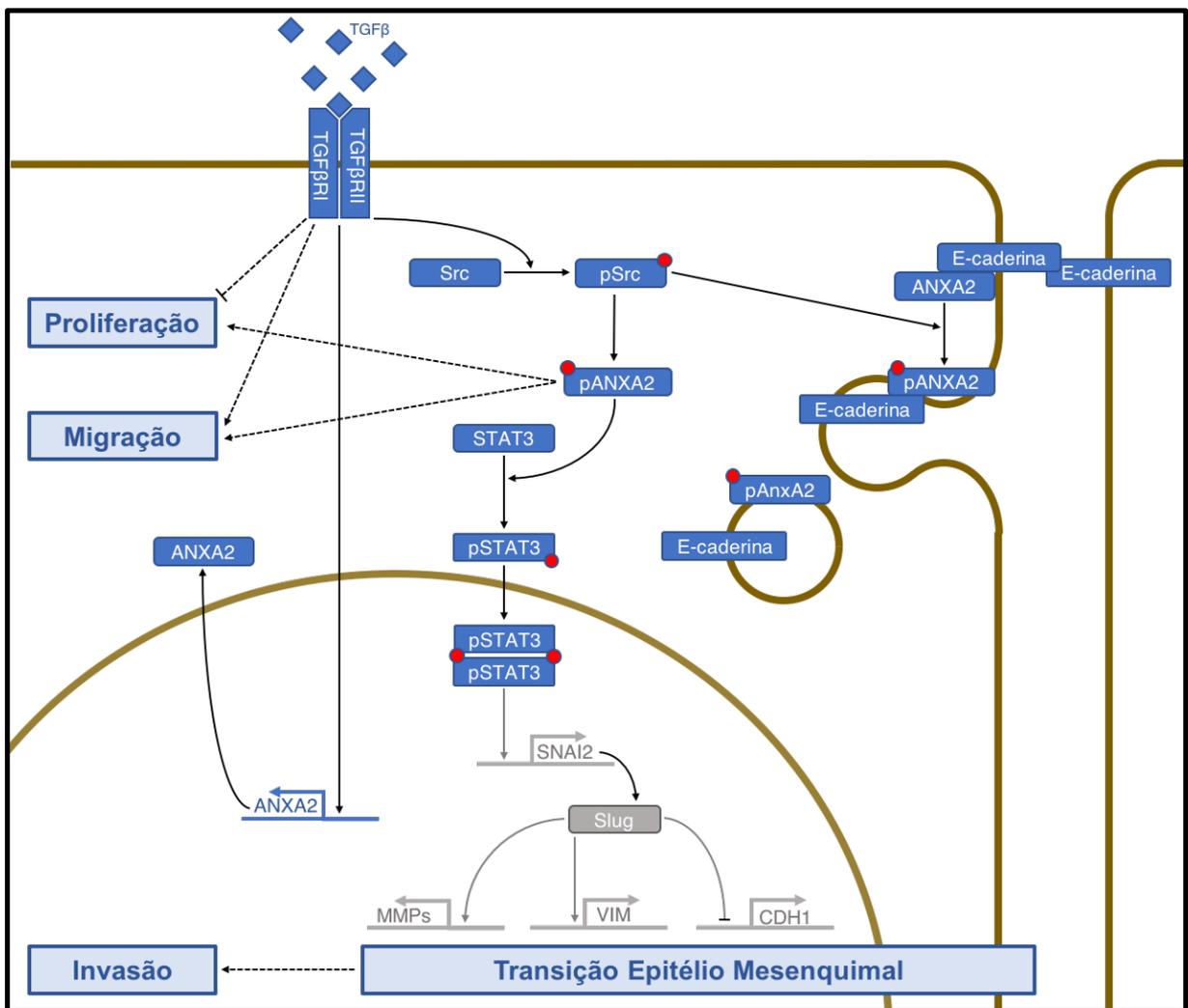


Figura 5-1. Esquema representativo do papel exercido pela ANXA2 frente ao tratamento com TGF- β neste modelo experimental. A ativação celular pelo TGF- β leva a fosforilação de ANXA2 por Src. Esta, uma vez fosforilada, regula a internalização de E-caderina e a fosforilação de STAT3. Uma vez translocada ao núcleo, STAT3 pode estar levando a EMT via aumento de expressão de Slug, promovendo a transcrição de MMPs, vimentina e a repressão de CDH1.

