

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

CASSIO DEJAIR FLEMING DE MORAES

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE A SINALIZAÇÃO DOS FATORES DE
CRESCIMENTO E DA VIA WNT/ β -CATENINA NA PROGRESSÃO DO CÂNCER
COLORRETAL

Rio de Janeiro

2016

CASSIO DEJAIR FLEMING DE MORAES

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE A SINALIZAÇÃO DOS FATORES DE
CRESCIMENTO E DA VIA WNT/ β -CATENINA NA PROGRESSÃO DO CÂNCER
COLORRETAL

Monografia apresentada ao Instituto Biomédico da Universidade
Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para a obtenção
de grau de Bacharel em Biomedicina

ORIENTADOR: Wallace Martins de Araújo

COORIENTADORA: Cristiane Barbosa Rocha

Rio de Janeiro

2016

CASSIO DEJAIR FLEMING DE MORAES

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE A SINALIZAÇÃO DOS FATORES DE
CRESCIMENTO E DA VIA WNT/ β -CATENINA NA PROGRESSÃO DO CÂNCER
COLORRETAL

Monografia apresentada ao Instituto Biomédico da Universidade
Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para a obtenção
de grau de Bacharel em Biomedicina

Aprovada em _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Ricardo Felipe Alves Moreira – UNIRIO

MSc – Bruna dos Santos Mendonça - INCa

Prof.^a. Cristiane Barbosa Rocha – UNIRIO (Coorientadora)

*“Se consegui enxergar longe é porque procurei olhar
acima dos ombros dos gigantes”*

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

E chega ao fim uma etapa de minha vida. Uma jornada pela qual não passei sozinho. Que, se não fosse pelas pessoas ao meu lado, nada teria sentido. Amigos, família, até pessoas que pareciam não ter nenhum significado. Todas influenciaram de alguma maneira nessa jornada. E iniciar-se-á uma outra etapa de minha vida. Algumas pessoas ainda estarão presente, outras, poucas se importarão. O que importa mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante.

Agradeço a toda minha família. Agradeço a meu pai que me ensinou sobre a vida. Se sou o que sou, foi por causa dele. Além de pai, é um amigo e uma mãe. À minha madrinha pelos conselhos e sempre disposta nas horas que mais precisava. À minha irmã que, apesar de mais nova, foi indispensável para conseguir passar por essa fase de minha vida, sempre sorridente e animadora.

Agradeço aos membros do laboratório de Biologia Estrutural. Primeiramente a Dr. Jose Morgado por ter aberto as portas de seu laboratório, dando-me a oportunidade de crescer na pesquisa. A todos os colegas do grupo: Andréa, Jennifer, Letícia, Jessica, Nathalia, Wal, Pedro, Júlio, Amélia, Érika, Annie, Renata, Michele, Thayssa, Murilo e Perony que me acolheram super bem e compartilharam de momentos memoráveis dentro e fora do laboratório. E por último, gostaria de agradecer ao meu orientador Wallace, que me ensinou tudo que sei da área hoje. Agradeço pela paciência e disposição para ensinar e esclarecer dúvidas de forma simples e didática.

Agradeço a todos os professores da UNIRIO pela dedicação ao ensino e fazer parte de minha formação.

E aos amigos que criei durante a UNIRIO. Principalmente ao grupo inseparável que viveu comigo experiências que nunca esquecerei: Gaybe e Andressa.

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é um problema de saúde pública no mundo inteiro. Esse câncer resulta de mutações em oncogenes e genes supressores tumorais, culminando na desregulação de diferentes vias responsáveis por eventos como diferenciação, proliferação, migração e sobrevivência. Nesse contexto, a via Wnt/ β -catenina está cronicamente ativa contribuindo para aquisição de um fenótipo maligno. Essa via de sinalização inviabiliza a formação do complexo destrutivo de β -catenina, favorecendo o acúmulo dessa proteína no citoplasma e o seu consequente deslocamento ao núcleo celular, onde ativa genes alvos do Tcf/Lef. Além disso, fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1) e o fator de crescimento epidermal (EGF) têm um papel proeminente no desenvolvimento do câncer. A ligação do IGF e EGF pode ativar vias intrínsecas de cascatas de sinalização tais como MAPK e PI3K. Nesta perspectiva, pretendemos avaliar se há uma interação da sinalização dos fatores de crescimento com a via Wnt/ β -catenina que pode levar a uma malignidade na progressão do câncer colorretal. Para isso, as células de CCR (HCT-116 e HT-29) foram cultivadas e tratadas com IGF-1, EGF e Wnt-3a. O tratamento com Wnt-3a induziu ativação de Tcf/Lef, porém não foi capaz de induzir estimular a migração nem a proliferação. Esses efeitos acontecem somente com a presença dos fatores de crescimento. Os tratamentos com os fatores de crescimento IGF-1 e EGF induziram aumento da proliferação celular em ambas as linhagens. A expressão de E-caderina foi reduzida com o tratamento com EGF. Isso indica que há uma interação entre a sinalização de fatores de crescimento e a via Wnt/ β -catenina contribuindo para a progressão do câncer colorretal contribuindo para a melhor compreensão deste tipo de câncer.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is a public health problem worldwide. It results from mutations in oncogenes and tumor suppressor genes, which leads to the deregulation of different pathways responsible for events such as differentiation, proliferation, migration and survivor. In this context, the Wnt/ β -catenin pathway is chronically active in CRC preventing the formation of the β -catenin destruction complex resulting in the accumulation of cytoplasmic β -catenin and consequently translocation to the nucleus, where it activates target genes of Tcf/Lef responsible for the events above described. Besides that, it is known that growth factors such as the Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and Epidermal Growth Factor (EGF) bind to its receptors activating MAPK and PI3K signaling. Therefore, we want to evaluate the interaction between the signaling mediated by growth factors and the Wnt/ β -catenin pathway in the progression of CRC. For this, we used two different colorectal cancer cell lineage (HCT-116 and HT-29). These cells were incubated and treated with IGF-1, EGF and Wnt3a. Wnt-3a treatment induced Tcf/Lef activation; however, it was not able to induce migration nor proliferation. The treatment with growth factors EGF or IGF-1 induced cell proliferation in both cell lineage. E-cadherin expression was decreased when cells were treated with EGF. All these results indicate that growth factors signaling and the Wnt/ β -catenin pathway interaction contributes with the progression of colorectal cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática do trato alimentar.....	4
Figura 2: Tipos celulares gerados pelas células tronco na base das criptas	6
Figura 3: Estimativas de incidência de câncer por sexo.....	7
Figura 4: Modelo de tumorigênese do câncer colorretal.....	9
Figura 5: Sinalização da via Wnt/ β -Catenina	11
Figura 6: Sinalização de IGF-1	14
Figura 7: Sinalização de EGF	15
Figura 8: Efeitos do Wnt-3a na atividade de luciferase	23
Figura 9: Resposta de crescimento celular após tratamento com IGF-1	24
Figura 10: Efeitos do Wnt-3a e do IGF-1 na atividade de luciferase	25
Figura 11: Efeitos do Wnt-3a e do IGF-1 na atividade de AKT.....	26
Figura 12: Resposta de crescimento após tratamento com Wnt-3a e/ou IGF-1.....	27
Figura 13: Efeitos de Wnt-3a e do IGF-1 na motilidade celular.....	28
Figura 14: Resposta de crescimento celular após tratamento com EGF.....	29
Figura 15: Efeitos do Wnt-3a e EGF na expressão de E-caderina.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC – do inglês, *Adenomatous Polyposis Coli*

Akt – do inglês, *Protein Kinase B (Pkb)*

BRAF – do inglês, *V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B*

BSA – do inglês, *Bovine Serum Albumine*

CCR – Câncer Colorretal

CJA – Complexo Juncional Apical

CK1 α - do inglês, *Casein kinase alpha 1*

CTNNB1 – do inglês, *Catenin Beta 1*

DMEM – do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

Dvl – do inglês, *Dishevelled*

EGF – do inglês, *Epidermal growth factor*

EGFR – do inglês, *Epidermal growth factor receptor*

ERK -do inglês, *Extracellular signal-regulated kinases*

FAP – do inglês, *Familiar Adenomatous Polyposis*

GAPDH – do inglês, *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

Grb2 – do inglês, *Growth factor receptor-bound protein 2*

GSK-3 β – do inglês, *Glycogen Synthase Kinase 3 beta*

HGF – do inglês, *Hepatocyte growth factor*

IGF-1 – do inglês, *Insulin-like growth factor-1*

INSR – do inglês, *Insulin receptor*

JA – Junções Aderentes

JAM – do inglês, *Junctional Adhesion Molecule*

JT – Junções Tight

KRAS – do inglês, *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*

Lgr5 – do inglês, *Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5*

LRP – do inglês, *Lipoprotein receptor-related protein*

MAPK – do inglês Mitogen-activated protein kinase

mTOR – do inglês, *Mechanistic target of rapamycin*

NGF – do inglês, *Nerve growth factor*

PBS – do inglês, *Phosphate buffered saline*

PGDF – do inglês, *Platelet-derived growth factor*

PIP2 – do inglês, *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*

PI3K – do inglês, *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*

PI3KCA – do inglês, *Phosphoinositiide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide*

PIP3 – do inglês, *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*

PTEN – do inglês, *Phosphatase and tensin homolog*

RIPA – do inglês, *Radioimmunoprecipitation assay*

SDS-PAGE – Sódio dodecil sulfato, *Polyacrilamide gel electrophoresis*

SFB – Soro Fetal Bovino

SHC – do inglês, *Src Homology 2 Domain-Containing*

SOS – do inglês, *Son of Sevenless*

Tcf/Lef – do inglês, *T-cell Factor/ Lymphoid Enhancer Factor*

TEM – Transição epitélio-mesenquimal

TGF- β – do inglês, *Transforming growth factor β*

VEGF – do inglês, *Vascular endothelial growth factor*

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. Sistema Digestório.....	3
1.2. Câncer Colorretal.....	7
1.2.1. Epidemiologia:.....	7
1.2.2. Patogênese molecular:.....	8
1.3. Via de sinalização Wnt/ β -Catenina.....	10
1.4. Fatores de Crescimentos.....	12
1.4.1. Fator de Crescimento semelhante à insulina do tipo 1.....	12
1.4.2. Fator de Crescimento Epidermal.....	14
1.5. Desregulação do complexo juncional apical e o processo de Transição epitélio mesenquimal.....	16
2. OBJETIVO.....	17
2.1. Objetivo Geral.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. METODOLOGIA.....	18
3.1. Cultura de Células.....	18
3.2. Tratamento.....	18
3.3. Ensaio de luciferase para a atividade de Tcf/Lef.....	19
3.4. Proliferação Celular por Cristal Violeta.....	19
3.5. Ensaio de Migração por Wound Healing.....	20
3.6. Obtenção de lisados totais para ensaio de immunobloting.....	20
3.7. Eletroforese em gel poliacrilamida contendo SDS-PAGE.....	21
3.8. Análise estatística.....	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Indução da atividade da via Wnt/ β -catenina em células de câncer colorretal.....	22
4.2. Resposta de crescimento celular após tratamento com IGF-1.....	23
4.3. Indução da atividade da via Wnt/ β -catenina em células de câncer colorretal.....	24
4.4. Efeitos do Wnt-3a e IGF-1 na atividade de Akt das células de câncer colorretal.....	25

4.5. Avaliação da proliferação celular com tratamento de Wnt-3a e/ou IGF-1 em células de câncer colorretal.....	26
4.6. Os efeitos da sinalização de Wnt/ β -catenina e IGF-1 na migração das células de câncer colorretal	26
4.7. Resposta de crescimento celular após tratamento com EGF	28
4.8. Efeitos do Wnt-3a e EGF na expressão de E-caderina em células de câncer colorretal.....	29
5. DISCUSSÃO.....	30
6. CONCLUSÃO.....	34
7. REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistema Digestório

As funções vitais para os organismos, tais como absorção de produtos da digestão, água, eletrólitos e vitaminas são realizadas pelo sistema digestório. Para isso, é necessária a movimentação do alimento pelo trato digestivo; a secreção de substâncias necessárias à digestão do alimento; absorção dos nutrientes como água, eletrólitos, vitaminas e produtos da digestão; o transporte dessas substâncias absorvidas através do sangue e o controle dessas funções pelo sistema nervoso e hormonal (GUYTON; HALL, 2006).

O sistema digestório se inicia na cavidade oral e se estende até o ânus, na forma de um tubo oco (fig. 1a). Cada parte deste trato está adaptada às suas funções específicas: para movimentação do alimento, armazenamento, digestão e absorção. Além disso, o trato alimentar apresenta glândulas associadas, responsáveis pela secreção de enzimas digestivas e outros agentes facilitadores da digestão. Um corte transversal da parede intestinal representado na figura 1b mostra as seguintes camadas de fora para dentro: (1) serosa, (2) camada muscular lisa longitudinal, (3) camada muscular lisa circular, (4) a submucosa e (5) a mucosa (LIAO; ZHAO; GREGERSEN, 2009).

