INCA
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Programa de pós-graduação *stricto sensu* em Oncologia

Waldemir Fernandes de Souza

PERDA DA ADESÃO CÉLULA-CÉLULA MEDIADA PELA E-CADERINA EM CÂNCER COLO-RETAL: VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS

Rio de Janeiro

2009

WALDEMIR FERNANDES DE SOUZA

PERDA DE ADESÃO CÉLULA-CÉLULA MEDIADA PELA E-CADERINA EM CÂNCER COLO-RETAL: VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer – INCa, para obtenção do grau de Mestre em Oncologia, área de concentração – Pesquisa Básica.

Orientador
José Andrés Morgado Díaz

Rio de Janeiro
2009

S719p Souza, Waldemir Fernandes de.

Perda de adesão célula-célula mediada pela e-caderina em câncer colo-retal: vias de sinalização envolvidas / Waldemir Fernandes de Souza. - Rio de Janeiro: INCA, 2009.

81f. il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Câncer. Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer (INCA-RJ), 2009. Orientador: José Andrés Morgado Díaz.

1. Neoplasias Colorretais. 2. Junções Aderentes. 3. Caderinas. 4. ATPase Trocadora de Sódio-Potássio. 5. Quinases da Família src. 5. Quinases Reguladas por Sinal Extracelular. I. Díaz, José Andrés Morgado. II. Título.

CDD 616.9944347

WALDEMIR FERNANDES DE SOUZA

PERDA DE ADESÃO CÉLULA-CÉLULA MEDIADA PELA E-CADERINA EM CÂNCER COLO-RETAL: VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer – INCa, para obtenção do grau de Mestre em Oncologia, área de concentração – Pesquisa Básica.

Aprovada em 30 de março de 2009 pela banca examinadora:

Dra. Raquel Ciuvalschi Maia - Grupo de Resistência às Drogas nas Neoplasias, INCa

Dr. Ricardo Luis Alves Silva - Laboratório de Oncologia Experimental, INCa

Dr. Emanuela de Moraes Ribeiro Pinto - Setor de Oncologia, GlaxoSmithKline Brasil

Esta dissertação de mestrado foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Estrutural da Divisão de Biologia Celular no Centro de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (INCa), sobre a orientação do Dr. José Andrés Morgado Díaz.

ÓRGÃOS FINANCIADORES:

Instituto Nacional de Câncer – Ministério da saúde
(INCa – MS)

Fundação Ary Frauzino para pesquisa e Controle do Câncer
(FAF)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
(CNPq)

Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
(FAPERJ)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
(CAPES)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Valdelicio e Maria Auxiliadora, meu irmão, Waldener, e minha avó Ila (*in memoriam*) pelo apoio incondicional em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A toda minha família pelo estímulo constante nessa jornada, em especial à Duda, por chamar a atenção do tio com suas constantes peraltices.

A família Jogaib, em especial ao Gustavo e a Tatiana, que acreditaram no meu potencial e me deram o apoio necessário para entrar no mundo da Biologia.

Ao meu orientador e grande amigo, José Morgado, pelos ensinamentos e direcionamentos que conduzem a minha formação profissional, e por enfrentar comigo os mais diversos contratempos.

À família Bioestrutural: Simone (Sissi), Andréia (Deiró), Fernanda (Fê), Lilian (Lili), Flavia (Flavidal), Tálineee, Sarah, Wallace, Julio (Xú), Pedro (Obina) e Tanakaaaaaaa, pelas discussões acerca do trabalho, pela ajuda no dia-a-dia e, principalmente, pelos nossos momentos de descontração.

Aos ex-integrantes do Grupo, Silvia, Paloma, Patrícia, Ana, e aos agregados, Gabriel (Ozama) e Nakamura (Naka), pela amizade e papos sobre futebol.

Ao Leandro Augusto, pela ajuda e vastas discussões e sugestões sobre o trabalho: valeu meu querido!

Ao pessoal do INCa que de alguma forma contribuiu para este trabalho.

A galera da Turma Francisco na Prancheta, em especial os amigos Chicó, Maguila, Zuzu e Leandro: estamos juntos galera!

A perseverança e a luta por um ideal norteiam a eterna busca do conhecimento.

Resumo

Durante a progressão do câncer colo-retal, alguns eventos são cruciais para iniciar o processo metastático. Estes eventos envolvem a desorganização dos contatos célula-célula, aumento da motilidade e invasividade celular, os quais fazem parte de um programa morfogenético conhecido como transição epitélio-mesenquimal (TEM). A adesão célula-célula é controlada por um sistema de proteínas de membrana, conhecido como complexo juncional apical, o qual é formado pelas junções *tight* e aderentes. A glicoproteína transmembrana E-caderina é a principal proteína das junções aderentes e desempenha um importante papel na regulação da organização e manutenção da adesão célula-célula, e de sinais intracelulares que medeiam a proliferação e motilidade celular. No entanto, os mecanismos celulares e moleculares que regulam a desorganização das junções aderentes mediada pela E-caderina, no câncer colo-retal, ainda não estão definidos. No presente estudo usando uma linhagem celular de câncer de cólon humano, Caco-2, foram avaliadas as vias de sinalização envolvidas na perda de adesão célula-célula mediada pela E-caderina e aumento do potencial migratório causado por TPA e EGF, assim como o envolvimento da Na^+/K^+-ATPase na desorganização das junções aderentes induzida pela ouabaína. Nossos resultados mostraram que os tratamentos com 200 nM de TPA e 100 ng/mL de EGF causaram desorganização das junções aderentes, e este evento foi modulado de forma diferencial pelas proteínas ERK1/2 e Src. A proteína ERK1/2 participando da modulação nos períodos iniciais dos tratamentos e a proteína Src atuando em resposta tardia. Além disso, o tratamento com estes agentes induziu um aumento da motilidade celular, sendo este efeito revertido pelo tratamento com o inibidor de Src, o PP1. Por outro lado, o tratamento com 10 e 100 μM de ouabaína também causou alterações morfológicas das junções aderentes e redistribuição da E-caderina. Este efeito parece ser modulado pela proteína ERK1/2, considerando o aumento da atividade desta proteína analisado em paralelo. Adicionalmente, foi observado que a ouabaína causou redução dos níveis protéicos da subunidade β1 da Na^+/K^+-ATPase e um aparente acúmulo citoplasmático da β- mas não da α-catenina. Em conclusão, nossos resultados indicam que a desorganização da adesão célula-célula mediada pela E-caderina, provocada por TPA e EGF, pode ser modulada inicialmente por ERK1/2 e posteriormente pela Src, sendo esta última também responsável pelo aumento da motilidade celular. E, além disso, os experimentos com ouabaína mostraram um papel importante da subunidade β1 da Na^+/K^+-ATPase na desorganização das junções aderentes e da proteína ERK1/2 como moduladora deste evento. Nossos resultados podem contribuir para o entendimento dos mecanismos que medeiam a desorganização dos contatos célula-célula mediado pela E-caderina e, de forma geral, da progressão do carcinoma colo-retal.

Palavras-chave: Neoplasias Colorretais. Junções Aderentes. Caderinas. ATPase Trocadora de Sódio-Potássio. Quinases da Família Src. Quinases Reguladas por Sinal Extracelular.

Abstract

During tumor development, some events are crucial to trigger the metastatic process. These events involve the disassembly of cell-cell contacts, increase of cell motility and invasivity, which are part of a morphogenetic program called epithelial mesenchymal transition (EMT). The cell-cell adhesion is controlled by a system of membrane proteins, known as the apical junctional complex, which is constituted for tight and adherent junctions. The transmembrane glycoprotein E-cadherin is the main adherens junction protein that plays a critical role in the organization and maintenance of cell-cell adhesion, and regulates intracellular signals to mediate cell proliferation and motility. Nevertheless, the cellular and molecular mechanisms that regulate the disassembly of the E-cadherin-mediated adherens junction in colorectal cancer, remain to be defined. In present study, using a human colon cancer cell line, Caco-2, we evaluate cell signaling pathways involved with the disassembly of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and the migratory potential caused by TPA and EGF. Furthermore, the roles of Na^+/K^+-ATPase on the adherens junction disassembly caused by ouabain, as well as cellular events involved also were analyzed. Our results show that treatment with 200 nM TPA and 100 ng/mL EGF caused adherens junction disruption in an event differentially modulated by ERK1/2 and Src proteins. ERK1/2 protein modulates adherens junction disassembly in early periods of treatment whereas Src protein in a later response. Besides, treatment with these agents induced an increase of cell motility, a process modulated by Src. On the other hand, treatment with 10 and 100 μM ouabain also caused morphological alterations of adherens junction and E-cadherin redistribution, and these events seem to be modulated by ERK1/2, considering the increased activity of this protein analyzed in parallel. Additionally, we observed reduction of protein levels of the Na^+/K^+-ATPase β1-subunit and apparent accumulation of β-catenin, but not α-catenin at the cytoplasm, after treatment with ouabain. In conclusion, our results indicate that disassembly of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion, promoted by TPA and EGF may be initially modulated by ERK1/2 and subsequently by Src. This later protein was also responsible by regulate the increase of cell motility induced by these agents. Furthermore, we showed that ouabain induces adherens junction disassembly concomitantly to decreasing protein levels of the Na^+/K^+-ATPase β1-subunit, and these events may be modulated by ERK1/2. Our findings may contribute for the understanding of mechanisms that mediate disassembly of E-cadherin-mediated cell-cell contacts and of a general manner on the progression of colorectal carcinoma.

Key words: Colorectal Neoplasias. Adherens Junction. Cadherins. kinases of the Src Family. Sodium-Potassium. Exchange ATPase. Extracellular Signal-Regulated Kinases.

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura do intestino grosso 2

Figura 2 - Modelo esquemático do complexo juncional 3

Figura 3 - Vias de transporte paracelular e transcelular 5

Figura 4 - Estrutura e composição molecular das junções *tight* 7

Figura 5 - Modelo mostrando os constituintes moleculares da junção aderente 10

Figura 6 - Esquema da estrutura da E-caderina 11

Figura 7 - Rede de sinalização celular 15

Figura 8 - Estrutura geral das quinases da família Src mostrando suas configurações inativa e ativa 18

Figura 9 - Modelo esquemático mostrando a associação da Na^+/K^+-ATPase com a E-caderina 21

Figura 10 - Histopatologia e principais mutações durante o desenvolvimento do câncer colo-retal 25

Figura 11 - Esquema mostrando a via de sinalização Wnt/β-catenina ... 26

Figura 12 - Esquema mostrando alterações celulares ocorridas durante a transição epitélio-mesenquimal (TEM) 28

Figura 13 - Alterações estruturais nas junções aderentes de células Caco-2 causadas por TPA e EGF são prevenidas pelo inibidor de Src, PP1 40

Figura 14 - Src participa da redistribuição da E-caderina induzida por TPA e EGF 42

Figura 15 - Análise da distribuição subcelular da E-caderina 43

Figura 16 - O Nível protéico da E-caderina não é modificado pelos tratamentos com TPA e EGF 44

Figura 17 - Tratamento com TPA aumenta a atividade de Src 45

Figura 18 - O tratamento com TPA aumenta a atividade da proteína ERK1/2 46

Figura 19 - Envolvimento da Src no aumento da motilidade celular induzida por TPA e EGF 48

Figura 20 - Ensaio de proliferação celular 50

Figura 21 - Ouabaína causa desorganização do complexo juncional apical de células Caco-2 52

Figura 22 - Tratamento com ouabaína induz a redistribuição da E-caderina 54

Figura 23 - Análise da distribuição subcelular da E-caderina após tratamento com ouabaína 55

