

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

BIOMEDICINA

MICHELLE DE SOUZA FERREIRA

**A SINALIZAÇÃO POR INSR/IGF1R AFETA OS NÍVEIS DE N-GLICANOS  
COMPLEXOS EM CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL**

RIO DE JANEIRO  
2018

MICHELLE DE SOUZA FERREIRA

**A SINALIZAÇÃO POR INSR/IGF1R AFETA OS NÍVEIS DE N-GLICANOS  
COMPLEXOS EM CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL**

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

RIO DE JANEIRO  
2018

MICHELLE DE SOUZA FERREIRA

A SINALIZAÇÃO POR INSR/IGF1R AFETA OS NÍVEIS DE N-GLICANOS  
COMPLEXOS EM CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL

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

Aprovada em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2018

BANCA EXAMINADORA

---

Ms. Annie Cristhine M. S. Squiavinato – INCA

---

Dr. Wallace Martins de Araújo – INCA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr. Claudia Cardoso Netto – UNIRIO  
(Coorientadora)

“Qualquer um podia deixar-se seduzir pela pesquisa quando os resultados apareciam aos montes. O difícil era amá-la quando eles não vinham e as razões disso eram difíceis de entender.”

- Alice Rowland (Para Sempre Alice)

## AGRADECIMENTOS

À minha família pelo amor e dedicação, durante toda a trajetória, que me tornou a pessoa que sou hoje, em especial a minha avó Francisca, que mesmo por pouco tempo de convivência, impactou na escolha de onde estou e qual caminho quero trilhar.

Aos membros do Programa de Oncobiologia Celular e Molecular, ao Dr. José Morgado por ter me acolhido em seu laboratório, possibilitando uma grande oportunidade profissional e de aprendizado. A todos os colegas do grupo, por terem me acolhido, ajudado e tornado o ambiente mais descontraído e divertido. Em especial para as “GlicoGirls”: Amélia que esteve presente no meu primeiro contato com diversas técnicas, encorajando a “botar a mão na massa” para aprender, Érika que mesmo antes de fazer parte de nosso grupo, já me socorria nos intermináveis “*blottings*” e Jéssica, por toda a paciência em me acompanhar, seja nas minhas primeiras vezes na cultura ou durante todos os “perrengues”, sempre tirando minhas dúvidas. Por último, mas não menos importante, ao meu orientador Julio, que me deu a chance de estar aqui hoje, agradeço pelas palavras de incentivo, paciência durante estes dois anos e todo ensinamento, não poderia estar mais satisfeita em fazer parte deste grupo.

A todos os professores que fizeram parte da minha jornada, todos tiveram um papel fundamental em minha formação.

Aos meus amigos, que nestes quatro anos não desistiram de mim mesmo eu “dando bolo” várias vezes. Obrigada por terem aguentado os surtos e sofrido junto comigo. Ao meu período 2014.2, que sempre se manteve unido, aos que fazem parte do grupo “Momentos”, obrigada por todas as risadas e por terem tornado a faculdade inesquecível.

Ao Raphael, por ser muito mais que um companheiro, por nunca ter negado apoio, sempre presente, por ter confiado e incentivado mesmo quando eu estava descrente. Obrigada por todo amor.

## RESUMO

O câncer representa um grave problema de saúde pública no mundo, visto que é uma das principais causas de morte em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Durante sua progressão, diversas alterações genéticas e moleculares afetam a funcionalidade de proteínas relacionadas à sinalização, incluindo aquelas que fazem parte do sistema insulina/fator de crescimento semelhante à insulina (IGF). Alterações metabólicas que resultam em glicosilação aberrante também são consideradas um dos pilares do câncer, pois evidências robustas sustentam que modificações que afetam os níveis dos glicanos podem modular tanto migração, adesão e sinalização celular quanto o estabelecimento de metástases. Embora diversos estudos, de forma independente, tenham contribuído para uma melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos e patológicos mediados pelo sistema insulina/IGF e por glicanos, abordagens integradas relacionando este sistema a alterações na glicosilação de proteínas não têm sido exploradas em câncer colorretal (CCR). O objetivo deste estudo é compreender como os distúrbios no sistema insulina/IGF em CCR afetam o fenótipo maligno e os níveis de *N*-glicanos complexos, sobretudo aqueles com ramificações do tipo  $\beta$ 1,6-*N*-acetilglicosamina ( $\beta$ 1,6-GlcNAc), que são produtos da enzima *N*-acetilglicosamiltransferase V (MGAT5), conhecidos por estarem relacionados tanto à desestabilização de junções aderentes, quanto à manutenção da estabilidade de receptores na membrana. Assim sendo, foi utilizado o OSI-906 – um inibidor potente e altamente seletivo de moléculas de tirosina quinase, que inibe a autofosforilação de receptores de insulina (INSR) e IGF1 (IGF1R) – para o tratamento das células HCT-116 e HT-29. Em ambas ocorreu uma diminuição significativa da viabilidade após o tratamento. Além disso, foi visto que a inibição da via de insulina/IGF afeta tanto os níveis quanto a localização de proteínas de junção (E-caderina e  $\beta$ -catenina). O tratamento com OSI-906 promoveu também uma mudança morfológica em HCT-116, caracterizada por um maior nível de compactação celular. Em relação a esta linhagem, dois esquemas de tratamento foram mantidos, sendo um utilizando apenas OSI-906, e outro em que houve estímulo com IGF previamente ao tratamento com o inibidor. Nas duas condições, ocorreu uma diminuição nos níveis de *N*-glicanos com ramificações do tipo  $\beta$ 1,6-GlcNAc, o que também foi observado em células HT-29 tratadas com OSI-906. Conjuntamente, os resultados sugerem uma correlação entre sinalização por INSR/IGF1R e a regulação dos níveis de *N*-glicanos com ramificações do tipo  $\beta$ 1,6-GlcNAc.

**Palavras-chaves:** sinalização celular, INSR/IGF1R, glicanos, câncer colorretal

## ABSTRACT

Cancer represents a serious public health problem in the world, as it is one of the leading causes of mortality in developed and developing countries. During its progression, several genetic and molecular changes affect the functionality of signaling-related proteins, including those that are part of the insulin/insulin-like growth factor (IGF) system. Metabolic changes that culminate in aberrant glycosylation are also considered to be a hallmark of cancer, because evidence has shown that glycans can modulate cell migration, cell-cell adhesion, cell signaling, and metastasis. Although several studies have contributed to a better understanding of the physiological and pathological molecular mechanisms mediated by insulin/IGF system and glycans independently, an integrated approach linking this system to glycosylation changes in colorectal cancer (CRC) development remains lacking. The aim of this study is to understand how disturbances in the insulin/IGF system in CRC affect both malignant phenotype and *N*-glycan expression pattern, mainly concerning  $\beta$ 1,6-GlcNAc branched *N*-glycans, which are products of the *N*-acetylglucosaminyltransferase V (MGAT5), known to be involved in destabilization of adherens junctions. For this purpose, OSI-906 - a potent and highly selective inhibitor of tyrosine kinase molecules that inhibit insulin receptor (INSR) and IGF1 (IGF1R) autophosphorylation - was used for the treatment of HCT-116 and HT-29 cells. In both, a significant decrease in viability after treatment occurred. Moreover, inhibition of the insulin/IGF pathway has been seen to affect both the levels and the localization of junction proteins (E-cadherin and  $\beta$ -catenin). Treatment with OSI-906 also promoted a morphological change in HCT-116, characterized by a higher level of cell compaction. In relation to this lineage, two treatment strategies were maintained, one with OSI-906 alone, and another with IGF stimulated prior to treatment with the inhibitor. Under both conditions, there was a decrease in *N*-glycan levels with  $\beta$ 1-6-GlcNAc branched *N*-glycans (L-PHA positive), which was also observed in HT-29 cells treated only with OSI-906. Together, these preliminary findings indicate a correlation between INSR/IGF1R signaling and the regulation of levels of  $\beta$ 1,6-GlcNAc branched *N*-glycans.

**Keywords:** signaling, INSR/IGF1R, glycans, colorectal cancer

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil segundo estimativas para 2018 .....	17
Figura 2 - Desenvolvimento do câncer colorretal .....	21
Figura 3 - As principais alterações genéticas e seus respectivos mecanismos celulares desencadeados .....	22
Figura 4 - Súmula das alterações celulares ao longo do processo de EMT .....	25
Figura 5 - Representação esquemática dos glicoconjugados mais comuns nas células de mamíferos.....	27
Figura 6 - Representação esquemática dos dois principais tipos de glicanos que modificam proteínas .....	28
Figura 7- Principais etapas da <i>N</i> -glicosilação .....	28
Figura 8 - Mecanismos celulares mediados por glicanos .....	30
Figura 9 - Papel dos glicanos na progressão tumoral .....	31
Figura 10 - MGAT3 e MGAT5 modulam o comportamento celular nos estágios iniciais e tardios do CCR .....	33
Figura 11 - Alterações específicas de glicosilação no CCR a partir da exacerbação da via de HBP. ....	35
Figura 12 - O sistema insulina/fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) .....	39
Figura 13 - Modelo proposto: Glicanos e o sistema insulina/IGF no câncer, um mecanismo integrado .....	42
Figura 14 - Efeitos do tratamento com OSI-906 sobre a viabilidade de células de CCR .....	47
Figura 15 - Avaliação da eficiência do tratamento com OSI-906 em células de CCR .....	49
Figura 16 - Efeitos da repressão da sinalização mediada por INSR/IGF1R sobre os níveis de <i>N</i> -glicanos nas células HCT6-116 e HT-29 .....	51
Figura 17 - Efeitos do tratamento com OSI-906 sobre os níveis de proteínas das constituintes das junções aderentes em células de CCR .....	54



Figura 18 - Efeitos do tratamento com OSI-906 sobre o citoesqueleto e proteínas das constituintes das junções aderentes em células de CCR ..... 55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC - do inglês, *adenomatous poliposis coli*  
Asn- asparagina  
ATCC - *American Type Culture Collection*  
BRAF - do inglês, *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*  
CCR - câncer colorretal  
CIMP- do inglês, *CpG island methylator phenotype*  
CIN - do inglês, *Chromosomal Instability*  
CMS - do inglês, *consensus molecular subtype*  
CSC- *do inglês, cancer stem cells*  
CTNNB1- do inglês, *catenin beta 1*  
EMT- do inglês, *epitelial-mesenchymal transition*  
E-PHA - *Phaseolus Vulgaris E*  
FAP - do inglês, *familiar adenomatous polyposis*  
Fuc- fucose  
Gal- galactose  
GalNAc- *N-acetilgalactosamina*  
Gcgr- do inglês, *glucagon receptor precursor*  
Glc- glicose  
GLcA - ácido glicurônico  
GLcN- glicosamina  
GlcNAc- *N-acetilglicosamina*  
GSK- 3 $\beta$  - glicogênio sintase quinase 3 beta  
HK - hexoquinase  
HNPCC - do inglês, *Hereditary nonpolyposis colorectal câncer*  
Ido-A - ácido idurônico  
IGF- do inglês, *insulin like growth factor*  
IGF2 - do inglês, *insulin like growth factor 2*  
IGFBP - do inglês, *insulin-like growth factor-binding protein*  
IGF1R - do inglês, *insulin like growth factor 1 receptor*  
INSR - do inglês, *insulin receptor*

IRS - do inglês, *insulin receptor substrate*

JA - junção aderente

JT- junção *tight*

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

LDH - lactato desidrogenase

L-PHA- *Phaseolus Vulgaris L*

Man- manose

MGAT3 - *N*-acetilglicosamiltransferase III

MGAT5 - *N*-acetilglicosamiltransferase V

MLH1- do inglês, mutL homolog 1

MMP- do inglês, *matrix metalloproteinase*

MSI - do inglês, *Microsatellite Instability*

MSS - do inglês, *microsatellite stable*

NeuAc - ácido *N*-acetilneuramínico

OST - oligossacariltransferase

PBS - solução salina, do inglês *phosphate buffered saline*

PIK3CA - do inglês, *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*

Ser- serina

SFB – Soro fetal bovino

SMAD4 - do inglês, *SMAD family member 4*

TCF/LEF - do inglês, *T-cell factor/lymphoid enhancer factor*

TGFBR2 - do inglês, *transforming growth factor beta receptor 2*

TGF- $\beta$  - do inglês, *transforming growth factor- $\beta$*

TGF- $\beta$ R - TGF $\beta$  receptor

Thr- treonina

TIMP-1 - do inglês, *tissue inhibitor of metalloproteinase-1*

TP53 - do inglês, *tumor protein p53*

Tyr- tirosina

UDP- uridina difosfato

Wnt - do inglês, *Wingless-type MMTV integration site family*

XIAP - do inglês, *X-linked inhibitor of apoptosis protein*

Xyl- xilose

$\beta$ 1,6GlcNAc -  $\beta$ 1,6-*N*-acetilglicosamina

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
1.1 Câncer.....	15
1.2 Câncer colorretal (CCR).....	16
1.2.1 Incidência e fatores de risco.....	16
1.2.2 Bases celulares e moleculares do CCR: uma abordagem integrada .....	18
1.2.3 Subtipos moleculares do CCR .....	23
1.2.4 Processo de Transição Epitélio-Mesenquimal e seu envolvimento na progressão do CCR .....	24
1.3 Glicosilação de proteínas .....	26
1.3.1 Introdução .....	26
1.3.2 Papel biológico dos glicanos .....	29
1.3.3 Glicosilação aberrante durante a progressão tumoral.....	30
1.4 Sistema insulina/fator de crescimento semelhante à insulina (IGF).....	37
1.4.1 Sistema Insulina/IGF: ligantes, proteínas de ligação e receptores.....	37
1.4.2 Proteínas <i>downstream</i> .....	38
1.4.3 Impacto do Sistema Insulina/IGF no desenvolvimento e progressão do câncer .....	40
2 OBJETIVO .....	43
2.1 GERAL .....	43
2.2 ESPECÍFICOS .....	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	44
3.1 CULTURA DE CÉLULAS E TRATAMENTO COM OSI-906 e IGF1 .....	44
3.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR .....	44
3.3 LECTINAS.....	45
3.4 CITOMETRIA DE FLUXO .....	45
3.5 WESTERN BLOTTING .....	45
3.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	46

3.7 DENSITOMETRIA E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	47
4 RESULTADOS.....	47
4.1 As linhagens celulares de CCR (HCT-116 e HT-29) tratadas com o inibidor OSI-906 sofrem diminuição em sua viabilidade .....	47
4.2 O tratamento de células de CCR (HCT-116 e HT-29) com OSI-906 inibe a fosforilação dos receptores de insulina (INSR) e IGF1 (IGF1R) .....	48
4.3 Repressão da sinalização INSR/IGF afeta os níveis de diferentes <i>N</i> -glicanos nas células HCT-116 e HT-29.....	50
4.4 A Inibição da via de insulina/IGF1 afeta os níveis de proteínas que compõem as junções aderentes .....	53
4.5 A inibição da via de insulina/IGF promove mudança na conformação nas células HCT-116 .....	55
5. DISCUSSÃO .....	56
6. CONCLUSÕES .....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer

O câncer representa um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo, visto que é uma das principais causas de morte tanto em países em desenvolvimento quanto naqueles considerados desenvolvidos. Estima-se que em 2018 ocorrerão 18,1 milhões de novos casos de câncer (17 milhões excetuando câncer de pele não melanoma) e 9,6 milhões de óbitos (BRAY et al., 2018). No Brasil, as estimativas para o biênio 2018/2019 são de 1,2 milhão de novos casos da doença, sendo 582 mil (300 mil em homens e 282 mil em mulheres) apenas para o ano 2018 (INCA, 2017). Além disso, as neoplasias malignas já correspondem a segunda causa de morte mais frequente em nosso país, superada apenas pelas doenças cardiovasculares (INCA, 2011).

A palavra câncer é utilizada para designar um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado e a capacidade de se disseminar por diferentes tecidos e órgãos. É de origem multifatorial, ou seja, são diversos os fatores que concorrem, e até mesmo se sobrepõem, para o seu surgimento e progressão.

Enquanto nos países de baixo e médio desenvolvimento ainda é alta a ocorrência dos tipos de câncer associados a infecções (colo do útero, estômago, esôfago, fígado), nos países desenvolvidos predominam os tipos de câncer associados ao estilo de vida (TORRE et al., 2015). No Brasil, observa-se que as regiões Sul e Sudeste são mais semelhantes aos países desenvolvidos no que tange a incidência dos mais variados tipos de câncer, pois diversos fatores de risco comuns em países desenvolvidos são prevalentes na população destas regiões, tais como: excesso de peso, sedentarismo, tabagismo, alto consumo de carnes processadas e etilismo. Ademais, as regiões Sul e Sudeste concentram cerca de 70% da ocorrência de casos novos do país, sendo a região Sudeste responsável por quase a metade desta incidência (INCA, 2017), predominando nestas áreas o desenvolvimento de tumores de próstata, mama e colorretal (FERLAY et al., 2015)



## **1.2 Câncer colorretal (CCR)**

### **1.2.1 Incidência e fatores de risco**

Entre os cânceres que mais acometem a população, o CCR é um dos que causam maior impacto socioeconômico e de saúde pública, uma vez que é a terceira neoplasia maligna mais comumente diagnosticada e a segunda principal causa de morte relacionada ao câncer em todo o mundo (BRAY et al., 2018). Nas últimas décadas, houve um aumento significativo na incidência de CCR, sobretudo daqueles precocemente diagnosticados, o que levou o número de casos de 783 mil em 1990 para 1,8 milhão em 2018 (BRAY et al., 2018; FERLAY et al., 2015b; RAFIEMANESH et al., 2016). No Brasil, conforme retratado na Figura 1, o CCR representa o terceiro tipo de câncer mais frequente entre os homens e o segundo em mulheres (INCA, 2017). Sabe-se também que aqueles pacientes que possuem a doença localizada apresentam uma sobrevida média global (taxa de sobrevivência cinco anos após a realização do diagnóstico) de até 90%. Sendo assim, diagnosticar precocemente o CCR é de extrema importância já que quando diagnosticados em estágios intermediários, possuem uma sobrevida estimada de 70%, enquanto os que são diagnosticados em estágios avançados, a estimativa decresce para apenas 12% (DESANTIS et al., 2014).



**Figura 1:** DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES NO BRASIL SEGUNDO ESTIMATIVAS PARA 2018 POR SEXO, EXCETO PELE NÃO MELANOMA\*. Retirado de Estimativas 2018: Incidência de Câncer no Brasil. INCA-RJ

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	<b>Homens</b>		Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%
							<b>Mulheres</b>
							

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

O desenvolvimento do CCR está intimamente relacionado à interação de condições genéticas e ambientais, sendo assim, diversos fatores de risco são considerados relevantes, tais como: predisposição genética, idade avançada, doenças inflamatórias que acometem o intestino (doença de Crohn e retocolite ulcerativa), dieta rica em embutidos e carne vermelha, além de etilismo e tabagismo (DOMINGO; NADAL, 2017; KASTRINOS; STOFFEL, 2014).

Aproximadamente 80% dos pacientes que desenvolvem o CCR são de forma esporádica, no entanto, não se deve menosprezar o papel da predisposição genética em sua etiologia. Desta forma, o CCR pode ser distinguido por sua origem em: a) esporádico (sem qualquer relação familiar, não apresentando mutação que os tornariam suscetível a doença); b) familiar (possuem membros da família de consanguinidade primária que sofreram de CCR esporádico, apresentando assim um risco de duas a três vezes maior em desenvolver a doença do que a população normal); e c) hereditário (resultante de mutações na linhagem germinativa, ocasionando uma predisposição genética para o desenvolvimento da FAP (do inglês *Familial Adenomatous Polyposis*) ou Síndrome de Lynch (LIN, 2012; SAIF; CHU, 2010).

A forma poliposa, denominada FAP, representa a segunda desordem hereditária mais comum em CCR, correspondendo a 1% dos casos da doença (MA et al., 2018). É caracterizada por ser autossômica dominante, causada por uma

mutação germinativa no gene supressor tumoral *APC* (do inglês, *Adenomatous Poliposis Coli*), culminando assim no aparecimento de múltiplos pólipos que, na ausência de cirurgia preventiva, podem tornar-se malignos, geralmente em torno dos 40 anos de idade (DE CAMPOS et al., 2010). Já o câncer colorretal hereditário não-poliposo (também conhecido como síndrome de Lynch ou como HNPCC (do inglês *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer*), está implicado em 2-4% dos casos da doença, sendo caracterizado pela alta capacidade em desenvolver carcinomas extra intestinais. É causado pela mutação germinativa em genes de reparo de DNA responsáveis por correções no pareamento incorreto (MA et al., 2018).

Além dos estudos que investigam os fatores de riscos e os componentes genéticos/hereditários relacionados ao desenvolvimento do CCR, muitos outros têm se dedicado a esclarecer os complexos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na aquisição do fenótipo maligno.