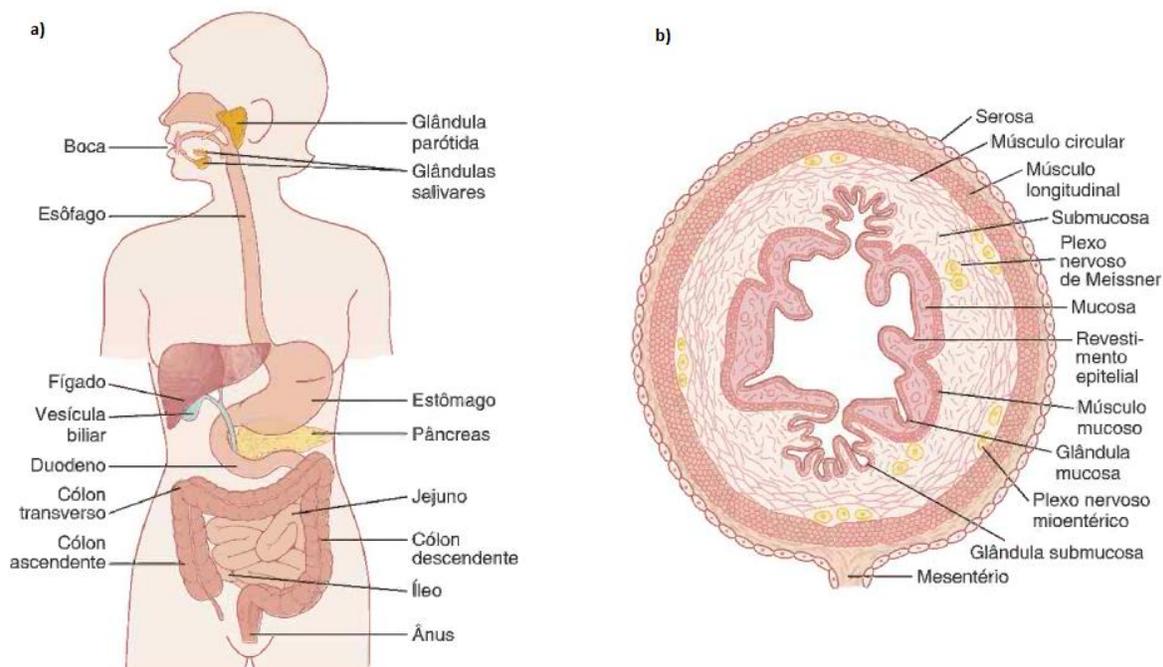


Figura 1: Representação esquemática do sistema digestório. (a) Esquema representativo mostrando os órgãos do sistema digestório e sua localização ao longo do corpo. O trato alimentar se inicia na boca na forma de um tubo oco e se estende até o ânus. Passando pelo esôfago, estômago, intestino delgado (subdividido em duodeno, jejuno e íleo), intestino grosso (subdividido em ceco, cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente e sigmoide), reto e ânus. (b) Esquema representativo de um corte transversal da parede intestinal mostrando as camadas teciduais, de fora para dentro: serosa, camada muscular lisa longitudinal, camada muscular lisa circular, submucosa e mucosa. Adaptado de Guyton et al, 2011.

A porção final do sistema digestório é constituída pelo intestino delgado e grosso. O intestino delgado tem aproximadamente 7 metros de comprimento e possui diferentes porções: duodeno, jejuno e íleo (fig. 1a). O intestino grosso se estende do final do íleo ao ânus possuindo cerca de 1,5 metros de comprimento. Essa porção tem a forma de um arco que rodeia as convoluções do intestino delgado. O intestino grosso é dividido em ceco, cólon ascendente, transverso, descendente e sigmoide. O sistema digestório termina com o reto e o ânus (fig. 1a) (GRAY; LEWIS, 1918).

Na mucosa do intestino delgado é possível observar as vilosidades intestinais que são projeções da mucosa com função de aumentar a superfície de absorção. Também se observa as glândulas intestinais ou criptas de Lieberkühn que são invaginações para o tecido conjuntivo e são locais de alta proliferação celular e de diferenciação, formando os diversos tipos de células do intestino (fig. 2). As células mais morfológicamente indiferenciadas ou células tronco são responsáveis pelo constante processo de renovação celular e encontram-se na base da cripta juntamente com as células de Paneth, responsáveis pela regulação da microbiota intestinal. Para caracterização das células tronco intestinais na base das criptas é utilizado um marcador conhecido como Receptor acoplado à proteína G contendo repetição rica em leucina-5 (Lgr5). O Lgr5 é um receptor de membrana responsável por aumentar a ativação da sinalização Wnt e sendo um alvo transcricional regulado pela própria via de Wnt (HE et al., 2014). Na porção superior da cripta, encontram-se células diferenciadas com funções absorptivas (enterócitos), secreção de muco (células caliciformes), secreção de hormônios (enteroendócrinas) e funções imunes (células M) (PHILPOTT; WINTON, 2014). Além disso, as células Cup também estão presentes na cripta intestinal, porém sua função não é totalmente esclarecida. Sabe-se apenas que há alta expressão de vimentina nessas células (FUJIMURA; IIDA, 2001). Nas criptas também está presente as células Tuft, que também não possuem funções totalmente esclarecidas (GERBE; LEGRAVEREND; JAY, 2012).

O epitélio do intestino grosso não apresenta vilosidades, nem pregas permanentes da mucosa, porém as criptas intestinais são maiores. As criptas do colón não apresentam células de Paneth, mas possuem células caliciformes em abundância. No fundo dessas criptas, encontra-se um tipo celular conhecido como células secretoras do fundo da cripta que contribui para o nicho de células tronco (SASAKI et al., 2016).

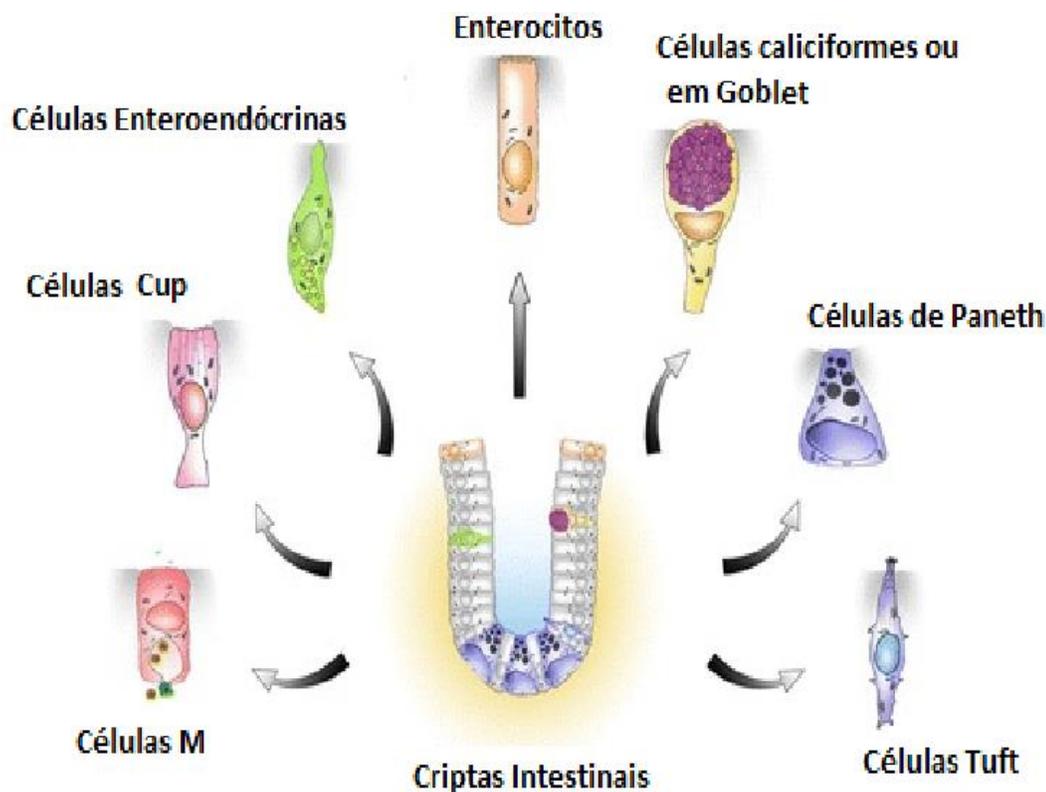


Figura 2 - Representação esquemática dos tipos celulares gerados pelas células tronco na base das criptas no intestino delgado. As células tronco são responsáveis pelo constante processo de renovação celular e encontram-se na base da cripta juntamente com as células de Paneth. Na porção superior da cripta, encontram-se células diferenciadas como os enterócitos, as células caliciformes, as enteroendócrinas, as células M, as células Cup as células Tuft. Adaptado de Gerbe et al, 2012.

Um equilíbrio entre proliferação celular nas criptas e morte celular no lúmen intestinal é crucial para a homeostase do epitélio intestinal. Enterócitos são descamados constantemente e são substituídos por células que migram da base até a zona apical da cripta intestinal de acordo com a maturação (NEGRONI; CUCCHIARA; STRONATI, 2015). A sinalização Wnt/ β -catenina regula esse processo de proliferação celular das criptas intestinais (VAN DER FLIER; CLEVERS, 2009). Portanto, a perda do equilíbrio entre proliferação e apoptose representa um mecanismo importante para o desenvolvimento do câncer colorretal.

1.2. Câncer Colorretal

1.2.1. Epidemiologia:

Câncer colorretal (CCR) é uma doença complexa com um curso clínico muito variado e importante divergências na resposta ao tratamento. De acordo com as estimativas do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) no Brasil, esse tipo de câncer é o terceiro mais comum entre os homens e o segundo entre as mulheres (fig. 3). Houve 746 mil em homens e 614 mil casos em mulheres, no mundo em 2012 (GLOBOCAN, 2012). No Brasil, 16.660 novos casos de CCR são estimados para homens e 17.620 para mulheres (INCA, 2015).

Localização primária	casos novos	%			Localização primária	casos novos	%
Próstata	61.200	28,6%			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%	

Figura 3: Estimativas de incidência de câncer por sexo. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma. *Números arredondados para múltiplos de 10. Fonte: Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.

Há uma maior incidência de CCR em países que consomem muita carne vermelha e processada, pouca ingestão de frutas, legumes e verduras, alta prevalência de obesidade e sobrepeso, altos índices de sedentarismo, consumo de álcool e tabagismos; sendo considerada uma doença de “estilo de vida”. Por isso, o consumo de frutas, hortaliças,

cereais integrais, feijões e sementes, alimentos ricos em fibras, assim como a prática de atividade física, são considerados fatores protetores contra a doença. A maioria dos CCR surge de mutações somáticas com evolução do clone celular tumoral. No entanto, são considerados fatores de risco para CCR, fatores como predisposição genética à doenças crônicas de intestino e idade. (WINKELS et al., 2014).

Para detecção deste tipo de câncer, recomenda-se colonoscopia e pesquisa de sangue oculto nas fezes. O diagnóstico é, então, confirmado por biópsia. A cirurgia é utilizada como tratamento inicial, onde se retira parte do intestino afetado e os nódulos linfáticos próximos à região. Posteriormente, radioterapia, associada ou não à quimioterapia, pode ser utilizada para evitar a reincidência do tumor (MORENO et al., 2016).

1.2.2. Patogênese molecular:

Os mecanismos moleculares por trás do desenvolvimento deste câncer são clinicamente importantes visto que eles estão relacionados com prognósticos e tratamento. O CCR se desenvolve por mais de 10 anos e as formas mais comuns de lesões iniciais são encontradas na forma de adenomas displásicos. Um dos conceitos fundamentais no estudo de CCR é a sequência adenoma-carcinoma, um termo que descreve a progressão de um epitélio normal para um epitélio displásico e carcinoma, com o acúmulo de diversas alterações genéticas (LESLIE et al., 2002). A figura 4 mostra o modelo de tumorigênese do CCR. Perda de função do gene supressor tumoral Polipose Adenomatosa Coli (APC) é um evento inicial e ocorre em mais de 70% dos CCR (ILYAS; TOMLINSON, 1997). A transformação para pólipos tardios e maiores se dá por mutações posteriores em genes como o oncogene homólogo ao gene do vírus Kirsten Rat Sarcoma (KRAS) (SUN; KLEBANER; TIAN, 2014). Subsequentemente, aproximadamente 10 a 20% desses pólipos vão se desenvolver em carcinoma a partir de mutações em genes da sinalização de p53 e fator de crescimento transformador β (TGF- β) (RAJAGOPALAN et al., 2003).

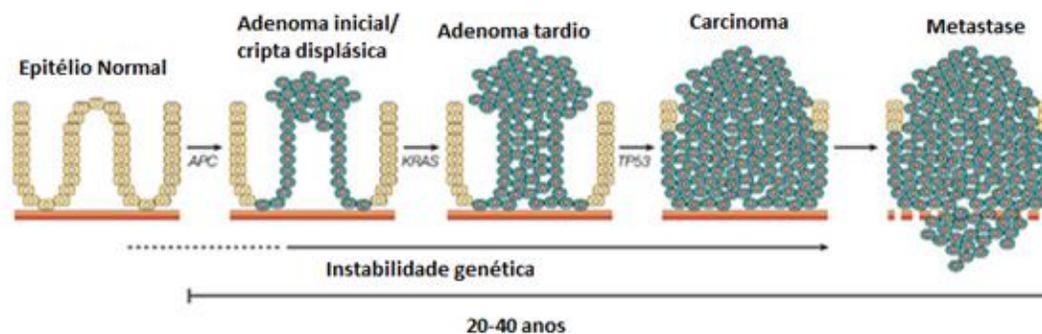


Figura 4: Modelo de tumorigênese do câncer colorretal. CCR se desenvolve por mais de 10 anos e as formas mais comuns de lesões se encontram na forma de adenomas displásicos. Perda de função do gene APC é um evento inicial, seguida por mutações em genes como KRAS. O desenvolvimento para carcinoma se dá a partir de mutações em genes da sinalização de p53 e TGF- β . Adaptado de Rajagopalan et al., 2003.