Figura 24 - Ouabaína reduz os níveis protéicos da subunidade β1 da Na^+/K^+-ATPase 57

Figura 25 - Tratamento com ouabaína reduz a expressão da Na^+/K^+-ATPase presente na superfície celular 58

Figura 26 - Ouabaína induz a ativação de ERK1/2 59

Figura 27 - Tratamento com ouabaína altera distribuição da β- mas não da α-catenina 61

Figura 28 - Modelo proposto para a regulação da desorganização da adesão célula-célula mediada pela E-caderina e aumento da motilidade celular em células Caco-2 70

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 - Estimativas, para o biênio 2008/2009, de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária 23

Siglas e Abreviações

α-SMA - Alfa actina de músculo esquelético

5AzaC - 5-aza-2-deoxicitidina

AA - Ácido araquidônico

ANOVA - Análise de variância

AP-1 - Proteína ativadora-1

aPKC - Proteína quinase C atípica

APC - *Adenomatous poliposis coli*

BAD - Promotor de morte associado à Bcl-2

BSA - Albumina bovina

CAR - Receptor de *coxsackievirus* e adenovírus

CBD - Domínio de ligação à catenina

CCR - Câncer colo-retal

CDK - Quinase dependente de ciclina

CIN - instabilidade cromossômica

CK - Citoqueratina

CKI-α - Caseína quinase I - α

Cox - Cicloxigenase

CsK - Quinase reguladora do c-terminal da Src

cPKC - Proteína quinase C clássica

DAG - Diacilglicerol

DR4/5 - Receptor de morte 4/5

Dsh (Dvl) - *Dishevelled*

Dsp - Desmoplaquina

EC - Domínio extracelular da E-caderina

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGTA - Ácido tetracético etileno-glicol

EPLIN - Proteína epitelial perdida em neoplasias

ER-α - Receptor de estrogênio α

ERK - Quinase regulada por sinal extracelular

ESAM - Molécula de adesão seletiva à célula endotelial

FADD - Domínio protéico de morte associado à Fas
FAK - Quinase de adesão focal
FAP - Polipose adenomatosa familiar
FasL - Ligante de Fas
Fz - *Frizzled*
GSK - Glicogênio sintase quinase
HIF - Fatores induzidos por hipóxia
HNPCC - Câncer colo-retal hereditário não poliposo
IkB - Proteína inibitória Kappa b
IkBK - Quinase da proteína IkB
JAM - Molécula de adesão juncional
JMD - Domínio próximo à membrana da E-caderina
JNK - c-Jun N-terminal quinase
LEF - Fator de aumento linfocitário
LRP - Proteína relacionada à receptor de lipoproteína
MAGUK - Guanilato quinase associada à membrana
MAPK - Proteína quinase ativada por mitógenos
MDR - Resistência a multidrogas
MEK - Proteína quinase quinase ativada por mitógenos
MIN - Instabilidade de microssatélite
MLH - Homóloga à MutL humana
MMP - Metaloproteinase de matriz
MMR - Reparo de mal-pareamento
MSH - Homóloga à MutS
MTOR - Alvo da rapamicina de mamífero
Muc - Mucina
NFkB - Fator nuclear Kappa b
nPKC - Proteína quinase C nova
PAR - Proteína de partição defeituosa
PALS - Proteína associada com Lin Seven
PATJ - Proteína de junção tight associada à PALS
PGE - Prostaglandina E
PI - Fosfatidil-inositol
PI3K - Fosfatidil-inositol-3-quinase

PKA - Proteína quinase A

PLA - Fosfolipase A

PLD - Fosfolipase D

PP1 - {4-amino-1-tert-butil-3-(1'-naftilmetil) pirazolo [3,4-d] pirimidina}

PTEN - Fosfatase homóloga à tensina

PTP-PEST - Fosfatase com uma sequência rica em prolina, glutamato, serina e treonina

Rb - Proteína de retinoblastoma

RSK - Proteína ribossomal S6 quinase

RTK - Receptor tirosina quinase

SDS - Sódio dodecil sulfato

SDS-PAGE - Gel de poliacrilamida contendo sódio dodecil sulfato

sE-cad - E-caderina solúvel

SFK - Família de tirosina quinases Src

SH - Domínio de homologia Src

SHP-2 - Fosfatase com domínio SH2

STAT - Transdutor de sinal e ativador de transcrição

TCF - Fator de célula T

TGF - Fator de crescimento transformante

TNF - Fator de necrose tumoral

TPA - 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

TRAIL - Ligante induzido por apoptose relacionado com TNF

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

Sumário

Página

RESUMO ix

ABSTRACT x

LISTA DE FIGURAS xi

LISTA DE TABELAS xiii

SIGLAS E ABREVIAÇÕES xiv

1 INTRODUÇÃO 1

1.1 Epitélio entérico 1

1.2 O Complexo juncional apical 2

1.2.1 Juncções ocludentes (ou *tight*) 5

1.2.2 Junções aderentes 9

1.2.2.1 E-caderina e câncer 12

1.3 Sinalização celular e tumorigênese epitelial 14

1.3.1 Proteínas quinases 15

1.3.1.1 Família MAPK 17

1.3.1.2 Família Src 17

1.3.2 Transportadores iônicos (Na^+/K^+-ATPase) 19

1.3.3 Ésteres de forbol, fatores de crescimento e glicosídios cardíacos: ferramentas para estudo de vias de sinalização 21

1.4 Câncer colo-retal: incidência e desenvolvimento 22

1.5 Transição epitélio-mesenquimal e câncer epitelial 27

1.6 Justificativa do estudo 29

2 OBJETIVOS 31

Parte I

2.1 Geral 31

2.1.1 Objetivos específicos 31

Parte II

2.2 Geral 32

2.2.1 Objetivos específicos 32

3 MATERIAL E MÉTODOS 33

3.1 Anticorpos e Reagentes 33

3.2 Cultura de células 33
3.3 Tratamentos com TPA e EGF 34
3.4 Tratamento com ouabaína 34
3.5 Obtenção de lisados totais e frações solúveis e insolúveis em Triton X-100 35
3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE), *imunoblotting* e análise densitométrica 35
3.7 Imunofluorescência 36
3.8 Microscopia eletrônica de transmissão 37
3.9 Ensaio de migração celular (*Wound healing assay*) 37
3.10 Ensaio de proliferação celular 37
3.11 Ensaio de ligação da ^{3}H-ouabaína às células Caco-2 38
3.12 Análise estatítica 38
4 RESULTADOS 39
Parte I
4.1 Vias de sinalização envolvidas com a desorganização da junção aderente e aumento do potencial migratório causado por TPA e EGF . 39
4.1.1 Src está envolvida na desorganização da junção aderente causada por TPA e EGF 39
4.1.2 Src participa da redistribuição da E-caderina causada por TPA e EGF 41
4.1.3 Src é ativada em resposta tardia ao tratamento com TPA 45
4.1.4 ERK1/2 é ativada em etapas iniciais do tratamento com TPA e EGF 46
4.1.5 TPA e EGF induzem aumento da motilidade celular e este evento é modulado pela Src 47
Parte II
4.2 Envolvimento da Na^{+}/K^{+}-ATPase na perda da adesão célula-célula mediada pela E-caderina 51
4.2.1 Tratamento com Ouabaína causa alterações morfológicas no complexo juncional apical de células Caco-2 51
4.2.2 Tratamento com Ouabaína causa redistribuição da E-caderina .. 52
4.2.3 O tratamento com Ouabaína reduz os níveis protéicos da subunidade β1 da Na^{+}/K^{+}-ATPase 56

4.2.4 ERK1/2 parece modular os efeitos da ouabaína sobre a desorganização da adesão intercelular mediada pela E-caderina 58

4.2.5 Ouabaína induz uma aparente redistribuição da β- mas não da α-catenina 60

5 DISCUSSÃO 62

5.1 Vias de sinalização envolvidas com a desorganização das junções aderentes e aumento do potencial migratório causado por TPA e EGF 62

5.2 Envolvimento da Na^+/K^+-ATPase na perda da adesão célula-célula mediada pela E-caderina 66

5.3 Considerações finais 69

6 CONCLUSÕES 71

6.1 Parte I 71

6.2 Parte II 71

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 72

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epitélio entérico

O tecido epitelial é constituído, geralmente, por células justapostas com pouca substância extracelular. Estas podem apresentar formas variadas (cilíndrica, cúbica ou pavimentosa) e, de acordo com tipo de agregação, formar camadas celulares simples, estratificadas ou pseudoestratificadas. O tecido epitelial desempenha uma importante função no revestimento da superfície externa e cavidades corporais (Casasco *et al*, 2007). A camada epitelial externa que reveste o intestino e separa o interior do meio externo recebe o nome de mucosa. Nos humanos, o intestino é dividido em duas porções: uma porção anterior (intestino delgado) e uma porção posterior (intestino grosso).

O intestino grosso é subdividido em ceco, cólon, sigmóide, reto e ânus. O cólon apresenta uma superfície plana com numerosas criptas, tendo como principais funções a reabsorção de eletrólitos e água presentes em seu lúmem. A mucosa colônica necessita de uma renovação constante devido ao contínuo estresse físico que é submetida. A substituição dessas células é feita através da diferenciação de células-tronco presentes na base das criptas: elas proliferam à medida que migram para a parte superior da cripta e se diferenciam totalmente quando atingem a superfície do epitélio (Fig. 1). Essa capacidade regenerativa é fundamental para manutenção da homeostase intestinal, prevenindo o desgaste provocado pelo fluxo do lúmen entérico (Sancho *et al*, 2004; Peifer, 2002). Este processo é finamente controlado e qualquer desregulação pode levar a formação de pólipos intestinais, podendo progredir para o desenvolvimento do câncer intestinal. Neste contexto, o complexo juncional apical, estrutura responsável pela manutenção da adesão célula-célula em epitélios, desempenha um papel importante.