6. Conclusões e Perspectivas

A partir dos resultados obtidos nesta tese, e artigos da literatura podemos concluir que a ANXA2 é uma proteína envolvida com distintos processos fisiológicos, mas que uma vez superexpressa desencadeia mudanças como a desregulação dos complexos juncionais (participando da retirada da E-caderina das membranas) e vias de indução da EMT como Src/ANXA2/STAT3. Dados de análise *in silico* e *ex vivo* (IHC) indicam a ANXA2 como possível marcador prognóstico, uma vez que está relacionada aos estádios mais avançados e aos subtipos de pior prognóstico. O seu papel exato na indução da EMT e características consequentes deste fenótipo, como a quimio e a radioresistência serão melhor exploradas por nosso grupo como sequência a este trabalho.

Os resultados preliminares já obtidos no modelo de irradiação, onde ocorrem o aumento de expressão e fosforilação da ANXA2 e a internalização de E-caderina sugerem que o mecanismo de ação da mesma esteja mais relacionada com a indução da EMT *em si*, do que com uma via exclusiva de TGF- β . Cui, Liu, Rescher e seus colaboradores já mostraram evidências de ações semelhantes da ANXA2 após ativação por EGF, Wnt/ β -catenina e insulina respectivamente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACLOQUE, H. et al. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. **J Clin Invest**, v. 119, n. 6, p. 1438-49, Jun 2009. ISSN 1558-8238

ALFONSO, P. et al. Proteome analysis of membrane fractions in colorectal carcinomas by using 2D-DIGE saturation labeling. **J Proteome Res**, v. 7, n. 10, p. 4247-55, Oct 2008. ISSN 1535-3893

ARENDS, M. J. Pathways of colorectal carcinogenesis. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v. 21, n. 2, p. 97-102, Mar 2013. ISSN 1533-4058

BAKIN, A. V. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. **J Biol Chem**, v. 275, n. 47, p. 36803-10, Nov 24 2000. ISSN 0021-9258

BASTIAN, B. C. Annexins in cancer and autoimmune diseases. **Cell Mol Life Sci**, v. 53, n. 6, p. 554-6, Jun 1997. ISSN 1420-682X

BHOWMICK, N. A. et al. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. **Mol Biol Cell**, v. 12, n. 1, p. 27-36, Jan 2001. ISSN 1059-1524

BRAY, F. et al. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. **Lancet Oncol**, v. 13, n. 8, p. 790-801, Aug 2012. ISSN 1474-5488

BROWNSTEIN, C. et al. Annexin II mediates plasminogen-dependent matrix invasion by human monocytes: enhanced expression by macrophages. **Blood**, v. 103, n. 1, p. 317-24, Jan 1 2004. ISSN 0006-4971

CAO, X.; SURMA, M. A.; SIMONS, K. Polarized sorting and trafficking in epithelial cells. **Cell Res**, v. 22, n. 5, p. 793-805, May 2012. ISSN 1748-7838

CAPALDO, C. T.; FARKAS, A. E.; NUSRAT, A. Epithelial adhesive junctions. **F1000Prime Rep**, v. 6, p. 1, 2014. ISSN 2051-7599

CAVALLO-MEDVED, D. et al. Mutant K-ras regulates cathepsin B localization on the surface of human colorectal carcinoma cells. **Neoplasia**, v. 5, n. 6, p. 507-19, Nov-Dec 2003. ISSN 1522-8002

CHEN, Y. T.; STEWART, D. B.; NELSON, W. J. Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells. **J Cell Biol**, v. 144, n. 4, p. 687-99, Feb 22 1999. ISSN 0021-9525

CHICHILI, G. R.; RODGERS, W. Clustering of membrane raft proteins by the actin cytoskeleton. **J Biol Chem**, v. 282, n. 50, p. 36682-91, Dec 14 2007. ISSN 0021-9258