Há três diferentes formas de manifestação da doença: esporádica, familiar, e hereditária (ARVELO; SOJO; COTTE, 2015). A forma esporádica representa 60 a 80% dos casos e está associado a indivíduos sem histórico familiar ou mutações da doença (BRENNER; KLOOR; POX, 2014). Aproximadamente 15 a 30% dos casos compreendem casos familiares, em que o paciente, muitas vezes jovens, possui históricos familiares ou predisposição genética à doença (STIGLIANO et al., 2014). A forma hereditária da doença acomete pacientes em idade jovem e se subclassifica em Polipose Adenomatose Familiar (FAP), Polipose Associada à MUTYH, Síndrome de Lynch, Síndrome de PeutzJeghers, Síndrome Polipose Juvenil e Síndrome Polipose Serratia (JASPERSON; BURT, 2015).

Um recente estudo categorizou o CCR em quatro subtipos: MSI Imune, canônico, metabólico e mesenquimal. Isso foi feito a partir de um consórcio internacional dedicado ao compartilhamento em larga escala de resultados e análise por grupos especialistas, com auxílio de ferramentas de bioinformática. Foi visto que cada subtipo de CCR possui diferenças moleculares que podem auxiliar o tratamento e o prognóstico (GUINNEY et al., 2015).

A maioria dos CCR é iniciada por mutações em APC ou β -catenina levando a uma ativação exacerbada da via. Subpopulações de CCR com alto nível de atividade de Wnt possui características mais malignas, como fenótipos mesenquimais e altos níveis de marcadores tumorais. Embora essa via seja responsável por eventos fisiológicos normais como proliferação e diferenciação das células troncos intestinais, quando cronicamente ativa é responsável pela progressão tumoral e metástase em CCR (BLAJ et al., 2016).

1.3. Via de sinalização Wnt/ β -Catenina

O desenvolvimento do CCR resulta de mutações em vários oncogenes e genes supressores tumorais desregulando diferentes vias celulares. Uma das vias de sinalização afetada é a via Wnt/ β -Catenina sendo esta fundamental no desenvolvimento embrionário e na manutenção dos tecidos, principalmente intestinal, regulando diferentes processos importante tais como, crescimento celular, sobrevivência e diferenciação. Uma ativação constante dessa via desregula todos esses eventos, tendo como consequência o desenvolvimento do câncer (BARKER; CLEVERS, 2006). Perda de função no gene que codifica a proteína APC, como em pacientes com FAP e em outras formas de cânceres esporádicos é o principal ativador crônico desta via (ZHAN; RINDTORFF; BOUTROS, 2016).

Quando a via está inativa, ocorre a formação adequada do complexo destrutivo de β -catenina pelas proteínas Axina e APC. Essas proteínas, quando juntas, facilitam a fosforilação de β -catenina pela glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK-3 β) e pela caseína quinase 1 alfa (CK1 α). CK1 α inicia a fosforilação de β -catenina no resíduo Ser45, sendo seguido pela fosforilação nos resíduos Thr41, Ser 37 e Ser33 por GSK-3 β . Essa série de fosforilação torna a proteína ubiquitinada para ser levada a destruição via proteassoma (ANWAR et al., 2016).

Por outro lado, ocorre a ativação da via quando há ligação de lipoglicoproteínas da família Wnt a seus receptores específicos Frizzled e ao receptor de lipoproteína de baixa densidade 5/6 (Lrp5/6). Isso gera a ativação desses receptores que enviam um sinal à proteína Dishevelled (Dvl). Essa proteína vai para a membrana onde polimeriza e é ativada (fig. 5). A ativação de Dvl atrai axina para a cauda citoplasmática de Lrp5/6 e também inibe

GSK-3 β , inviabilizando a formação do complexo destrutivo (BASU; HAASE; BEN-ZE'EV, 2016). Isso culmina no acúmulo de β -catenina no citoplasma, com consequente translocação para o núcleo, onde se liga aos fatores de transcrição Tcf/Lef, ativando diversos genes alvos (NOVELLASDEMUNT; ANTAS; LI, 2015).

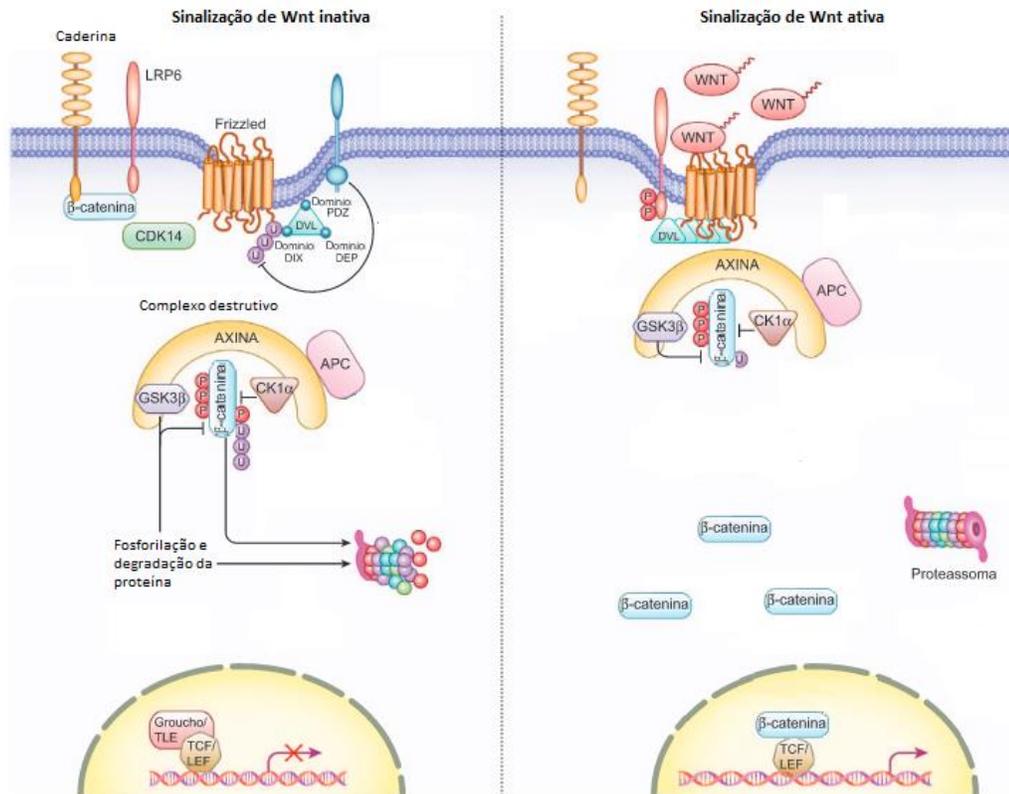


Figura 5: Sinalização da via Wnt/β-Catenina. Quando a via está inativa, ocorre a formação funcional do complexo destrutivo de β-Catenina, que leva essa proteína à degradação. Quando a via Wnt está ativada, a fosforilação dos receptores atrai membros do complexo para a membrana plasmática, inviabilizando a formação dessa estrutura. Isso resulta na acumulação de β-Catenina no citoplasma e consequente translocação para o núcleo, onde ativa genes alvos do Tcf/Lef. Adaptado de Zhan et al, 2016.

Além da via Wnt/β-Catenina, diversas outras vias celulares estão desreguladas em CCR. A sinalização de fatores de crescimento é frequentemente vistas alteradas em CCR.

Essa sinalização desregulada contribui para a aquisição de um fenótipo maligno, incluindo progressão do ciclo celular, evasão da apoptose, indução de instabilidade gênica e indução de invasão e metástase (WU et al., 2013).

1.4. Fatores de Crescimentos

Os fatores de crescimento são substâncias, geralmente polipeptídeos, que após se ligarem aos seus receptores específicos, são capazes de estimular diversos eventos celulares que incluem proliferação, diferenciação sobrevivência, migração celular e estimular a secreção de hormônios. Existem diversos fatores de crescimento que possuem diferentes funções. Alguns exemplos de fatores de crescimento são: Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF), Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), Fator de Crescimento Nervoso (NGF), Fator de Crescimento de Fibroblasto (FGF), Fator de Crescimento Transformador β (TGF- β), Fator de Crescimento Epidermal (EGF) e Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF) além de algumas citocinas (BALBAA, 2013).

Fatores de crescimento já vêm sendo relacionado à patogênese do câncer há muito tempo. As células cancerígenas possuem diversos mecanismos pelos quais gera uma amplificação do sinal dessas moléculas. Por exemplo, uma alta expressão de receptores na superfície de células tumorais pode aumentar a sensibilidade à baixas concentrações de fatores de crescimento. Além disso, diversos proto-oncogenes transcrevem proteínas que são fatores de crescimento propriamente ditos, receptores, ou ainda, proteínas envolvidas nessa sinalização celular (NORMANNO et al., 2006).

1.4.1. Fator de Crescimento semelhante à insulina do tipo 1

A sinalização de IGF-1 tem papel importante no crescimento e desenvolvimento de diversos tecidos (fig. 6). Essa sinalização também está implicada no desenvolvimento de diversas patologias, principalmente no câncer. O sistema IGF é composto pelos ligantes IGF-1, IGF-2; e pelos receptores IGF-1 (IGF-1R), IGF-2 (IGF-2R). As funções biológicas de IGF-1 e IGF-2 são mediadas principalmente pelo IGF-1R, um receptor de tirosina quinase transmembrana que possui mais afinidade por IGF-1 que IGF-2. (HEIDEGGER et

al., 2015). O IGF-2R é estruturalmente diferente do IGF-1R, pois é também um receptor manose 6-fosfato. Esse receptor está envolvido no controle dos níveis sanguíneos de IGF-2 e na modulação do tráfico de enzimas lisossomais (PAVELIC; BUKOVIĆ; PAVELIĆ, 2002).

A ligação de IGF-1 ou IGF-2 ao IGF-1R gera uma mudança conformacional da subunidade β , resultando na autofosforilação de seu domínio citoplasmático. Isso gera ativação do receptor de tirosina quinase que, então, auto-fosforila resíduos adicionais de tirosina, funcionando como sítios de ligação para substratos e proteínas adaptadoras Shc. Os substratos e as proteínas adaptadoras recrutam outros fatores, como Grb2/SOS e a subunidade regulatória p85 de fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K), levando à ativação da via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e PI3K, respectivamente. Isso afeta a proliferação celular, diferenciação e homeostase tecidual assim como a sobrevivência celular, ações metabólicas, e mecanismos antiapoptóticos (LEROITH; ROBERTS, 2003). As atividades de IGF-1 são reguladas por 6 diferentes proteínas (IGFBP1-6), presentes no sangue periférico e fluídos extracelular. Essas proteínas se ligam ao IGF-1, aumentando sua meia-vida, modulando a viabilidade da ligação com seu receptor e modulando diretamente a interação com o receptor (VIGNERI et al., 2015).

A sinalização de IGF-1 é um determinante crucial para o desenvolvimento de CCR e também possui implicações importantes no prognóstico de pacientes com esta doença. De fato, altos níveis de IGF-1 estão relacionados a um maior risco de CCR (VIGNERI et al., 2015). Além disso, a sinalização de IGF-1 estimula diversas cascatas celulares, responsáveis por eventos como progressão do ciclo celular e inibição da apoptose, favorecendo a progressão tumoral (ZHANG et al., 2013).