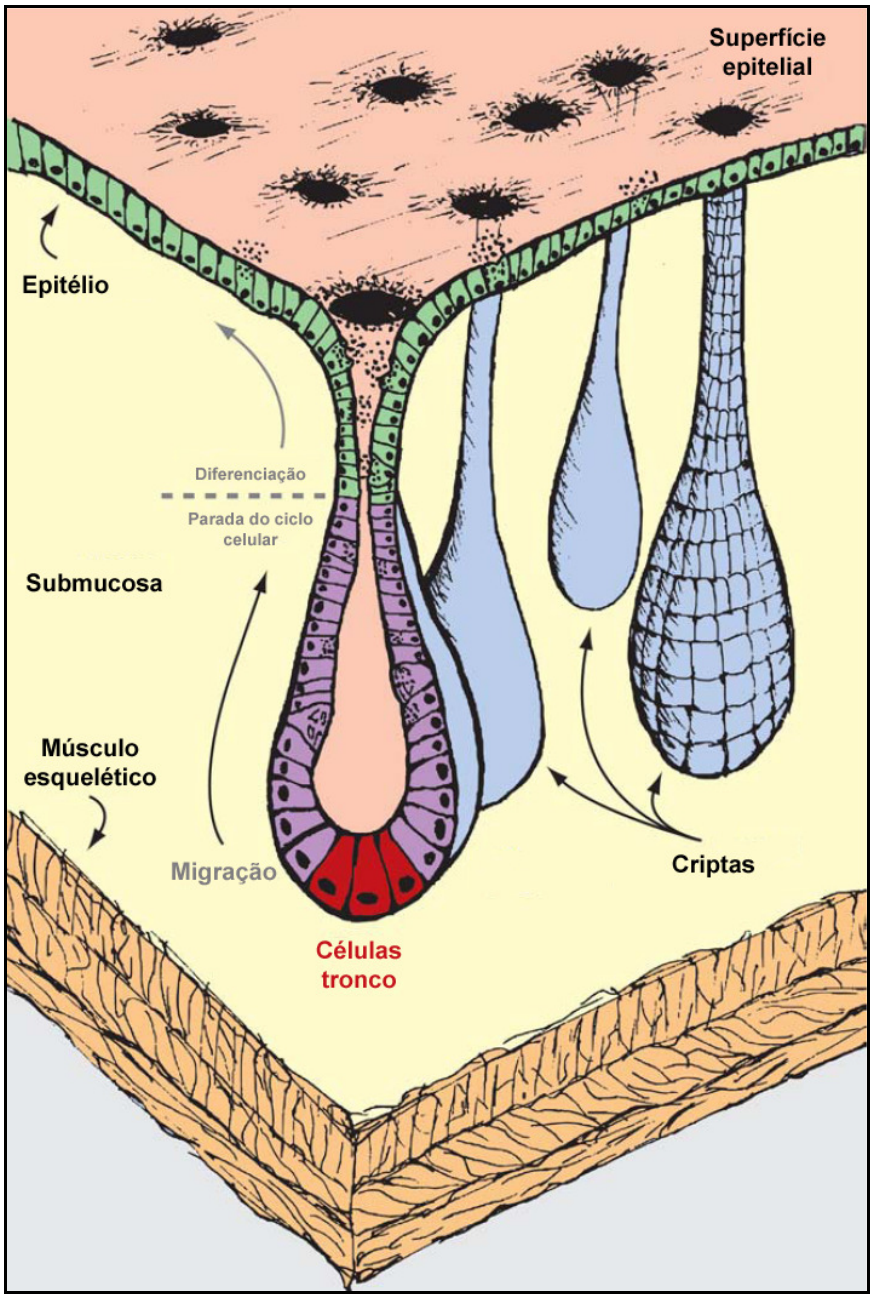


Figura 1: Representação esquemática da estrutura do intestino grosso. Células-tronco, presentes na parte inferior da cripta, ocasionalmente geram células progenitoras que proliferam e migram para a região superior da cripta. Assim que estas páram de proliferar, se diferenciam, renovando a mucosa entérica (Adaptada de Sancho *et al*, 2004).

1.2 O complexo juncional apical

O epitélio apresenta uma forte adesão intercelular, sendo essa característica tissular mantida pelo complexo juncional. O complexo juncional é constituído por estruturas de membrana especializadas que regulam a adesão célula-célula, sendo

essencial para morfologia e função epitelial. Essas estruturas protéicas adesivas (Fig. 2) são conhecidas como junções ocludentes (ou *tight*), junções aderentes e desmossomos (Rodriguez-Boulan *et al*, 2005). Elas se conectam ao citoesqueleto (junções aderentes e *tight* se conectam a microfilamentos, e desmossomos a filamentos intermediários), estabilizando a adesão célula-célula (Braga, 2002).

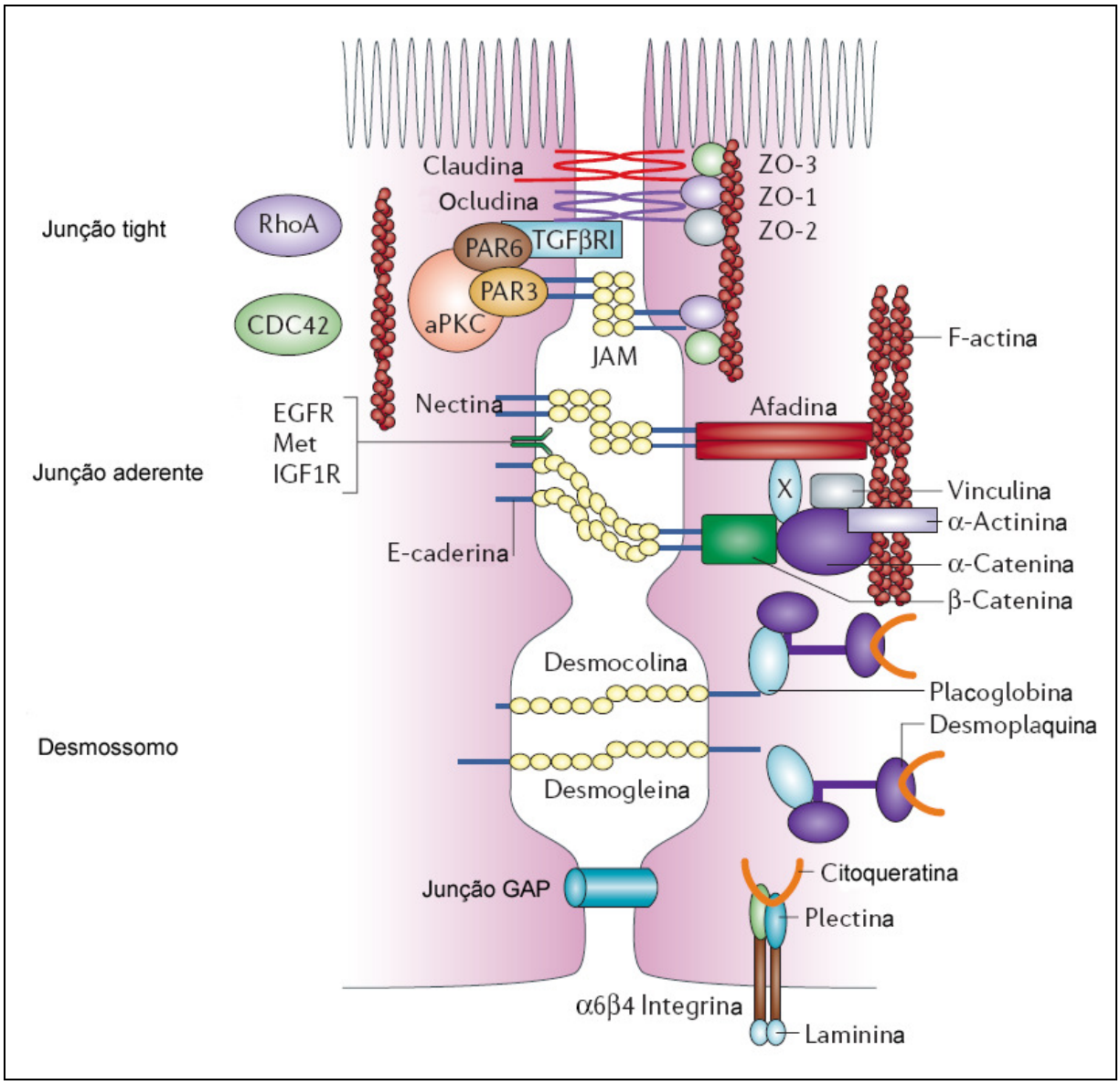


Figura 2: Modelo esquemático do complexo juncional. O esquema mostra a localização das junções *tight* e aderentes e desmossomos, assim como os diferentes componentes moleculares destas estruturas (modificado de Thiery & Sleeman, 2006).

Conceitos atuais na literatura utilizam o termo “complexo juncional apical” para denominar a estrutura composta pelas junções *tight* e aderentes, e definir este complexo como responsável pela manutenção da adesão célula-célula em epitélios (Hartsock & Nelson, 2008). Este complexo atua na determinação da polaridade celular, delimitando dois tipos de domínio de membrana, o apical e o basolateral, que apresentam composições lipídicas e protéicas distintas. A distribuição assimétrica das proteínas de membrana no intestino permite regular dois tipos de transportes, que são responsáveis pela passagem do conteúdo luminal através da barreira do epitélio: o transporte transcelular e o transporte paracelular (Fig. 3). O transporte transcelular ocorre por dentro da célula, onde atravessa a superfície celular, passa pelo citoplasma e alcança a parte basal da célula. Este tipo de transporte desempenha um papel importante na absorção de nutrientes, como monossacarídeos, devido a presença de transportadores protéicos no domínio apical da membrana plasmática. A via paracelular ocorre entre células adjacentes, sendo regulada pelas junções *tight*. Este tipo de junção pode ter sua estrutura momentaneamente alterada para aumentar o fluxo paracelular de água e solutos, uma função importante para a absorção de nutrientes presentes no lúmen entérico (Miyoshi & Takai, 2008).

Dados recentes na literatura vêm mostrando que os componentes do complexo juncional apical podem ainda atuar como reguladores de vias de sinalização. Estas vias podem modular vários eventos fisiológicos, como o remodelamento do citoesqueleto de actina, aumentando o potencial migratório das células, ou promover a ativação da proliferação celular (Nelson, 2008; Laprise *et al*, 2004).

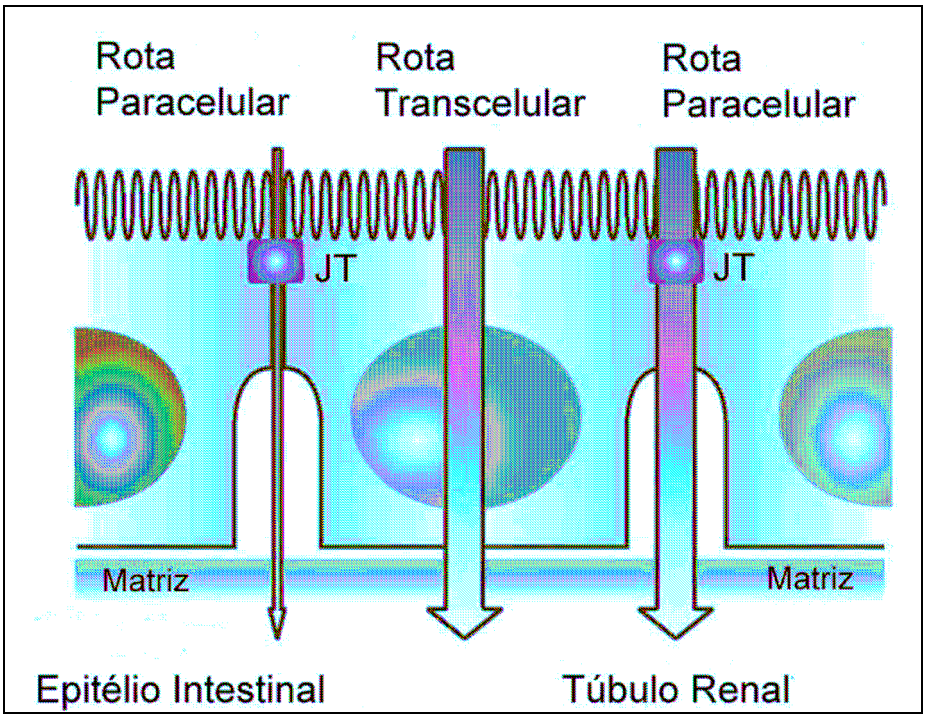


Figura 3: Vias de transporte paracelular e transcelular. Estas vias controlam a passagem de fluídos e solutos do lúmen para o interstício. A figura mostra que o fluxo paracelular é menor no intestino quando comparado com o mesmo fluxo do túbulo proximal do epitélio renal, especializado na absorção de fluídos e eletrólitos. JT, junção *tight* (modificada de Miyoshi & Takai, 2005).