### **1.2.2 Bases celulares e moleculares do CCR: uma abordagem integrada**

A progressão tumoral em carcinomas se deve, em grande parte, a presença de instabilidades genética e epigenética, onde o acúmulo de alterações tanto em genes supressores tumorais quanto em proto-oncogenes representa um mecanismo crucial para este processo (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000; TOMASETTI et al., 2015). Em 2012, a rede de pesquisa TCGA (do inglês, *The Cancer Genome Atlas*) realizou uma abrangente caracterização molecular em 224 amostras de pacientes com CCR, em que um subconjunto de 97 casos foi sequenciado por todo seu genoma e, a partir disso, foram categorizados em dois grupos: CCRs hipermutados (16% dos casos) e CCRs não hipermutados (84% restante). Destas amostras consideradas não hipermutadas, foram observadas mutações somáticas em *APC* (81%), *TP53* (60%), *KRAS* (43%), *PIK3CA* (18%), entre outras. Dois genes que foram frequentemente mutados em CCRs não hipermutados, foram menos observados em CCRs hipermutados: *TP53* (60% vs. 20%) e *APC* (81% vs. 51%) (NETWORK et al., 2012). Três características principais também foram observadas, possuindo estas uma íntima relação com o

desenvolvimento do CCR, são elas: instabilidade cromossômica (CIN, do inglês *Chromosomal Instability*); instabilidade de microssatélite (MSI, do inglês *Microsatellite Instability*); e fenótipo metilador de ilhas CPG (CIMP).

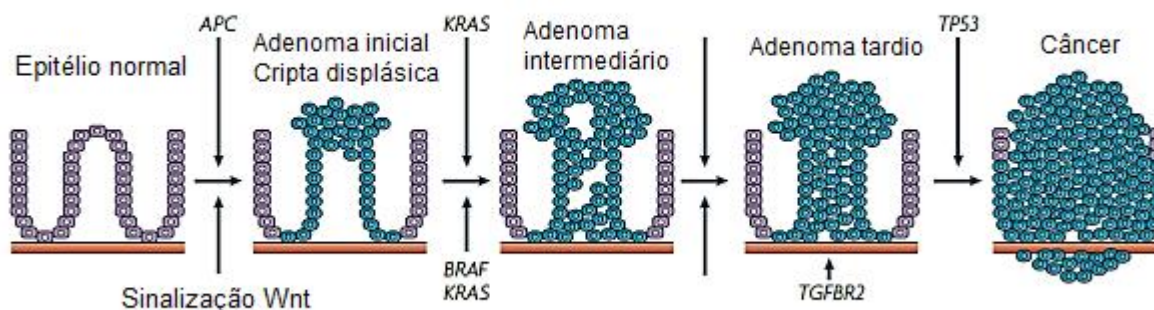
A CIN é a forma mais comum de instabilidade genômica, sendo encontrada em aproximadamente 85% dos casos de CCRs (GRADY; CARETHERS, 2008). É caracterizada pela presença de múltiplas alterações cromossômicas, numérica ou estruturais, resultando em uma variabilidade cariotípica das células (PINO; CHUNG, 2014). Apesar de ocorrer frequentemente no CCR, os mecanismos que dão origem a CIN, bem como o papel da aneuploidia na progressão tumoral, permanecem ainda não totalmente elucidados, porém, tem sido sugerido que a CIN seja uma consequência de anormalidades funcionais dos telômeros, anomalias ocorridas durante o *checkpoint* mitótico, erro funcional ou numeral dos centrossomas ou a perda de heterozigidade (PINO; CHUNG, 2014). Entretanto, há evidências que a instabilidade cromossômica promova a progressão de carcinomas ao acarretar o aumento da diversidade clonal (GRADY, 2004). Sob a perspectiva clínica, através de meta-análises, foi demonstrado que a CIN é um marcador de mau prognóstico em CCR, porém, aspectos técnicos dos ensaios que podem determinar o estado da instabilidade cromossômica, limitaram seu uso em laboratórios clínicos (GRADY; PRITCHARD, 2014).

A MSI representa cerca de 15% de todos os CCRs e está associada a um defeito no mecanismo de reparo de falhas do DNA e, correlacionando-se fortemente também a um genoma hipermutado (NETWORK et al., 2012; WALTHER et al., 2009). É caracterizada pela inserção ou deleção de sequências em tandem em regiões de microssatélites, visto que tais regiões estão propensas a uma alta taxa de erro durante a replicação do DNA. Estudos apontam que a MSI é responsável pela hipermetilação da região promotora de *MLH1*, resultando na inativação desse gene, promovendo a instabilidade genética (MOJARAD et al., 2013). Esse tipo de instabilidade, normalmente, vem acompanhado por mutações de gene como *TGFBR2* e *BRAF* (GRADY; PRITCHARD, 2014; MOURADOV et al., 2013). Os tumores que apresentam MSI estão majoritariamente localizados no cólon ascendente/direito, são pouco diferenciados e apresentam um infiltrado

tumoral de células T. Além disso, quando comparados com os de MSS (do inglês, *microsatellite stable*), apresentam melhor prognóstico no CCR (MOJARAD et al., 2013).

A hipermetilação das ilhas CpG (regiões genômicas ricas em bases nitrogenadas citosina e guanina, frequentemente regiões promotoras, presentes em 40%-50% dos genes humanos) é um fenômeno epigenético envolvido na carcinogênese de diversos tumores, uma vez que promove a inativação transcricional de genes supressores tumorais (GALLOIS; LAURENT-PUIG; TAIEB, 2016), sendo no CCR a presença de CIMP também fortemente correlacionada a um genoma hipermutado (NETWORK et al., 2012).

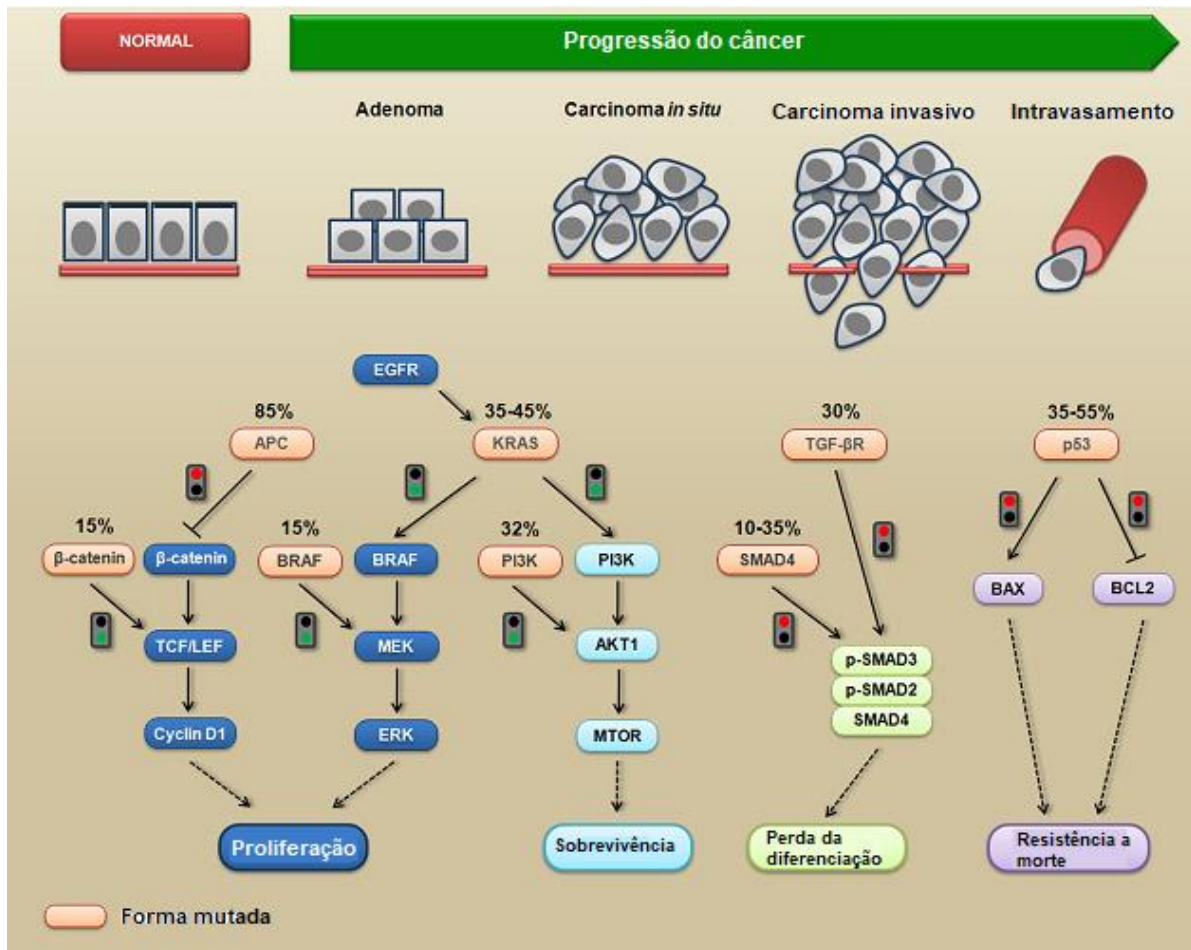
No CCR, o acúmulo de alterações clínicas e histopatológicas ao longo do tempo acompanham a transformação das células epiteliais glandulares normais em adenocarcinomas invasivos. Em 1990, em trabalho pioneiro, Fearon e Vogelstein propuseram um modelo genético da carcinogênese colorretal, onde a partir de uma sequência de eventos ocorreria o desenvolvimento da doença. Em um primeiro instante as mutações promoveriam uma hiperplasia do epitélio intestinal do cólon que posteriormente progrediria para uma displasia, resultando na formação de um adenoma e, mais tardiamente, no desenvolvimento de um carcinoma (Figura 2). Embora ainda haja desdobramentos do modelo original, vários princípios fundamentais foram estabelecidos. Sabe-se que são necessárias sucessivas etapas genéticas e que a aquisição temporal dessas mudanças genéticas é importante na dinâmica de progressão da doença. Por exemplo, mutações em *APC* servem para induzir o evento iniciador na formação de adenoma em modelos humanos e de camundongos. Em contraste, a ativação mutacional de *KRAS* não pode iniciar o câncer *in vivo*, somente quando combinada com mutação em *APC*, para só assim promoverem a progressão tumoral (HAIGIS et al., 2008).



**Figura 2: Desenvolvimento do câncer colorretal.** Modelo da progressão tumoral contendo os diferentes estágios histopatológicos da doença. Adaptado de WALTHER et al., 2009. *APC*, *adenomatous polyposis coli*; *Wnt*, *Wingless-type MMTV integration site family*; *KRAS*, *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*; *BRAF*, *v-ras murine sarcoma viral oncogene homolog B*; *TP53*, *tumor protein p53*; *TGFBR2*, *transforming growth factor beta receptor 2*.

A partir de uma análise genômica em tumores mamários e colorretais, um grupo de mutações (<15) foi considerada como sendo “*drivers*” da tumorigênese (LEARY et al., 2008), ou seja, mutações que, ocorrendo em determinados genes, ocasionariam o desenvolvimento da doença, uma vez que conferem vantagens seletiva ao crescimento celular. No caso do CCR ocorre primeiramente uma alteração na via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, mais frequentemente por mutação em *CTNNB1* (gene que codifica a proteína  $\beta$ -catenina) ou inativação do gene supressor *APC*, o qual impossibilita a formação do complexo protéico que encaminha a  $\beta$ -catenina para degradação via proteassoma, permitindo o seu acúmulo no citoplasma e translocação para o núcleo, ativando genes relacionados a proliferação celular, por se ligar ao fator de transcrição TCF/LEF (VOGELSTEIN et al., 2013). As mutações subsequentes podem variar entre os tumores, não seguindo o mesmo padrão. A progressão é conduzida por estas mutações, sendo as mais frequentes: de *KRAS*, *PI3K*, *TP53* e genes da via de TGF- $\beta$  (*TGF- $\beta$ R* e *SMAD4*). Curiosamente, dados robustos apontam que mutações que ocorrem em *BRAF* e *KRAS* são mutuamente exclusivas (GONSALVES et al., 2014). A figura 3

retrata as principais alterações que atuam no desenvolvimento do CCR e os subsequentes processos celulares desencadeados.



**Figura 3: As principais alterações genéticas e seus respectivos mecanismos celulares desencadeados.** A progressão da doença tem relação com mutações em diversos genes como os que codificam as proteínas *APC*, *KRAS*, *SMAD4*, *TP53*, as quais desencadeiam várias alterações fenotípicas, que levam a: uma maior taxa proliferativa; ativação de vias de sobrevivência; perda da diferenciação, e aquisição de resistência aos sinais que ativam o programa de morte celular programada. Adaptado de (DE-FREITAS-JUNIOR; MORGADO-DÍAZ, 2015)

Durante anos, diversos estudos concentraram esforços em categorizar o CCR em subtipos com base no perfil de expressão gênica, entretanto, devido a limitações técnicas e ao alto grau de heterogeneidade tumoral, não havia consenso sobre o assunto, retardando assim o desenvolvimento de estratégias terapêuticas

mais específicas. A primeira proposta, aqui já citada, identificou duas assinaturas moleculares do CCR (hipermutados e não-hipermutados), sendo posteriormente sucedida por diversas outras sem que houvesse consenso (BUDINSKA et al., 2013; MARISA et al., 2013; SADANANDAM et al., 2013). Todavia, no ano de 2015, a partir de uma abrangente análise viabilizada pela formação de um consórcio que possibilitou a combinação de dados genômicos de todos estes estudos supracitados, o CCR pôde ser classificado em quatro subtipos moleculares consenso (CMS, do inglês *consensus molecular subtype*): CMS1 (MSI-imune), CMS2 (canônico), CMS3 (metabólico) e CMS4 (mesenquimal) (GUINNEY et al., 2016).

### 1.2.3 Subtipos moleculares do CCR

O CMS1, que corresponde a 14% dos casos de CCR, é caracterizado por apresentar instabilidade de microssatélites e marcante infiltrado de células do sistema imunológico, sendo também associado a presença de CIMP e mutação em *BRAF*. Este subtipo é mais comum na região do cólon ascendente/direito de pacientes do sexo feminino com idade mais avançada. O CMS2, que corresponde a 37% dos casos, representa o CCR que apresenta alterações moleculares clássicas, como os altos níveis de instabilidade cromossômica e ativação da via de *Wnt*. A ocorrência mais comum é no cólon distal e reto, apresentando altas taxas de sobrevivência mesmo após a recaída. O CMS3, com 13% dos casos, compreende os tumores com MSS, exibindo um fenótipo epitelial e marcantes alterações metabólicas, além da presença de mutações em *KRAS* e *APC*. Já o CMS4, que abrange 23% dos casos, apresenta o pior prognóstico, estando mais relacionado a ativação de genes associados à transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês *epithelial-mesenchymal transition*), ativação de vias alvo de *TGF- $\beta$*  (do inglês, *transforming growth factor- $\beta$* ), infiltração estromal, remodelamento da matriz extracelular e angiogênese (FESSLER; MEDEMA, 2016; INAMURA, 2018). Os demais 13% foram classificados como indeterminados ou *mixed*, não havendo portanto características em comum que permitissem agrupar estes casos para gerar um quinto subtipo molecular (GUINNEY et al., 2016).

Além das alterações aqui apresentadas, a busca por parâmetros prognósticos adicionais permeia as pesquisas relacionadas ao CCR. Desta forma, inúmeros estudos apontam os *buddings* tumorais como um fator importante para tal. Esta estrutura é definida pela presença de células isoladas ou pequenos grupos de até cinco células tumorais que possuem a capacidade de se destacar do epitélio neoplásico e migrar para um estroma distante, conferindo agressividade ao tumor (MITROVIC et al., 2012). Embora tais células sejam consideradas como uma representação do processo de EMT, esta hipótese não havia sido validada, sendo pouco compreendidos os mecanismos pelos quais as células em desenvolvimento se destacam do tumor principal (ZLOBEC; LUGLI, 2010).

Dados recentes apontam que os perfis de expressão gênica da região destas células e das que constituem os tumorais principais são diferentes. Além disso, foi visto que o perfil dos *buddings* assemelham-se aos de EMT, com ativação de vias de sinalização *TGF $\beta$*  e *Wnt* em amostras de pacientes, além de ter sido demonstrado que tal estrutura está presente não apenas no CMS4, mas também em *buddings* provenientes dos CMS2 e CMS3. Ademais, foi sugerido no mesmo estudo que há uma mudança do subtipo molecular de CMS2 para CMS4 nestas massas, indicando que as características moleculares não são constantes em todo o tumor, sendo a subtipagem molecular influenciada pela localização da área analisada (DE SMEDT et al., 2017).

Esse conjunto de dados revela a importância de se investigar de forma pormenorizada os mecanismos envolvidos na transição epitélio-mesenquimal (ZHU et al., 2013).

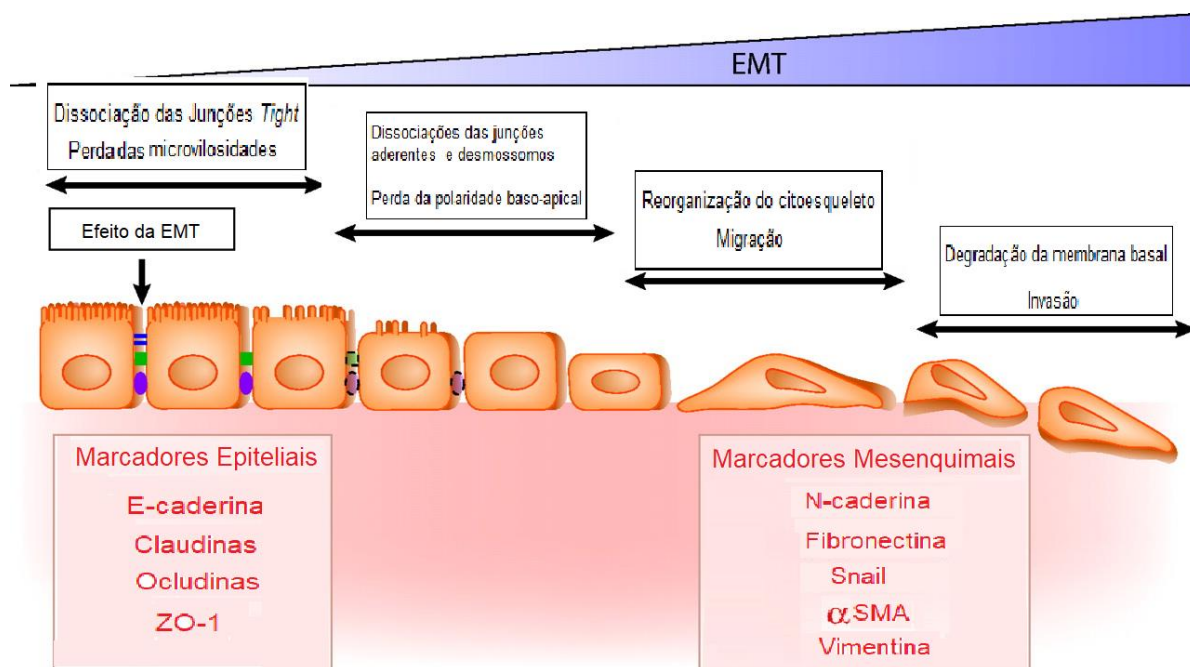
#### **1.2.4 Processo de Transição Epitélio-Mesenquimal e seu envolvimento na progressão do CCR**

As células epiteliais são caracterizadas por manterem grande interação umas com as outras através de junções intercelulares e comunicantes, que juntamente com o sistema de adesão célula-matriz mantêm a cito-arquitetura e a integridade epitelial. As junções aderentes (JA) e as junções *tight* (JT) formam o



complexo juncional apical, que pode sofrer desorganização durante a progressão tumoral devido à ativação do programa de EMT (GLOUSHANKOVA, 2008).

A transição epitélio-mesenquimal é um processo único, inicialmente observado no desenvolvimento embrionário e reparo tecidual, em que as células perdem as propriedades epiteliais e adquirem características mesenquimais (KALLURI; NEILSON, 2003). Em carcinomas o programa de EMT pode ser reativado, contribuindo assim para a progressão da doença (NIETO et al., 2016). A Figura 4 ilustra as diferentes etapas da EMT.



**Figura 4: Súmula das alterações celulares ao longo do processo de EMT.** Esquema representativo dos eventos mais relevantes: Desmontagem dos complexos protéicos de adesão célula-célula e a perda da polaridade celular; repressão de genes relacionados ao fenótipo epitelial e ativação de genes associados à manutenção do fenótipo mesenquimal; reorganização do citoesqueleto de actina, aquisição de motilidade e capacidade invasiva. Adaptado de ANGADI; KALE, 2015.