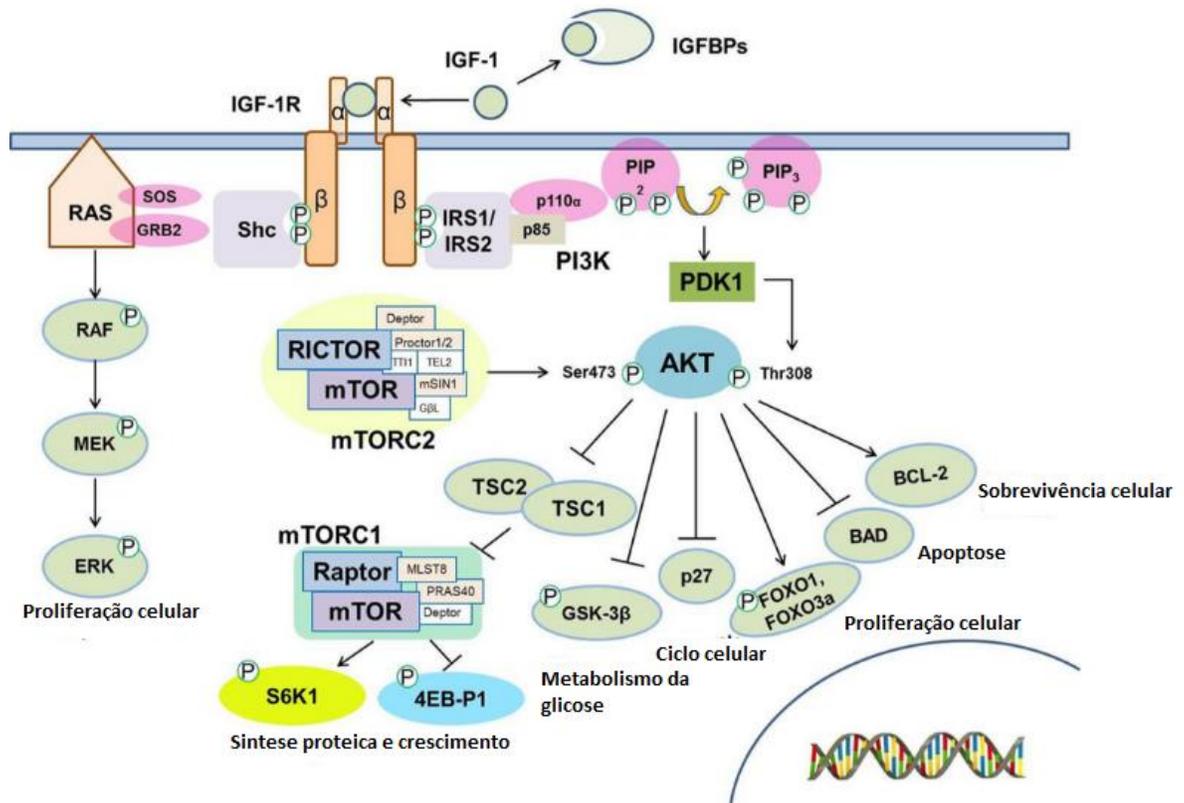


Figura 6 - Via de Sinalização do IGF-1. A ligação de IGF-1 ao IGF-1R gera uma mudança conformacional da subunidade β , resultando na autofosforilação de seu domínio citoplasmático. Isso leva à ativação do receptor de tirosina quinase que, então, autofosforila resíduos adicionais de tirosina, funcionando como sítios de ligação para substratos e proteínas adaptadoras Shc. Os substratos e as proteínas adaptadoras recrutam outros fatores, como Grb2/SOS e a subunidade regulatória p85 de PI3K, levando à ativação da via das MAPK e PI3K. Fonte: Modificado de Jung et al, 2015.

1.4.2. Fator de Crescimento Epidermal

Os fatores de crescimento epidermal (EGF) possuem papel importante na diferenciação, sobrevivência celular e na morfogênese de diversos órgãos. Além disso, uma superexpressão de proteínas que fazem parte dessa via está relacionado à patogênese de diversos tipos de cânceres, induzindo proliferação celular e resistência à apoptose (NORMANNO et al., 2006).

Esses fatores se ligam à receptores de EGF (EGFR), um receptor da família de tirosinas quinases. Como representado na figura 7, após ligação ocorre uma homo ou hetero-dimerização do receptor, ativando uma trans-fosforilação das subunidades de tirosina (CHAKRABORTY et al., 2014). Esses sítios de tirosina fosforilados servem de sítio para a ligação de proteínas sinalizadoras de cascatas celulares, incluindo janus quinase (JAK), responsáveis por eventos como sobrevivência, proliferação e oncogênese; PI3K, atuando em eventos como angiogênese, tumorigênese, e inibição da apoptose; MAPK, responsáveis pela expressão gênica e progressão do ciclo celular; e fosfolipase γ (PLC γ), responsáveis pela transformação e diferenciação celular e apoptose (WIEDUWILT; MOASSER, 2008).

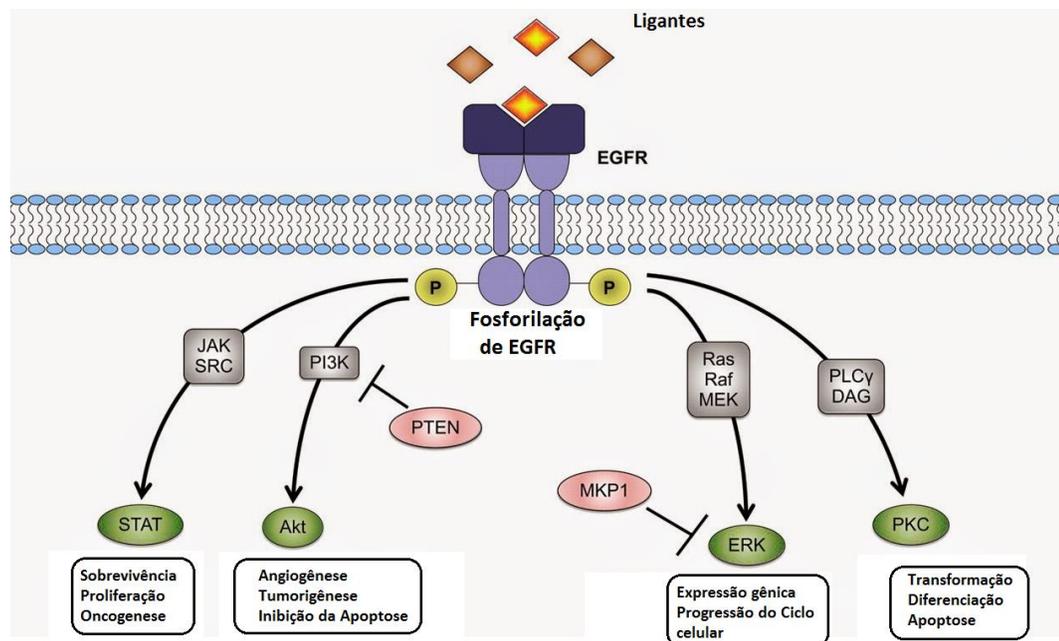


Figura 7: Sinalização de EGF. EGF se liga a seus receptores gerando uma homo ou hetero-dimerização do receptor. Isso leva a uma trans-fosforilação das subunidades de tirosina. Esses sítios de tirosina fosforilados servem para a ligação de proteínas que ativam cascatas celulares, incluindo Janus Kinase (JAK), PI3K, MAPK e PLC γ /PKC, responsáveis por diversos eventos celulares. Adaptado de Charaborty et al., 2014.

Células de CCR podem adquirir autonomia na proliferação a partir da produção não controlada de fatores de crescimento, ou expressão aumentada de receptores desses fatores.

Esse processo leva a ativação de diferentes cascatas de sinalização que estimulam a proliferação, angiogênese e metástase. É nesse cenário que o EGF possui papel importante no crescimento e na progressão tumoral, a partir do aumento da proliferação, sobrevivência, invasão e escape da resposta imune (TROIANI et al., 2016). O bloqueio de EGFR tem sido usado no tratamento de diversos cânceres, incluindo CCR, a partir da administração de anticorpos monoclonais anti-EGFR, como Cetuximab e Panitumumab (SOBANI et al., 2016).

1.5. Desregulação do complexo juncional apical e o processo de Transição epitélio mesenquimal

As células epiteliais interagem com as células vizinhas através de diferentes junções celulares que estão dispersas ao longo da membrana. O domínio lateral dessas células é responsável pela adesão célula-célula enquanto que o domínio basal é responsável pela interação célula-matriz. Esse contato entre as células adjacentes é mantido pelas junções tight (JT), junções aderentes (JA), desmossomos e junções comunicantes (GAP). A combinação das duas primeiras junções é referida como complexo juncional apical (CJA). Todas essas junções coordenam sinalizações intracelulares e intercelulares que regulam diversos eventos celulares (FERREIRA; FELGUEIRAS; FARDILHA, 2015).

As JT estão localizadas na superfície basolateral da célula, logo abaixo do limite apical da membrana. Essas junções regulam o fluxo paracelular de íons e macromoléculas, além da manutenção da polaridade celular. Fazem parte dessa estrutura, 4 proteínas transmembranas integrais: ocludinas, claudinas, tricelulina e molécula de adesão juncional (JAM) (SUZUKI, 2013).

As JA estão localizadas abaixo das JT e possuem função principal de estabelecer adesão física entre as células. Também possuem função de regulação do citoesqueleto de actina, sinalização intracelular e regulação transcricional. Essa estrutura é formada por duas proteínas principais, as caderinas e nectinas. As E-caderinas, uma das mais importantes proteínas dessas junções, formam um complexo com as β -catenina e α -catenina e se ancoram ao citoesqueleto de actina, processo crítico para a integridade celular. Por isso, essa proteína é conhecida como um supressor tumoral, garantindo a manutenção da integridade celular e impedindo processos migratórios (IVANOV; NAYDENOV, 2013).

A desorganização das junções intercelulares está alterada em eventos fisiológicos celulares como migração e divisão celular. Além disso, em diversas patologias, por exemplo, como durante o processo de metástase, algumas células cancerígenas possuem essas junções desreguladas. Isso altera a polaridade celular e reorganiza o citoesqueleto, tornando a célula isolada e com capacidade migratória e invasiva. Esse processo é conhecido como transição epitélio-mesenquimal (TEM) (SINGH; DHAWAN, 2015). O processo de TEM em CCR é controlado por fatores de transcrição, tais como Snail, Slug, Zeb e Twist. Esses fatores são capazes de suprimir a transcrição de E-caderina de forma direta ou indiretamente. Além da E-caderina, proteínas epiteliais tais como ZO-1, Claudinas e ocludinas se mostram down-reguladas. Em contrapartida, marcadores mesenquimais, tais como N-caderina, Vimentina e α -actina de músculo liso se mostram up-regulados (BUSCH; MCGRAW; SANDLER, 2014).

Durante a progressão do CCR, as células cancerígenas estão sujeitas ao processo de TEM devido à combinação de sinais extracelulares em seus microambientes. A via Wnt/ β -catenina e cascatas sinalizadas por fatores de crescimento estão envolvidas na progressão de vários cânceres, incluindo CCR (CAO et al., 2015). No entanto, o papel que estas vias cumprem em conjunto durante a progressão do CCR, ainda é pouco elucidado. Por isso, esse estudo tenta compreender o papel das vias Wnt/ β -catenina e das cascatas sinalizadas pelos fatores de crescimento IGF-1 e EGF no CCR, na tentativa de identificar biomarcadores de diagnóstico ou prognóstico ou ainda, componentes moleculares que possam ser usados no tratamento deste tipo de câncer.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a interação da via e Wnt/ β -catenina e da sinalização de IGF-1 e do EGF na progressão do câncer colorretal para a aquisição de um fenótipo maligno de transição epitélio mesenquimal.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a ativação da via Wnt através da atividade transcricional de β -catenina.
- Avaliar a sinalização induzida por IGF-1, EGF e Wnt-3a.
- Avaliar a expressão de E-caderina após tratamento com Wnt-3a e com os fatores de crescimento IGF-1 e EGF
- Correlacionar os efeitos induzidos pelo tratamento de Wnt-3a e fatores de crescimento no que tange aos eventos de proliferação e migração.

3. METODOLOGIA

3.1. Cultura de Células

Duas diferentes linhagens derivadas de CCR humano foram utilizadas neste estudo. A primeira foi a linhagem HT-29 (ATCC: HTB-28), essa célula é pouco invasiva, possui diferenciação intermediária e mutações em P53. A segunda foi a linhagem HCT-116 (ATCC: CCL-247), essas células são indiferenciadas, com alto potencial invasivo e metastático, além de crescerem em multicamadas. Possuem mutações em K-RAS, PI3KCA e no gene CTNNB1, que transcreve a proteína β -catenina. Ambas as linhagens foram cultivadas em meio Dulbecco's modificado, DMEM (GIBCO BRL, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 60mg/L de estreptomicina, 100mg/L de penicilina G (Invitrogen), e mantidas a 37°C em um ambiente com 5% de CO₂.

3.2. Tratamento

Com o objetivo de induzir a ativação da via PI3K as células HT-29 e HCT-116 foram tratadas com IGF-1 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA) por 24 horas ou 48 horas na concentração final de 50 ng/mL. Para a reconstituição desse fator foi utilizado 20 mM de citrato. Os tratamentos ocorreram em meio DMEM 1% SFB. Para o ensaio de luciferase foi utilizado 10 ng/mL de IGF-1. As células também foram tratadas com EGF (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), na concentração de 100 ng/mL. Para a

reconstituição desse fator de crescimento foi utilizado 10 mM de ácido acético com 0,1% de BSA.

Para induzir a ativação da via Wnt/ β -catenina, as células HT-29 e HCT-116 foram tratadas com Wnt-3a (R&D Systems) solúvel por 24 ou 48 horas. Para a reconstituição de 10 μ g desse composto, foi utilizado 100 mL TBS-T0,01% com BSA 0,1%. A concentração final utilizada foi de 100 ng/mL. Os tratamentos ocorreram em meio DMEM 1% SFB. Para o ensaio de luciferase, utilizou-se como controle de ativação da via Wnt/ β -catenina, cloreto de lítio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 20 mM.