1.2.1 Junções ocludentes (ou *tight*)

A junção ocludente ou *tight* está presente na região superior do complexo juncional apical, no epitélio de vertebrados. Desempenha um papel muito importante na modulação do fluxo paracelular, atuando como uma barreira semipermeável que regula a passagem de íons, solutos e água. Possui também uma função conhecida como "cerca" que atua na determinação da polaridade celular, discriminando um domínio apical e um domínio basolateral, os quais apresentam composição lipídica e protéica distintas, refletindo diferenças de funcionalidade entre essas regiões. Em nível molecular, as proteínas que constituem a junção *tight* participam de diversas vias de sinalização, que atuam na regulação dos mais variados processos celulares, como proliferação e diferenciação (Fig. 4A). Estudos recentes têm relatado dois tipos de junção *tight*: a) a junção *tight* bicelular (bJT), que se apresenta como pontos de anastomose entre membranas plasmáticas de duas células adjacentes, quando observada por microscopia eletrônica; e b) a junção *tight* tricelular (tJT), que se apresenta como pontos de contato entre três células, sendo

formada por três pares de elementos de selagem centrais (Fig. 4B). Estes dois tipos de junções *tight* (JT) desempenham um importante papel na selagem do espaço intercelular (Cereijido *et al*, 2008; Chiba *et al*, 2008; Ikenouchi *et al*, 2005). As JTs são constituídas por proteínas integrais de membrana, como a molécula de adesão juncional (JAM), ocludina, claudina e tricelulina, e por proteínas *scaffold* responsáveis pela associação da JT ao citoesqueleto, como as proteínas *zonula occludens* (ZO), ZO-1, -2 e -3, e ainda por complexos protéicos citoplasmáticos que atuam na construção e manutenção da polaridade celular, como PAR6/PAR3/aPKC e CRB/PALS/PATJ (Fig. 4C).

As JAMs são glicoproteínas que pertencem a superfamília das imunoglobulinas. Elas possuem dois domínios extracelulares característicos de imunoglobulinas, uma região transmembrana e um domínio C-terminal citoplasmático. São proteínas transmembrana de uma passagem e são subdivididas em JAM-A, -B, -C, CAR, ESAM e JAM4. Essas proteínas participam da adesão celular, interagindo com seus domínios extracelulares de maneira homofílica ou heterofílica, atuando na adesão célula-célula e célula-matriz, através da ligação com as subunidades β1 e β2 da integrina. As JAMs também participam da formação da polaridade ápico-basolateral, além de estarem envolvidas na função de barreira da junção *tight* (Chiba *et al*, 2008; Rehder *et al*, 2006).

A ocludina é uma proteína que apresenta quatro passagens pela membrana, dois *loops* extracelulares e os domínios C- e N-terminal intracelulares. Foram as primeiras proteínas integrais de membrana a serem identificadas nas JTs (Feldman *et al*, 2005). Estudos têm revelado a atuação da ocludina em diferentes eventos celulares relacionados a carcinogênese. Por exemplo, Barrios-Rodiles e colaboradores (2005) relataram que a ocludina interage com o Receptor I de TGF-β (TβR-I), regulando a desorganização das junções *tight* induzida por TGF-β, durante a transição epitélio-mesenquimal (TEM). Experimentos usando hepatócitos de camundongos deficientes para ocludina mostraram que essa proteína inibe a apoptose através da ativação das vias MAPK e Akt (Murata *et al*, 2005), demonstrando seu papel na sinalização celular, além da sua atuação como molécula de adesão.

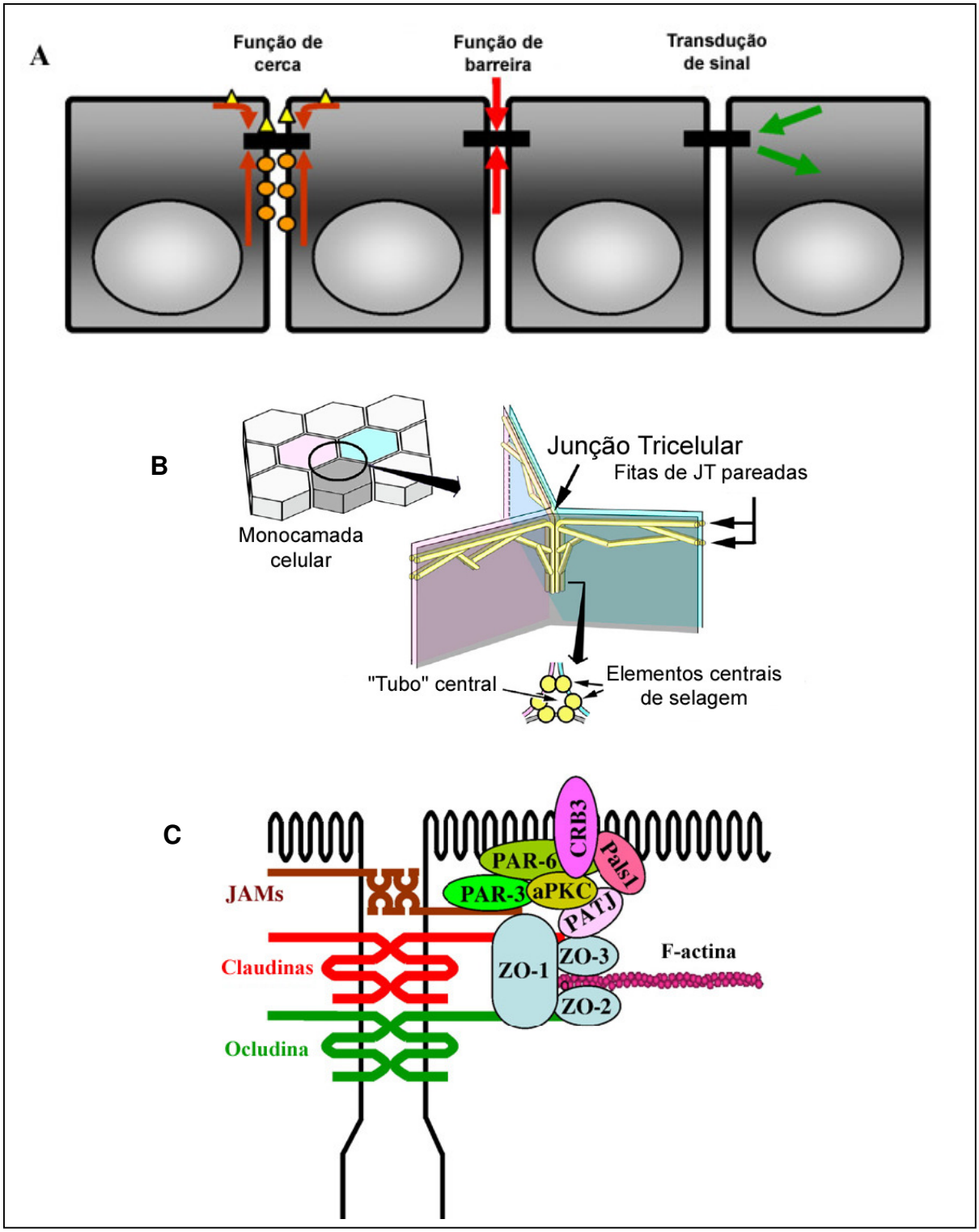


Figura 4: Estrutura e composição molecular das junções *tight*. O esquema mostra as diferentes funções desempenhadas pela junção *tight* (A), a estrutura da junção *tight* tricelular (B), e a arquitetura molecular da junção *tight* bicelular (C). Adaptado de Chiba *et al*, 2008 e Ikenouchi *et al*, 2005.

As claudinas compreendem uma família de proteínas com cerca de 24 membros em humanos. Possuem quatro passagens pela membrana, dois *loops* extracelulares e os domínios C- e N-terminal intracelulares, no entanto sem nenhuma similaridade com a ocludina. Alterações nos níveis de expressão das claudinas podem causar perturbações na funcionalidade de barreira paracelular e promover também o potencial tumorigênico. Estudos feitos por nosso Grupo (Oliveira *et al*, 2005), demonstraram que as claudina-1, -3 e -4 estão superexpressas em câncer de cólon. Tem sido relatado ainda, que em células de câncer de ovário as claudina-3 e -4 são fosforiladas pelas proteínas quinases A (PKA) e C (PKC), respectivamente, levando a um deslocamento destas proteínas da membrana para o citosol, promovendo um aumento da permeabilidade paracelular (D'Souza *et al*, 2005). Uma revisão detalhada sobre a expressão diferencial em diferentes tipos de câncer epitelial e a importância dessas proteínas como potenciais alvos terapêuticos no câncer colo-retal foi recentemente discutida por Oliveira & Morgado-Díaz (2007).

As tricelulinas são proteínas que possuem quatro passagens pela membrana. Elas se orientam de maneira vertical nas fitas de junção *tight* presentes nos contatos tricelulares. Possuem cerca de 32% de similaridade com o domínio C-terminal da ocludina. Ikenouchi e colaboradores (2005) têm relatado a atuação do repressor transcricional Snail na redução da expressão da tricelulina em células Eph4. Ainda recentemente, foi mostrado que em células MDCKII, a perda da expressão da ocludina resultava na localização da tricelulina na bJT (Ikenouchi *et al*, 2008).

As proteínas ZOs (ZO-1, -2 e -3) fazem parte da família de proteínas guanilato quinase associadas à membrana (MAGUK), possuem domínios PDZ que permitem a interação com as proteínas integrais de membrana da junção *tight*, como JAM, ocludina e claudina, e atuam na ligação destas proteínas ao citoesqueleto (González-Mariscal *et al*, 2008). Dados experimentais publicados por Saito e colaboradores (2008), usando células MEF, têm sugerido que ZO-1/-2 atuam como proteínas *scaffold* da quinase reguladora do c-terminal da Src (Csk), recrutando-a para ser inativada, um evento regulado por uma via sinalização mediada pela proteína Src. A ZO-2 pode participar também da regulação do ciclo celular, atuando na repressão transcricional da ciclina D1, como visto em cultura de células MDCK (Huerta *et al*, 2007).

Os complexos protéicos citoplasmáticos PAR6/PAR3/aPKC e CRB/PALS/PATJ são responsáveis pela formação da junção *tight* e a polarização epitelial. Durante a formação da adesão célula-célula, a interação entre as proteínas E-caderinas de células adjacentes leva a associação das proteínas citoplasmáticas PAR6 e aPKC, que posteriormente interagem com PAR3. Quando o complexo PAR6/PAR3/aPKC está formado, a proteína CRB3 pode interagir com aPKC ou PAR6, promovendo a diferenciação de um complexo juncional prematuro para um maduro. A CRB3 se associa com a proteína PATJ através da PALS1, formando o complexo CRB3/PALS1/PATJ. PATJ interage com proteínas da família ZO, atuando dessa forma na estabilização da junção *tight* (Assémat *et al*, 2008). Trabalhos têm relatado a importância da sinalização da aPKC, e consequentemente da formação do complexo PAR6/PAR3/aPKC, na organização da junção *tight* (Gopalakrishnan *et al*, 2007; Standaert *et al*, 1999) e a participação do complexo CRB3/PALS1/PATJ na biogênese da polaridade epitelial (Michel *et al*, 2005; Shin *et al*, 2005).

1.2.2 Junções aderentes

A junção aderente (JA) está presente no complexo juncional apical logo abaixo da junção *tight*. Desempenha um papel crucial na formação da adesão célula-célula, além de atuar em diversas vias de sinalização intracelular, podendo regular variados eventos, como o estabelecimento da polaridade ápico-basolateral, migração e proliferação celular. Em nível molecular, as JAs podem ser subdivididas em dois tipos de complexos de adesão: o complexo nectina/afadina e o complexo E-caderina/catenina (Niessen & Gottardi, 2008). Ambos complexos se associam ao citoesqueleto de actina, estabilizando a junção aderente (Fig. 5).