DAS, S. et al. Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) is a novel interactor of annexin A2 in prostate cancer cells. **Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 2216-26, Mar 16 2010. ISSN 1520-4995

DASSAH, M. et al. The endothelial cell annexin A2 system and vascular fibrinolysis. **Gen Physiol Biophys**, v. 28 Spec No Focus, p. F20-8, 2009. ISSN 0231-5882 (

DE GRAAUW, M. et al. Annexin A2 depletion delays EGFR endocytic trafficking via cofilin activation and enhances EGFR signaling and metastasis formation. **Oncogene**, v. 33, n. 20, p. 2610-9, May 15 2014. ISSN 1476-5594

DEORA, A. B. et al. An annexin 2 phosphorylation switch mediates p11-dependent translocation of annexin 2 to the cell surface. **J Biol Chem**, v. 279, n. 42, p. 43411-8, Oct 15 2004. ISSN 0021-9258

DERYNCK, R.; ZHANG, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. **Nature**, v. 425, n. 6958, p. 577-84, Oct 9 2003. ISSN 1476-4687

DIEPENBRUCK, M.; CHRISTOFORI, G. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe? **Curr Opin Cell Biol**, v. 43, p. 7-13, Jun 29 2016. ISSN 1879-0410

DRUCKER, P. et al. Lipid segregation and membrane budding induced by the peripheral membrane binding protein annexin A2. **J Biol Chem**, v. 288, n. 34, p. 24764-76, Aug 23 2013. ISSN 1083-351X

DUNCAN, R. et al. Characterisation and protein expression profiling of annexins in colorectal cancer. **Br J Cancer**, v. 98, n. 2, p. 426-33, Jan 29 2008. ISSN 0007-0920

EMOTO, K. et al. Annexin II overexpression is correlated with poor prognosis in human gastric carcinoma. **Anticancer Res**, v. 21, n. 2B, p. 1339-45, Mar-Apr 2001. ISSN 0250-7005

Annexin II overexpression correlates with stromal tenascin-C overexpression: a prognostic marker in colorectal carcinoma. **Cancer**, v. 92, n. 6, p. 1419-26, Sep 15 2001. ISSN 0008-543X

ESPOSITO, I. et al. Tenascin C and annexin II expression in the process of pancreatic carcinogenesis. **J Pathol**, v. 208, n. 5, p. 673-85, Apr 2006. ISSN 0022-3417

FEARON, E. R. Molecular genetics of colorectal cancer. **Annu Rev Pathol**, v. 6, p. 479-507, 2011. ISSN 1553-4014

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, Mar 1 2015. ISSN 1097-0215

FILIPENKO, N. R.; WAISMAN, D. M. The C terminus of annexin II mediates binding to F-actin. **J Biol Chem**, v. 276, n. 7, p. 5310-5, Feb 16 2001. ISSN 0021-9258

FODDE, R.; BRABLETZ, T. Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. **Curr Opin Cell Biol**, v. 19, n. 2, p. 150-8, Apr 2007. ISSN 0955-0674

GENETOS, D. C. et al. Hypoxia increases Annexin A2 expression in osteoblastic cells via VEGF and ERK. **Bone**, v. 47, n. 6, p. 1013-9, Dec 2010. ISSN 1873-2763

GERKE, V.; CREUTZ, C. E.; MOSS, S. E. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 6, p. 449-61, Jun 2005. ISSN 1471-0072

GERKE, V.; MOSS, S. E. Annexins: from structure to function. **Physiol Rev**, v. 82, n. 2, p. 331-71, Apr 2002. ISSN 0031-9333

GIEPMANS, B. N.; VAN IJZENDOORN, S. C. Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. **Biochim Biophys Acta**, v. 1788, n. 4, p. 820-31, Apr 2009. ISSN 0006-3002

GILLETTE, J. M.; CHAN, D. C.; NIELSEN-PREISS, S. M. Annexin 2 expression is reduced in human osteosarcoma metastases. **J Cell Biochem**, v. 92, n. 4, p. 820-32, Jul 1 2004. ISSN 0730-2312