3.3. Ensaio de luciferase para a atividade de Tcf/Lef

As células HT-29 (2×10^3 células) e HCT-116 (2×10^4 células) foram plaqueadas em placa de 24 poços. Após 24 horas, as células foram transfectadas com dois diferentes genes repórter Tcf luciferase: um plasmídeo Tcf-luciferase Super8x TOPflash (wild-type) e outro plasmídeo mutado, o Super8x FOPflash, o qual seve como controle negativo para a atividade do Super8x TOPflash. As células foram transfectadas transientemente com 2 μ g de PRK-TK Renila luciferase. Para a realização da co-transfecção, foi utilizado 3 μ L de FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche Applied Science, Basel, Switzerland). Após um intervalo de 24 horas de transfecção, as células foram lavadas 2 vezes com PBS, e em seguida submetidas ao tratamento com 50 ng/mL de IGF-1, e/ou 100 ng/mL de Wnt-3a, ou ainda cloreto de lítio a 20 mM. No dia seguinte, as células foram lisadas com auxílio do Ki Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison WI, EUA). Utilizou-se o Luminômetro de placas Verita (Turner Biosystems) para realizar a leitura. A atividade da luciferase foi normalizada pela atividade da Renila luciferase.

3.4. Proliferação Celular por Cristal Violeta

Em uma placa de 96 poços, plaqueou-se 10^4 células HT-29 e 2×10^4 células HCT-116 com volume final de 200 μ L por poço, incluindo meio DMEM com 1% de SFB com 50 ng/mL de IGF-1, 100 ng/mL de EGF e/ou 100 ng/mL de Wnt-3a. Após 24, 48 ou 72 horas as células foram lavadas com PBS e fixadas com etanol a 100% por 10 min. O etanol foi retirado e aplicou-se a solução de cristal violeta (Cristal violeta 0,05% em etanol 20%)

por 10 min. Lavou-se os poços com PBS e aplicou-se 100 μ L de metanol em cada poço. Após 5 min, foi feita a análise colorimétrica à 595 nm usando leitor de Elisa Spectra Max 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA)

3.5. Ensaio de Migração por Wound Healing

Em uma placa de 6 poços, foram plaqueadas células HT-29 e HCT-116 até atingirem confluência total. Com uma ponteira estéril de 10 μ L, foi feito um risco coincidindo com o diâmetro do poço. Foi adicionado meio DMEM 1% SFB com 50 ng/mL de IGF-1, e/ou 100 ng/mL de Wnt-3a. A análise do potencial migratório foi monitorada por microscopia de contraste diferencial interferencial (DIC) nos tempos 0 e 24 horas após indução do risco, e a aquisição de imagens foi realizada através do microscópio invertido Axio Observer Z1. A quantificação da migração foi realizada através de medições da extensão do limite do fechamento remanescente entre os dois lados da monocamada, utilizando o programa Adobe Photoshop Cs3 (Adobe Systems Inc, CA, EUA). As medições foram realizadas em 5 campos diferentes. Os valores obtidos convertidos em percentagens foram utilizados para um gráfico realizado com o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.6. Obtenção de lisados totais para ensaio de immunoblotting

Para obtenção dos lisados totais, 10×10^4 células HT-29 e 30×10^4 células HCT-116 foram plaqueadas em placas de cultura com 6 poços. Após 24h e 48h de tratamento com 50 ng/mL de IGF-1, 100 ng/mL de EGF, e/ou 100 ng/mL de Wnt-3a, as células foram lisadas. Para a extração total de proteínas foi utilizado o Tampão de extração RIPA contendo: Triton X-100 1% (Sigma-Aldrich); deoxicolato de sódio 0,5% (Reagen – Quimibrás Ind., Brasil); SDS 0,2% (Invitrogen); Cloreto de sódio 150 mM (Sigma-Aldrich), pH 7,4; fluoreto de sódio 20 mM; ortovanadato de sódio 1mM (Sigma-Aldrich); e 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).

Em seguida, foi feita a raspagem dos poços com auxílio de um rodo. A solução foi coletada e transferida para um eppendorf e, então homogeneizada a cada 5 minutos durante

15 minutos, sempre deixando em gelo entre os intervalos. O extrato foi centrifugado a 10000 rpm, a 4 °C durante 10 minutos. Coletou-se o sobrenadante que foi armazenado a – 80 °C. A dosagem do extrato proteico foi feita utilizando o kit comercial BCA (Bioagency Biotecnologia Ltda) e a proteína BSA (Sigma-Aldrich) como padrão. A leitura colorimétrica foi realizada em um comprimento de onda de 562 nm.

3.7. Eletroforese em gel poliacrilamida contendo SDS-PAGE

As proteínas foram separadas por eletroforese em SDS-PAGE, com géis na concentração de 7.5 a 10% de acrilamida. Quantidade iguais de proteínas foram utilizados a cada corrida. Após, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando o aparelho de eletrotransferência semiúmido (Bio-Rad Laboratories Inc.) a 10 V por uma hora. Em seguida, 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-Aldrich) contendo leite desnatado 5%, durante 60 min em agitador orbital. As membranas foram então encubadas com anticorpos primários de interesse *overnight*, exceto quando a proteína de interesse era GAPDH, cuja encubação levava 4 horas. Essas membranas foram lavadas 3 vezes por 10 min com TBS-T e então encubadas com respectivos anticorpos secundários conjugados a peroxidase por 1 hora. Após, novamente, 3 lavagens de 10 min com TBS-T, a reatividade das proteínas em estudo foi determinada utilizando um kit comercial de quimioluminescência (Amersham Biosciences GE Healthcare, Reino Unido). A reação foi detectada ora por filme, revelado em câmara escura, ora pelo aparelho Chemidoc (Bio-Rad), que concedia as imagens em um software.

3.8. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software). Foram considerados estatisticamente significativo com $P < 0.05$ pelo teste One-Way Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste Bonferroni após análise de três experimentos independentes.

4. RESULTADOS

4.1. Indução da atividade da via Wnt/ β -catenina em células de câncer colorretal

Com o objetivo de induzir a ativação da via Wnt, tratamos às células HT-29 e HCT-116 com a proteína recombinante Wnt-3a por 24 h. Em seguida foi medida a atividade transcricional através de um ensaio de luciferase de Tcf/Lef. Para comparar o efeito de Wnt-3a em relação à atividade transcricional de Tcf/Lef foi utilizado o cloreto de lítio (LiCl) a 20 mM como controle positivo. Inicialmente verificamos as condições de tratamento com Wnt-3a em diferentes concentrações do soro fetal bovino (SFB) de 10% e 1%. Nossos resultados indicam que o tratamento com Wnt-3a nas células com a 1% de SFB aumentou na atividade de Tcf/Lef tanto na linhagem HT-29 (fig. 8a) assim como na linhagem HCT-116 (fig. 8b). No entanto, com 10% de SFB não foi visto indução do aumento na atividade de Tcf/Lef, quando comparado com o controle positivo LiCl 20 mM.

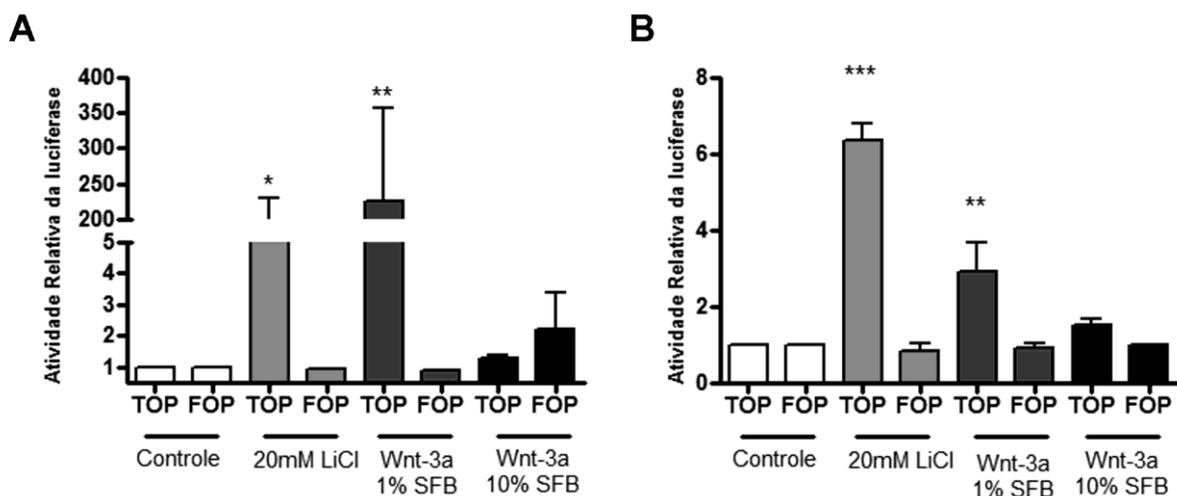
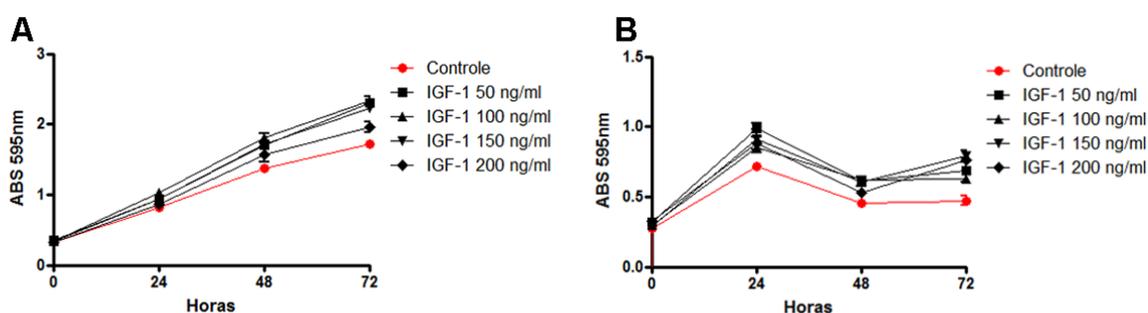


Figura 8: Efeitos do Wnt-3a na atividade de luciferase das células de câncer colorretal. As células HT-29 e HCT-116 foram plaqueadas e, após 24 horas, transfectadas com TOPflash ou FOPflash. No dia seguinte, as células foram submetidas ao tratamento com LiCl (20 mM) ou Wnt-3a (100 ng/mL) com 10% ou 1% de SFB. Houve um aumento da atividade transcricional quando as células foram tratadas com Wnt-3a e soro a 1%. LiCl é um conhecido inibidor de GSK3 β , e conseqüente indutor da via Wnt/ β -catenina. Por isso, esse composto foi usado como controle positivo de transcrição. A atividade da luciferase

foi normalizada pela atividade da Renila luciferase. Resultado representativo de três experimentos independente, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, teste ANOVA.

4.2. Resposta de crescimento celular após tratamento com IGF-1

A fim de avaliar o efeito do tratamento do IGF-1 nas células HT-29 e HCT-116 foi realizada uma curva de crescimento celular. Para isso as células HT-29 e HCT-116 foram tratadas com diferentes concentrações de IGF-1 (50, 100, 150 e 200 ng/mL) por 72 h na



presença de SFB 1%. Como mostra a figura 9, no tempo de 72 h, o tratamento com IGF-1, tanto na linhagem HT-29 (fig. 9a) como na HCT-116 (fig. 9b), aumentou a proliferação celular quando comparados com o controle. O tratamento não se mostrou dose dependente em relação às concentrações de IGF-1 utilizadas. Como não houve diferença nas diferentes concentrações de IGF-1 utilizadas, a concentração de 50 ng/mL foi usada nos experimentos seguintes.

Figura 9: Resposta de crescimento celular após tratamento com IGF-1. As células HT-29 (a) e HCT-116 (b) foram plaqueadas em uma placa de 96 poços, incluindo meio DMEM com 1% de SFB. Após 4h, elas foram tratadas com diferentes concentrações de IGF-1 (50 ng/mL, 100 ng/mL, 150 ng/mL e 200 ng/mL). A proliferação celular foi quantificada pelo ensaio de Cristal Violeta depois de 24, 48 e 72 horas de tratamento. Nota-se um aumento da proliferação celular com o tratamento de IGF-1, para o tempo 72 h em ambas as linhagens celulares quando comparado ao controle. Resultado representativo de um experimento único.

4.3. Indução da atividade da via Wnt/ β -catenina em células de câncer colorretal

O próximo passo foi avaliar a interação entre as vias PI3K/Akt e Wnt/ β -catenina. Para isso as células foram tratadas com Wnt-3a, IGF-1 ou ambos em SFB 1% e em seguida foi verificada a ativação transcricional da via Wnt/ β -catenina. Após 24h de tratamento com Wnt-3a (100 ng/mL), IGF-1 (10 ng/mL) ou ambos, foi medida a atividade de Tcf/Lef através do ensaio de luciferase. Como mostra a figura 10, tanto na linhagem HT-29 (fig. 10a) como na HCT-116 (fig. 10b), como esperado, houve ativação de Tcf/Lef com o tratamento com Wnt-3a. No tratamento somente com IGF-1 não houve ativação da via Wnt. O tratamento em conjunto de Wnt-3a e IGF-1 não se mostrou diferente quando comparado com o tratamento individual de Wnt-3a. Com isso, o IGF-1 não é capaz de ativar a via Wnt nas linhagens celulares e somente o tratamento com Wnt-3a é responsável pela ativação da via.