As nectinas fazem parte da família de imunoglobulinas de moléculas de adesão. Estas proteínas compreendem principalmente quatro membros: nectina-1, -2, -3 e -4. Apresentam um domínio extracelular contendo três regiões características de imunoglobulinas e um domínio C-terminal citoplasmático que geralmente possui um motivo de ligação PDZ. As nectinas podem se associar lateralmente, formando homodímeros. A formação de estruturas adesivas entre células adjacentes pode ser feita através da interação entre nectinas (interação homotípica) ou entre nectinas e receptores similares a nectinas (interação heterotípica). Na porção citoplasmática,

interage com a proteína afadina (também chamada de AF-6), responsável pela ligação deste complexo de adesão ao citoesqueleto de actina (Niessen, 2007). As nectinas parecem atuar de maneira crucial no recrutamento de proteínas para formação das junções *tight* e aderentes, como relatado por Okamoto e colaboradores (2005). Estudos têm mostrado que a redução da expressão de nectina-1α está associada ao aumento do potencial maligno em queratinócitos (Matsushima *et al*, 2003) e que a superexpressão dela está associada a formação da junção aderente em células de câncer gástrico (Peng *et al*, 2002).

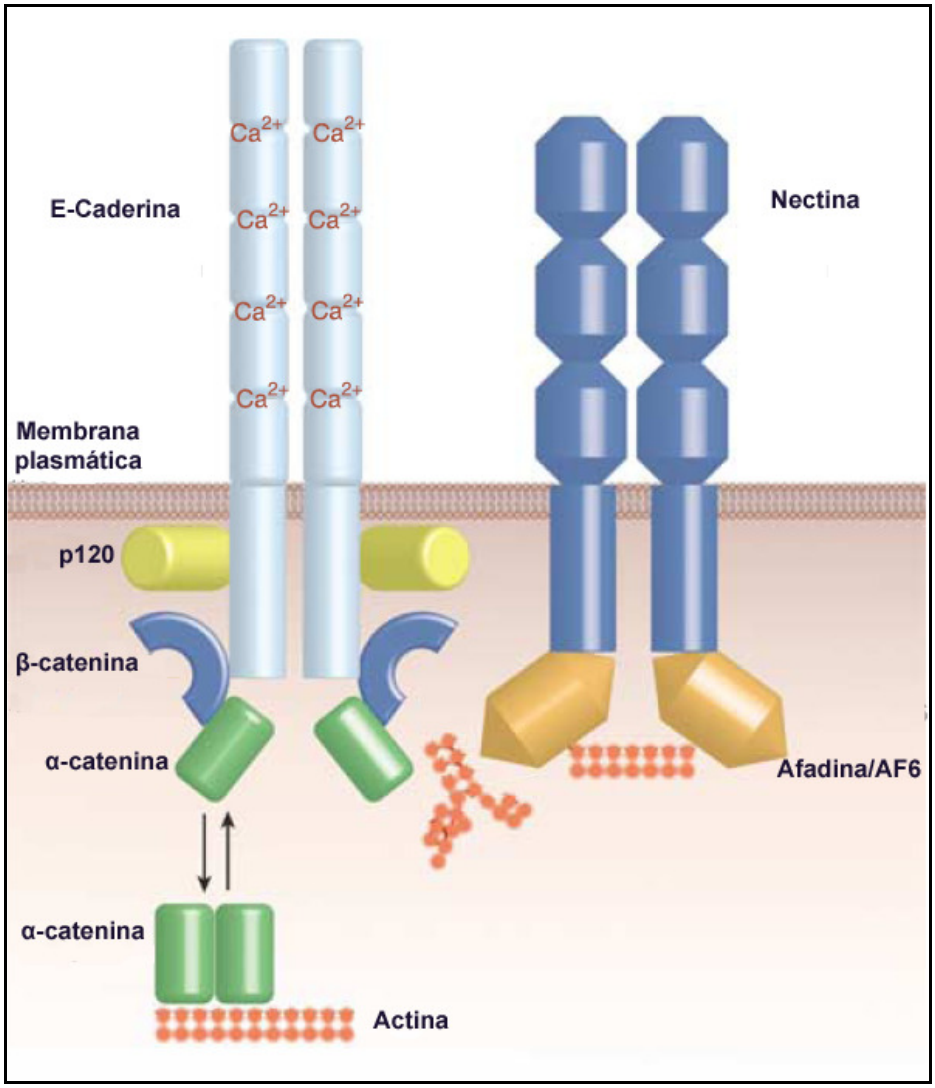


Figura 5: Modelo mostrando os constituintes moleculares da junção aderente. O esquema mostra também a associação do complexo E-caderina/catenina e nectina/afadina aos filamentos de actina citoplasmáticos. (Modificado de Niessen, 2007).

As caderinas pertencem a uma superfamília de moléculas de adesão dependentes de cálcio, sendo dividida em seis subfamílias: caderinas clássicas do tipo I e do tipo II, caderinas desmossomais, caderinas transmembrana de sete passagens, grandes caderinas e protocaderinas (Stemmler, 2008). A E-caderina, integrante da subfamília de caderinas clássicas do tipo I, é a principal proteína transmembrana presente na junção aderente de células epiteliais. A E-caderina possui cinco domínios extracelulares repetitivos (conhecidos como EC, do inglês *Extracellular Cadherin*), um domínio próximo à membrana (conhecido como JMD, do inglês *juxtamembrane domain*) e um domínio de ligação à catenina (conhecido como CBD, do inglês *catenin binding domains*), representados na figura 6 (Hartsock & Nelson, 2008).

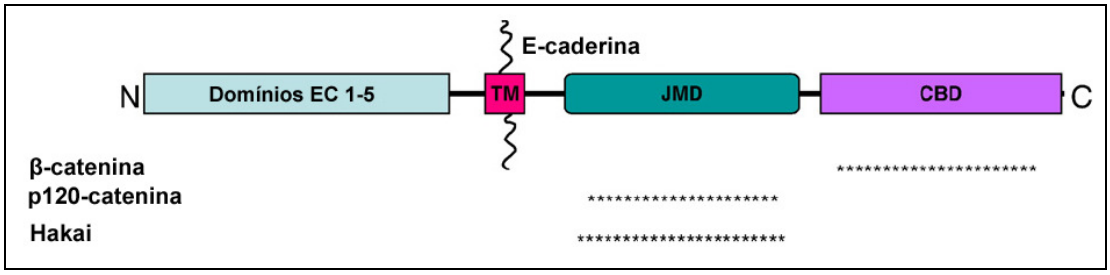


Figura 6: Esquema da estrutura da E-caderina. Esse esquema mostra os domínios extracelulares repetitivos (EC), o domínio próximo à membrana (JMD) e o domínio de ligação à catenina (CBD). TM representa a região de passagem pela membrana. Os asteriscos representam as regiões que já foram demonstradas por interagir com as respectivas proteínas descritas no lado esquerdo. Adaptado de Hartsock & Nelson, 2008.

Assim como as nectinas, as E-caderinas também se associam lateralmente, formando homodímeros. Os domínios EC são responsáveis pela interação de E-caderinas de células adjacentes, a qual é dependente de cálcio, atuando na manutenção da função de adesão intercelular. Os domínios intracelulares, JMD e CBD, permitem a interação da E-caderina com as proteínas da família catenina.

As cateninas compreendem uma família de proteínas composta por três membros principais: α-, β- e p120-catenina. A p120-catenina se associa ao domínio JMD da E-caderina, sendo responsável pela regulação local dos filamentos de actina e estabilidade do complexo caderina-catenina (Pokutta & Weis, 2007). A β-

catenina se liga ao domínio CBD de E-caderina, além de interagir com a α-catenina. Embora tenha sido demonstrado que α-catenina não interage simultaneamente com filamentos de actina e β-catenina (Nelson, 2008), tem sido proposto que monômeros de α-catenina, ligados a β-catenina, podem interagir com diversas proteínas (como vinculina, α-actinina, ZO-1 e EPLIN), que estariam atuando no ancoramento do complexo caderina-catenina ao citoesqueleto de actina (Abe & Takeichi, 2008; Stemmler, 2008).

A desorganização do complexo E-caderina/catenina tem sido associada a eventos que desencadeiam o processo tumorigênico. Dessa forma, sua correta regulação atua de maneira crucial para modular processos fisiológicos variados, tais como apoptose, proliferação e motilidade celular.

1.2.2.1 E-caderina e câncer

A adesão célula-célula desempenha um importante papel na manutenção da homeostase do tecido epitelial. A ocorrência de desorganização do complexo juncional apical influencia no desenvolvimento da carcinogênese epitelial. Durante o processo de formação de carcinomas, a ocorrência de desestabilização da junção aderente é observada, tendo como principal indício a expressão diminuída da E-caderina (Gloushankova, 2008) ou sua translocação da membrana plasmática para o citoplasma.

A diminuição da expressão da E-caderina pode amplificar também a resposta da via canônica Wnt, a qual está envolvida com a estabilização do *pool* citoplasmático de β-catenina. Desta forma, a β-catenina pode se translocar para o núcleo, podendo assim ativar fatores transcricionais da família Tcf, induzindo diversos eventos relacionados ao processo tumorigênico, tais como aumento da proliferação celular, escape da apoptose e aumento do potencial invasivo (Jeanes *et al*, 2008; Fuchs *et al*, 2005).

A desorganização da adesão célula-célula pode ser mediada por diversos fatores. Por exemplo, um estudo tem mostrado que a desestabilização da junção aderente pode ser regulada por uma via de sinalização envolvendo endocitose da E-caderina. Este mecanismo é regulado pela proteína clatrina e pode

ser prevenido pela p120-catenina (Yap *et al*, 2007), mantendo a sua localização na membrana, onde ela pode desempenhar sua função na junção aderente.

Na progressão de alguns carcinomas também pode ser observada a clivagem do domínio extracelular da E-caderina, resultando na E-caderina solúvel (sE-cad) e na liberação do domínio intracelular para o citoplasma. Algumas metaloproteases, tais como MMP-3, -7 e –9, têm sido descritas atuando nesse processo de clivagem. Subsequentemente, a sE-cad pode atuar de maneira parácrina, se associando ao domínio extracelular da E-caderina de células adjacentes e levando à uma desorganização da junção aderente. Já o domínio intracelular, pode ser translocado para o núcleo e ativar genes relacionados com o processo tumorigênico, como ciclina D1, AP-1 e STAT1/STAT2 (Salahshor *et al*, 2007; Symowicz *et al*, 2007; Ii *et al*, 2006). No câncer colo-retal, a redução da expressão da E-caderina indica um mal prognóstico, sendo correlacionada com o aumento da invasividade tumoral, desenvolvimento de sítios metastáticos e uma menor taxa de sobrevida (Kwak *et al*, 2007).

Em um estudo usando o modelo clássico de depleção do cálcio extracelular, foi mostrado uma interrelação de vias de sinalização celular, envolvendo PKA e GTPases da família Rho, para regular de forma concomitantemente a organização do citoesqueleto de actina e das junções intercelulares, onde a E-caderina cumpre papel importante. Além disso, neste estudo postulou-se que após a depleção do cálcio extracelular, acontece a formação de lamelipódios, um evento crucial para a malignização celular (Leve *et al*, 2008).