GOKHALE, N. A. et al. Phosphoinositide specificity of and mechanism of lipid domain formation by annexin A2-p11 heterotetramer. **J Biol Chem**, v. 280, n. 52, p. 42831-40, Dec 30 2005. ISSN 0021-9258

GRINDHEIM, A. K. et al. Reactive oxygen species exert opposite effects on Tyr23 phosphorylation of the nuclear and cortical pools of annexin A2. **J Cell Sci**, v. 129, n. 2, p. 314-28, Jan 15 2016. ISSN 1477-9137

HALL, A.; NOBES, C. D. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 355, n. 1399, p. 965-70, Jul 29 2000. ISSN 0962-8436

HANSEN, M. D.; EHRLICH, J. S.; NELSON, W. J. Molecular mechanism for orienting membrane and actin dynamics to nascent cell-cell contacts in epithelial cells. **J Biol Chem**, v. 277, n. 47, p. 45371-6, Nov 22 2002. ISSN 0021-9258

HAYES, M. J.; MOSS, S. E. Annexin 2 has a dual role as regulator and effector of v-Src in cell transformation. **J Biol Chem**, v. 284, n. 15, p. 10202-10, Apr 10 2009. ISSN 0021-9258

HAYES, M. J. et al. Annexin-actin interactions. **Traffic**, v. 5, n. 8, p. 571-6, Aug 2004. ISSN 1398-9219

__Regulation of actin dynamics by annexin 2. **EMBO J**, v. 25, n. 9, p. 1816-26, May 3 2006. ISSN 0261-4189

HITCHCOCK, J. K.; KATZ, A. A.; SCHAFER, G. Dynamic reciprocity: the role of annexin A2 in tissue integrity. **J Cell Commun Signal**, v. 8, n. 2, p. 125-33, Jun 2014. ISSN 1873-9601

HOLLAS, H. et al. Annexin A2 recognises a specific region in the 3'-UTR of its cognate messenger RNA. **Biochim Biophys Acta**, v. 1763, n. 11, p. 1325-34, Nov 2006. ISSN 0006-3002

JASPERSON, K. W. et al. Hereditary and familial colon cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2044-58, Jun 2010. ISSN 1528-0012

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 61, n. 2, p. 69-90, Mar-Apr 2011. ISSN 1542-4863

. Cancer statistics, 2008. **CA Cancer J Clin**, v. 58, n. 2, p. 71-96, Mar-Apr 2008. ISSN 0007-9235 (

JUNG, Y. et al. Annexin II expressed by osteoblasts and endothelial cells regulates stem cell adhesion, homing, and engraftment following transplantation. **Blood**, v. 110, n. 1, p. 82-90, Jul 1 2007. ISSN 0006-4971

KANG, J. S. et al. Dysregulation of annexin I protein expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. **Clin Cancer Res**, v. 8, n. 1, p. 117-23, Jan 2002. ISSN 1078-0432

KANG, J. S.; LIU, C.; DERYNCK, R. New regulatory mechanisms of TGF- β receptor function. **Trends Cell Biol**, v. 19, n. 8, p. 385-94, Aug 2009. ISSN 1879-3088

KLAUS, A.; BIRCHMEIER, W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 5, p. 387-98, May 2008. ISSN 1474-1768

LAMOUILLE, S. et al. TGF-beta-induced activation of mTOR complex 2 drives epithelial-mesenchymal transition and cell invasion. **J Cell Sci**, v. 125, n. Pt 5, p. 1259-73, Mar 1 2012. ISSN 1477-9137

LAMOUILLE, S.; DERYNCK, R. Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. **J Cell Biol**, v. 178, n. 3, p. 437-51, Jul 30 2007. ISSN 0021-9525

LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 3, p. 178-96, Mar 2014. ISSN 1471-0080

LEE, D. B. et al. Annexin A2 heterotetramer: role in tight junction assembly. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 287, n. 3, p. F481-91, Sep 2004. ISSN 1931-857X