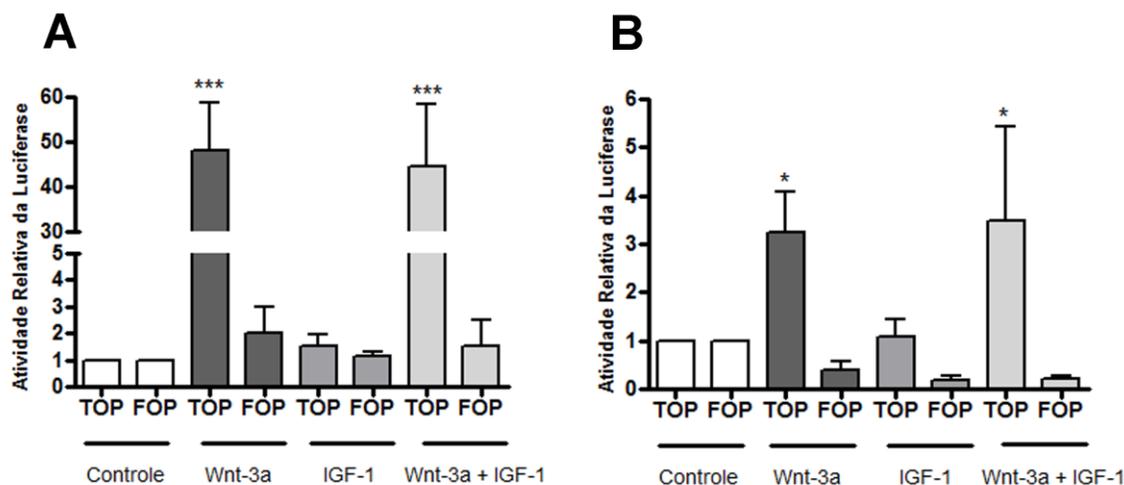


Figura 10: Efeitos do Wnt-3a e IGF-1 na atividade da luciferase. As células HT-29 e HCT-116 foram plaqueadas em placa de 24 poços. Após 24 horas, as células foram transfectadas com TOPflash ou FOPflash e submetidas ao tratamento com Wnt-3a (100 ng/mL), IGF-1 (10 ng/mL) ou ambos em SFB 1%. Houve um aumento da atividade transcricional quando ambas linhagens foram tratadas com Wnt-3a ou Wnt-3a com IGF-1.

A atividade da luciferase foi normalizada pela atividade da Renila luciferase. Resultado representativo de três experimentos independente, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, teste ANOVA.

4.4. Efeitos do Wnt-3a e IGF-1 na atividade de Akt das células de câncer colorretal

Com objetivo de avaliar a ativação dos receptores de IGF-1 foi monitorado sua sinalização downstream através da atividade de Akt. A atividade de Akt foi avaliada nas linhagens celulares HT-29 e HCT-116 tratadas com Wnt-3a, IGF-1 ou ambos (Fig. 11). No tratamento com Wnt-3a não houve alteração da fosforilação de Akt. Já em presença de IGF-1, houve aumento da fosforilação de Akt em ambas as linhagens, mostrando-se ser um indutor da via PI3K/Akt. O tratamento com IGF-1 em conjunto com Wnt-3a também induziu aumento na fosforilação de Akt quando comparado com o controle, porém não foi diferente do tratamento individual de IGF-1.

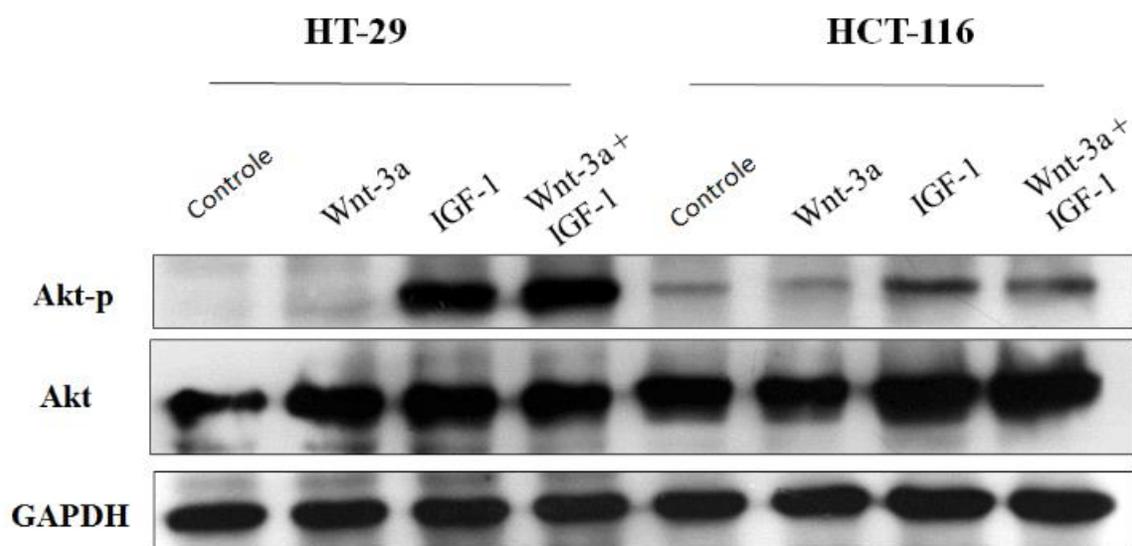


Figura 11: Efeitos do Wnt-3a e IGF-1 na atividade de Akt. O perfil de fosforilação de Akt foi analisado por *Western blotting* após o tratamento com Wnt-3a (100 ng/mL), IGF-1 (50 ng/mL) ou ambos. Nota-se um aumento da fosforilação de Akt com o tratamento com IGF-1 ou Wnt-3a e IGF-1 em conjunto, quando comparado ao grupo controle. O resultado

se repetiu em ambas as linhagens. GAPDH foi usado como *housekeeping*. Resultado representativo de um experimento único.

4.5. Avaliação da proliferação celular com tratamento de Wnt-3a e/ou IGF-1 em células de câncer colorretal

Para avaliar a interação da via PI3K/Akt e Wnt/ β -catenina na proliferação celular foi realizada uma curva de proliferação com as linhagens HT-29 (a) e HCT-116 (b) submetidas ao tratamento com Wnt-3a e IGF-1 após 0, 24, 48 e 72h de tratamento. Conforme mostra a figura 12, o tratamento com Wnt-3a não induziu aumento da proliferação nas células HT-29 (fig. 12a) e HCT-116 (fig. 12b). Já o tratamento somente com IGF-1 induziu proliferação apenas na linhagem HCT-116. O tratamento combinado de IGF-1 mais Wnt estimularam o aumento da proliferação para as ambas as células. Portanto, o tratamento com Wnt-3a não estimula o aumento da proliferação celular.

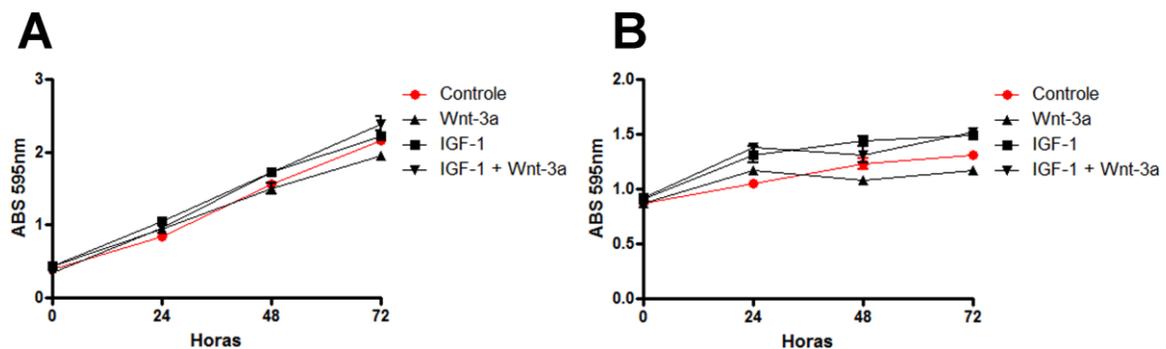


Figura 12: Reposta de crescimento celular após tratamento com Wnt-3a e/ou IGF-1. Crescimento celular de células (a) HT-29 e (b) HCT-116, quantificado pelo teste cristal violeta após 72 horas de tratamento com Wnt-3a e/ou IGF-1. O tratamento com Wnt-3a sozinho não foi capaz de induzir proliferação celular. Percebe-se um aumento da proliferação somente quando as células foram tratadas com IGF-1 ou IGF-1 + Wnt-3a. Resultado representativo de um experimento único.

4.6. Os efeitos da sinalização de Wnt/ β -catenina e IGF-1 na migração das células de câncer colorretal

O próximo passo foi avaliar a migração através do ensaio de migração por *wound-healing*. A figura 13 mostra que o tratamento individual com Wnt-3a diminuiu a migração, tanto da linhagem HT-29 assim como na linhagem HCT-116 (fig. 13). Já o IGF-1 não foi capaz de estimular a migração em nenhuma linhagem. No entanto, no tratamento em conjunto (IGF-1+Wnt-3a) percebe-se uma interação entre os tratamentos, visto que ambos estão induzindo uma maior migração quando comparado com os tratamentos individuais.

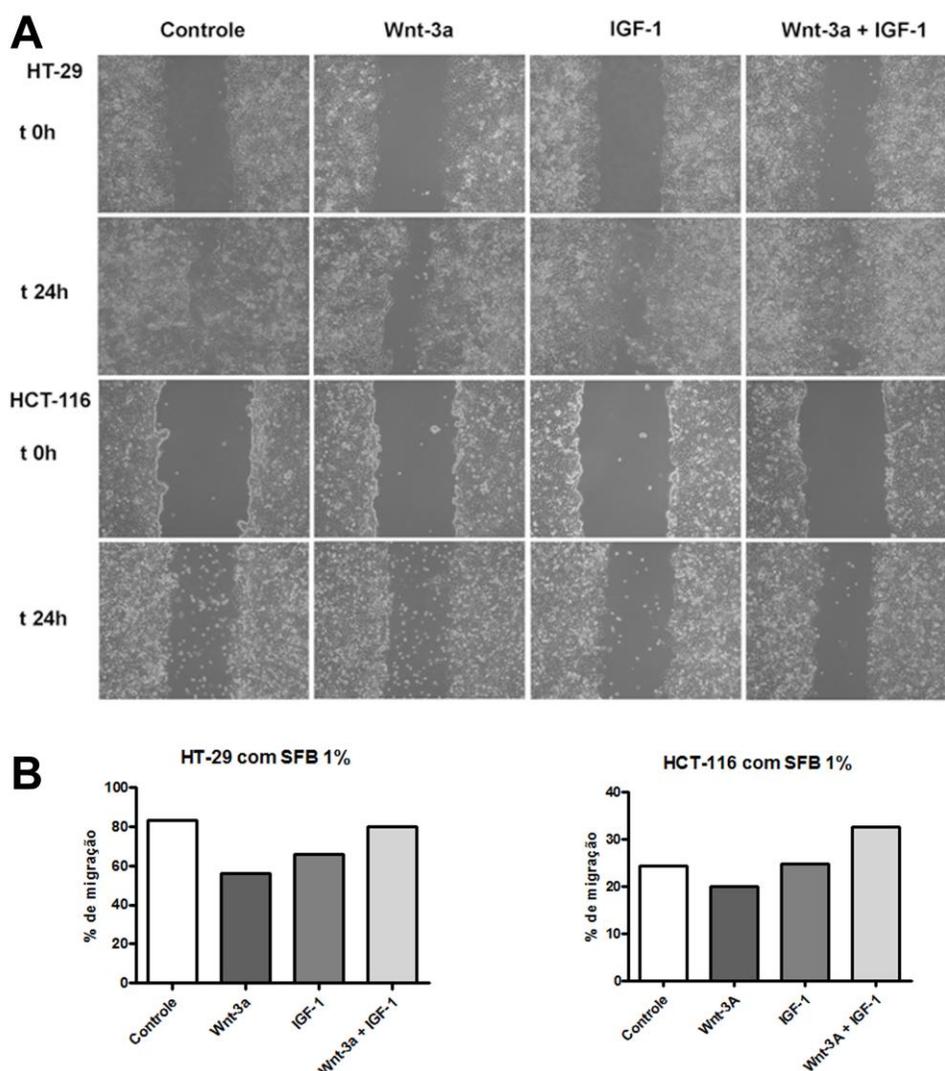


Figura 13: Efeitos de Wnt-3a e IGF-1 na motilidade celular. A análise do potencial migratório foi monitorada por microscopia de contraste diferencial interferencial nos

tempos 0 e 24 horas após indução do risco e tratamento com IGF-1 (50 ng/mL), Wnt-3a (100 ng/mL) ou ambos em conjunto. As células quando tratadas com Wnt-3a e IGF-1 em conjunto, tiveram um aumento da migração quando comparado com os tratamentos individuais. Isso indica uma interação entre os tratamentos. Resultado representativo de um experimento único.