Eventos epigenéticos também estão envolvidos na diminuição da expressão da E-caderina durante a progressão tumoral. A hipermetilação de uma ilha CpG, próxima a região promotora do gene *E-caderina*, tem sido associada a redução de sua expressão em carcinomas de mama, próstata e colo-retal. Agentes desmetilantes vêm sendo usados para confirmar a associação desse evento com o processo de aumento do potencial maligno. Por exemplo, a utilização do 5-aza-2-deoxicitidina (5AzaC) provocou um aumento da agregação celular, diminuição da motilidade e supressão de metástase em células de câncer de mama (Van Roy & Berx, 2008). Recentemente, também foi relatado por Liu e colaboradores (2008) que a deacetilação da lisina 9 da histona H3 levava a diminuição da expressão da E-caderina em câncer colo-retal.

Para modular a estrutura e função das proteínas das junções aderentes é necessário um mecanismo de regulação finamente controlado, que responda aos mais variados estímulos celulares. Essa regulação é desempenhada por proteínas que formam uma intrincada rede de comunicação, através de eventos moleculares, conhecida como via de sinalização.

1.3 Sinalização celular e tumorigênese epitelial

Nos organismos multicelulares, a comunicação intercelular e entre as células e o meio externo atua de maneira crucial no controle da fisiologia celular. Através desses mecanismos, uma célula pode induzir o crescimento, morte, proliferação e vários eventos intracelulares. A molécula sinal atua como principal componente desse processo, possibilitando a modulação das mais variadas proteínas intracelulares e consequentemente modulando as funções que estas desempenham. As moléculas sinal (também conhecidas como sensores) ativam proteínas presentes nas vias de sinalização intracelular (também conhecidas como aceptores), as quais atuam na transdução de sinal até as proteínas alvo (efetores), responsáveis pelo controle do comportamento celular (Liberali *et al*, 2008). Dentre as moléculas sinal podemos encontrar citocinas, quimiocinas, íons, fatores de crescimento e hormônios. As proteínas de sinalização intracelular possuem um importante papel, pois atuam na mediação da transdução de sinal externo até as proteínas ou genes alvo, atuando numa intrincada rede de sinalização celular, que leva ao desencadeamento de um fenótipo específico, como mostrado na figura 7. Diversas vias de sinalização estão relacionadas com o processo tumorigênico. Dentre essas, podemos destacar aquelas relacionadas com as proteínas quinases e com os transportadores iônicos.

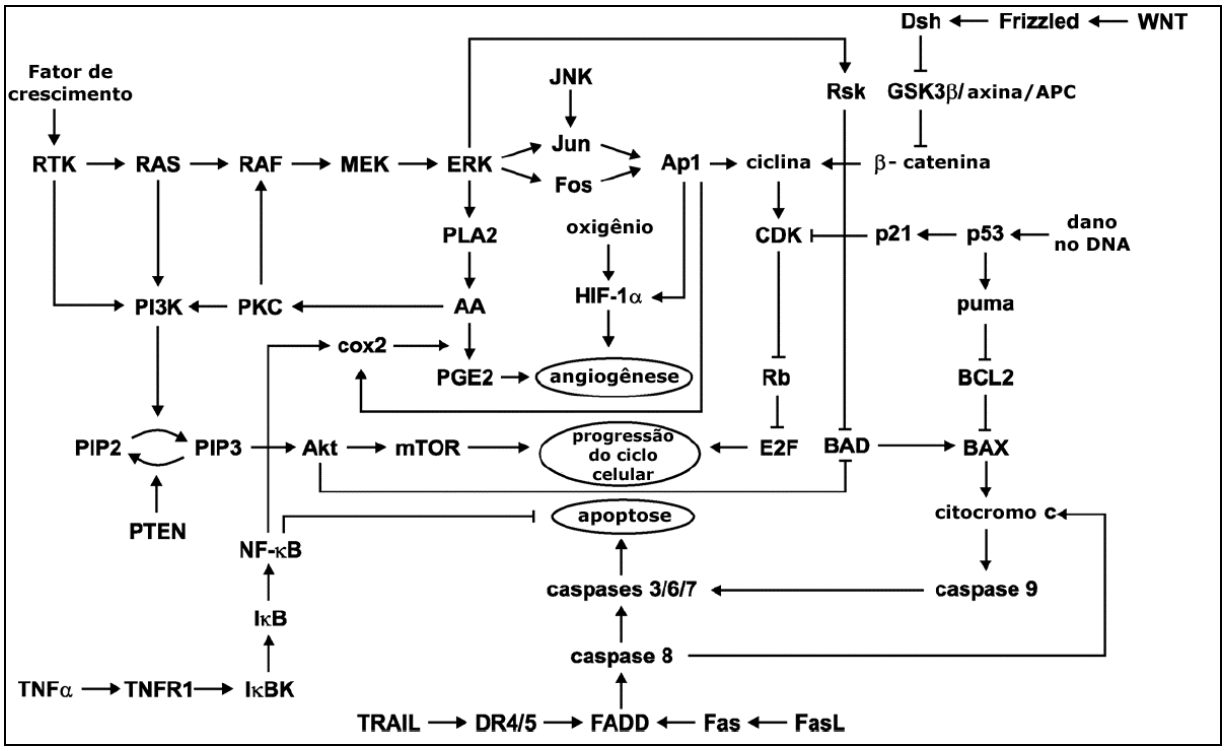


Figura 7: Rede de sinalização celular. O esquema é um exemplo de vias de sinalização mostrando as principais vias de transdução de sinal envolvidas na proliferação celular, apoptose e angiogênese. Alterações em componentes dessas vias podem desencadear o processo tumorigênico. Modificado de Hornberg *et al*, 2006.

1.3.1 Proteínas quinases

As proteínas quinases são enzimas que atuam na modificação pós-traducional de proteínas, catalisando a transferência de um radical fosfato do nucleotídeo adenosina trifosfato (ATP) para resíduos de aminoácidos específicos, processo conhecido como fosforilação. As principais proteínas quinases são aquelas que fosforilam resíduos serina/treonina ou tirosina. Variados tipos de proteínas pertencentes a estes dois grupos de quinases participam da modulação da adesão célula-célula.

A família da proteína quinase C (PKC) compreende serina/treonina quinases que podem ser subdivididas em 3 grupos: as PKCs clássicas (cPKC), as PKCs novas (nPKC) e as PKCs atípicas (aPKC). Dentre elas, a ativação de aPKCs pela proteína Cdc42 tem sido descrita como crucial para formação das junções *tight* e da polaridade epitelial. Foi relatado que a interação de nectinas com E-caderina nos contatos célula-célula imaturos ativa a proteína Cdc42, que por sua vez interage com o complexo PAR6-aPKC, induzindo ativação de aPKCs. Uma vez ativada,

aPKC participa do estabelecimento da adesão célula-célula (Cereijido *et al*, 2008). Em câncer gástrico, o fator de crescimento epidermal (EGF) tem sido associado com a ativação de proteínas da família PKC, levando à organização da junções *tight* devido a translocação das proteínas ZO-1 e ocludina do citoplasma para os contatos célula-célula (Yoshida *et al*, 2005). Por outro lado, proteínas da família PKC também podem estar envolvidas no processo de tumorigênese. Em câncer colo-retal, tem sido descrita a participação de proteínas da família PKC e EGFR na desorganização da adesão célula-célula dependente de E-caderina (Barbosa *et al*, 2003). Além disso, PKC está envolvida na via PKC/ERK/NFkB, conhecida por induzir a expressão de fosfolipase D1 (PLD1), levando ao escape da apoptose e aumento do potencial invasivo em células de câncer de cólon (Kang et al, 2008). Recentemente, foi demonstrado por Tanaka e colaboradores (2008) que proteínas da família PKC estão envolvidas na desorganização do complexo juncional apical causada pela prostaglandina E2 (PGE_2), através de um evento que requer a participação dos receptores EP1 e EP2 e a proteína claudina-1, em células de adenocarcinoma de cólon humano.

A família de receptores ErbB é constituída por proteínas tirosina quinase transmembrana que atuam na transmissão de sinais extracelulares para o citoplasma. Pode ser dividida em quatro subfamílias: EGFR, ErbB2, ErbB3 e ErbB4 (Lafky *et al*, 2008). A ativação fisiológica desses receptores é dependente de dimerização, homofílica ou heterofílica, entre os membros da família, resultando na fosforilação em resíduos de tirosina. O EGFR tem sido associado à ativação da via de sinalização PI3K-Akt, relacionada com sobrevivência celular, e da via Ras-ERK1/2, que induz proliferação celular, ambos processos cruciais para o aumento do potencial tumorigênico. Além disso, foi relatado que a ativação da via EGFR-Ras-ERK1/2 pode levar ao aumento da motilidade celular em células epiteliais da córnea, facilitando o processo de cicatrização (Lyu *et al*, 2006), e pode também atuar no aumento do potencial invasivo. O EGFR também pode se associar com a proteína E-caderina presente na membrana plasmática, prevenindo a dimerização do receptor e a ativação das vias de sinalização subsequentes, responsáveis pelo aumento da migração, proliferação e sobrevivência celular (Bremm *et al*, 2008).

1.3.1.1 Família MAPK

A família de proteínas quinases reguladas por mitógenos (MAPK) são serina/treonina quinases que atuam na transdução de variados sinais extracelulares até o núcleo, regulando processos como apoptose, migração e proliferação celular. As MAPKs podem ser divididas em 3 principais subgrupos: as c-Jun N-terminal quinases (JNKs), as p-38 e as quinases reguladas por sinal extracelular, chamadas de ERKs (Pimienta & Pascual, 2007). As JNKs possuem um papel ainda controverso no processo tumorigênico. Em modelos de camundongos, por exemplo, foi relatado que a perda da expressão de JNK1 causa diminuição da expressão de ciclina D e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), levando a diminuição da proliferação de hepatócitos e neovascularização tumoral, sendo um alvo terapêutico atrativo para carcinomas hepáticos. Porém, trabalhos também relatam a participação da via JNK em processos pró-apoptóticos, em resposta a tratamentos quimioterápicos. Então, a modulação da via JNK depende do contexto celular, exibindo respostas variadas (Johnson & Nakamura, 2007). A p-38 tem sido relacionada a mecanismos de resistência quimioterápica por induzir a expressão do gene de resistência a multidrogas (MDR) em células de câncer gástrico (Guo *et al*, 2008). Além disso, foi relatada a participação da via Src/Rac1/p-38 na ativação da proteína Akt, induzindo o processo de radioresistência em células de carcinoma cervical (Kim *et al*, 2008). As proteínas da subfamília ERK têm sido caracterizadas como participantes da transdução de sinais proliferativos. A clássica ativação de ERK1/2, pela via EGFR/Ras/Raf/MEK, pode induzir a expressão de genes como AP-1 que, por sua vez, induz a expressão de ciclina D, causando um aumento da proliferação celular. A ativação sustentada de ERK1/2 também tem sido relacionada ao aumento da motilidade celular e do potencial invasivo, aumentando consequentemente o potencial metastático, em variados tipos de carcinomas (Wu *et al*, 2008).

1.3.1.2 Família Src

A família de tirosina quinase Src (SFK) pertence ao grupo de quinases não-receptores e reúne oito membros divididos em duas subfamílias: a subfamília Src (Src, Yes, Fyn e Fgr) e a subfamília Lyn (Lyn, Hck, Lck e Blk). Possuem uma

região N-terminal (50 - 70 resíduos de aminoácidos) que varia entre os membros da família (Fig. 8). Esta região compreende um sítio de miristoilação ou palmitoilação, seguido por um domínio de homologia a Src 3 (SH3), com aproximadamente 50 aminoácidos, que se associa a um motivo consenso rico em prolina (PXXP). Essa região está associada com o domínio de homologia a Src 2 (SH2), constituído por aproximadamente 100 aminoácidos, que pode interagir com o domínio quinase (ou SH1), responsável pela atividade enzimática, presente na região C-terminal (Ingley, 2008).