Diversos relatos apontam uma desregulação das proteínas do complexo juncional apical tanto em amostras de tumores humanos quanto em linhagens

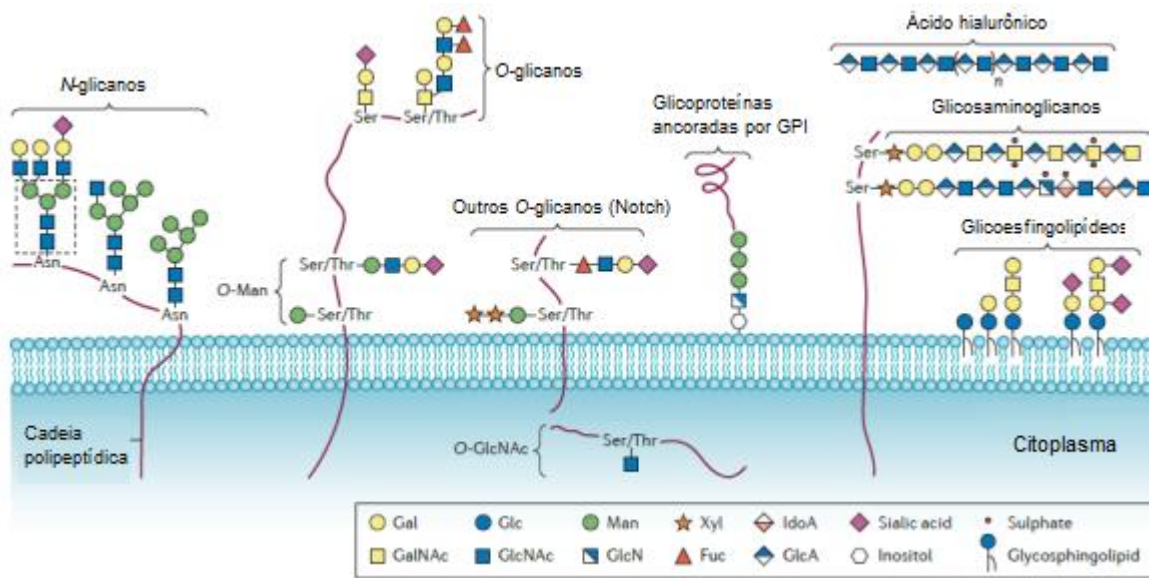
celulares, apresentando um aumento ou diminuição de seus níveis e/ou mudanças de localização subcelular (GEHREN et al., 2015).

Durante o processo da EMT, modificações pós traducionais regulam mecanismos moleculares que contribuem para as alterações fenotípicas em células tumorais. A glicosilação é uma das modificações mais frequentemente observadas, regulando funções importantes relacionadas a interação célula-célula e célula-matriz, com efeitos também na migração, invasão e demais eventos tumorais (DE-FREITAS-JUNIOR; MORGADO-DÍAZ, 2015; GU et al., 2012; PINHO; REIS, 2015).

### **1.3 Glicosilação de proteínas**

#### **1.3.1 Introdução**

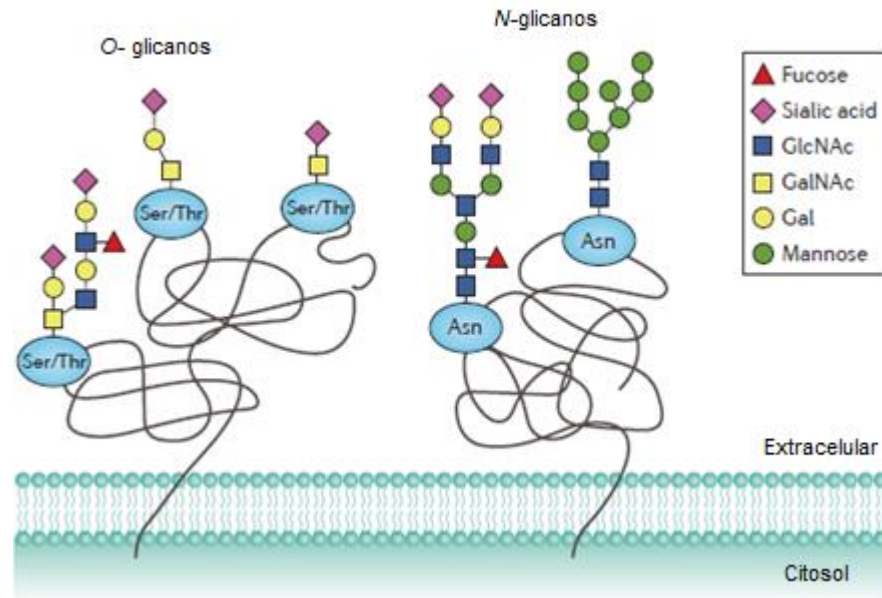
Os carboidratos são as moléculas orgânicas mais abundantes na natureza, sendo sintetizados e metabolizados por quase todos os organismos. Os açúcares mais simples, denominados monossacarídeos, possuem a fórmula empírica  $(CH_2O)_n$ , onde n pode variar de três a sete, e formam oligo ou polissacarídeos por meio de ligações glicosídicas (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011). Os glicanos (carboidratos covalentemente ligados a proteínas ou lipídeos) possuem uma complexa heterogeneidade (Figura 5) que é resultado direto de várias de suas características, entre estas: isomeria dos monômeros (ex: formas cíclicas  $\alpha$  e  $\beta$ ); ligação entre os monômeros pode ser de diferentes tipos; ausência ou presença de ramificações (ID; BUF; LIBRARY, 2002).



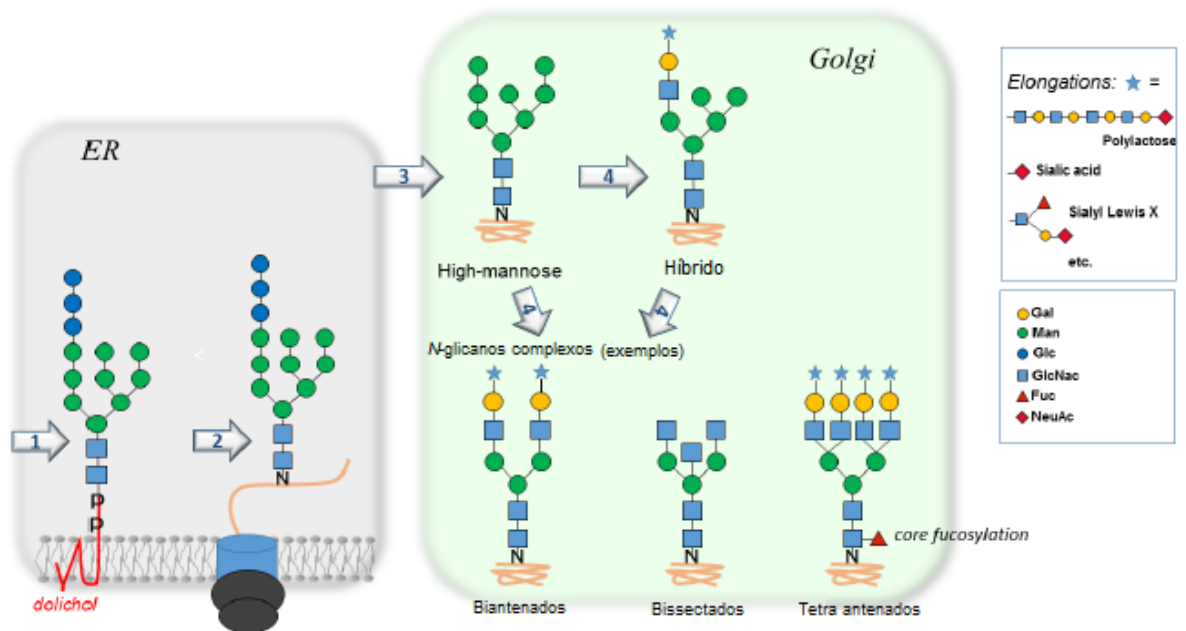
**Figura 5: Representação esquemática dos glicoconjugados mais comuns nas células de mamíferos.** Glicoconjugados. Adaptado (PINHO; REIS, 2015). Gal, galactose; GalNAc, *N*-acetilgalactosamina; Glc, glicose; GlcNAc, *N*-acetilglicosamina; Man, manose; GlcN, glicosamina; Xyl, xilose; Fuc, fucose; IdoA, ácido idurônico; GlcA, ácido glicurônico; Sialic acid, ácido siálico

As proteínas podem sofrer modificações co- e pós-traducionais. Dentre estas modificações, a glicosilação é uma das mais comuns, visto que aproximadamente um quinto delas são glicosiladas (KHOURY; BALIBAN; FLOUDAS, 2014). Ao decorrer do retículo endoplasmático (RE) e complexo de Golgi, as proteínas são modificadas de várias maneiras, inclusive pelo processo de glicosilação. Para que este evento ocorra, é necessária a ação de enzimas que catalisem a adição e remoção de monossacarídeos (glicosiltransferases e glicosidases, respectivamente) (NELSON; COX, 2013).

No âmbito da glicosilação de proteínas, predominam majoritariamente dois tipos de glicanos: 1) os *O*-glicanos, onde sua porção carboidrática se liga a hidroxila de resíduos de serina ou treonina de proteínas; e 2) os *N*-glicanos, onde ocorre a transferência *en bloc* de um oligossacarídeo precursor para resíduos de asparagina em uma sequência específica (Asn-X-Ser/Thr, onde X pode ser qualquer aminoácido, exceto prolina). A figura 6 mostra ambos os glicoconjugados enquanto a 7 ilustra o processo e maturação dos *N*-glicanos.



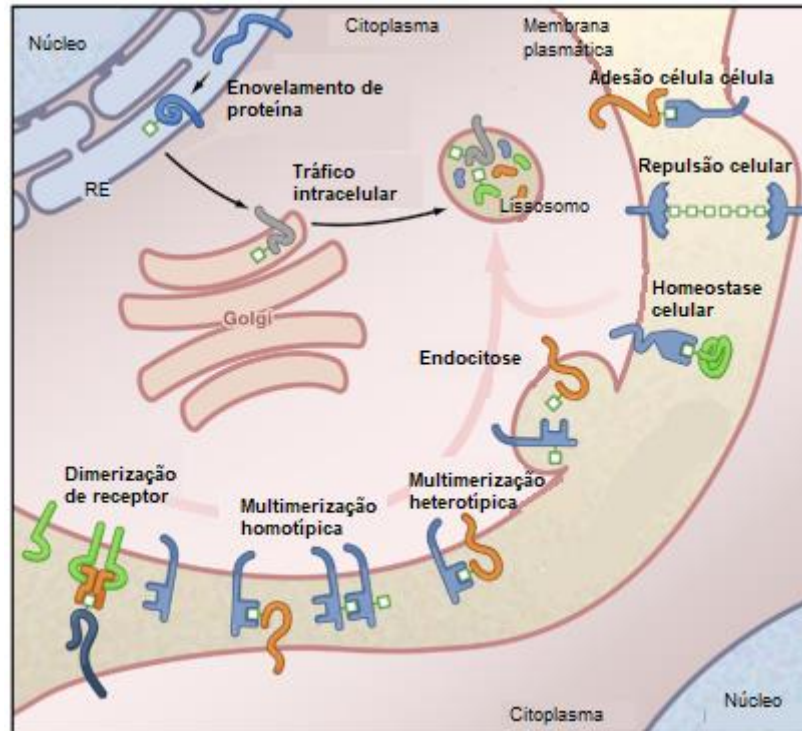
**Figura 6: Representação esquemática dos dois principais tipos de glicanos que modificam proteínas.** Os O-glicanos encontram-se covalentemente ligados a resíduos de serina (Ser) ou treonina (Thr) de glicoproteínas, enquanto os N-glicanos encontram-se covalentemente ligados a resíduos de asparagina (Asn). Adaptado de (MUNKLEY; MILLS; ELLIOTT, 2016).



**Figura 7: Principais etapas da N-glicosilação.** 1. Síntese de um oligossacarídeo precursor mediante a adição sequencial de monossacarídeos a uma molécula de dolicol-fosfato ancorada na membrana do RE, até completar um oligossacarídeo de 14 unidades. 2. Transferência *en bloc* deste oligossacarídeo para resíduos de asparagina em uma sequência específica (Asn-X-Ser/Thr, onde X pode ser qualquer aminoácido, exceto prolina), em uma reação catalisada pela enzima OST (oligossacariltransferase) (círculos em cinza representam os ribossomos). 3. No Golgi, ocorre processo de clivagens, resultando em glicanos *high-mannose*. 4. Clivagem de parte dos resíduos de manose, seguido de ramificações e extensão de cadeia por diferentes monossacarídeos, resultando assim nos glicanos complexos. Adaptado de (OLIVEIRA-FERRER; LEGLER; MILDE-LANGOSCH, 2017)

### 1.3.2 Papel biológico dos glicanos

Um número crescente de estudos nas últimas décadas se concentrou na investigação dos papéis funcionais dos carboidratos estruturais, abrindo um campo na ciência denominado glicômica funcional. Sendo assim, é atribuído a estes um papel na manutenção/regulação de diversos mecanismos celulares, uma vez que ao modificarem as proteínas, atuam conseqüentemente, nos eventos celulares dos quais elas participam. Os glicanos desempenham funções no metabolismo, sinalização, adesão célula-célula, reconhecimento celular e de patógenos pelo sistema imune, endocitose, controle de qualidade na síntese de proteínas e funcionalidade de receptores (OHTSUBO; MARTH, 2006). A figura 8 ilustra o papel funcional dos glicanos.

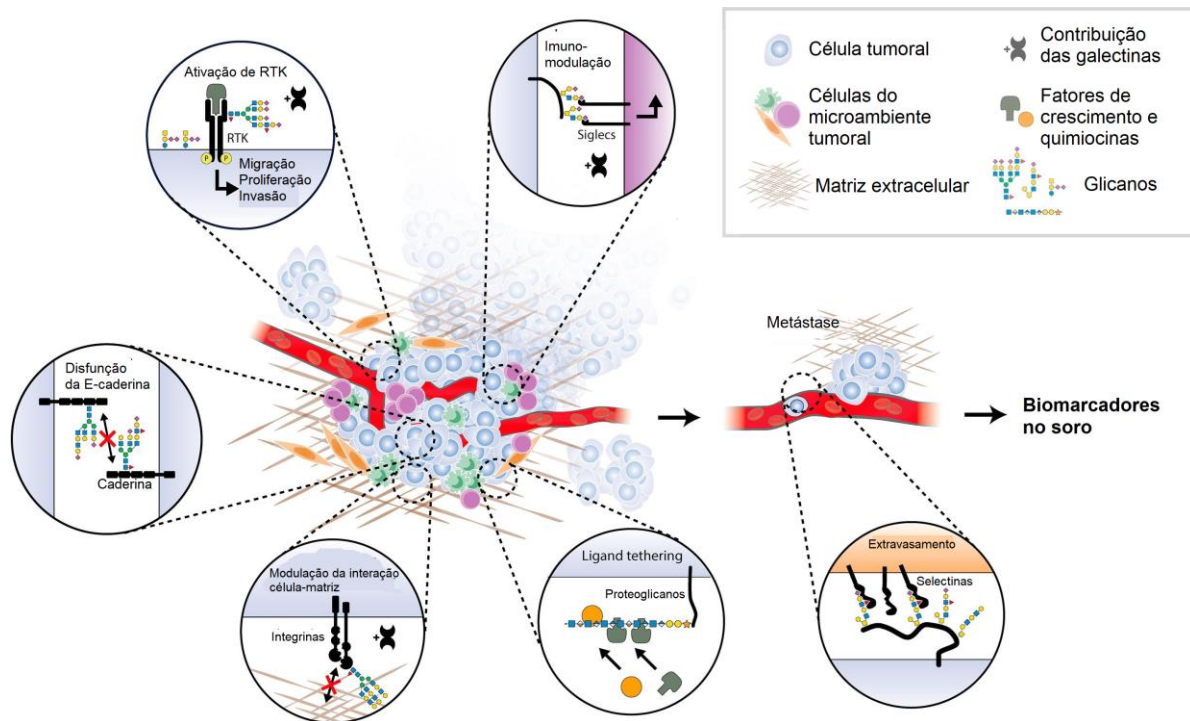


**Figura 8: Mecanismos celulares mediados por glicanos.** Os glicanos participam de diversos processos celulares, tais como: adesão célula-célula, endocitose, funcionalidade de receptores e controle de qualidade na síntese de proteínas. Adaptado de (OHTSUBO; MARTH, 2006).

### 1.3.3 Glicosilação aberrante durante a progressão tumoral

A glicosilação aberrante é considerada um *hallmark* do câncer, uma vez que desempenha um papel fundamental nas principais etapas do desenvolvimento e progressão do tumor (MUNKLEY; ELLIOTT, 2016; VAJARIA; PATEL, 2017). A figura 9 ilustra a contribuição destes glicoconjugados em tais processos que auxiliam na formação de metástases.





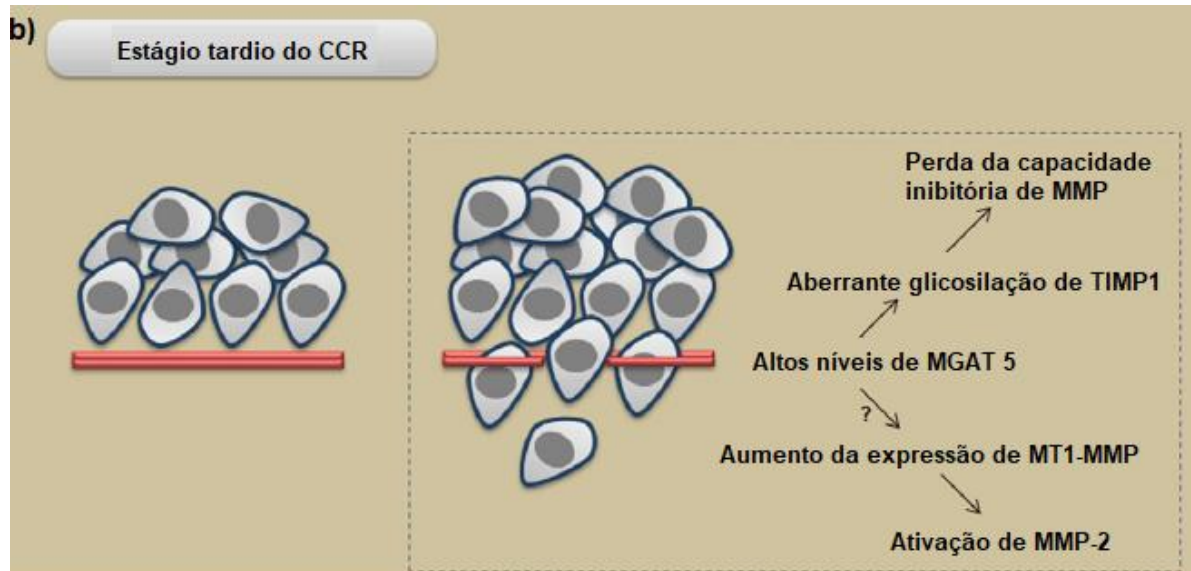
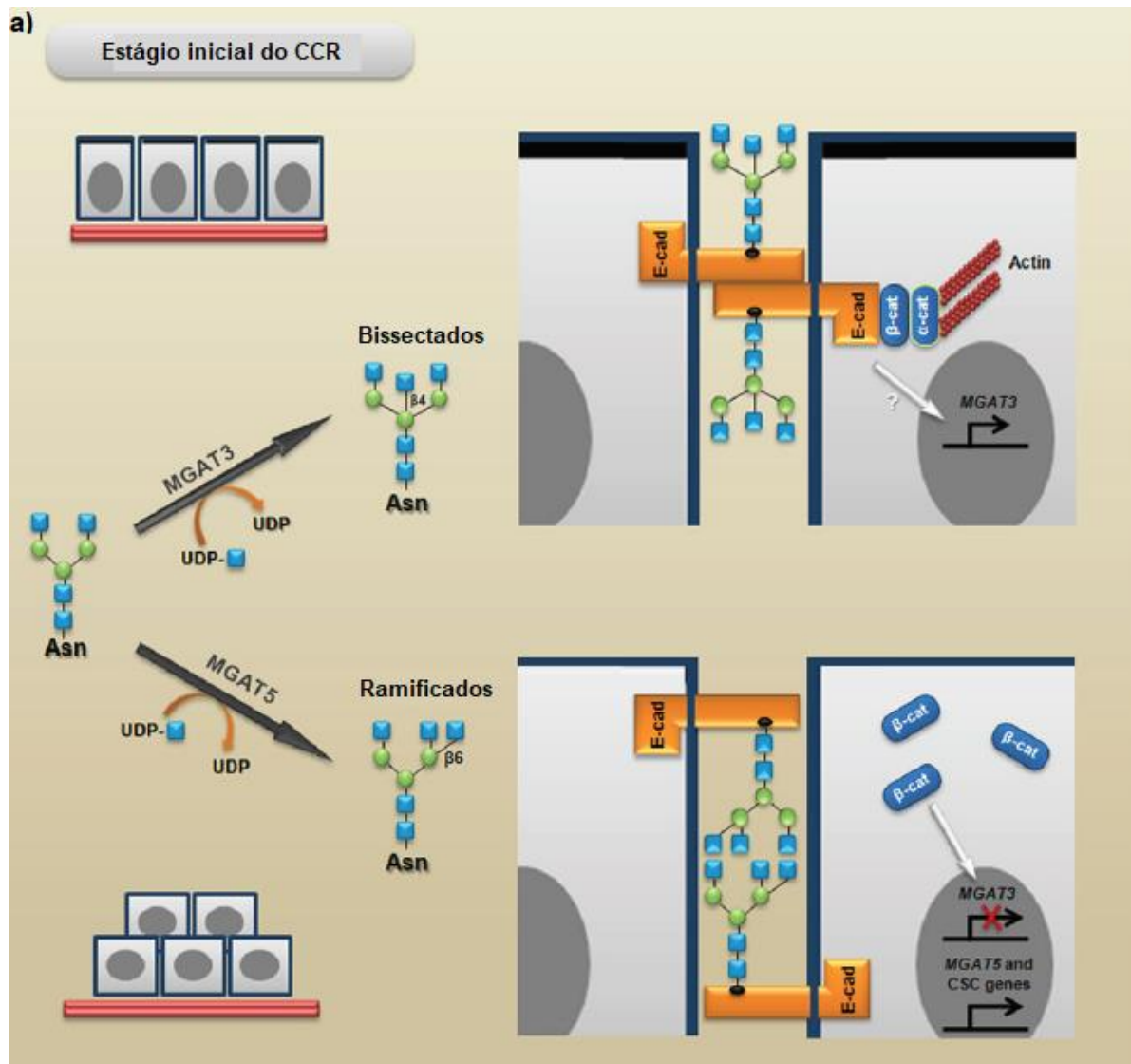
**Figura 9: Papel dos glicanos na progressão tumoral.** Os glicoconjugados contribuem em diversos processos durante a progressão do carcinoma e metástase. A glicosilação aberrante em receptores tirosina quinases (RTKs) promove sua ativação, ocasionando um aumento da migração, invasão e proliferação celular. Interação célula-célula e célula matriz também podem sofrer alteração, como, por exemplo, E-caderina e integrinas apresentando modificação por *N*-glicanos ramificados, resultando em um fenótipo migratório. Proteínas que apresentam domínio de ligação a carboidratos, como as galectinas, regulam a resposta imune, favorecendo o escape do sistema imunológico. Os glicanos Sialyl Lewis são ligantes para selectinas, contribuindo para interação entre célula tumoral e o endotélio, facilitando o extravasamento e a formação de metástases. Esses glicoconjugados podem ser detectados no soro dos pacientes e, assim, serem utilizados como biomarcadores preditivos de diagnóstico. Adaptado de (RODRIGUES et al., 2018).