4.7. Resposta de crescimento celular após tratamento com EGF

A fim de avaliar o efeito do tratamento do EGF nas células HT-29 e HCT-116 foram realizadas curvas de crescimento celular. As células HT-29 e HCT-116 foram tratadas com diferentes concentrações de EGF (50, 100, 150 e 200 ng/mL) por 72 h na presença de SFB 1%. A figura 14 mostra que o tratamento com EGF na linhagem HT-29 (fig. 14a) aumentou a proliferação celular quando comparados com o controle. Na linhagem HCT-116 (fig. 14b) o tratamento com EGF não foi eficaz em induzir aumento da proliferação. A concentração de 100 ng/mL de EGF foi usada nos experimentos seguintes.

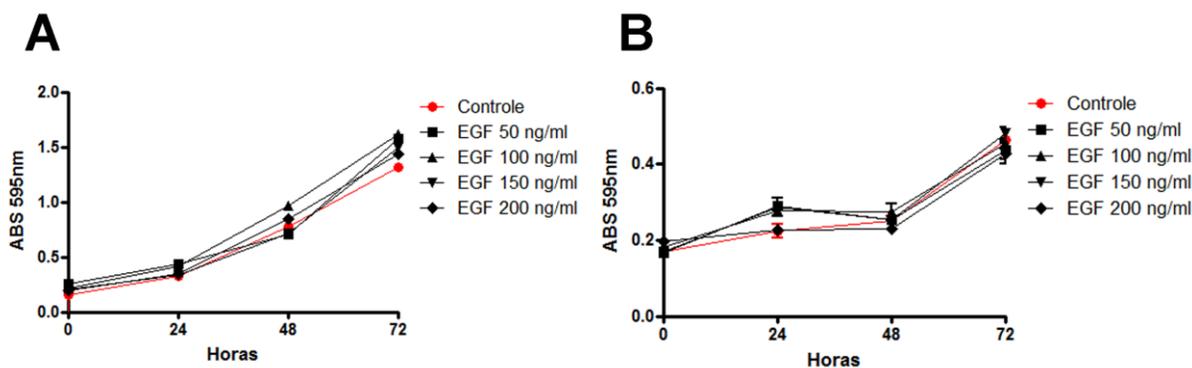


Figura 14: Resposta de crescimento celular após tratamento com EGF. As células HT-29 (a) e HCT-116 (b) foram plaqueadas em uma placa de 96 poços, com volume final de 200 μ L por poço, incluindo meio DMEM com 1% de SFB. Após 4h, elas foram tratadas com diferentes concentrações de EGF (50 ng/mL, 100 ng/mL, 150 ng/mL, 200 ng/mL). A proliferação celular foi quantificada pelo ensaio de Cristal Violeta depois de 24, 48 e 72 horas de tratamento. Nota-se um aumento da proliferação celular com o tratamento de EGF

para a linhagem HT-29, quando comparado ao controle. Resultado representativo de um experimento único.

4.8. Efeitos do Wnt-3a e EGF na expressão de E-caderina em células de câncer colorretal

Sabe-se que a regulação da expressão de E-caderina está relacionada com o desenvolvimento da transição epitélio mesenquimal (TEM), que é crucial para a disseminação e a invasão de células tumorais, além de ser considerada como um regulador negativo da via canônica *Wnt*. Com essas considerações verificamos se o tratamento com EGF e Wnt-3a poderia modular a expressão de E-caderina. Nossos resultados mostraram que não houve alteração na expressão dessa proteína, em nenhuma linhagem celular, entre os tratamentos para o tempo de 24 horas (fig. 15a). No entanto, em ambas as linhagens, no tempo 48 horas (fig. 15b), houve diminuição da expressão de E-caderina com o tratamento com EGF.

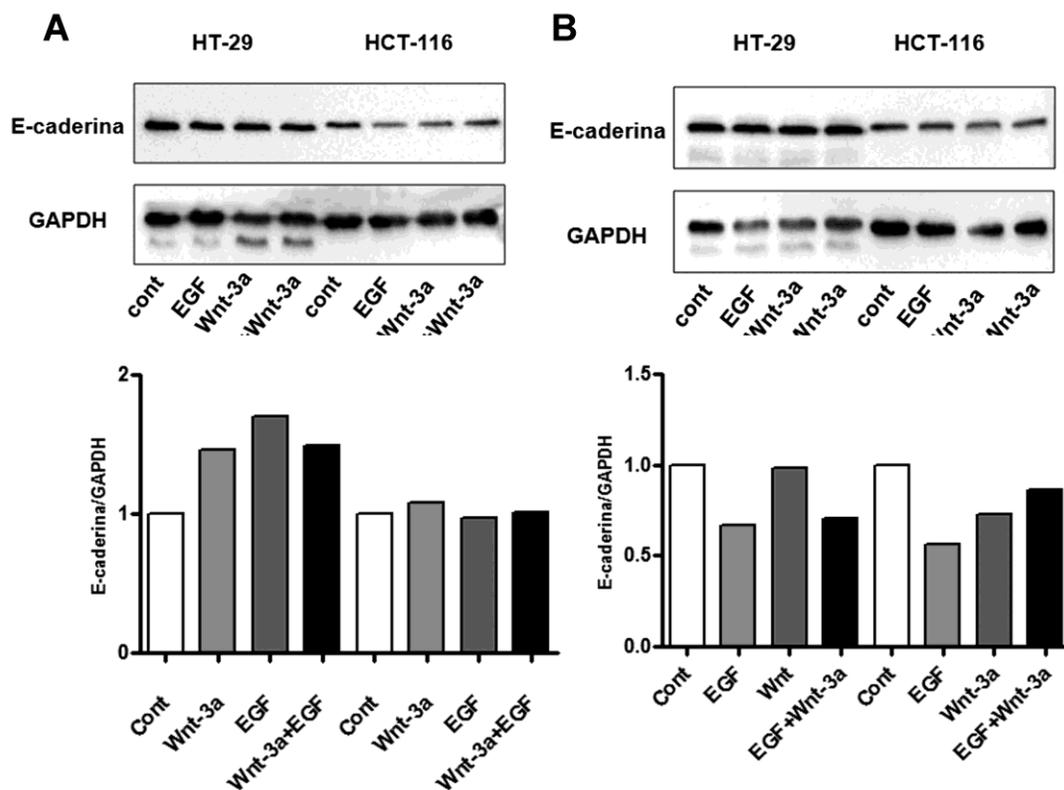


Figura 15: Efeitos do Wnt-3a e EGF na expressão de E-caderina. O perfil de expressão de E-caderina foi analisado por *Western blotting* após o tratamento com Wnt-3a (100 ng/mL), EGF (100 ng/mL) ou ambos. Houve diminuição da expressão de E-caderina com o tratamento com EGF em ambas as linhagens para o tempo de 48 horas. GAPDH foi usado como *housekeeping*. A quantificação foi realizada a partir da razão da densitometria entre E-caderina e GAPDH. Os controles foram normalizados para 1. Resultado representativo de um experimento único.

5. DISCUSSÃO

Os efeitos do tratamento da proteína recombinante Wnt-3a nas linhagens HT-29 e HCT-116 foram verificados, e na presença de 1% de SFB, houve um aumento na atividade transcricional de β -catenina (fig. 8). De fato, a ligação de Wnt-3a ao receptor Frizzled, juntamente com LRP5/6, inviabiliza a formação do complexo de destruição de β -catenina. Essa proteína se acumula no citoplasma com posterior translocação para o núcleo, onde se

liga aos fatores de transcrição Tcf/Lef, ativando diversos genes alvos (VALENTA; HAUSMANN; BASLER, 2012). No entanto, com SFB 10%, o tratamento com Wnt-3a não se mostrou efetivo. Os fatores e indutores presentes no soro e em grande concentração podem estar saturando os receptores, de modo que não há diferença entre os tratamentos.

A curva resposta de crescimento celular (fig. 9) mostrou que IGF-1, em diferentes concentrações, está aumentando a proliferação celular no tempo de 72 horas. De fato, IGF-1 é um fator de crescimento celular e possui papel em estimular a proliferação celular, mitogênese, diferenciação e sobrevivência (LEROITH; ROBERTS, 2003). Esse efeito se dá a partir da sinalização do IGF-1R em vias celulares de proliferação, tais como PI3K e MAPK. No entanto, o efeito não foi dose-dependente. As diferentes concentrações de 50, 100, 150 e 200 ng/u de IGF-1 não mostraram diferença entre elas em ambas as linhagens celulares. Possivelmente, IGF-1 com concentração de 50 ng/mL já seja o suficiente para saturar os receptores IGF-1R presente nas células.

Estudos mostram que a sinalização de IGF-1R inibe a atividade de GSK3- β e ativa a proteína Ras, estimulando a via Wnt/ β -catenina em carcinoma hepatocelular (HSIEH et al., 2013). No entanto, outro estudo mostra que a sinalização de IGF-1R inibe a via Wnt/ β -catenina no desenvolvimento da cabeça em *Xenopus* (RICHARD-PARPAILLON et al., 2002). Em células de CCR humano, IGF-1 causa a fosforilação de β -catenina em seus resíduos de tirosina, isso leva a sua dissociação da E-caderina e seu acúmulo no citoplasma (PLAYFORD et al., 2000). Portanto, a fim de avaliar a interação entre a via Wnt/ β -catenina e a sinalização de IGF-1 na atividade de β -catenina, as células foram tratadas com IGF-1 e Wnt-3a solúveis e a atividade de Tcf/Lef foi medida através do ensaio de luciferase. Como mostra na figura 10, houve ativação de Tcf/Lef com o tratamento com Wnt-3a. O IGF-1 não foi capaz de induzir aumento da atividade transcricional e o tratamento de Wnt-3a em conjunto com IGF-1 não se mostrou diferente quando comparado com Wnt-3a individualmente. Estudos em câncer de orofaringe mostram que apesar de haver interação entre a via Wnt/ β -catenina e a sinalização de IGF, o fator de crescimento não induz a atividade transcricional de Tcf/Lef. Possivelmente, a fosforilação de β -catenina em seus resíduos de tirosina também induz uma diminuição da ligação com Tcf/Lef e, portanto, não influência na atividade transcricional (KIELY et al., 2007).

Com objetivo de avaliar a ativação dos receptores de IGF-1 foi monitorado sua sinalização downstream através da atividade de Akt. O IGF-1 quando ligado ao seu receptor IGF-1R, inicia um sinal intracelular que ativa diversas proteínas quinases, incluindo a PI3K, que fosforila PIP2 na membrana criando um sítio de ligação para Akt que é em seguida, fosforilada (VIGNERI et al., 2015). A atividade de Akt foi avaliada nas linhagens celulares HT-29 e HCT-116 tratadas com Wnt-3a, IGF-1 ou ambos (fig. 11). No tratamento com Wnt-3a não houve alteração da fosforilação de Akt. A linhagem celular HCT-116 possui uma mutação no gene PIK3CA, gene que transcreve para o domínio catalítico p110 α da PI3K. Essa mutação torna a via constitutivamente ativa, por isso essa linhagem possui níveis basais de atividade de Akt (SAMUELS et al., 2005). O tratamento das células com IGF-1 induziu aumento da fosforilação de Akt em ambas as linhagens, mostrando-se ser, de fato, um indutor da via PI3K/Akt. O tratamento de IGF-1 em conjunto com Wnt-3a não se mostrou diferente quando comparado com IGF-1 sozinho.

A interação da sinalização de IGF-1 e Wnt/ β -catenina na proliferação celular foi avaliada. Os tratamentos, tanto na linhagem HT-29 (a) como na linhagem HCT-116 (b), não mostraram diferença na proliferação celular em soro 1%. Alguns tipos de câncer, como no caso do CCR, superexpressam tanto IGF-1R como receptor de insulina (IR). Devido à similaridade desses receptores, receptores híbridos (HR) podem ser formados. Esses receptores possuem mais afinidade para IGF-1 do que para insulina (BELFIORE, 2007). Possivelmente, em CCR, IGF-1 esteja se ligando com mais afinidade à HR do que IGF-1R e por isso, exercendo efeitos metabólicos em vez de mitogênicos.

O próximo passo foi avaliar a interação das vias na migração celular. O IGF-1 não foi capaz de estimular a migração celular, em nenhuma das linhagens (fig. 13). No entanto, no tratamento conjunto com Wnt-3a e IGF-1 foi evidenciado um aumento da migração para ambas as linhagens quando comparado com os tratamentos individuais. De fato, a sinalização de IGF-1, em células de CCR humano, causa a fosforilação de β -catenina em seus resíduos de tirosina, levando à sua dissociação da E-caderina e seu acúmulo no citoplasma. Isso desregula as junções celulares, podendo promover eventos relacionados à migração (PLAYFORD et al., 2000).

Visto que a sinalização de IGF-1 estava pouco interagindo com a via Wnt/ β -catenina, outro fator de crescimento, EGF, foi usado para avaliar alguma interação. A

sinalização de EGF induz diversas vias, além das MAPK e PI3K, tais como JAK e PLC γ (WIEDUWILT; MOASSER, 2008). A sinalização de EGF promove migração celular e invasão em células cancerígenas (BARR et al., 2008). O EGF induz, de fato, a proliferação celular como mostra a figura 14. O EGF também é conhecido por induzir a expressão do repressor transcricional Snail correlacionando com uma down-regulação de E-caderina em células cancerígenas (LU et al., 2003). Como mostra a figura 15, a expressão de E-caderina foi reduzida quando houve tratamento de EGF. Esse efeito foi visto somente no tratamento por 48 h devido à tamanha complexidade de indução gênica do repressor e posterior inibição da transcrição de E-caderina (JI et al., 2009).