- LOKMAN, N. A. et al. The role of annexin A2 in tumorigenesis and cancer progression. **Cancer Microenviron**, v. 4, n. 2, p. 199-208, Aug 2011. ISSN 1875-2284
- MADUREIRA, P. A. et al. Genotoxic agents promote the nuclear accumulation of annexin A2: role of annexin A2 in mitigating DNA damage. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e50591, 2012. ISSN 1932-6203
- MASAKI, T. et al. Involvement of annexin I and annexin II in hepatocyte proliferation: can annexins I and II be markers for proliferative hepatocytes? **Hepatology**, v. 20, n. 2, p. 425-35, Aug 1994. ISSN 0270-9139
- MASSAGUE, J.; OBENAU, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 298-306, Jan 21 2016. ISSN 1476-4687
- MERRIFIELD, C. J. et al. Annexin 2 has an essential role in actin-based macropinocytic rocketing. **Curr Biol**, v. 11, n. 14, p. 1136-41, Jul 24 2001. ISSN 0960-9822
- MICKLEBURGH, I. et al. Annexin A2 binds to the localization signal in the 3' untranslated region of c-myc mRNA. **FEBS J**, v. 272, n. 2, p. 413-21, Jan 2005. ISSN 1742-464X
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, I. N. D. C. J. A. G. D. S. **Estimativa 2014**. Rio de Janeiro 2013.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estimativa 2016**. SILVA, I. N. D. C. J. A. G. D. Rio de Janeiro 2016.
- MOREL, E.; GRUENBERG, J. Annexin A2 binding to endosomes and functions in endosomal transport are regulated by tyrosine 23 phosphorylation. **J Biol Chem**, v. 284, n. 3, p. 1604-11, Jan 16 2009. ISSN 0021-9258
- MOREL, E.; PARTON, R. G.; GRUENBERG, J. Annexin A2-dependent polymerization of actin mediates endosome biogenesis. **Dev Cell**, v. 16, n. 3, p. 445-57, Mar 2009. ISSN 1878-1551
- MOUSTAKAS, A.; HELDIN, C. H. Non-Smad TGF- β signals. **J Cell Sci**, v. 118, n. Pt 16, p. 3573-84, Aug 15 2005. ISSN 0021-9533
- MYRVANG, H. K. et al. Protein interactions between surface annexin A2 and S100A10 mediate adhesion of breast cancer cells to microvascular endothelial cells. **FEBS Lett**, v. 587, n. 19, p. 3210-5, Oct 1 2013. ISSN 1873-3468
- NELSON, W. J.; DICKINSON, D. J.; WEIS, W. I. Roles of cadherins and catenins in cell-cell adhesion and epithelial cell polarity. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 116, p. 3-23, 2013. ISSN 1878-0814
- NIESSEN, C. M.; GOTTARDI, C. J. Molecular components of the adherens junction. **Biochim Biophys Acta**, v. 1778, n. 3, p. 562-71, Mar 2008. ISSN 0006-3002

NIETO, M. A. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. **Science**, v. 342, n. 6159, p. 1234850, Nov 8 2013. ISSN 1095-9203

NIETO, M. A.; CANO, A. The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. **Semin Cancer Biol**, v. 22, n. 5-6, p. 361-8, Oct 2012. ISSN 1096-3650

NIETO, M. A. et al. Emt: 2016. **Cell**, v. 166, n. 1, p. 21-45, Jun 30 2016. ISSN 1097-4172

OKAMOTO, R. et al. Recruitment of E-cadherin associated with alpha- and beta-catenins and p120ctn to the nectin-based cell-cell adhesion sites by the action of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in MDCK cells. **Genes Cells**, v. 10, n. 5, p. 435-45, May 2005. ISSN 1356-9597

OZDAMAR, B. et al. Regulation of the polarity protein Par6 by TGF β receptors controls epithelial cell plasticity. **Science**, v. 307, n. 5715, p. 1603-9, Mar 11 2005. ISSN 1095-9203

PEINADO, H.; OLMEDA, D.; CANO, A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 6, p. 415-28, Jun 2007. ISSN 1474-175X

QUIROS, M.; NUSRAT, A. RhoGTPases, actomyosin signaling and regulation of the epithelial Apical Junctional Complex. **Semin Cell Dev Biol**, v. 36, p. 194-203, Dec 2014. ISSN 1096-3634