Apesar de existir uma enorme diversidade estrutural de glicanos, somente um grupo relativamente pequeno de arranjos tem sido relacionado ao fenótipo maligno (OLIVEIRA-FERRER; LEGLER; MILDE-LANGOSCH, 2017). Neste sentido, estudos têm demonstrado que diversos carcinomas apresentam expressão aumentada de *N*-glicanos tri- ou tetra-antenados, com ramificações formadas a partir da adição de  $\beta$ 1,6-*N*-acetilglicosamina ( $\beta$ 1,6-GlcNAc) pela enzima *N*-acetilglicosamiltransferase V (MGAT5). Por outro lado, também pode ser observada a presença de estruturas bissectadas, catalizadas pela enzima *N*-

acetilglicosamiltransferase III (MGAT3), que compete, juntamente com o MGAT5, pelo mesmo substrato. A presença de arranjos bissectados impede a posterior modificação pela MGAT5, bloqueando portanto a formação de *N*-glicanos ramificados (KIZUKA; TANIGUCHI, 2016).

Sabe-se que em condições normais, o epitélio do cólon apresenta altos níveis de expressão de MGAT3, conferindo uma maior expressão de *N*-glicanos bissectados, favorecendo inclusive a formação de junções aderentes. A E-caderina humana possui quatro potenciais sítios de *N*-glicosilação e diferentes perfis de *N*-glicanos ligados a esta proteína estão relacionados com a estabilidade das JAs (PINHO et al., 2013). Entretanto, durante a progressão tumoral, estas estruturas dão lugar às estruturas ramificadas, devido ao aumento dos níveis de expressão de MGAT5. Acredita-se que estruturas tri- ou tetra antenadas, sintetizadas por MGAT5, funcionam como um obstáculo estereoquímico, comprometendo assim a estabilidade dos complexos de adesão célula-célula e célula-matriz (LANGER et al., 2012). Estudos em células WiDr de carcinoma de cólon humano revelaram também que a glicosilação aberrante de TIMP-1 (inibidor de MMP-1), através da superexpressão de MGAT5, exacerba o comportamento maligno e a taxa de crescimento de tumor além de promover a superexpressão de MT1-MMP (MMP-14), ocasionando um aumento do potencial invasivo (BOON et al., 2016; KIM et al., 2012). Além disso, foi observado que a superexpressão de MGAT5 promove um aumento significativo na população de células troncos tumorais (GUO; NAGY; PIERCE, 2014). Portanto, de uma maneira geral, a presença de estruturas bissectadas estaria relacionada a um caráter de supressão tumoral, enquanto que a presença de estruturas ramificadas, ao processo de invasão e metástase (KIZUKA; TANIGUCHI, 2016). A figura 10 ilustra resumidamente a competição de MGAT3 e MGAT5 pelo mesmo substrato e o papel pró-tumoral de MGAT5.



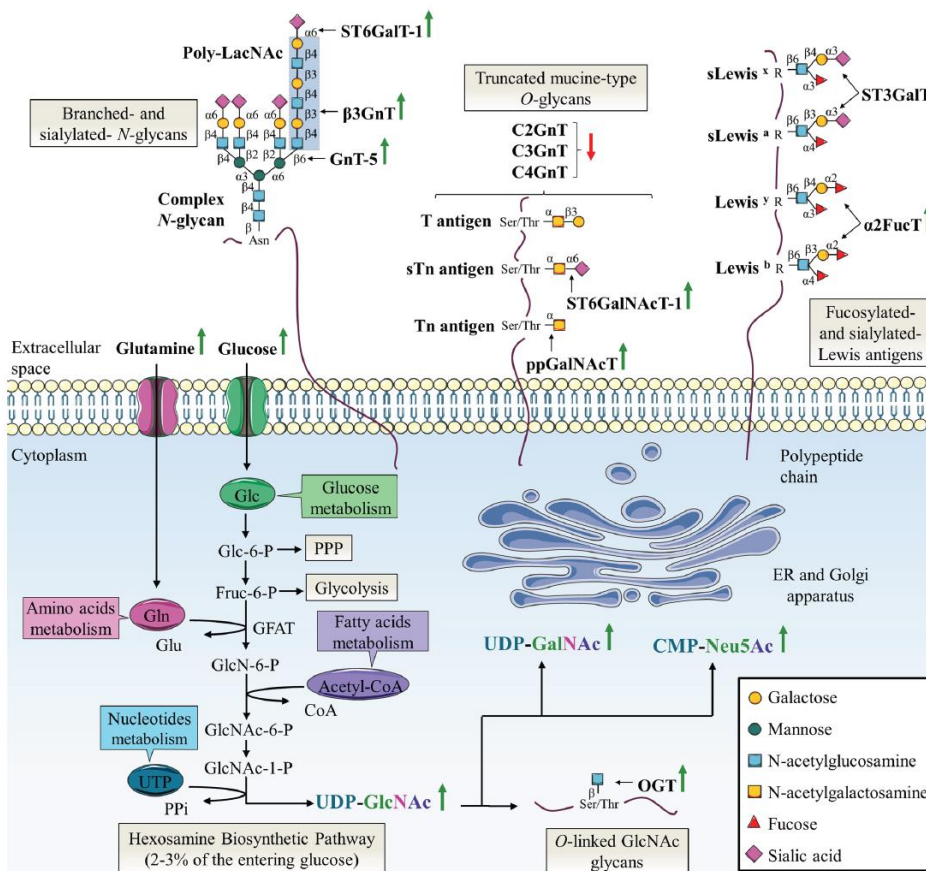


**Figura 10: MGAT3 e MGAT5 modulam o comportamento celular nos estágios iniciais e tardios do CCR.** a) A formação de junções aderentes é favorecida pela expressão dos produtos de MGAT3, estabelecendo um mecanismo recíproco via regulação positiva da expressão de MGAT3. Por sua vez, MGAT5 catalisa a transferência de  $\beta$ -1,6GlcNAc, gerando *N*-glicanos ramificados que têm sido associados com: I) instabilidade das junções aderentes; II) inibição de MGAT3 induzida por  $\beta$ -catenina; e III) aumento da expressão de genes relacionados com a manutenção do *stemness*. b) MGAT5 potencializa também o comportamento maligno tanto através da perda de capacidade inibitória de MMPs pela TIMP-1 quanto pelo aumento dos níveis de expressão de MT1-MMP. Adaptado (DE-FREITAS-JUNIOR; MORGADO-DÍAZ, 2015)

Outros estudos têm buscado elucidar tanto os mecanismos pelos quais os *N*-glicanos são modulados quanto as alterações metabólicas que resultam em glicosilação aberrante. No metabolismo celular tumoral, uma alteração bastante prevalente é a captação aumentada de glicose pelas células malignas que, majoritariamente, fermentam glicose a lactato mesmo na presença de oxigênio. Este processo é denominado Efeito de Warburg (ou “glicólise aeróbica”), o qual possibilita uma vantagem para o crescimento, sendo considerado um *hallmark* metabólico do câncer. Estas vantagens incluem: 1) proteção contra espécies reativas de oxigênio, através da geração de NADPH a partir da via das pentoses; 2) resistência às variações da tensão de oxigênio; 3) produção de ácido láctico que favorece a invasão celular e 4) utilização de intermediários da via glicolítica para alimentar reações anabólicas, tais como as vias de síntese de hexosaminas, glicogênio, ribose 5-fosfato, triacilglicerídeo, fosfolípídeos, alanina e malato. Desta forma, as células tumorais desenvolvem um programa adaptativo, onde há um aumento do fator  $1\alpha$  induzido por hipóxia (HIF1A), possibilitando uma maior expressão de enzimas glicolíticas chaves, como a hexoquinase (HK) e a lactato desidrogenase (LDH) e de transportadores de glicose (por exemplo, GLUT1). A ativação da via de PI3K/AKT1/mTORC1, em condições aeróbicas favorece também o aumento dos níveis de HIF1A, contribuindo assim para essa reprogramação metabólica (KROEMER; POUYSSEGUR, 2008).

Ainda neste contexto, um estudo recente apontou que a alta concentração de glicose exacerba a malignidade do câncer, evidenciado tanto pela presença de níveis aumentados de *O*-GlcNAc (modificação pós traducional caracterizada pela adição de *N*-acetilglicosamina *O*-ligada à proteínas citosólicas, ver figura 5) quanto por uma tendência em amplificar os níveis de glicanos L-PHA positivos (lectina específica para *N*-glicanos complexos tri ou tetra-antenados, com ramificações formadas a partir da adição de  $\beta$ 1,6-*N*-acetilglicosamina). Este processo estaria relacionado portanto a um pior prognóstico devido a exacerbação da via de biossíntese de hexosaminas (HBP) (VASCONCELOS-DOS-SANTOS et al., 2017).

Tal via produz o nucleotídeo doador de açúcar UDP-GlcNAc, que é de vital importância para a formação de diversos glicoconjugados. Sendo assim, sua desregulação pode acarretar glicosilação aberrante, tal como ocorre em células malignas (VERY; LEFEBVRE; YAZIDI-BELKOURA, 2018), conforme ilustrado na Figura 11.



**Figura 11: Alterações específicas de glicosilação no CCR a partir da exacerbação da via de HBP.** A glicosilação anormal das células cancerosas está representada, através da abundância e disponibilidade de nucleotídeos doadores de açúcar e co-fatores. As glicosilações aberrantes mais frequentemente observadas no CCR são os *N*-glicanos ramificados, sialilados, *O*-glicanos do tipo mucina, fucosilação e sialilação de antígenos Lewis e *O*-GlcNac glicosilação. As setas verdes e vermelhas indicam, respectivamente, aumento e diminuição da disponibilidade de nutrientes e açúcares nucleotídeos, expressão ou atividade de glicosiltransferases no câncer colorretal. Adaptado de (VERY; LEFEBVRE; YAZIDI-BELKOURA, 2018).

Relacionada também com o metabolismo celular, a desregulação do sistema insulina/fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) está presente em diversas doenças, inclusive diabetes e câncer. Recentemente, estudos revelaram que tal sinalização está envolvida na regulação de mecanismos celulares relacionados ao fenótipo maligno, tais como: transição epitélio-mesenquimal; proliferação; invasão; migração; apoptose; e resistência a drogas terapêuticas (AFRATIS et al., 2017; BAILEY et al., 2017; LI et al., 2017; VIGNERI et al., 2015). Corroborando estes dados, foi visto que altos níveis de glicose induzem EMT em células de carcinoma de pulmão, além de que em células de câncer colorretal, condições hiperglicêmicas também ocasionam um aumento da taxa de proliferação, efeito amplificado com níveis elevados de insulina ou IGF1 (ALISSON-SILVA et al., 2013; MASUR et al., 2011).

Tendo em vista que os receptores destas vias também podem ser modulados através de modificações *co* e *pós*-traducionais, tais como *N*- e *O*-glicosilação (ELLEMAN et al., 2000; SPARROW et al., 2008), e que há uma possível correlação entre o sistema insulina/IGF e os níveis de glicanos no contexto de CCR (DE-FREITAS-JUNIOR et al., 2013), é de vital importância mais estudos que tenham como objetivo elucidar como estes mecanismos se relacionam com a progressão tumoral.

## 1.4 Sistema insulina/fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)

### 1.4.1 Sistema Insulina/IGF: ligantes, proteínas de ligação e receptores

O sistema insulina/IGF compreende diversos componentes, incluindo ligantes, proteínas de ligação, receptores e proteínas *downstream*. A insulina, um hormônio produzido pelas células  $\beta$  do pâncreas, controla a glicemia e absorção de glicose em diversos tecidos, além de atuar na síntese lipídica no fígado (KLEMENT; FINK, 2016). O eixo de sinalização IGF é fundamental para o crescimento, desenvolvimento e manutenção de muitos tecidos no corpo humano (CARLYLE et al., 2015). Os peptídeos similares estruturalmente à insulina, IGF1 e IGF2 (do inglês, *insulin-like growth factor*), são produzidos no fígado e em outros tecidos, atuando em vias autócrina e parácrina. Eles são importantes tanto para a diferenciação e crescimento celular quanto para o controle metabólico. Além destes que são responsáveis por desencadear as cascatas de sinalização do sistema, uma família constituída por seis proteínas que se ligam ao IGF com alta afinidade (IGFBP, do inglês *insulin-like growth factor-binding protein*) exercem um papel regulatório fundamental, através da modulação da interação destes ligantes aos seus respectivos receptores. Em fluidos biológicos, os IGFs são frequentemente associados aos IGFBPs, sendo raramente encontrados em sua forma livre (POLLAK, 2012). Este processo ocorre de tal forma que as IGFBPs afetam a disponibilidade de IGFs, através do bloqueio da interação destes ligantes com seus respectivos receptores, regulando a meia vida daqueles e facilitando a ativação de sinalizações devido a liberação controlada dos ligantes (HU et al., 2017). As IGFBPs são encontradas em ambas formas, precursoras e maduras, e sua estrutura molecular consiste em três domínios (amino, central e carboxílico terminal). O domínio central, também conhecido o domínio de ligação, geralmente sofre modificações pós traducionais, tais como glicosilação ou fosforilação (FORBES; MCCARTHY; NORTON, 2012).

Os três receptores que compõem o sistema insulina/IGF são os receptores de IGF1 e IGF2 (IGF1R e IGF2R) e o receptor de insulina (INSR), sendo que variações de *splicing* resultam em duas isoformas: INSR-A (isoforma curta) e

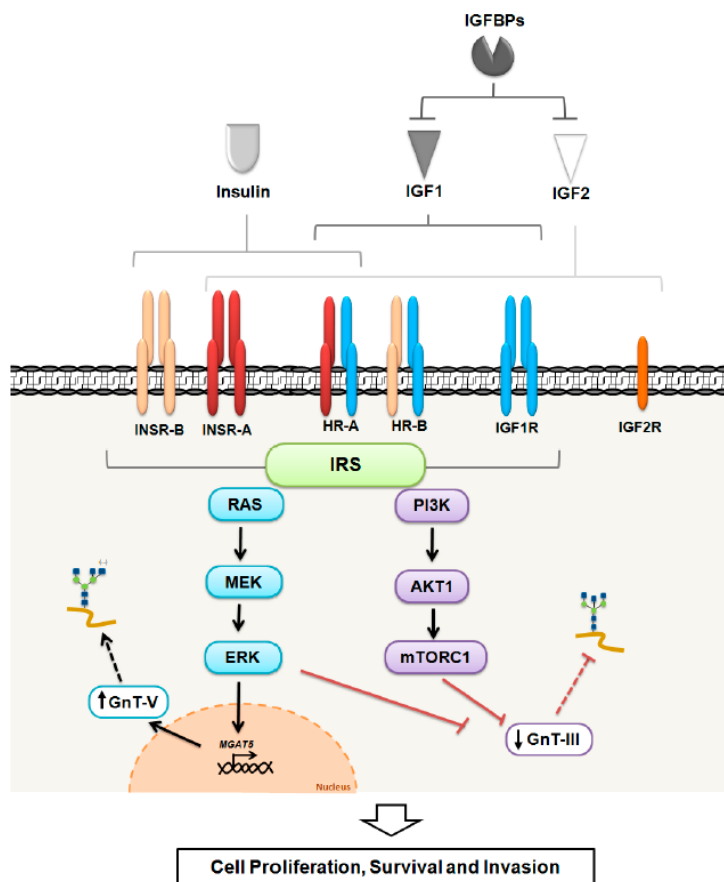
INSR-B (isoforma longa) (SIDDLÉ, 2011). Além disso, a interação destas isoformas com IGF1R também pode gerar receptores híbridos A (HR-A) e B (HR-B). Excetuando o IGFR2, que possui uma estrutura monomérica, os demais receptores formam uma estrutura heterotetrâmica, constituindo-se em duas subunidades alfa e duas beta. A primeira, extracelular, é responsável pela ligação do ligante, enquanto a beta possui uma porção intramembranar, localizando-se o domínio tirosina quinase. Além da regulação da atividade dos receptores por fosforilação, estes receptores também são modulados por modificações em suas subunidades, por exemplo, a alfa pode ser *N*-glicosilada enquanto a beta é *N*- e *O*- glicosilada, sendo esta exclusiva no INSR. O domínio extracelular de INSR é altamente glicosilado, contendo em cada monômero um total de 19 sítios potenciais de *N*-glicosilação (SPARROW et al., 2008). Além disso, a *N*-glicosilação do INSR em Asn<sub>397</sub> ou Asn<sub>418</sub> foi descrita como vital para sua biossíntese e processamento normal (BASTIAN et al., 1993). Em relação aos IGFRs, a subunidade  $\alpha$  de IGF1R contém 11 potenciais sítios de *N*-glicosilação enquanto o domínio extracelular de IGF2R exibem 19 locais (KIESS et al., 1991; ULLRICH et al., 1986). Estas modificações de glicosilação afetam o dobramento, atividade e função do receptor, podendo variar de acordo com as condições fisiopatológicas (ROBAJAC et al., 2016).

#### **1.4.2 Proteínas *downstream***

A ativação dos receptores de insulina/IGF desencadeia uma sinalização intracelular através de proteínas IRS (substrato do receptor de insulina), uma família de moléculas adaptadoras que consistem em quatro membros bastante relacionados (IRS1-IRS4) e outros dois mais distantes (IRS5/DOK 4 e IRS6/DOK5), que articulam a ativação dos receptores às cascatas *downstream*, tais como as vias PI3K/AKT1 e RAS/MEK/ERK (IKINK et al., 2016). Em humanos duas formas são expressas, IRS1 e IRS2, sendo ambas altamente reguladas por fosforilação (Tyr, Ser e Thr) e por ubiquitinação (RUI et al., 2001). As vias PI3K/AKT1 e RAS/MEK/ERK, apesar de normalmente estarem associadas à sobrevivência e proliferação respectivamente, estão também intimamente interligadas modulando diversos mecanismos celulares, inclusive durante o desenvolvimento de tumores

malignos (YE et al., 2014). Os receptores e suas respectivas vias *downstream* estão representados na Figura 12.

Diversos mecanismos podem ocasionar um desequilíbrio na rede de sinalização do sistema insulina/IGF em câncer, incluindo: aumento da disponibilidade dos ligantes; desregulação de proteínas de sinalização; e superexpressão dos receptores. Recentemente, um número crescente de estudos revelaram que a sinalização insulina/IGF está envolvida na aquisição do fenótipo maligno tais como a transição epitélio mesenquimal, proliferação, invasão, migração e apoptose (DE-FREITAS-JUNIOR et al., 2017).