Todos esses resultados indicam uma possível interação entre a via Wnt/ β -catenina e a sinalização de fatores de crescimento EGF e IGF-1. O tratamento com Wnt-3a induziu ativação de Tcf/Lef, porém não foi capaz de estimular a migração nem a proliferação. Esses efeitos acontecem na presença dos fatores de crescimento. Os tratamentos com os fatores de crescimento IGF-1 e EGF induziram aumento da proliferação celular em ambas as linhagens. A expressão de E-caderina foi reduzida com o tratamento com EGF. Isso indica que há uma interação entre a sinalização de fatores de crescimento e a via Wnt/ β -catenina contribuindo para a progressão do câncer colorretal contribuindo para a melhor compreensão deste tipo de câncer.

Tanto a via Wnt/ β -catenina quanto a sinalização de fatores de crescimento são importantes para a progressão de CCR. Enquanto a via Wnt/ β -catenina foi responsável pela indução da transcrição de genes, a sinalização de IGF-1 e EGF foi responsável por induzir a proliferação de células cancerígenas. O papel individual dessas cascatas é bem elucidado em CCR. No entanto, a interação dessas duas sinalizações ainda não é bem esclarecido. Nossos resultados mostraram que ambos os tratamentos agem mutualmente, estimulando a migração celular. Mais estudos são necessários para confirmar essa interação e os mecanismos por trás desse evento na malignidade de CCR. Sendo possível a elucidação de mecanismos de evolução dessa doença e postular possíveis tratamentos terapêuticos.

6. CONCLUSÃO

A via Wnt/ β -catenina foi ativada a partir do tratamento com Wnt-3a solúvel somente, visto que a atividade transcricional de Tcf/Lef foi aumentada. Esse efeito não foi visto no tratamento com IGF-1. O tratamento com fatores de crescimento induziu a proliferação celular. A expressão de E-caderina se mostrou reduzida quando as células foram tratadas com EGF. Todos esses resultados indicam que esses fatores são, de fato, importantes para a progressão do CCR. Além disso, a partir da análise de migração das células, parece haver uma interação entre a sinalização de fatores de crescimento e a via Wnt/ β -catenina. Essa interação pode não ser pela atividade transcricional de β -catenina, mas sim a partir da desregulação das junções celulares, promovendo um fenótipo mais migratório. Mais estudos são necessários para confirmar essa interação, além de avaliar os possíveis mecanismos por trás desse efeito.

7. REFERÊNCIAS

ANWAR, M. et al. Frequent activation of the β -catenin gene in sporadic colorectal carcinomas: A mutational & expression analysis. **Molecular carcinogenesis**, v. 55, n. 11, p. 1627–1638, nov. 2016.

ARVELO, F.; SOJO, F.; COTTE, C. Biology of colorectal cancer. **ecancermedicalsecience**, v. 9, p. 520, 9 abr. 2015.

BALBAA, M. **Importance of Growth Factors** *Biochemistry & Physiology: Open Access OMICS International*, , 2013. Disponível em: <<http://www.omicsgroup.org/journals/importance-of-growth-factors-2168-9652.1000e118.php?aid=20791>>

BARKER, N.; CLEVERS, H. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, n. 12, p. 997–1014, dez. 2006.

BARR, S. et al. Bypassing cellular EGF receptor dependence through epithelial-to-

mesenchymal-like transitions. **Clinical & experimental metastasis**, v. 25, n. 6, p. 685–693, 2008.

BASU, S.; HAASE, G.; BEN-ZE'EV, A. Wnt signaling in cancer stem cells and colon cancer metastasis. **F1000Research**, v. 5, p. F1000 Faculty Rev-699, 19 abr. 2016.

BELFIORE, A. The role of insulin receptor isoforms and hybrid insulin/IGF-I receptors in human cancer. **Current pharmaceutical design**, v. 13, n. 7, p. 671–686, 2007.

BLAJ, C. et al. ADNP is a therapeutically inducible repressor of WNT signaling in colorectal cancer. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, nov. 2016.

BRENNER, H.; KLOOR, M.; POX, C. P. Colorectal cancer. **Lancet (London, England)**, v. 383, n. 9927, p. 1490–1502, abr. 2014.

BUSCH, E. L.; MCGRAW, K. A.; SANDLER, R. S. The potential for markers of epithelial-mesenchymal transition to improve colorectal cancer outcomes: a systematic review. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 23, n. 7, p. 1164–1175, jul. 2014.

CAO, H. et al. Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. **Pathology, research and practice**, v. 211, n. 8, p. 557–569, ago. 2015.

CHAKRABORTY, S. et al. Constitutive and ligand-induced EGFR signalling triggers distinct and mutually exclusive downstream signalling networks. **Nature communications**, v. 5, p. 5811, dez. 2014.

FERREIRA, A. R.; FELGUEIRAS, J.; FARDILHA, M. Signaling pathways in anchoring junctions of epithelial cells: cell-to-cell and cell-to-extracellular matrix interactions.

Journal of receptor and signal transduction research, v. 35, n. 1, p. 67–75, fev. 2015.

FUJIMURA, Y.; IIDA, M. A new marker for cup cells in the rabbit small intestine: expression of vimentin intermediate filament protein. **Medical electron microscopy : official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan**, v. 34, n. 4, p. 223–229, dez. 2001.

GERBE, F.; LEGRAVEREND, C.; JAY, P. The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 17, p. 2907–2917, 19 set. 2012.

GLOBOCAN. **Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>.

GRAY, H.; LEWIS, W. H. Anatomy of the Human Body. In: LEA & FEBIGER (Ed.). . 20th ed. ed. Philadelphia: [s.n.].

GUINNEY, J. et al. The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer. **Nature medicine**, v. 21, n. 11, p. 1350–1356, 12 nov. 2015.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. In: ELSEVIER (Ed.). . **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

HE, S. et al. Expression of Lgr5, a marker of intestinal stem cells, in colorectal cancer and its clinicopathological significance. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 68, n. 5, p. 507–513, jun. 2014.

HEIDEGGER, I. et al. The insulin-like growth factor (IGF) axis as an anticancer target in prostate cancer. **Cancer letters**, v. 367, n. 2, p. 113–121, out. 2015.

HSIEH, C.-H. et al. Apicidin-resistant HA22T hepatocellular carcinoma cells strongly

activated the Wnt/beta-catenin signaling pathway and MMP-2 expression via the IGF-IR/PI3K/Akt signaling pathway enhancing cell metastatic effect. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 77, n. 12, p. 2397–2404, 2013.

ILYAS, M.; TOMLINSON, I. P. The interactions of APC, E-cadherin and beta-catenin in tumour development and progression. **The Journal of pathology**, v. 182, n. 2, p. 128–137, jun. 1997.

INCA. **Estimativa 2016**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>>.

IVANOV, A. I.; NAYDENOV, N. G. Dynamics and regulation of epithelial adherens junctions: recent discoveries and controversies. **International review of cell and molecular biology**, v. 303, p. 27–99, 2013.

JASPERSON, K.; BURT, R. W. The Genetics of Colorectal Cancer. **Surgical oncology clinics of North America**, v. 24, n. 4, p. 683–703, out. 2015.

Jl, H. et al. EGF-induced ERK activation promotes CK2-mediated disassociation of alpha-Catenin from beta-Catenin and transactivation of beta-Catenin. **Molecular cell**, v. 36, n. 4, p. 547–559, nov. 2009.

KIELY, B. et al. Beta-catenin transcriptional activity is inhibited downstream of nuclear localisation and is not influenced by IGF signalling in oesophageal cancer cells. **International journal of cancer**, v. 121, n. 9, p. 1903–1909, nov. 2007.

LEROITH, D.; ROBERTS, C. T. J. The insulin-like growth factor system and cancer. **Cancer letters**, v. 195, n. 2, p. 127–137, jun. 2003.

LESLIE, A. et al. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. **The British journal of surgery**, v. 89, n. 7, p. 845–860, jul. 2002.

LIAO, D.-H.; ZHAO, J.-B.; GREGERSEN, H. Gastrointestinal tract modelling in health and disease. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 15, n. 2, p. 169–176, 14 jan. 2009.

LU, Z. et al. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. **Cancer cell**, v. 4, n. 6, p. 499–515, dez. 2003.

MORENO, C. C. et al. Colorectal Cancer Initial Diagnosis: Screening Colonoscopy, Diagnostic Colonoscopy, or Emergent Surgery, and Tumor Stage and Size at Initial Presentation. **Clinical colorectal cancer**, v. 15, n. 1, p. 67–73, mar. 2016.

NEGRONI, A.; CUCCHIARA, S.; STRONATI, L. Apoptosis, Necrosis, and Necroptosis in the Gut and Intestinal Homeostasis. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 250762, 21 set. 2015.

NORMANNO, N. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. **Gene**, v. 366, n. 1, p. 2–16, jan. 2006.

NOVELLASDEMUNT, L.; ANTAS, P.; LI, V. S. W. Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A Review in the Theme: Cell Signaling: Proteins, Pathways and Mechanisms. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 309, n. 8, p. C511-21, out. 2015.

PAVELIC, K.; BUKOVIĆ, D.; PAVELIĆ, J. The role of insulin-like growth factor 2 and its receptors in human tumors. **Molecular Medicine**, v. 8, n. 12, p. 771–780, dez. 2002.

PHILPOTT, A.; WINTON, D. J. Lineage selection and plasticity in the intestinal crypt. **Current opinion in cell biology**, v. 31, p. 39–45, dez. 2014.

PLAYFORD, M. P. et al. Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of beta-catenin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**

of the United States of America, v. 97, n. 22, p. 12103–12108, out. 2000.

RAJAGOPALAN, H. et al. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 9, p. 695–701, set. 2003.

RICHARD-PARPAILLON, L. et al. The IGF pathway regulates head formation by inhibiting Wnt signaling in *Xenopus*. **Developmental biology**, v. 244, n. 2, p. 407–417, abr. 2002.

SAMUELS, Y. et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. **Cancer cell**, v. 7, n. 6, p. 561–573, jun. 2005.

SASAKI, N. et al. Reg4(+) deep crypt secretory cells function as epithelial niche for Lgr5(+) stem cells in colon. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 37, p. E5399–E5407, 13 set. 2016.

SINGH, A. B.; DHAWAN, P. Claudins and cancer: Fall of the soldiers entrusted to protect the gate and keep the barrier intact. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 42, p. 58–65, jun. 2015.

SOBANI, Z. A. et al. Oncogenic fingerprint of epidermal growth factor receptor pathway and emerging epidermal growth factor receptor blockade resistance in colorectal cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 7, n. 5, p. 340–351, 10 out. 2016.

STIGLIANO, V. et al. Early-onset colorectal cancer: A sporadic or inherited disease? **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 20, n. 35, p. 12420–12430, 21 set. 2014.

SUN, S.; KLEBANER, F.; TIAN, T. A new model of time scheme for progression of colorectal cancer. **BMC Systems Biology**, v. 8, n. Suppl 3, p. S2–S2, 22 out. 2014.

SUZUKI, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. **Cellular**

and molecular life sciences : CMLS, v. 70, n. 4, p. 631–659, fev. 2013.

TROIANI, T. et al. Therapeutic value of EGFR inhibition in CRC and NSCLC: 15 years of clinical evidence. **ESMO Open**, v. 1, n. 5, p. e000088, 16 set. 2016.

VALENTA, T.; HAUSMANN, G.; BASLER, K. The many faces and functions of beta-catenin. **The EMBO journal**, v. 31, n. 12, p. 2714–2736, jun. 2012.

VAN DER FLIER, L. G.; CLEVERS, H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. **Annual review of physiology**, v. 71, p. 241–260, 2009.

VIDAL, F. et al. Lithium reduces tumorigenic potential in response to EGF signaling in human colorectal cancer cells. **International journal of oncology**, v. 38, n. 5, p. 1365–1373, maio 2011.

VIGNERI, P. G. et al. The Insulin/IGF System in Colorectal Cancer Development and Resistance to Therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 5, p. 230, 15 out. 2015.

WIEDUWILT, M. J.; MOASSER, M. M. The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 65, n. 10, p. 1566–1584, maio 2008.

WINKELS, R. M. et al. The COLON study: Colorectal cancer: Longitudinal, Observational study on Nutritional and lifestyle factors that may influence colorectal tumour recurrence, survival and quality of life. **BMC Cancer**, v. 14, p. 374, 27 maio 2014.

WU, W. K. K. et al. Dysregulation and crosstalk of cellular signaling pathways in colon carcinogenesis. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 86, n. 3, p. 251–277, jun. 2013.

ZHAN, T.; RINDTORFF, N.; BOUTROS, M. **Wnt signaling in cancer** *Oncogene* The

Author(s) , 12 set. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/onc.2016.304>>

ZHANG, R. et al. The role of insulin-like growth factor 1 and its receptor in the formation and development of colorectal carcinoma. **The Journal of international medical research**, v. 41, n. 4, p. 1228–1235, ago. 2013.

ZIELINSKA, H. A. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer: a role for insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding protein 3? **Breast Cancer : Targets and Therapy**, v. 7, p. 9–19, 19 jan. 2015.