RANKIN, C. R. et al. Annexin A2 regulates beta1 integrin internalization and intestinal epithelial cell migration. **J Biol Chem**, v. 288, n. 21, p. 15229-39, May 24 2013. ISSN 1083-351X

REEVES, S. A. et al. Developmental regulation of annexin II (Lipocortin 2) in human brain and expression in high grade glioma. **Cancer Res**, v. 52, n. 24, p. 6871-6, Dec 15 1992. ISSN 0008-5472

RESCHER, U. et al. Tyrosine phosphorylation of annexin A2 regulates Rho-mediated actin rearrangement and cell adhesion. **J Cell Sci**, v. 121, n. Pt 13, p. 2177-85, Jul 1 2008. ISSN 0021-9533

Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes. **J Cell Sci**, v. 117, n. Pt 16, p. 3473-80, Jul 15 2004. ISSN 0021-9533

RIDLEY, A. J. Life at the leading edge. **Cell**, v. 145, n. 7, p. 1012-22, Jun 24 2011. ISSN 1097-4172

RODA, O. et al. New insights into the tPA-annexin A2 interaction. Is annexin A2 CYS8 the sole requirement for this association? **J Biol Chem**, v. 278, n. 8, p. 5702-9, Feb 21 2003. ISSN 0021-9258

SANTIBANEZ, J. F. JNK mediates TGF-beta1-induced epithelial mesenchymal transdifferentiation of mouse transformed keratinocytes. **FEBS Lett**, v. 580, n. 22, p. 5385-91, Oct 2 2006. ISSN 0014-5793

SCITA, G.; DI FIORE, P. P. The endocytic matrix. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 464-73, Jan 28 2010. ISSN 1476-4687

SHARMA, M. R. et al. Angiogenesis-associated protein annexin II in breast cancer: selective expression in invasive breast cancer and contribution to tumor invasion and progression. **Exp Mol Pathol**, v. 81, n. 2, p. 146-56, Oct 2006. ISSN 0014-4800

SHEN, X. et al. The activity of guanine exchange factor NET1 is essential for transforming growth factor-beta-mediated stress fiber formation. **J Biol Chem**, v. 276, n. 18, p. 15362-8, May 4 2001. ISSN 0021-9258

SHIOZAWA, Y. et al. Annexin II/annexin II receptor axis regulates adhesion, migration, homing, and growth of prostate cancer. **J Cell Biochem**, v. 105, n. 2, p. 370-80, Oct 1 2008. ISSN 1097-4644

SIMONS, K.; SAMPAIO, J. L. Membrane organization and lipid rafts. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 10, p. a004697, Oct 2011. ISSN 1943-0264

SYED, S. P. et al. Angiostatin receptor annexin II in vascular tumors including angiosarcoma. **Hum Pathol**, v. 38, n. 3, p. 508-13, Mar 2007. ISSN 0046-8177

TARIN, D.; THOMPSON, E. W.; NEWGREEN, D. F. The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. **Cancer Res**, v. 65, n. 14, p. 5996-6000; discussion 6000-1, Jul 15 2005. ISSN 0008-5472

TAVARES, A. L. et al. TGF beta-mediated RhoA expression is necessary for epithelial-mesenchymal transition in the embryonic chick heart. **Dev Dyn**, v. 235, n. 6, p. 1589-98, Jun 2006. ISSN 1058-8388

THIERY, J. P. et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 871-90, Nov 25 2009. ISSN 1097-4172

THIERY, J. P.; SLEEMAN, J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, n. 2, p. 131-42, Feb 2006. ISSN 1471-0072

TORRE, L. A. et al. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 25, n. 1, p. 16-27, Jan 2016. ISSN 1538-7755

TRESSLER, R. J. et al. Extracellular annexin II is associated with divalent cation-dependent tumor cell-endothelial cell adhesion of metastatic RAW117 large-cell lymphoma cells. **J Cell Biochem**, v. 53, n. 3, p. 265-76, Nov 1993. ISSN 0730-2312