**Figura 12: O sistema insulina/fator de crescimento semelhante a insulina(IGF).** Os ligantes (insulina,IGF1 e IGF2) se ligam aos seus respectivos receptores, desencadeando vias *downstream* (RAS/MEK/ERK e PI3K/AKT1/mTORC1) através das proteínas IRS, com exceção de IGF2R que não desencadeia sinalização. As IGFbps modulam negativamente tanto IGF1 quanto IGF2. A

ativação da via RAS/MEK/ERK já foi demonstrada que está envolvida na *upregulação* do gene *MGAT5*, aumentando inclusive os níveis de expressão de N-glicanos  $\beta$  1,6 ramificados. Pelo contrário, a ativação da cascata de sinalização de PI3K/AKT/mTOR foi associado á diminuição da expressão de N-glicanos bissectados mediado por MGAT3. Estas sinalizações possuem um impacto no crescimento celular, sobrevivência e invasão, favorecendo portanto o desenvolvimento e progressão tumoral. Adaptado de (DE-FREITAS-JUNIOR et al., 2017).

### **1.4.3 Impacto do Sistema Insulina/IGF no desenvolvimento e progressão do câncer**

Alterações no sistema insulina/IGF podem estar relacionadas a aquisição de um fenótipo mais agressivo em diversos tipos de tumores epiteliais. Em carcinoma hepatocelular, a diminuição na expressão de IGFBP1 está correlacionada com a invasão microvascular e metástase (DAI et al., 2014). Além disso, o sistema insulina/IGF também pode contribuir na aquisição de resistência a quimio- e radioterapia. Um estudo utilizando células de câncer colorretal quimioresistente, selecionadas a partir do tratamento com 5-fluorouracil ou oxaliplatina, mostrou que estas células apresentam uma alta expressão de marcadores de CSC (do inglês, *cancer stem cells*) concomitante com o aumento da expressão e ativação de IGF1R (DALLAS et al., 2009). Em um modelo de quimioresistência de câncer de ovário, em que as células foram categorizadas em estágios de resistência inicial (as primeiras células resistentes, com viabilidade de 60 – 65%) e resistência tardia (viabilidade de 95%, referentes a  $IC_{50}$  de cada droga), a superexpressão de IGF1R foi associada com a aquisição inicial da resistência ao tratamento de cisplatina-paclitaxel (sozinho ou em combinação). Nestas mesmas células, o tratamento com inibidores de IGF1R (em combinação com cisplatina, paclitaxel ou ambos) foi capaz de reverter a resistência nestes estágios iniciais (SINGH et al., 2014). Ademais, tal inibição de IGF1R e também de AKT1 naqueles estágios mais avançados permitiram que o fenótipo das CSCs fosse anulado, demonstrando assim que a via IGF1R/AKT1 impacta significamente na aquisição da quimioresistência em células tumorais.

Em células de câncer de próstata que apresentam um fenótipo epitelial, o estímulo com IGF1 leva a uma superexpressão de ZEB1 tanto em níveis protéicos

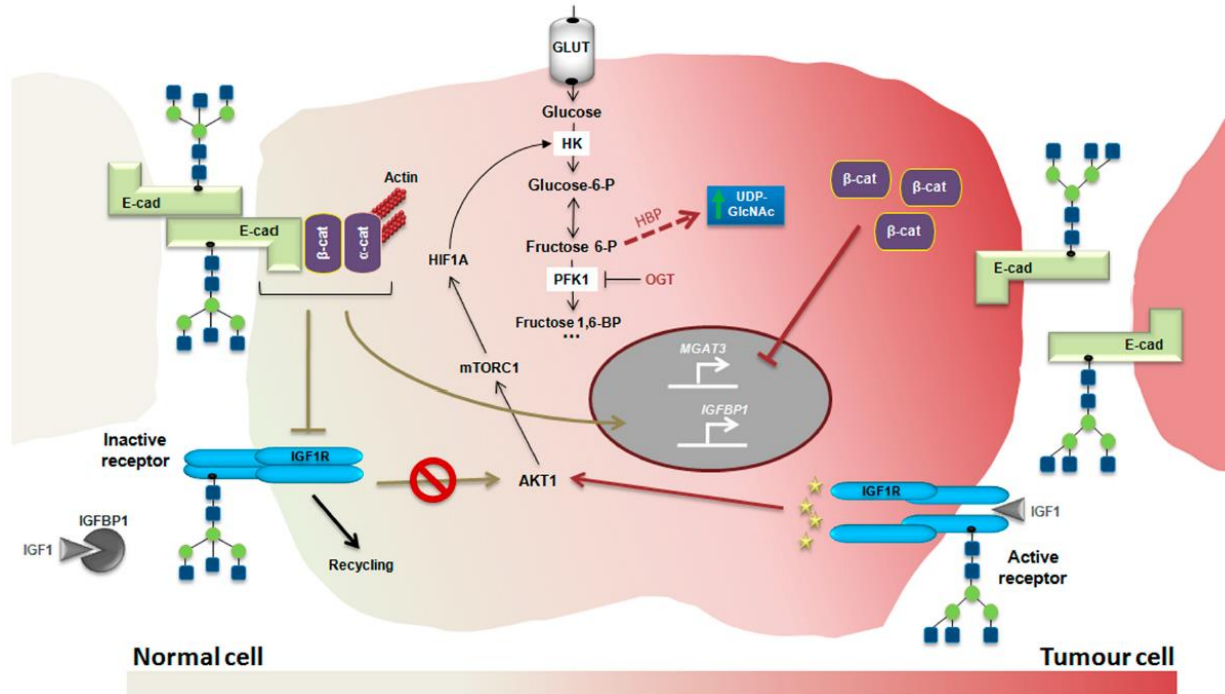


quanto de mRNA, ocasionando uma repressão de E-caderina e superexpressão de N-caderina e Fibronectina. Além disso, foi demonstrado um aumento nos níveis de Snail, outro fator de transcrição que inibe a expressão de E-caderina, quando induzido por IGF1 em células de câncer de pulmão, promovendo portanto a transição epitélio-mesenquimal (CRAENE; BERX, 2013; GRAHAM et al., 2008; ZHOU et al., 2015). Também foi observado que a inibição da sinalização PI3K/AKT1/mTORC1 ou *knockdown* de IGF1R foram capazes de suprimir o programa de EMT em células de câncer de mama, além de reduzir os nichos de CSC (CHANG et al., 2013).

Em um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado também um mecanismo integrado através do qual a interação entre a E-caderina e a sinalização de INSR/IGF1R é capaz de modular a expressão de N-glicanos bissectados. Neste modelo, foi observado que a expressão exógena de E-caderina em células MDA-MB-435 (que não expressam E-caderina endógena) inibe a fosforilação de INSR e IGF1R, enquanto que a estimulação das células MDA-MB-435+E-caderina com insulina e IGF1 promove diminuição tanto da expressão global de N-glicanos bissectados quanto dos especificamente ligados à E-caderina, além de induzir uma regulação positiva da expressão de marcadores mesenquimais e aumentar inclusive o potencial invasivo das células (DE-FREITAS-JUNIOR et al., 2013).

Considerando estes dados existentes na literatura, foi levantada a hipótese da existência de um mecanismo integrado através do qual alterações no sistema de insulina/IGF e modificações metabólicas que culminam na glicosilação aberrante poderiam regular o fenótipo maligno durante a progressão do câncer colorretal. A inter-relação em células de CCR ocorreriam uma vez que o alto grau de ramificações de N-glicanos tanto desestabilizariam a adesão célula-célula mediada por E-caderina quanto favoreceria a estabilização de IGF1 devido à sua interação com galectinas, potencializando o eixo AKT1/mTORC1/HIF1A/HK. Como consequência da regulação positiva de HK, o fluxo da via das hexosaminas (HBP) se tornaria maior, aumentando a biossíntese de GlcNAc. Concomitantemente à repressão do IGFBP1, a translocação da  $\beta$ -catenina citoplasmática para o núcleo

promoveria a inibição da expressão de MGAT3, estabelecendo assim um mecanismo de *feedback* positivo sobre a atividade de IGFR1. A figura 13 resume o modelo proposto.



**Figura 13: Modelo proposto: Glicanos e o sistema insulina/IGF no câncer, um mecanismo integrado.** Em um contexto normal, altos níveis de *N*-glicanos bissectados catalizados por MGAT3 favorecem o estabelecimento de um fenótipo estável, através da adesão célula-célula mediada por E-caderina, que por sua vez promove a expressão de MGAT3, estabelecendo assim um feedback funcional. Tanto as junções aderentes estáveis quanto a expressão de IGF1P1 levariam a inibição da atividade de IGFR1, associado portanto a um decréscimo do eixo AKT1/mTORC1/HIF1A/HK. No contexto do câncer, os altos níveis de *N*-glicanos  $\beta$  1,6 ramificados, catalizados pela MGAT5, desestabiliza a adesão célula célula mediada por E-caderina e favorece a ativação da via de IGF1R, portanto aumentando o eixo AKT1/mTORC1/HIF1A/HK. Além disso, como consequência da alta atividade de HK, o fluxo da via de biossíntese das hexosaminas (HBP) se intensifica, promovendo a biossíntese de GlcNAc e *N*-glicanos ramificados. A translocação da  $\beta$ -catenina do citoplasma para o núcleo promove a inibição de MGAT3, que concomitantemente com a repressão de IGF1P1, resulta em um mecanismo de feedback positivo para a atividade de IGFR1. Adaptado de (DE-FREITAS-JUNIOR et al., 2017).

## 2 OBJETIVO

### 2.1 GERAL

Compreender como os distúrbios na sinalização por INSR/IGF1R em células de câncer colorretal afetam o fenótipo maligno e os níveis de *N*-glicanos complexos, sobretudo os que apresentam ramificações formadas por  $\beta$ 1,6-GlcNAc.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Analisar a viabilidade das linhagens celulares de CCR ( HCT-116 e HT-29) frente ao tratamento bem como o nível de fosforilação dos receptores de insulina (INSR) e IGF1 (IGF1R)
- Analisar os níveis dos *N*-glicanos frente a inibição da sinalização mediada por INSR/IGFR por OSI-906
- Verificar os níveis de proteínas de adesão e sua localização subcelular após o tratamento das células de CCR com OSI-906

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 CULTURA DE CÉLULAS E TRATAMENTO COM OSI-906 e IGF1**

Duas linhagens celulares derivadas de câncer colorretal humano foram utilizadas neste estudo: HCT-116 (catálogo ATCC CCL-247), indiferenciada, invasiva e mutação em *RAS*; HT-29 (catálogo HTB-38), pouco diferenciada, muito invasiva e mutações em *P53* e *RAS*. Foram cultivadas, de acordo com o experimento, em frascos de cultura ou placas, a 37° C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM -GIBCO), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina G (100mg/L) e streptomomicina (60mg/L) (Invitrogen,CA,USA.). Após as células aderirem, o tratamento foi realizado com OSI-906 (Linsitinib, um duplo inibidor de moléculas de tirosina quinase de INSR e IGF1R) nas concentrações de 1 e 2 µM (BioVision, CA, USA). Já o tratamento com IGF1 (agonista de IGF1R) (Cell Signaling Technology, MA, USA) foi realizado na concentração de 50 ng/mL. As células-controle permaneciam com o meio já citado. Os períodos de incubação foram 24, 48 e 72h, dependendo do experimento realizado.

#### **3.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR**

As células HCT-116 e HT-29 foram cultivadas em placas de 96 poços e tratadas por 0, 24, 48 e 72h. Posteriormente, incubadas com 10µL de brometo tiazolil azul de tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich Co) por 2h a 37°C, no escuro. Em seguida, centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min. Após o descarte do sobrenadante, os cristais de formazan foram diluídos em 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich Co.), homogeneizando por 3 min. No escuro, foram incubadas por 10 min a 37°C. A absorbância de 538nm foi então medida pelo espectrofotômetro modelo Spectra Max 190 spectrophotometer (Molecular Devices, LLC, CA, EUA).

### 3.3 LECTINAS

A fim de monitorar os níveis de glicanos, foram utilizadas duas lectinas específicas: L-PHA (*Phaseolus Vulgaris leucoagglutinin*) (Vector laboratories, CA, EUA) a qual reconhece *N*-glicanos complexos tri ou tetra-antenados, com ramificações formadas a partir da adição de  $\beta$ 1,6 *N*-acetilglicosamina e E- PHA (*Phaseolus Vulgaris E*) (United States Biological, MA, USA) específicas para *N*-glicanos bissectados com ramificações  $\beta$ 1,4GlcNAc.

### 3.4 CITOMETRIA DE FLUXO

Transcorridas 48h do tratamento com o inibidor OSI-906, nas concentrações de 1 e 2  $\mu$ M, mantidas em placas de 6 poços, as células foram 2x lavadas com PBS, tripsinalizadas (Invitrogen Co.) e centrifugadas a 1500 rpm durante 2 min. Em seguida ao descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuscitado em 1 mL de PBS e o processo de centrifugação se repetiu. Posteriormente, 600 $\mu$ L de paraformaldeído 4% (diluído em PBS a partir de paraformaldeído 16%) (Electron Microscopy Sciences, PA, USA) foram utilizados para a fixação, em cada condição, durante 8 min. Após uma sequência de centrifugações e lavagens com PBS, as lectinas E-PHA e L-PHA, a uma concentração de 5 $\mu$ g/mL, foram adicionadas e incubadas por 30 min em agitação leve. Células não marcadas foram utilizadas a fim de obter controles negativos das lectinas, adicionando ao invés destas, BSA 4% (Sigma-Aldrich Co). Logo depois da lavagem do precipitado formado após a nova centrifugação, ressuspendeu-se em 400  $\mu$ L de PBS as células, analisando por citometria de fluxo (Acure). A partir dos dados obtidos, geraram-se gráficos em histograma e *dotspot*, com valores das médias e medianas, através do *software* FlowJo.

### 3.5 WESTERN BLOTTING

Após o tratamento, as células foram lavadas 2x com PBS e extraídas com um tampão de lise, composto por NP-40 1% (CalbioChem) Tris-HCl 20mM pH8.0

(Sigma-Aldrich Co.), NaCl 137 mM (Sigma-Aldrich Co.), glicerol 9% (MERK, HE,GER), EDTA 2mM (Sigma-Aldrich Co.), coquetel de inibidores de proteases (1:100) e ortovanadato de sódio (1:100) (Sigma-Aldrich Co). O produto proveniente da extração foi homogeneizado ao longo de 30 min, a intervalos de 5 min no vórtex e centrifugado a 1000 g a 4°C durante 10 min. O sobrenadante teve seus níveis protéicos estabelecidos a partir do ensaio BCA (BioAgency, SP, BR), utilizando a proteína albumina sérica bovina (BSA) como padrão. O conteúdo protéico de cada amostra, contendo 45µg, foi separado eletroforéticamente por SDS-PAGE em géis de poliacrilamida na concentração de 10%. Em seguida, estas proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando uma cuba de transferência semi-úmida (Bio-Rad Laboratories Inc.) a 10V por 1h.

O bloqueio seguiu-se a partir de uma solução de leite desnatado 5% em TBS-T 0,1% durante 1h e assim, foram incubadas com anticorpos primários *overnight* a 4°C. Após uma série de lavagens com TBS-T 0,1%, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário diluído em solução de bloqueio, durante 1h e em seguida, reveladas com o Kit ECL (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA).

Os anticorpos primários utilizados foram: p-INSRIGF1R (1:1000 e 1:250) ; IGF1R (1:000) ; INSR (1:1000);  $\beta$ -catenina (1:1000) (Cell Signaling, rabbit) ; E-caderina( 1:2500) (Zymed, mouse). Todos foram diluídos em TBS-1 0,1%. Para o anticorpo secundário, foi utilizado na concentração de 1:40000 na solução de bloqueio (leite a 5% em TBS-T 0,1%).

### **3.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA**

Decorridas 48 h do tratamento com o inibidor, nas concentrações 1 e 2 µM, as células mantidas em placas de 12 poços sobre lamínulas de vidro, foram lavadas com PBS e fixadas por 10 min em paraformaldeído 4%. Após lavagem com PBS/CM (PBS contendo CaCl<sub>2</sub> e MgCl<sub>2</sub> a 100mM), as mesmas permaneceram 10 min em NH<sub>4</sub>Cl e em seguida, foram reidratadas com PBS/CM e permeabilizadas por 5 min com 0,5% Triton X-100. Posteriormente, seguiu-se o

bloqueio por 1 h em BSA 0,2% e incubação *overnight* com os anticorpos primários anti- E-caderina e  $\beta$ -catenina (ambos mouse, diluição 1:300) (BD, NH, USA e Zymed Laboratories, Inc. respectivamente) em atmosfera úmida. Sucessivamente as lavagens com PBS, as lamínulas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a AlexaFluor 488 por 1h (diluição 1:200) (ThermoFisher Scientific, MA, USA). A fim de visualizar a organização dos filamentos de actina, as células foram incubadas com faloidina conjugada a TRIT-C (concentração 500ng/mL) durante 30 min e novamente lavadas com PBS. Seus núcleos foram marcados com DAPI (Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole) (Vector Laboratories., EUA) durante 1 min e em seguida, as lamínulas foram montadas em lâminas utilizando *Prolong Gold Antifade Reagent* (Invitrogen,CA,USA ). As imagens foram obtidas através do microscópio de fluorescência Apotome Axiovert 200M (Carl Zeiss Inc.).

### **3.7 DENSITOMETRIA E ANÁLISE ESTATÍSTICA**

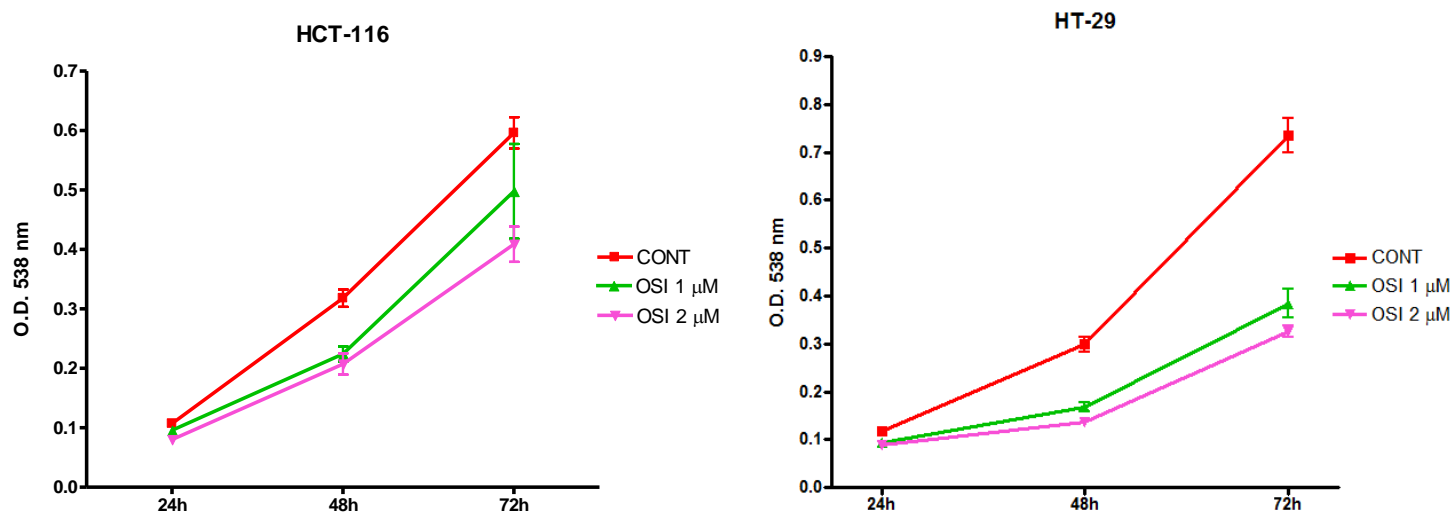
A densitometria dos filmes fotográficos foi realizada segundo o *software* Labworks 4.6 (UVP Inc., Upland, EUA). A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPadPrism 4.02 (GraphPad Software Inc., EUA). Foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0.05$  pelo One-way ANOVA, após a análise de três experimentos independentes.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 As linhagens celulares de CCR (HCT-116 e HT-29) tratadas com o inibidor OSI-906 sofrem diminuição em sua viabilidade**

A fim de analisar o efeito do OSI-906 sobre a viabilidade celular em células de CCR, as linhagens celulares HCT-116 e HT-29 foram tratadas com o referido inibidor nas concentrações de 1 e 2  $\mu$ M por 24, 48 e 72h, e, em seguida, foi realizado o ensaio de MTT. Foi vista uma diminuição da viabilidade celular em ambas as linhagens, sendo mais proeminente na HT-29, entretanto, tanto nesta quanto na HCT-116, houve uma resposta dose-dependente, ou seja, na concentração mais alta do tratamento, as células estavam menos viáveis (Figura

14). Além disso, na linhagem HCT-116, a concentração de  $1\mu\text{M}$  apresentou uma similaridade com o controle após 72h de tratamento, desta forma, para as análises subsequentes, foi escolhido o tempo de 48 h, uma vez que no tempo de 24 h, a quantidade de células poderia impossibilitar futuros experimentos.