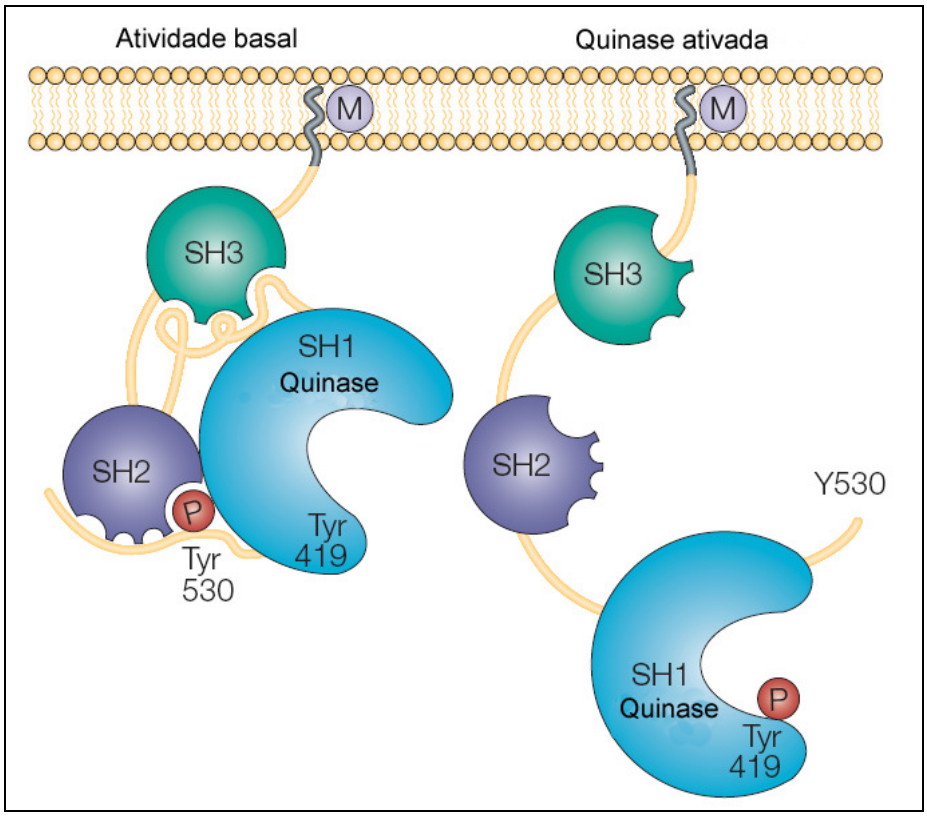


Figura 8: Estrutura geral das quinases da família Src mostrando suas configurações inativa e ativa. Note que na configuração de ativação basal ou inativa, o domínio SH2 interage com o resíduo fosforilado Tyr 530, presente no C-terminal. O domínio quinase (SH1) e o SH3 também interagem, resultando numa estrutura molecular fechada. Já na configuração ativa, a interação intramolecular entre os domínio SH1 e SH3 é desfeita, resultando numa configuração molecular mais aberta, o resíduo Tyr 530 é desfosforilado e ocorre também a fosforilação do resíduo Tyr 419, induzindo a atividade catalítica da enzima. M: Miristoilação; P: fosforilação. Adaptada de Yeatman, 2004.

As SFKs atuam na modulação de diversas vias de sinalização, podendo regular eventos como crescimento celular, migração, sobrevivência e invasão. A desregulação da atividade dessas proteínas pode desencadear um

processo carcinogênico. A proteína Src tem sido associada com a progressão do câncer de cólon devido a sua atuação na ativação da via PI3K-Akt, a qual está relacionada com eventos de escape da apoptose e de aumento da proliferação celular (Chen, 2008). Além disso, um estudo mostrou que o aumento de expressão da Src ou diminuição da expressão de tirosinas fosfatases, como a fosfatase com domínio SH2 (SHP-2) e a fosfatase com uma sequência rica em prolina, glutamato, serina e treonina (PTP-PEST), pode induzir a progressão do carcinoma colo-retal através do aumento da migração e invasão celular mediada pela proteína vilina, uma proteína responsável pela regulação do citoesqueleto de actina (Mathew *et al*, 2008). A formação de um complexo protéico envolvendo Src e a proteína quinase de adesão focal (FAK) também tem sido associada com a formação de lamelipódios, aumento da proteólise de componentes da matriz extracelular e aumento da expressão de VEGF, induzindo migração, invasão e angiogênese (Mitra & Schlaepfer, 2006). Diversos estudos relacionaram a atividade de Src com a desorganização da junção aderente e desenvolvimento do câncer colo-retal. Coluccia e colaboradores (2006), por exemplo, relataram que Src pode atuar na fosforilação da proteína β-catenina, levando a desorganização do complexo E-caderina/catenina e ativação da via β-catenina/Tcf4 em células de câncer colo-retal. Porém, recentes estudos têm mostrado que a proteína Src pode desempenhar um papel dúbio na junção aderente, induzindo a síntese ou degradação da E-caderina, dependendo do estímulo celular (Shindo *et al*, 2008). Mais estudos são necessários para definir a função desta quinase no desenvolvimento do câncer colo-retal.

1.3.2 Transportadores iônicos (Na^+/K^+-ATPase)

Os transportadores iônicos fazem parte de uma superfamília de proteínas transportadoras com função ATPase, sendo subdividida em quatro grupos principais, designados como tipo P, F, V e ABC. Essas proteínas se localizam em membranas biológicas, hidrolisam ATP e transportam ao menos uma substância através de membranas biológicas, via hidrólise de ATP.

Os transportadores do tipo P estão envolvidos com o transporte de diversos tipos de cátions, como cálcio, sódio, potássio e cobre, através de

membranas biológicas. Um dos membros mais estudados desse grupo é a Na^+/K^+-ATPase (Pederson, 2007).

As Na^+/K^+-ATPases são transportadores transmembrana que atuam no transporte de três íons sódio para fora e dois íons potássio para dentro da célula, gerando um gradiente de sódio e de potássio através da membrana plasmática. Consistem de heterodímeros protéicos constituídos por uma subunidade α (responsável pela atividade catalítica), uma subunidade β e, ocasionalmente, uma subunidade γ (responsáveis pela modulação da atividade da Na^+/K^+-ATPase). Em mamíferos, têm sido identificadas quatro diferentes isoformas da subunidade α e três distintas isoformas da subunidade β (Lefranc & Kiss, 2008; Rajasekaran *et al*, 2008).

A Na^+/K^+-ATPase desempenha um importante papel na manutenção da homeostase celular. Como transportador iônico, pode atuar como regulador da comunicação neuronal, da contração muscular e do volume celular, através da modulação da pressão osmótica. Pode atuar também na transdução de sinais para vias de sinalização intracelulares, modulando a ativação de Src, EGFR, NFκB, Ras-ERK1/2, entre outras proteínas. Além disso, a Na^+/K^+-ATPase pode ainda regular a formação e manutenção da adesão célula-célula (Mijatovic *et al*, 2007).

Rajasekaran e colaboradores (2008) têm sugerido que a atuação da Na^+/K^+-ATPase na regulação da adesão intercelular depende da interação da subunidade β com a E-caderina. Ainda, recentemente, foi relatada que essa interação é estabilizada por N-glicanos (Fig. 9), responsáveis por manter esses transportadores nos sítios de adesão célula-célula (Vagin *et al*, 2007). A associação da Na^+/K^+-ATPase com a E-caderina pode atuar também na modulação da organização do citoesqueleto de actina mediado pela proteína RhoA, induzindo o recrutamento de proteínas para formação da junção *tight* e o estabelecimento da polaridade celular (Mijatovic *et al*, 2007).

Diversos trabalhos têm relatado a atuação da Na^+/K^+-ATPase no processo carcinogênico. Foi mostrado que a inibição da subunidade $\alpha 1$ pode levar à redução da proliferação e migração, em células de glioblastomas (Lefranc & Kiss, 2008). Em câncer de pulmão de células não pequenas, a diminuição da expressão da subunidade $\beta 1$ tem sido associada à desregulação do complexo E-caderina/catenina, causando perda de adesão célula-célula e facilitando o processo

de invasão individual. Esse mecanismo parece ser regulado pelo repressor transcricional Snail, responsável pela diminuição da expressão de E-caderina e da subunidade β1 (Mijatovic *et al*, 2007). Em câncer colo-retal, o papel destas ATPases ainda não é conhecido.

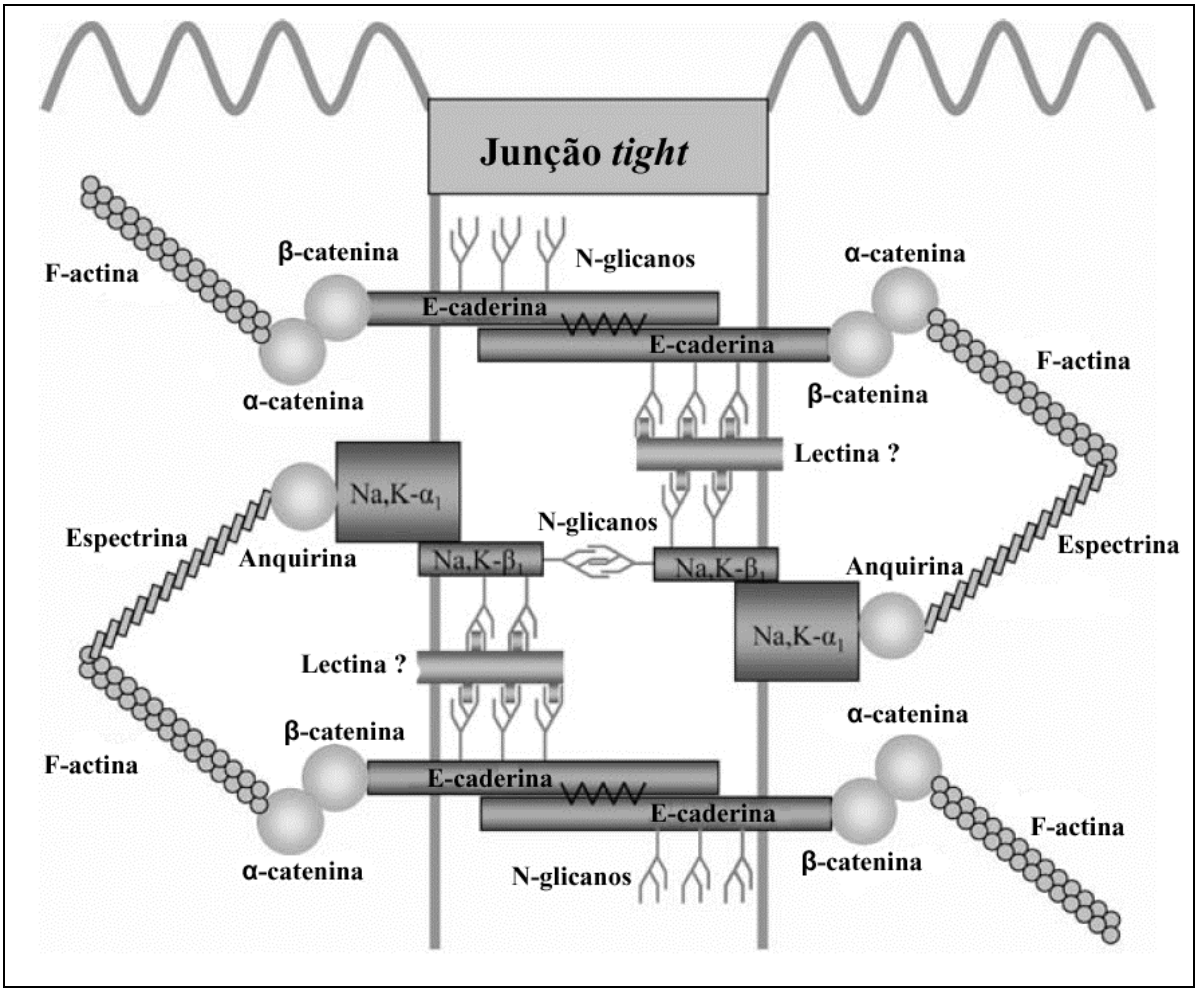


Figura 9: Modelo esquemático mostrando a associação da Na^+/K^+-ATPase com a E-caderina. O modelo postula que essa interação, mediada pela presença de N-glicanos e lectinas, confere estabilidade às junções aderentes. Adaptado de Vagin *et al*, 2007.