TSAPARA, A. et al. The RhoA activator GEF-H1/Lfc is a transforming growth factor- β target gene and effector that regulates alpha-smooth muscle actin expression and cell migration. **Mol Biol Cell**, v. 21, n. 6, p. 860-70, Mar 15 2010. ISSN 1939-4586

VALAPALA, M.; VISHWANATHA, J. K. Lipid raft endocytosis and exosomal transport facilitate extracellular trafficking of annexin A2. **J Biol Chem**, v. 286, n. 35, p. 30911-25, Sep 2 2011. ISSN 1083-351X

VARDOULI, L.; MOUSTAKAS, A.; STOURNARAS, C. LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta. **J Biol Chem**, v. 280, n. 12, p. 11448-57, Mar 25 2005. ISSN 0021-9258

WANG, P. et al. Physical and functional interactions of SNAP-23 with annexin A2. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 37, n. 4, p. 467-76, Oct 2007. ISSN 1044-1549

WANG, T. et al. ANXA2 binds to STAT3 and promotes epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 31, p. 30975-92, Oct 13 2015. ISSN 1949-2553

WANG, Y. Q. et al. Tyrosine 23 Phosphorylation of Annexin A2 Promotes Proliferation, Invasion, and Stat3 Phosphorylation in the Nucleus of Human Breast Cancer SK-BR-3 Cells. **Cancer Biol Med**, v. 9, n. 4, p. 248-53, Dec 2012. ISSN 2095-3941

WICKI, A.; HERRMANN, R.; CHRISTOFORI, G. Kras in metastatic colorectal cancer. **Swiss Med Wkly**, v. 140, p. w13112, 2010. ISSN 1424-3997

WU, B. et al. Up-regulation of ANXA2 gene promotes proliferation and invasion of breast cancer MCF-7 cells. **Cell Prolif**, v. 45, n. 3, p. 189-98, Jun 2012. ISSN 1365-2184

XIU, D. et al. Annexin A2 Coordinates STAT3 to Regulate the Invasion and Migration of Colorectal Cancer Cells In Vitro. **Gastroenterol Res Pract**, v. 2016, p. 3521453, 2016. ISSN 1687-6121

YAMADA, A. et al. Requirement of nectin, but not cadherin, for formation of claudin-based tight junctions in annexin II-knockdown MDCK cells. **Oncogene**, v. 25, n. 37, p. 5085-102, Aug 24 2006. ISSN 0950-9232

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**, v. 280, n. 7, p. 6016-27, Feb 18 2005. ISSN 0021-9258

YANG, T. et al. Prognostic and diagnostic significance of annexin A2 in colorectal cancer. **Colorectal Dis**, v. 15, n. 7, p. e373-81, Jul 2013. ISSN 1463-1318

ZHANG, J. et al. Silencing of the annexin II gene down-regulates the levels of S100A10, c-Myc, and plasmin and inhibits breast cancer cell proliferation and invasion. **Saudi Med J**, v. 31, n. 4, p. 374-81, Apr 2010. ISSN 0379-5284

ZHAO, P. et al. Annexin II promotes invasion and migration of human hepatocellular carcinoma cells in vitro via its interaction with HAb18G/CD147. **Cancer Sci**, v. 101, n. 2, p. 387-95, Feb 2010. ISSN 1349-7006

ZHENG, L. et al. Tyrosine 23 phosphorylation-dependent cell-surface localization of annexin A2 is required for invasion and metastases of pancreatic cancer. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e19390, 2011. ISSN 1932-6203

ZHONG, L. P. et al. Increased expression of Annexin A2 in oral squamous cell carcinoma. **Arch Oral Biol**, v. 54, n. 1, p. 17-25, Jan 2009. ISSN 1879-1506

ZHOU, B. P. et al. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. **Nat Cell Biol**, v. 6, n. 10, p. 931-40, Oct 2004. ISSN 1465-7392

ZIMMERMANN, U. et al. Expression of annexin II in conventional renal cell carcinoma is correlated with Fuhrman grade and clinical outcome. **Virchows Arch**, v. 445, n. 4, p. 368-74, Oct 2004. ISSN 0945-6317