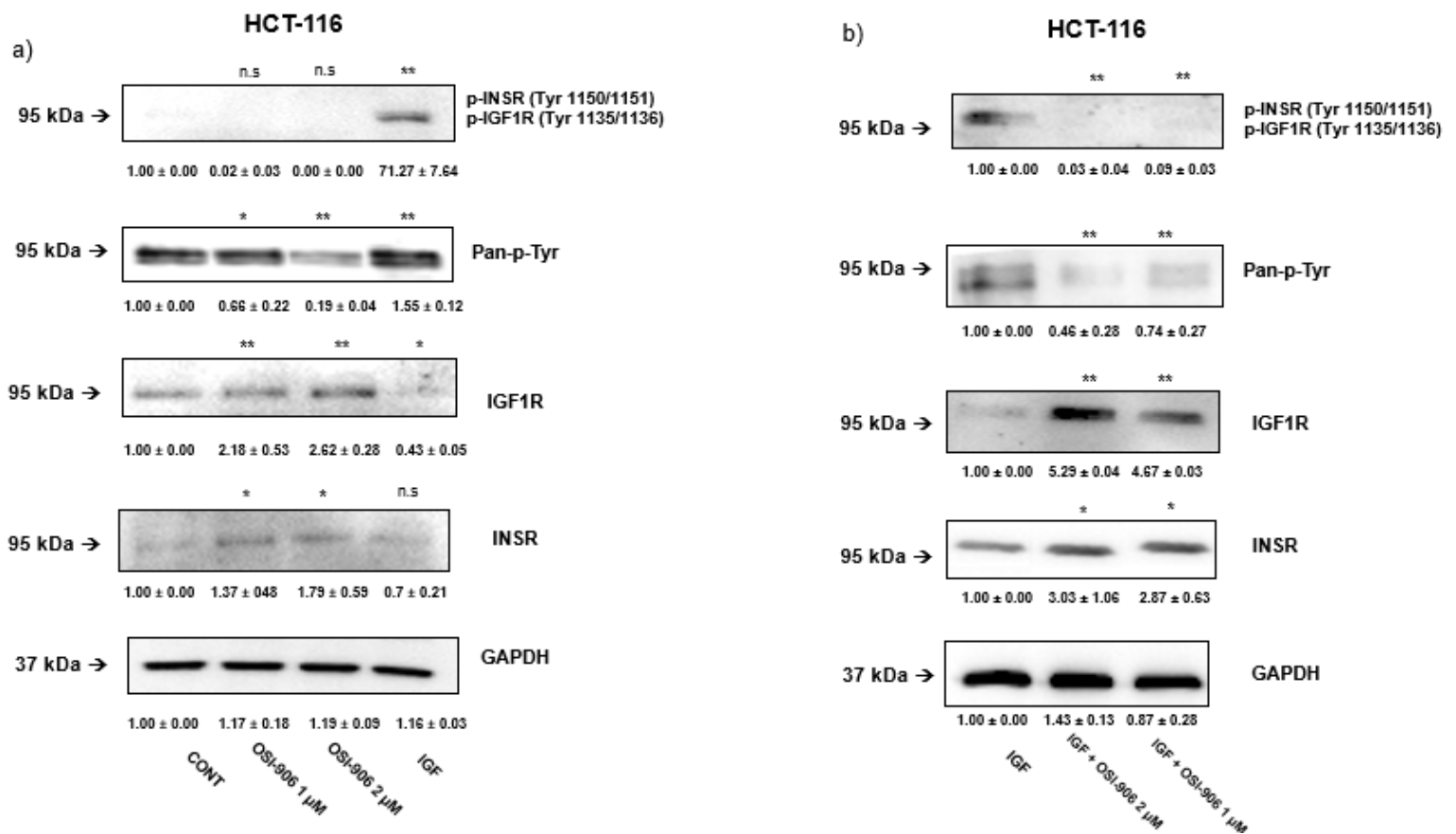
**Figura 14: Efeitos do tratamento com OSI-906 sobre a viabilidade de células de CCR. O monitoramento da viabilidade celular foi realizado através do ensaio MTT, nas células HCT-116 e HT-29, frente o tratamento com o inibidor (1 e 2  $\mu\text{M}$ ), nos tempos de 24,48 e 72h.**

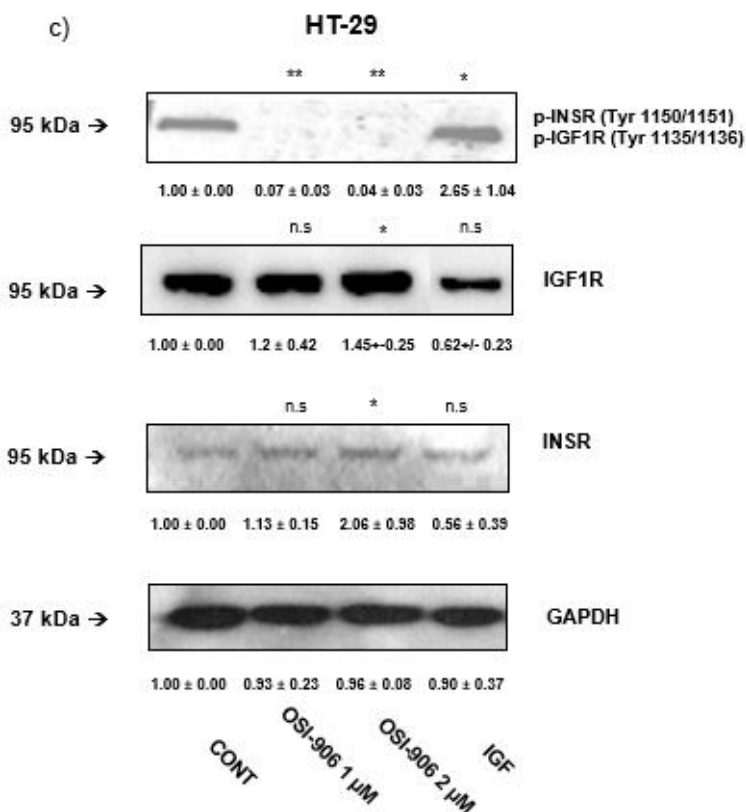
#### **4.2 O tratamento de células de CCR (HCT-116 e HT-29) com OSI-906 inibe a fosforilação dos receptores de insulina (INSR) e IGF1 (IGF1R)**

A fim de verificar a capacidade inibitória de OSI-906 em células de CCR, foram analisados os efeitos deste inibidor sobre os níveis de fosforilação de INSR e IGF1R. Na linhagem HCT-116, os níveis basais de fosforilação dos receptores não foram detectáveis com o anticorpo utilizado, o que foi contornado mediante estímulo com IGF1 (Figura 15, letras a e b). Entretanto, um forte indício da eficiência de OSI-906 em tais células foi visto quando analisados os níveis de fosforilação em tirosinas (anticorpo Pan-p-Tyr) na faixa de peso molecular dos



receptores de insulina e IGF1, indicando uma diminuição dose-dependente em seus níveis e um aumento na condição de estímulo com IGF1. A respeito dos níveis totais dos receptores, foi observado um aumento quando as células foram tratadas com OSI-906 e diminuição sob estímulo com IGF1 (Figura 15, letra a). Na linhagem HT-29, observou-se a completa inibição da fosforilação dos receptores em ambas as concentrações do inibidor, e um aumento dos níveis das formas fosforiladas quando estimulada por IGF1, sendo o período de tratamento de 48h (Figura 15, letra c). Em relação aos níveis totais dos receptores, houve um aumento em ambas condições de tratamento, e uma diminuição quando estimulada por IGF1.





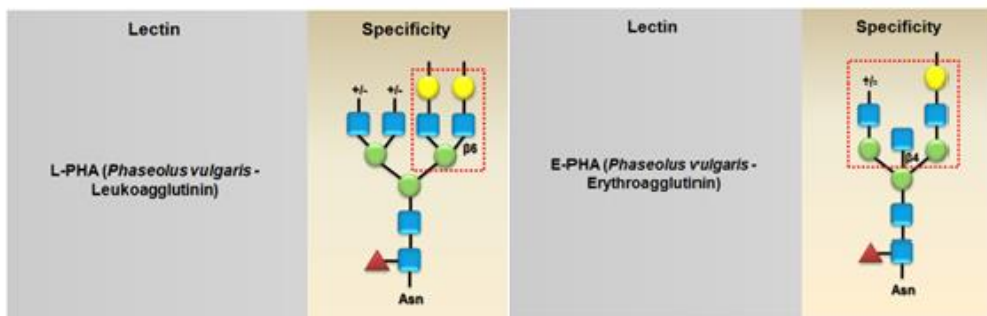
**Figura 15: Avaliação da eficiência do tratamento com OSI-906 em células de CCR.** Após o período de 48h de tratamento, foi realizado *Western Blotting* a fim de analisar o nível de fosforilação das proteínas INSR e IGF1R, nas células HCT-116 e HT-29. Médias e desvio padrão representados, em comparação com o controle \*P<0,05 \*\* P<0,01 n=3

#### 4.3 Repressão da sinalização por INSR/IGF1R afeta os níveis de diferentes *N*-glicanos nas células HCT-116 e HT-29

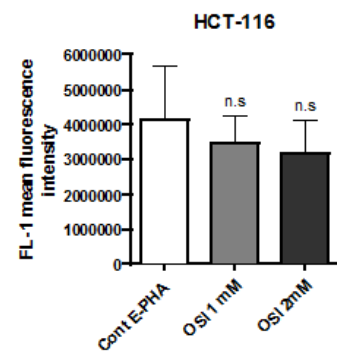
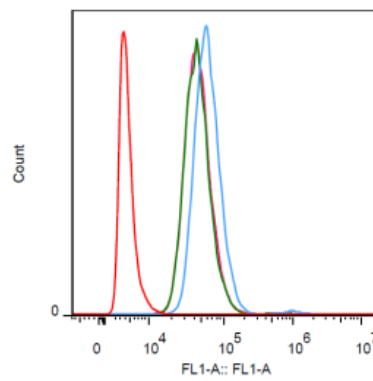
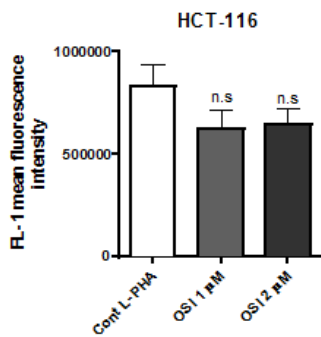
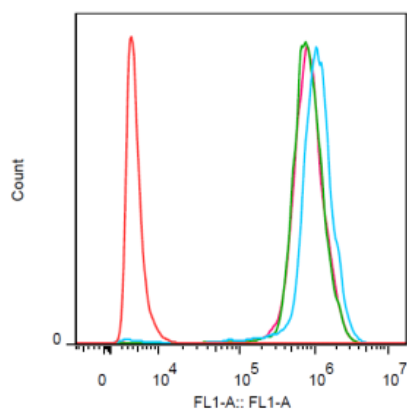
A fim de investigar se a via de insulina/IGF seria capaz de afetar os níveis totais de *N*-glicanos ramificados e bissectados, utilizou-se OSI-906 para reprimir a mesma, e em seguida, foi realizado um ensaio de citometria de fluxo em que as células foram marcadas com as lectinas específicas L-PHA e E-PHA conjugadas a isotiocianato de fluoresceína (FIT-C) (especificidade de cada conforme Figura 16, letra a). Em relação a HCT-116, o tratamento promoveu uma tendência em diminuir tanto os níveis dos ramificados (Figura 16, letra b, painel esquerdo), como esperado, porém, também aqueles bissectados (Figura 16, letra b, painel

direito). Na condição experimental em que há tratamento prévio com IGF1 e posterior inibição com OSI-906, os resultados foram similares, sendo observadas uma tendência em diminuir tanto os níveis de *N*-glicanos ramificados (L-PHA positivos) (Figura 16, letra c, painel esquerdo) quanto dos bissectados (E-PHA positivos) (Figura 16, letra c, painel direito), em ambas as concentrações. Já nos resultados referentes à linhagem HT-29, houve uma tendência na redução dos níveis de *N*-glicanos ramificados (Figura 16, letra d, painel esquerdo), enquanto observou-se um indício em aumento nos níveis dos glicanos positivos para a marcação com E-PHA, em ambas as concentrações do inibidor, sendo este possível aumento mais acentuado mediante tratamento com 2  $\mu$ M de OSI-906 (Figura 16, letra d, painel direito).

a)



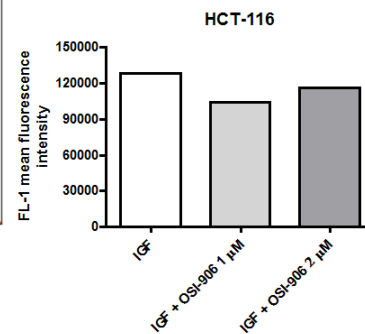
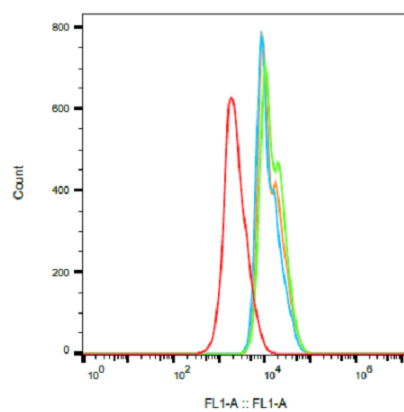
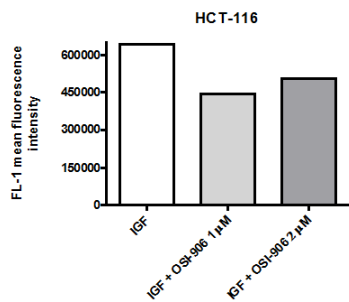
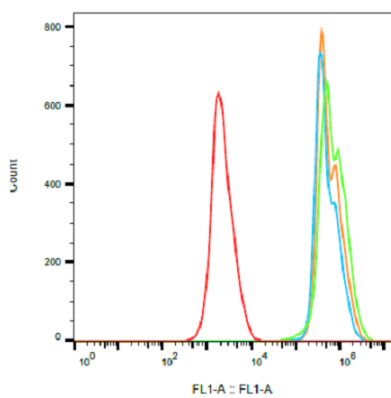
b)



Sample Name	
—	Cont neg.fcs
—	CONT L-PHA.fcs
—	L-PHA OSI 1uM.fcs
—	L-PHA OSI 2uM.fcs

Sample Name	
—	Cont neg.fcs
—	CONT E-PHA.fcs
—	E-PHA OSI 1uM.fcs
—	E-PHA OSI 2uM.fcs

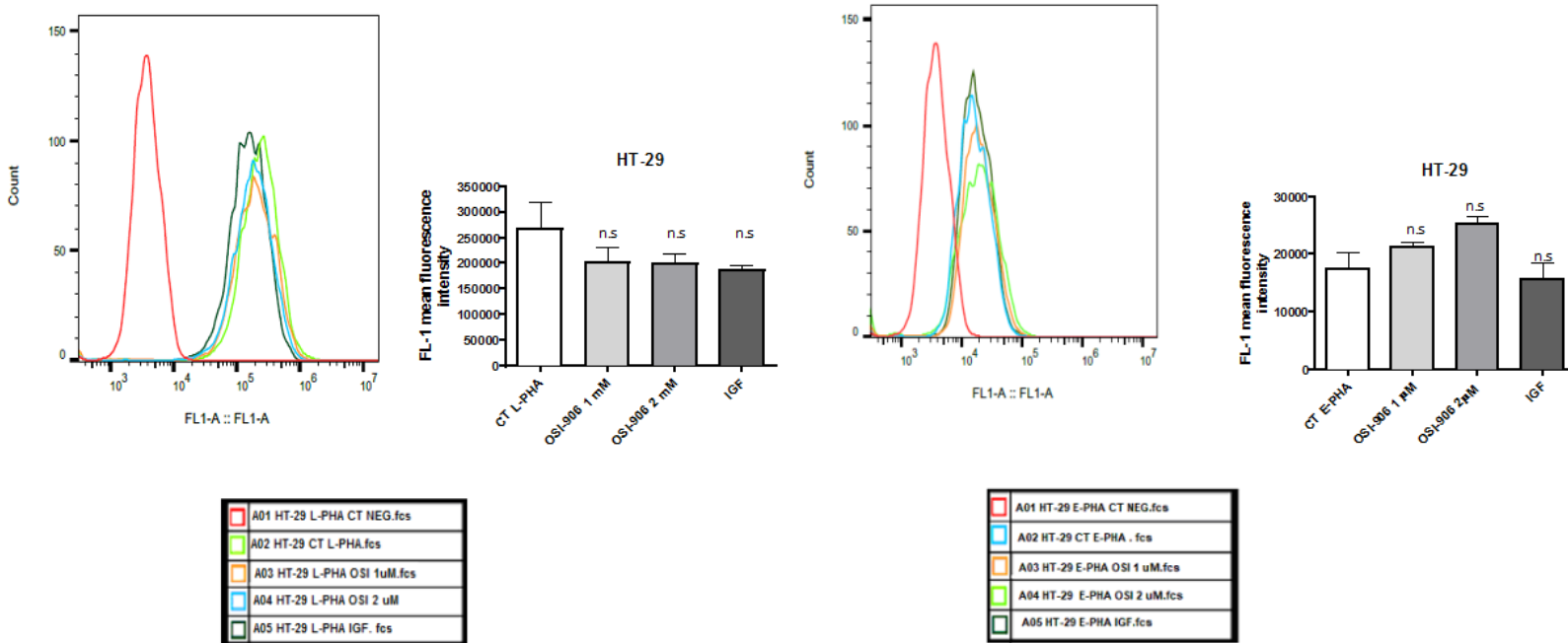
c)



Sample Name	
—	A01 CN.fcs
—	A05 LPHA+IGF.fcs
—	A03 LPHA+IGF+OSI 1uM.fcs
—	A04 LPHA+IGF+OSI 2uM.fcs

Sample Name	
—	A01 CN.fcs
—	A09 EPHA+IGF.fcs
—	A07 E-PHA+IGF+OSI 1uM.fcs
—	A08 EPHA+IGF+OSI 2uM.fcs

d)

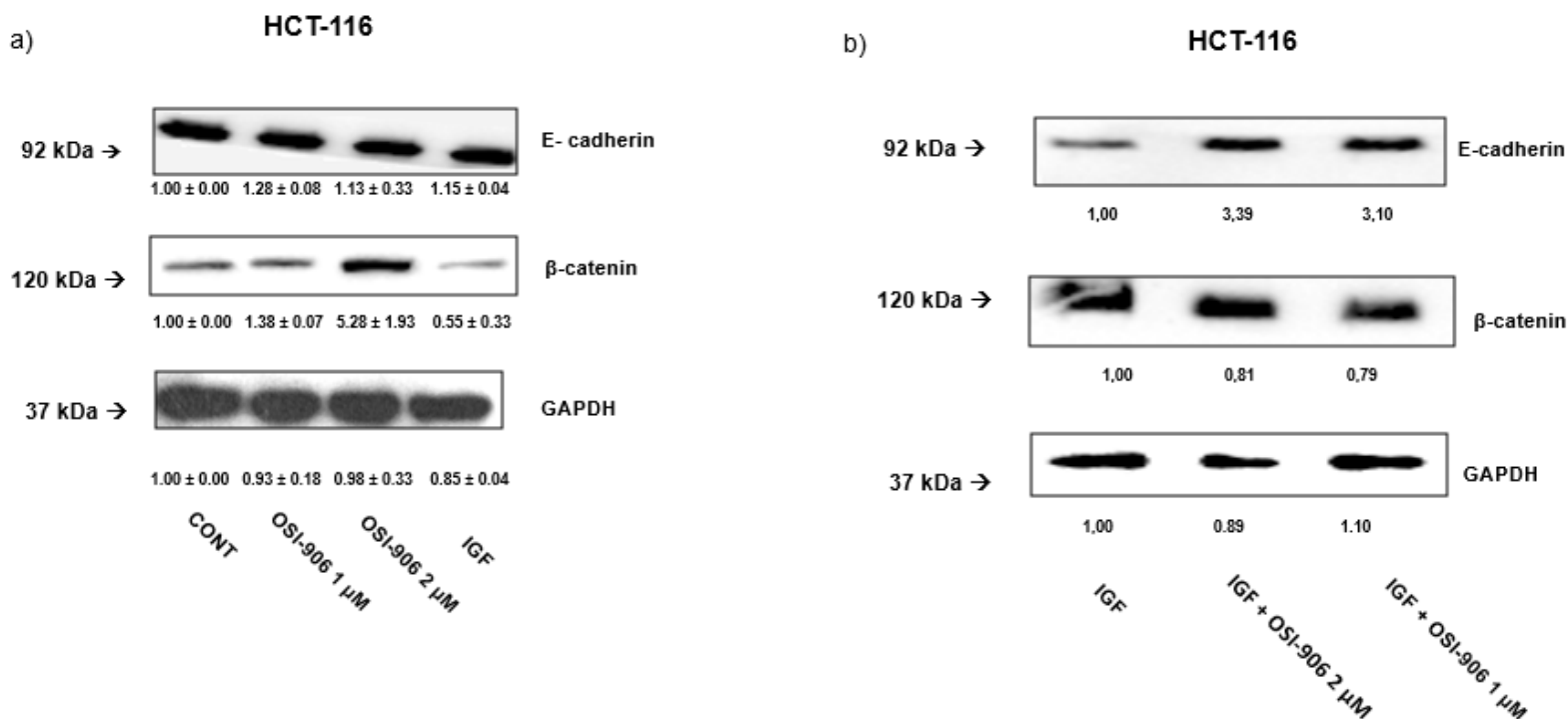


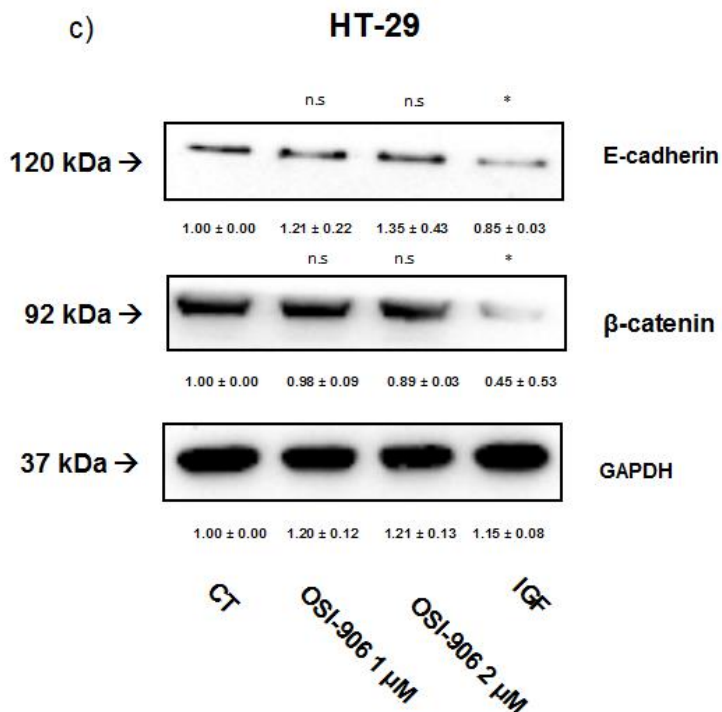
**Figura 16: Efeitos da repressão da sinalização mediada por INSR/IGF1R sobre os níveis de *N*-glicanos nas células HCT-116 e HT-29.** Após 48h de tratamento, as células foram tripsinilizadas e, para a quantificação da intensidade de fluorescência por citometria de fluxo, foram utilizadas as seguintes lectinas específicas: L-PHA, a qual reconhece *N*-glicanos complexos tri ou tetra-antenados, com ramificações formadas a partir da adição de  $\beta$ 1,6 *N*-acetilglicosamina; E- PHA específicas para *N*- glicanos bissectados com ramificações  $\beta$ 1,4GlcNAc. n=3

#### 4.4 A Inibição da via de insulina/IGF1 afeta os níveis de proteínas que compõem as junções aderentes

Visto que tanto a sinalização por receptores tirosina-quinase quanto modificações pós-traducionais podem alterar os níveis de proteínas do complexo juncional apical, foi analisado se a repressão da via de insulina/IGF1 também exercia efeito sobre proteínas constituintes das junções aderentes. Para tal, foi realizado um *western blotting*, para as proteínas E-caderina e  $\beta$ -catenina. Referente ao tratamento das células HCT-116 somente com OSI-906, aparentemente, não ocorreram modificações nos níveis da E-caderina, entretanto,

quando observada a  $\beta$ -catenina, a inibição da via de insulina/IGF levou a aumento de seus níveis, sendo mais acentuado na maior concentração utilizada (2  $\mu$ M), por outro lado, mediante estimulação com IGF1, observou-se uma redução dos níveis desta proteína (Figura 17, letra a). Na condição em que as células HCT-116 foram previamente estimuladas com IGF1, verificou-se que o tratamento com OSI-906 promoveu aumento dos níveis de E-caderina (Figura 17, letra b). Em relação a  $\beta$ -catenina, foi visto que em ambos tratamentos, houve uma tênue diminuição de seus níveis (Figura 17, letra b). Nas células HT-29, os níveis de  $\beta$ -catenina, frente ao tratamento com o inibidor, assemelharam-se ao controle, no entanto, houve diminuição mediante estímulo com IGF (Figura 17, letra c). Já em relação aos níveis de E-caderina, um discreto aumento foi observado após o tratamento com ambas as concentrações de OSI-906, entretanto, naquelas estimuladas apenas com IGF1, ocorreu uma diminuição dos níveis desta. (Figura 17, letra c).

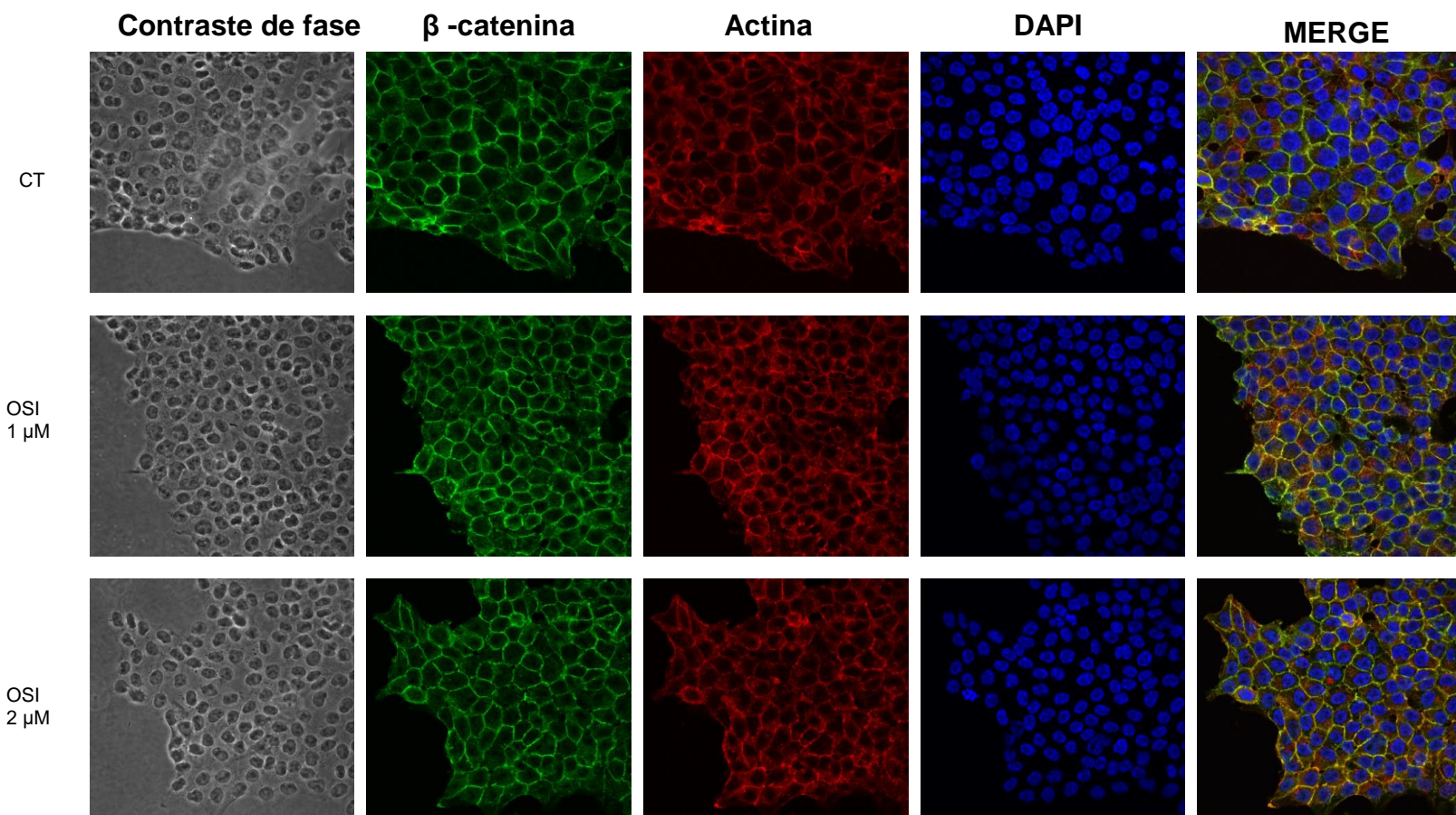




**Figura 17: Efeitos do tratamento com OSI-906 sobre os níveis de proteínas das constituintes das junções aderentes em células de CCR.** Para tal, foi realizado um *western blotting*, para as proteínas E-caderina e β-catenina \*P<0,05

#### 4.5 Inibição da via de insulina/IGF promove mudança na conformação nas células HCT-116

Uma vez analisada a expressão, era importante investigar se ocorria uma mudança também na localização das proteínas de junções avaliadas, além de observar o citoesqueleto, através da organização dos filamentos de actina. Para tal, após 48 h de tratamento, foi realizado um ensaio de imunofluorescência nas células HCT-116. Não foram observadas mudanças expressivas na localização subcelular de β-catenina e na organização básica do citoesqueleto de actina. Foi observado que em ambas as concentrações de OSI-906 ocorreu uma mudança na conformação nas células HCT-116, que adquiriram um maior nível de compactação celular, sugerindo que possam ter sofrido diminuição de tamanho/volume (Figura 18).



**Figura 18: Efeitos do tratamento com OSI-906 sobre o citoesqueleto de actina e proteína constituinte das junções aderentes em células de CCR.** As células foram mantidas em placas de 12 poços sobre lamínulas de vidro, e após 48 h do tratamento com o inibidor, nas concentrações 1 e 2  $\mu$ M, foi realizado um ensaio de imunofluorescência.

## 5. DISCUSSÃO

A glicosilação aberrante tem sido considerada um evento crucial na progressão de tumores epiteliais (MUNKLEY; MILLS; ELLIOTT, 2016; PINHO; REIS, 2015), entretanto, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos com alterações nos níveis de *N*-glicanos durante a progressão do CCR necessitam de maiores estudos a fim de serem completamente esclarecidos. Assim, conforme abordado ao longo do trabalho, há indícios da existência de um mecanismo através do qual alterações no sistema insulina/IGF, e modificações metabólicas que



culminem na glicosilação aberrante, poderiam regular o fenótipo maligno durante a progressão do CCR. Uma vez que tanto a glicosilação de proteínas quanto a sinalização insulina/IGF têm sido consideradas alvos terapêuticos em potencial, no presente estudo foi utilizado o composto OSI-906, a fim de observar se a inibição desta via teria algum impacto sobre a glicosilação em células de CCR. Sabe-se que há uma redução significativa do crescimento de tumores humanos, em modelos xenográficos, induzida por tratamento com anticorpos que inibem a via em questão (FENG et al., 2012; LEIPHRAKAM et al., 2014). Apesar do uso clínico do OSI-906 ser controverso quanto a sua eficácia terapêutica (QU et al., 2017), pois a reatividade cruzada com o INSR-B pode modular o metabolismo da glicose *in vivo* levando à resistência à insulina e hiperglicemia (ATZORI et al., 2011; SIMPSON et al., 2017), seu uso com a finalidade de elucidar mecanismos celulares revela-se válido.

Sendo assim, foi observada que a inibição da via de insulina/IGF com o uso de tal inibidor promoveu uma diminuição na viabilidade de ambas as células de CCR utilizadas, sendo em HT-29 a redução mais proeminente. PITTS *et al.*, 2010 observaram que dentre diversas linhagens celulares de CCR, a HT-29 foi categorizada como sensível a OSI-906 ( $IC_{50} < 1.5 \mu\text{mol/L}$ ) enquanto HCT-116, como resistente ( $IC_{50} > 5 \mu\text{mol/L}$ ). Aqui, o mecanismo responsável por tal diminuição na viabilidade celular não foi averiguado, entretanto, sabe-se que OSI-906 inibe a proliferação mediada por IGF1/IGF2 além de induzir apoptose, sendo que a sensibilidade pela droga varia a partir da linhagem celular, sendo aquelas com fenótipo epitelial mais sensíveis quando comparadas com aquelas submetidas a transição epitelio-mesenquimal (MULVIHILL et al., 2009). Vale ressaltar que já foi visto o efeito pró-apoptótico de OSI-906 através da via *IRS1/IRS2/PI3K/AKT*, através de uma regulação negativa de IRS-1/2 e *p-AKT* (S473) e um aumento significativo da morte celular após o tratamento com tal inibidor, isolado ou em conjunto com MK-0646/Dalotuzumab (anticorpo monoclonal anti-IGF). Foi constatado também que *XIAP* (do inglês, *X-linked inhibitor of apoptosis protein*), um substrato fisiológico de *AKT* crítico para a sobrevivência celular que neutraliza a ativação de caspases, é regulada negativamente com tratamentos MK-0646 e OSI-

906, demonstrando que o esta proteína é um alvo *downstream* de IGF1R (LEIPHRAKPAM et al., 2014).

Alterações moleculares que afetam fatores de crescimento e seus respectivos receptores desempenham papel importante na progressão tumoral, sendo a via de sinalização de insulina/IGF superexpressa em muitos tipos de câncer, incluindo CCR. Cerca de 30 - 40% dos tumores colorretais, são dependentes de IGF1R (LEIPHRAKPAM et al., 2014). Sendo assim, foi investigado como estava o estado de ativação desta via de sinalização nas linhagens celulares utilizadas no presente estudo. Em HCT-116, não foram detectáveis níveis basais de ativação dos receptores, sendo compatível com o que já foi visto por BARICEVIC et al., 2015. Em relação às células HT-29, o resultado aqui encontrado corrobora com outros dados da literatura, em que foi observado que esta linhagem apresenta níveis basais de fosforilação nos receptores de INSR e IGF1R (BARICEVIC et al., 2015), sendo que a partir do estímulo por IGF1, a fosforilação ocorre de maneira dose dependente. Na linhagem HCT-116, porém, os níveis de fosforilação do receptor só foram detectáveis por *western blotting*, quando ocorre estimulação por análogos de insulina ou tratamento com ligantes (BARICEVIC et al., 2015; SETI; LEIKIN-FRENKEL; WERNER, 2009). Desta forma, no decorrer do presente trabalho, optou-se por acrescentar uma nova condição experimental caracterizada pelo tratamento prévio das células HCT-116 com IGF1, condição controle, mesmo havendo indícios de que a via estava de alguma forma sendo afetada pelo OSI-906, conforme observado na análise dos níveis de fosforilação em tirosinas (anticorpo Pan-p-Tyr) na faixa de peso molecular dos receptores de insulina e IGF1, além do fato do tratamento ter promovido diminuição em sua viabilidade celular.

Após confirmação da eficácia do inibidor, foi analisado o impacto da inibição da via de insulina/IGF1 sobre o perfil de glicosilação das células. Sabe-se que a sinalização mediada por INSR/IGF1R está relacionada ao eixo *AKT/mTORC/HIF1A*, que no contexto do câncer (VERNIERI et al., 2016) pode promover uma alta atividade da enzima hexoquinase (HK) (DE-FREITAS-JUNIOR et al., 2017); como consequência, pode haver intensificação da via das

hexosaminas, afetando assim os níveis intracelulares de UDP-GlcNAc (VASCONCELOS-DOS-SANTOS et al., 2017). Este nucleotídeo doador de açúcar é de vital importância para a formação de diversos glicoconjugados e sua desregulação pode acarretar a glicosilação aberrante, tal como ocorre em células malignas. Uma das alterações mais frequentemente do glicoma, observadas no CCR, é o aumento dos níveis de *N*-glicanos ramificados (VERY; LEFEBVRE; YAZIDI-BELKOURA, 2018). Em função disso, realizou-se um ensaio de citometria de fluxo a fim de investigar os níveis tanto de *N*-glicanos ramificados quanto dos bissectados, uma vez que as enzimas responsáveis por ambas estruturas (MGAT5 e MGAT3) competem pelo mesmo substrato, exercendo de uma maneira geral papéis contrários no contexto da progressão tumoral de carcinomas (KIZUKA; TANIGUCHI, 2016).

Nas duas condições de tratamento das células HCT-116 com OSI-906 que foram testadas (estimuladas previamente ou não com IGF1) ocorreu uma tendência na diminuição dos níveis de *N*-glicanos com ramificações do tipo  $\beta$ 1-6 (L-PHA positivos), o que também foi observado em células HT-29 tratadas com mesmo inibidor. Tal resultado corrobora com uma hipótese apresentada em estudo prévio, a qual já apontava possível correlação entre os níveis de *N*-glicanos com ramificações do tipo  $\beta$ -1,6 e ativação da via de IGF1R (DE-FREITAS-JUNIOR et al., 2017).

Entretanto, uma série de outras análises devem ser realizadas a fim de elucidar completamente os detalhes moleculares envolvidos neste rede regulatória. Em relação aos níveis de *N*-glicanos bissectados (E-PHA positivos), em HCT-116 e HT-29, foi vista uma diminuição quando ocorria tratamento com OSI-906, o que foi considerado um resultado surpreendente, entretanto, estas mudanças no glicoma se mostraram sutis no referido estudo e, mesmo que não tenham sido estatisticamente significativas, não se pode afirmar ainda que não haja uma importância biológica associada. Em trabalho realizado por nosso grupo utilizando a linhagem MDA-MB-435 (células de melanoma previamente descrita como derivadas de carcinoma ductal de mama) foi relatado um mecanismo integrado através do qual os níveis de *N*-glicanos bissectados são regulados por *crosstalk*

entre a E-caderina e a sinalização de INSR/IGF1R, no entanto, neste caso a inativação da via correlacionou-se com aumento dos níveis de glicanos bissectados (DE-FREITAS-JUNIOR et al., 2013). É importante ressaltar que os resultados baseados em citometria de fluxo aqui apresentados, por carecerem de mais réplicas biológicas, devem ser considerados ainda como dados preliminares.

Conjuntamente, embora os resultados sejam mais consistentes no que tange a diminuição dos *N*-glicanos com ramificações do tipo  $\beta$ -1,6 nas células de CCR tratadas com OSI-906, também são necessárias mais análises para compreender de forma pormenorizada como se dá a relação entre a via de insulina/IGF e a regulação dos níveis deste tipo de *N*-glicano. Um possível desdobramento desse projeto que poderá auxiliar a esmiuçar esta relação, será através da utilização de células de CCR *knockout* (CRISPR/Cas9) para *MGAT5* (modelo recentemente desenvolvido por nosso grupo de pesquisa), pois, no sentido contrário, veríamos se a inibição nos níveis destes glicanos implicaria em alguma mudança substancial no sistema de insulina/IGF1R. Há indícios que *N*-glicanos ramificados tem estreita relação com tais vias metabólicas, pois foi visto que camundongos *Mgat 5*<sup>-/-</sup> apresentaram hipoglicemia, uma melhor tolerância a glicose e menor sensibilidade a glucagon, além de uma diminuição de metabólitos glicolíticos e de HBP, um desequilíbrio regulatório similar aos relatados naqueles camundongos *knockout* para *Gcgr* (do inglês, *glucagon receptor precursor*). Portanto, o remodelando dos níveis de *N*-glicanos, no receptor de glucagon, resulta em mudanças nos nutrientes da via de biossíntese de hexosamina, retratando assim a importância biológica em estudar o impacto dos glicanos em questão sob vias metabólicas. (JOHNSWICH et al., 2014).

Visto que ocorreu uma alteração nos níveis de *N*-glicanos e que tanto modificações pós-traducionais quanto vias desencadeadas por receptores tirosina-quinase podem alterar os níveis de proteínas do complexo juncional (HALL et al., 2014; LU et al., 2003; PINHO et al., 2013), foram analisados também os níveis de duas proteínas constituintes das junções aderentes (E-caderina e  $\beta$ -catenina). Sabe-se que ambas exercem papel fundamental na adesão célula-célula, auxiliando na manutenção da morfologia da célula epitelial. Os resultados

mostraram que o inibidor da via de insulina/IGF1 promoveu aumento nos níveis de E-caderina nas células HT-29, e, nas células HCT-116, este aumento foi observado de forma tênue e na condição em que a inibição com OSI-906 foi precedida por estímulo com IGF1, de forma mais acentuada. Tal resultado pode apontar para um fenótipo mais epitelial, uma vez que no presente trabalho foi vista uma diminuição dos níveis de *N*-glicanos ramificados, o que pode ter facilitado a estabilidade dos complexos de adesão célula-célula, uma vez que estas estruturas ramificadas atuam como obstáculo estereoquímico que dificulta interação molecular entre moléculas de E-caderina de células vizinhas. Além disso, estudos descrevem que níveis diminuídos, ou quando ocorre a perda de função ou expressão de E-caderina, levam a mudanças morfológicas e aquisição de um fenótipo mais móvel e invasivo (CHENG; CHANG; LEUNG, 2012). Em relação a  $\beta$ -catenina, o tratamento com OSI-906 levou a uma tênue diminuição em seus níveis, tanto em HT-29 (não significativo) quanto nas células HCT-116 estimuladas previamente com IGF. Tal resultado necessita de maiores investigações, com a finalidade de verificar uma possível correlação entre a via de insulina/IGF1 e a sinalização da via de Wnt/ $\beta$ -catenina. Estudos retratam que a sinalização mediada por IGFR pode tanto inibir a atividade de GSK3- $\beta$  (glicogênio sintase quinase 3 beta) em carcinoma hepatocelular, ativando Ras e estimulando a via *Wnt/  $\beta$ -catenina* (HSIEH et al., 2013) quanto inibir a mesma via, porém, em um contexto fisiológico, no caso do desenvolvimento da cabeça em um gênero de rã (RICHARD-PARPAILLON et al., 2002). Em células de CCR, foi demonstrado que o estímulo com IGF1 pode aumentar os níveis de fosforilação da  $\beta$ -catenina em seus resíduos de tirosina, ocasionando sua dissociação da E-caderina e posterior acúmulo no citoplasma (PLAYFORD et al., 2000).

Uma vez que foram avaliados os níveis de constituintes das junções aderentes, considera-se importante também investigar possíveis mudanças na localização destas proteínas após o tratamento com OSI-906, além de observar o citoesqueleto, avaliando o padrão de organização dos filamentos de actina. Em HCT-116 foi observada uma mudança na morfologia das células, adquirindo estas em cultura um maior nível de compactação celular, sugerindo que possam ter

sofrido diminuição de tamanho/volume. Sumarizando, este trabalho teve como finalidade investigar como a sinalização de insulina/IGF1 poderia implicar nas modificações dos níveis de *N*-glicanos no contexto do CCR. Embora não tenham sido investigados todos os pontos desejados, o presente estudo apresentou um conjunto de resultados preliminares que corroboram a hipótese de que a sinalização por INSR/IGF1R é capaz de regular os níveis de *N*-glicanos com ramificações do tipo  $\beta$ 1-6, sendo ainda necessários maiores estudos a fim de elucidar de forma pormenorizada os mecanismos que explicam essa relação.

## 6. CONCLUSÕES

- O tratamento das linhagens HCT-116 e HT-29 com OSI-906 promove uma diminuição da viabilidade e inibição da fosforilação dos receptores de insulina e IGF.
- A inibição por OSI-906 possivelmente afeta níveis de diferentes *N*-glicanos complexos, evidenciando o papel da via de INSR/IGF1R sobre o glicoma em células de CCR.
- Inibição da via de insulina/IGF1 afeta os níveis de proteínas que compõem as junções aderentes, promovendo também alterações morfológicas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFRATIS, N. A. et al. IGF-IR cooperates with ER $\alpha$  to inhibit breast cancer cell aggressiveness by regulating the expression and localisation of ECM molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. October 2016, p. 1–12, 2017.

ALISSON-SILVA, F. et al. Increase of O-Glycosylated Oncofetal Fibronectin in High Glucose-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition of Cultured Human Epithelial Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

ANGADI, P.; KALE, A. Epithelial-mesenchymal transition - A fundamental mechanism in cancer progression: An overview. **Indian Journal of Health Sciences**, v. 8, n. 2, p. 77, 2015.

ATZORI, F. et al. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of dalotuzumab (MK-0646), an anti-insulin-like growth factor-1 receptor monoclonal antibody, in patients with advanced solid tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 19, p. 6304–6312, 2011.

BAILEY, K. L. et al. TGF $\beta$ /Smad3 regulates proliferation and apoptosis through IRS-1 inhibition in colon cancer cells. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–14, 2017.

BARICEVIC, I. et al. A framework for the in vitro evaluation of cancerrelevant molecular characteristics and mitogenic potency of insulin analogues. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 9, p. 1040–1050, 2015.

BASTIAN, W. et al. Glycosylation of Asn397 or Asn418 is required for normal insulin receptor biosynthesis and processing. **Diabetes**, v. 42, n. 7, p. 966–974, 1993.

BOON, L. et al. Glycosylation of matrix metalloproteases and tissue inhibitors: present state, challenges and opportunities. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 11, p.

1471–1482, 2016.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Journal for Clinicians**, 2018.

BUDINSKA, E. et al. Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer. **Journal of Pathology**, v. 231, n. 1, p. 63–76, 2013.

CARLYLE, W. C. et al. HHS Public Access. v. 162, n. 3, p. 561–567, 2015.

CHANG, W.-W. et al. The expression and significance of insulin-like growth factor-1 receptor and its pathway on breast cancer stem/progenitors. **Breast Cancer Research**, v. 15, n. 3, p. R39, 2013.

CHENG, J.-C.; CHANG, H.-M.; LEUNG, P. C. K. Epidermal Growth Factor Induces Human Oviductal Epithelial Cell Invasion by Down-Regulating E-Cadherin Expression. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 97, n. 8, p. E1380–E1389, 2012.

CRAENE, B. DE; BERX, G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 2, p. 97–110, 2013.

DAI, B. et al. Insulin-like growth factor binding protein-1 inhibits cancer cell invasion and is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 7, n. 9, p. 5645–5654, 2014.

DALLAS, N. A. et al. Chemoresistant Colorectal Cancer Cells, the Cancer Stem Cell Phenotype and Increased Sensitivity to Insulin-like Growth Factor Receptor-1 Inhibition. v. 69, n. 5, p. 1951–1957, 2009.



DE-FREITAS-JUNIOR, J. C. M. et al. Insulin/IGF-I signaling pathways enhances tumor cell invasion through bisecting GlcNAc N-glycans modulation. An interplay with E-cadherin. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–14, 2013.

DE-FREITAS-JUNIOR, J. C. M. et al. Glycans as regulatory elements of the insulin/IGF system: Impact in cancer progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, 2017.

DE-FREITAS-JUNIOR, J. C. M.; MORGADO-DÍAZ, J. A. The role of N-glycans in colorectal cancer progression: potential biomarkers and therapeutic applications. **Oncotarget**, v. 7, n. 15, 2015.

DE CAMPOS, F. G. C. M. et al. [Colorectal cancer in familial adenomatous polyposis: Are there clinical predictive factors?]. **Cirugía española**, v. 88, n. 6, p. 390–7, 2010.

DE SMEDT, L. et al. Expression profiling of budding cells in colorectal cancer reveals an EMT-like phenotype and molecular subtype switching. **British Journal of Cancer**, v. 116, n. 1, p. 58–65, 2017.

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

DOMINGO, J. L.; NADAL, M. Carcinogenicity of consumption of red meat and processed meat: A review of scientific news since the IARC decision. **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 256–261, 2017.

ELLEMAN, T. C. et al. Mutational analysis of the N-linked glycosylation sites of the human insulin receptor. **Biochemical Society**, v. 779, p. 771–779, 2000.

FENG, X. et al. Multiple antitumor effects of picropodophyllin in colon carcinoma cell

lines: Clinical implications. **International Journal of Oncology**, v. 40, n. 4, p. 1251–1258, 2012.

FERLAY, J. et al. Reprint of: Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. **European Journal of Cancer**, v. 51, n. 9, p. 1201–1202, 2015a.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 2015b.

FESSLER, E.; MEDEMA, J. P. Colorectal Cancer Subtypes: Developmental Origin and Microenvironmental Regulation. **Trends in Cancer**, v. 2, n. 9, p. 505–518, 2016.

FORBES, B. E.; MCCARTHY, P.; NORTON, R. S. Insulin-like growth factor binding proteins: A structural perspective. **Frontiers in Endocrinology**, v. 3, n. MAR, p. 1–13, 2012.

GALLOIS, C.; LAURENT-PUIG, P.; TAIEB, J. Methylator phenotype in colorectal cancer: A prognostic factor or not? **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 99, p. 74–80, 2016.

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

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**, v. 113, n. 3, p. 236–247, 2011.

GLOUSHANKOVA, N. A. Changes in regulation of cell-cell adhesion during tumor transformation. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 73, n. 7, p. 742–50, 2008.

GONSALVES, W. I. et al. Patient and tumor characteristics and BRAF and KRAS mutations in colon cancer, NCCTG/Alliance N0147. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 106, n. 7, p. 1–8, 2014.

GRADY, W.; CARETHERS, J. Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 135, n. 4, p. 1079–1099, 2008.

GRADY, W. M. Genomic instability and colon cancer. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 23, n. 1–2, p. 11–27, 2004.

GRADY, W.; PRITCHARD, C. Molecular Alterations and Biomarkers in Colorectal Cancer. **Toxicologic pathology**, v. 42, n. 1, p. 124–139, 2014.

GRAHAM, T. R. et al. Insulin-like growth factor-I - Dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. **Cancer Research**, v. 68, n. 7, p. 2479–2488, 2008.

GU, J. et al. Potential roles of N-glycosylation in cell adhesion. **Glycoconjugate Journal**, v. 29, n. 8–9, p. 599–607, 2012.

GUINNEY, J. et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. **Nat Med**, v. 21, n. 11, p. 1350–1356, 2016.

GUO, H.; NAGY, T.; PIERCE, M. Post-translational glycoprotein modifications regulate colon cancer stem cells and colon adenoma progression in Apcmin/+mice through altered Wnt receptor signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 45, p. 31534–31549, 2014.

HAIGIS, K. M. et al. Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. **Nature Genetics**, v. 40, n. 5, p. 600–608, 2008.

HALL, M. K. et al. Cell surface N-glycans influence the level of functional E-cadherin at the cell-cell border. **FEBS Open Bio**, v. 4, p. 892–897, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

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.

HU, Q. et al. IGF1R, a novel target of lung cancer? **Clinica Chimica Acta**, v. 466, p. 172–177, 2017.

ID, C. R. E. F.; BUF, S.; LIBRARY, M. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 20, p. 245–277, 2002.

IKINK, G. J. et al. IRS4 induces mammary tumorigenesis and confers resistance to HER2-targeted therapy through constitutive PI3K/AKT-pathway hyperactivation. **Nature Communications**, v. 7, p. 1–15, 2016.

INAMURA, K. Colorectal cancers: An update on their molecular pathology. **Cancers**, v. 10, n. 1, 2018.

INCA. **ABC DO CÂNCER: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer**. [s.l.: s.n.].

INCA. **Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil**. [s.l.: s.n.].

JOHSWICH, A. et al. N-glycan remodeling on glucagon receptor is an effector of nutrient sensing by the hexosamine biosynthesis pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 23, p. 15927–15941, 2014.

KALLURI, R.; NEILSON, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1776–1784, 2003.

KASTRINOS, F.; STOFFEL, E. M. History, genetics, and strategies for cancer prevention in lynch syndrome. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 12, n. 5, p. 715–727, 2014.

KHOURY, G. A.; BALIBAN, R. C.; FLOUDAS, C. A. Proteome-wide post-translational modification statistics: Frequency analysis and curation of the swiss-prot database. **Scientific Reports**, v. 1, p. 1–5, 2014.

KIESS, W. et al. Biosynthesis of the Insulin-Like Growth Factor-1 (Igf-1) Mannose-6-Phosphate Receptor in Rat C6 Glial-Cells - the Role of N-Linked Glycosylation in Binding of Igf-1 to the Receptor. **Molecular Endocrinology**, v. 5, n. 2, p. 281–291, 1991.

KIM, Y. S. et al. Overexpression and  $\beta$ -1,6-N-Acetylglucosaminylation-initiated aberrant glycosylation of TIMP-1: A “double whammy” strategy in colon cancer progression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 39, p. 32467–32478, 2012.

KIZUKA, Y.; TANIGUCHI, N. Enzymes for N-Glycan branching and their genetic and nongenetic regulation in cancer. **Biomolecules**, v. 6, n. 2, p. 1–21, 2016.

KLEMENT, R. J.; FINK, M. K. Dietary and pharmacological modification of the insulin/IGF-1 system: Exploiting the full repertoire against cancer. **Oncogenesis**, v.

5, n. November 2015, 2016.

KROEMER, G.; POUYSSEGUR, J. Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. **Cancer Cell**, v. 13, n. 6, p. 472–482, 2008.

LANGER, M. D. et al. N-glycosylation alters cadherin-mediated intercellular binding kinetics. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 10, p. 2478–2485, 2012.

LEARY, R. J. et al. Integrated analysis of homozygous deletions, focal amplifications, and sequence alterations in breast and colorectal cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 42, p. 16224–16229, 2008.

LEIPHRAKPAM, P. D. et al. In vivo analysis of insulin-like growth factor type 1 receptor humanized monoclonal antibody MK-0646 and small molecule kinase inhibitor OSI-906 in colorectal cancer. **Oncology Reports**, v. 31, n. 1, p. 87–94, 2014.

LI, H. et al. IGF-IR signaling in epithelial to mesenchymal transition and targeting IGF-IR therapy: Overview and new insights. **Molecular Cancer**, v. 16, n. 1, p. 1–15, 2017.

LIN, O. S. Colorectal cancer screening in patients at moderately increased risk due to family history. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 4, n. 6, p. 125, 2012.

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, 2003.

MA, H. et al. Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer. **Pathology**, v.

50, n. 1, p. 49–59, 2018.

MARISA, L. et al. Gene Expression Classification of Colon Cancer into Molecular Subtypes: Characterization, Validation, and Prognostic Value. **PLoS Medicine**, v. 10, n. 5, 2013.

MASUR, K. et al. Diabetogenic glucose and insulin concentrations modulate transcriptom and protein levels involved in tumour cell migration, adhesion and proliferation. **British Journal of Cancer**, v. 104, n. 2, p. 345–352, 2011.

MITROVIC, B. et al. Tumor budding in colorectal carcinoma: Time to take notice. **Modern Pathology**, v. 25, n. 10, p. 1315–1325, 2012.

MOJARAD, E. N. et al. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. **Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench**, v. 6, n. 3, p. 120–128, 2013.

MOURADOV, D. et al. Survival in stage II/III colorectal cancer is independently predicted by chromosomal and microsatellite instability, but not by specific driver mutations. **American Journal of Gastroenterology**, v. 108, n. 11, p. 1785–1793, 2013.

MULVIHILL, M. J. et al. Discovery of OSI-906: A selective and orally efficacious dual inhibitor of the IGF-1 receptor and insulin receptor. **Future Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 6, p. 1153–1171, 2009.

MUNKLEY, J.; ELLIOTT, D. J. Hallmarks of glycosylation in cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 23, p. 35478–35489, 2016.

MUNKLEY, J.; MILLS, I. G.; ELLIOTT, D. J. The role of glycans in the development and progression of prostate cancer. **Nature Reviews Urology**, v. 13, n. 6, p. 324–

333, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry 6th ed.** [s.l: s.n.].

NETWORK, T. C. G. A. et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. **Nature**, v. 487, n. 7407, p. 330–337, 2012.

NIETO, M. A. et al. Emt: 2016. **Cell**, v. 166, n. 1, p. 21–45, 2016.

OHTSUBO, K.; MARTH, J. D. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. **Cell**, v. 126, n. 5, p. 855–867, 2006.

OLIVEIRA-FERRER, L.; LEGLER, K.; MILDE-LANGOSCH, K. Role of protein glycosylation in cancer metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 44, p. 141–152, 2017.

PINHO, S. S. et al. E-cadherin and adherens-junctions stability in gastric carcinoma: Functional implications of glycosyltransferases involving N-glycan branching biosynthesis, N-acetylglucosaminyltransferases III and v. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 3, p. 2690–2700, 2013.

PINHO, S. S.; REIS, C. A. Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 9, p. 540–555, 2015.

PINO, M. S.; CHUNG, D. C. NIH Public Access THE CHROMOSOMAL INSTABILITY PATHWAY IN COLON. v. 138, n. 6, p. 2059–2072, 2014.

PITTS, T. M. et al. Development of an integrated genomic classifier for a novel agent in colorectal cancer: approach to individualized therapy in early development. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for**



**Cancer Research**, v. 16, n. 12, p. 3193–204, 2010.

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**, v. 97, n. 22, p. 12103–12108, 2000.

POLLAK, M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: An update. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 3, p. 159–169, 2012.

QU, X. et al. Update of IGF-1 receptor inhibitor (ganitumab, dalotuzumab, cixutumumab, teprotumumab and figitumumab) effects on cancer therapy. **Oncotarget**, v. 8, n. 17, p. 29501–29518, 2017.

RAFIEMANESH, H. et al. Incidence and Mortality of Colorectal Cancer and Relationships with the Human Development Index across the World. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 17, n. 5, p. 2465–73, 2016.

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, 2002.

ROBAJAC, D. et al. Gestation-associated changes in the glycosylation of placental insulin and insulin-like growth factor receptors. **Placenta**, v. 39, p. 70–76, 2016.

RODRIGUES, J. G. et al. Glycosylation in cancer: Selected roles in tumour progression, immune modulation and metastasis. **Cellular Immunology**, n. January, 2018.

RUI, L. et al. Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. **The Journal of clinical investigation**, v. 107, n. 2, p. 181–9, 2001.

SADANANDAM, A. et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. **Nat Med**, v. 19, n. 5, p. 619–625, 2013.

SAIF, M. W.; CHU, E. Biology of colorectal cancer. **Cancer Journal**, v. 16, n. 3, p. 196–201, 2010.

SETI, H.; LEIKIN-FRENKEL, A.; WERNER, H. Effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on IGF-I receptor signalling in colorectal cancer cells. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 115, n. 3, p. 127–136, 2009.

SIDDLE, K. Signalling by insulin and IGF receptors: Supporting acts and new players. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 47, n. 1, 2011.

SIMPSON, A. et al. Insulin-Like Growth Factor (IGF) Pathway Targeting in Cancer: Role of the IGF Axis and Opportunities for Future Combination Studies. **Targeted Oncology**, v. 12, n. 5, p. 571–597, 2017.

SINGH, R. K. et al. IGF-1R inhibition potentiates cytotoxic effects of chemotherapeutic agents in early stages of chemoresistant ovarian cancer cells. **Cancer Letters**, v. 354, n. 2, p. 254–262, 2014.

SPARROW, L. G. et al. N-linked glycans of the human insulin receptor and their distribution over the crystal structure. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 71, n. 1, p. 426–439, 2008.

TOMASETTI, C. et al. Only three driver gene mutations are required for the development of lung and colorectal cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 1, p. 118–123, 2015.

TORRE, L. A. et al. Global Cancer Statistics, 2012. **CA: a cancer journal of**

**clinicians.**, v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015.

ULLRICH, A. et al. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. **The EMBO Journal**, v. 5, n. 10, p. 2503–12, 1986.

VAJARIA, B. N.; PATEL, P. S. Glycosylation: a hallmark of cancer? **Glycoconjugate Journal**, v. 34, n. 2, p. 147–156, 2017.

VASCONCELOS-DOS-SANTOS, A. et al. Hyperglycemia exacerbates colon cancer malignancy through hexosamine biosynthetic pathway. **Oncogenesis**, v. 6, n. 3, 2017.

VERNIERI, C. et al. Targeting cancer metabolism: Dietary and pharmacologic interventions. **Cancer Discovery**, v. 6, n. 12, p. 1315–1333, 2016.

VERY, N.; LEFEBVRE, T.; YAZIDI-BELKOURA, I. EL. Drug resistance related to aberrant glycosylation in colorectal cancer. **Oncotarget**, v. 9, n. 1, p. 1380–1402, 2018.

VIGNERI, P. G. et al. The Insulin/IGF System in Colorectal Cancer Development and Resistance to Therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 5, n. October, p. 1–7, 2015.

VOGELSTEIN, B. et al. Cancer Genome Landscapes. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1546–1558, 2013.

WALTHER, A. et al. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 7, p. 489–499, 2009.

YE, Q. et al. ERK and AKT signaling cooperate to translationally regulate survivin expression for metastatic progression of colorectal cancer. **Oncogene**, v. 33, n. 14,

p. 1828–1839, 2014.

ZHOU, J. et al. Implication of epithelial-mesenchymal transition in IGF1R- induced resistance to EGFR-TKIs in advanced non-small cell lung cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 42, 2015.

ZHU, Q.-C. et al. Epithelial-mesenchymal transition and its role in the pathogenesis of colorectal cancer. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 14, n. 5, p. 2689–98, 2013.

ZLOBEC, I.; LUGLI, A. Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: Tumor budding as oncotarget. **Oncotarget**, v. 1, n. 7, p. 651–661, 2010.