1.3.3 Ésteres de forbol, fatores de crescimento e glicosídios: ferramentas para estudo de vias de sinalização

A utilização de agentes promotores tumorais ou de inibidores protéicos tem sido empregada amplamente no estudo de vias de sinalização que atuam no processo tumorigênico. Por exemplo, ésteres de forbol (como o 12-*O*-

tetradecanoilforbol-13-acetato, TPA) são potentes promotores tumorais, conhecidos por ativar a via de sinalização das proteínas PKCs. Os ésteres de forbol mimetizam a ação do diacilglicerol (DAG), ativador endógeno das PKCs clássicas e novas (Kang *et al*, 2008; Mackay & Twelves, 2007). Os fatores de crescimento (como o fator de crescimento epidermal, EGF, e o fator de crescimento transformante-α, TGF-α) atuam na ativação de receptores tirosina quinase, como EGFR, c-KIT e c-MET, presentes na superfície celular, desencadeando cascatas de sinalização intracelular que regulam proliferação e diversos outros processos celulares (Lafky *et al*, 2008; Amit *et al*, 2007). Os glicosídios, como a ouabaína e a oleandrina, são substâncias inibidoras da Na^+/K^+-ATPase, se ligando com grande afinidade à subunidade α. Diversos trabalhos têm utilizado os glicosídios, a fim de destrinchar o papel da Na^+/K^+-ATPase nos mais variados processos celulares, usando célula MDCK (Mijatovic *et al*, 2007; Contreras *et al*, 2004).

1.4 Câncer colo-retal: incidência e desenvolvimento

O Câncer representa uma das principais causas de morte no mundo. Em 2004 foi estimado que cerca de 7,4 milhões de pessoas morreram de câncer e, continuando com a tendência atual, estima-se que cerca de 11,8 milhões de pessoas morrerão de câncer no ano de 2030 (World Health Organization, 2008). O câncer colo-retal (CCR) apresenta-se como o quarto mais incidente na população brasileira (Tabela 1) e, desconsiderando os tumores de pele não melanoma, a sua incidência estimada é de aproximadamente 54 mil novos casos para o biênio 2008/2009 (Instituto Nacional de Câncer & Ministério da Saúde, 2007).

Tabela 1- Estimativas, para o biênio 2008/2009, de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária.

Localização Primária	Estimativa de casos novos		
Neoplasia Maligna	Masculino	Feminino	Total
Próstata	49.530	-	49.530
Mama Feminina	-	49.400	49.400
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.810	9.460	27.270
Cólon e Reto	12.490	14.500	26.990
Estômago	14.080	7.720	21.800
Colo do Útero	-	18.680	18.680
Cavidade Oral	10.380	3.780	14.160
Esôfago	7.900	2.650	10.550
Leucemias	5.220	4.320	9.540
Pele Melanoma	2.950	2.970	5.920
Outras Localizações	55.610	62.270	117.880
Subtotal	**175.970**	**175.750**	**351.720**
Pele não Melanoma	55.890	59.120	115.010
Todas as Neoplasias	**231.860**	**234.870**	**466.730**

Fonte: Instituto Nacional de Câncer & Ministério da Saúde, 2007.

Os principais fatores de risco para este tipo de neoplasia são a história familiar de câncer de cólon e reto, a predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino (como as poliposes adenomatosas), assim como uma dieta rica em gorduras animais, baixa ingestão de frutas, vegetais e cereais, e ainda o consumo excessivo de álcool e o tabagismo. Também são considerados fatores de risco o sedentarismo, a obesidade e a idade, visto que tanto a incidência como a mortalidade aumenta de maneira proporcional à idade (Instituto Nacional de Câncer & Ministério da Saúde, 2007; Van den Brandt & Goldbohm, 2006).

O desenvolvimento do câncer colo-retal resulta da instabilidade genética, possibilitando a proliferação descontrolada das células normais. O acúmulo de mutações que levam à ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor pode aumentar a proliferação celular, acarretando formação de lesões neoplásicas benignas ou malignas. Os principais oncogenes que apresentam anormalidades genéticas encontrados em câncer de cólon são o *K-RAS e β-catenina*, e dentre os genes supressores de tumor encontramos o *APC*, *p53* e alguns pertencentes a família de reparo de mal-pareamento (MMR), como o *MSH2*, *MLH1*, *MSH6* (Houlston & Tomlinson, 2001).

Estimativas apontam que aproximadamente 75% dos casos de câncer colo-retal são de origem esporádica, sendo o restante de origem familiar (Kitisin & Mishra, 2006). O câncer esporádico resulta da ação cumulativa de agentes carcinógenos ambientais ou alimentares. Dentre as causas de origem hereditária destacamos o câncer colo-retal hereditário não poliposo (HNPCC), que representa uma incidência 2 % a 5 % dos casos herdáveis, e a polipose adenomatosa familiar (FAP), com incidência aproximada de 1 % dos cânceres colo-retais hereditários (Rowley, 2005). Esta última é resultado de uma mutação do gene *APC* (*Adenomatous poliposis coli*), responsável por desempenhar importantes funções na adesão célula-célula, regulação do ciclo celular e apoptose (Fearnhead *et al*, 2001).

Em CCR, dois tipos de instabilidade genética têm sido identificados: a) àquelas referentes à instabilidade de microssatélite (MIN) e b) às referentes a instabilidade cromossômica (CIN). A MIN tem sido associada à inativação somática de genes MMR, responsáveis pela manutenção da fidelidade de replicação do DNA, principalmente por silenciamento epigenético. A CIN é caracterizada pela perda de alelos e aneuploidia. Dentre os casos esporádicos de CCR, cerca de 85 % apresentam CIN e o restante dos casos se enquadram na MIN. Nos casos herdáveis, a FAP se enquadra como bom exemplo de CIN, apresentando um cariótipo aneuplóide, desencadeando mutações em genes supressores tumorais e oncogenes, como *APC, p-53 e K-RAS* (Fig. 10). A HNPCC se enquadra como modelo para MIN, podendo apresentar mutações nos mais variados tipos de genes MMR, sendo os mais frequentes os genes *MLH1* e *MSH2* (Michor *et al*, 2005; Sancho *et al*, 2004).

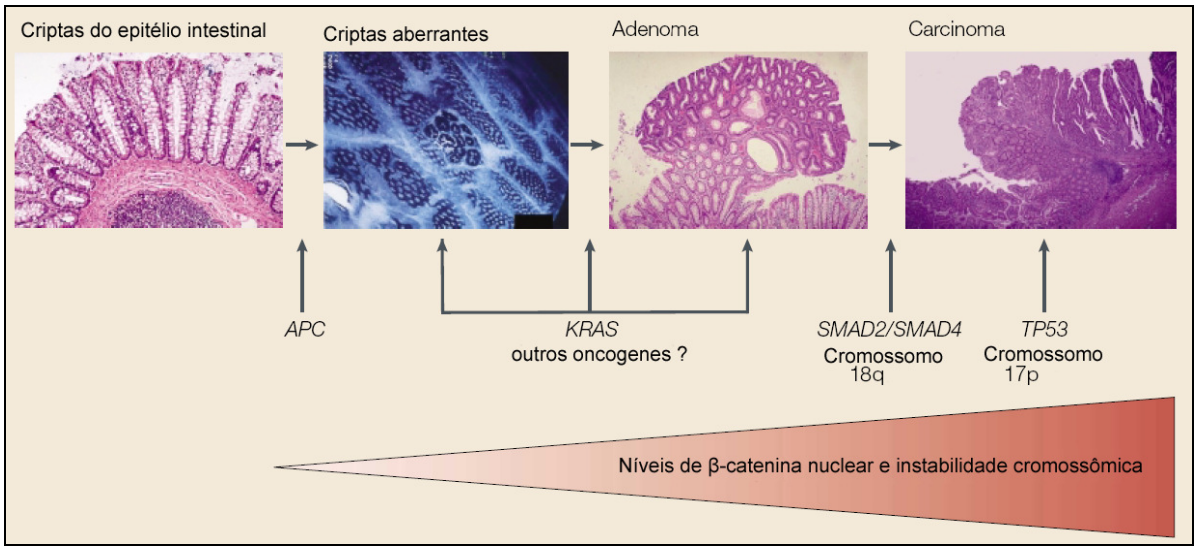


Figura 10: Histopatologia e principais mutações durante o desenvolvimento do câncer colo-retal. Durante o processo carcinogênico, o tecido colônico passa por diversas alterações morfológicas, resultantes das mutações em oncogenes (*K-RAS*) e genes supressores tumorais (*APC*, *SMAD2/4, TP53*). Em particular, a perda de função do gene *APC* parece dar início à cascata de eventos que eventualmente culminam na transformação maligna do epitélio colônico. Modificado de Fodde *et al*, 2001.

Alterações na via Wnt são as mais frequentes em câncer colo-retal, onde são encontradas mutações no gene *APC* em cerca de 80 % dos casos (Shitashige et al, 2008). A via Wnt/β-catenina (também conhecida como via Wnt canônica) desempenha um importante papel na renovação tecidual, motilidade e sobrevivência celular. Nesta via, proteínas solúveis Wnt são secretadas pelas células e se associam aos receptores *Frizzled* (Fz) e LRP5/6. Essa associação desencadeia uma cascata de sinalização que impede que o complexo formado pelas proteínas APC/Axina/CK1α/GSK3β direcione a proteína β-catenina para degradação dependente de proteassoma (Fig. 11). Dessa forma, a β-catenina pode acumular no citoplasma e se translocar para o núcleo, associando-se aos fatores transcricionais Tcf/Lef e induzindo a expressão de diversos genes relacionados com proliferação celular, escape da apoptose e invasividade celular. Quando mutações no gene *APC* induzem a perda da sua função, como acontece na FAP, a via Wnt canônica passa a desempenhar uma ativação crônica, levando a expansão de adenomas benignos, que na maioria das vezes progridem para um carcinoma de cólon invasivo (Barker & Clevers, 2006; Fuchs et al, 2005).

Outra via frequentemente envolvida com o CCR é aquela relacionada com a proteína K-Ras, ativa em aproximadamente 50 % dos casos. Mutações, que desencadeiam a ativação constitutiva de K-Ras, atuam de maneira crucial na progressão do câncer colo-retal e levam à ativação da via MAPK, relacionada com aumento do potencial metastático, proliferação e motilidade celular (Wu *et al*, 2008; Sancho *et al*, 2004).

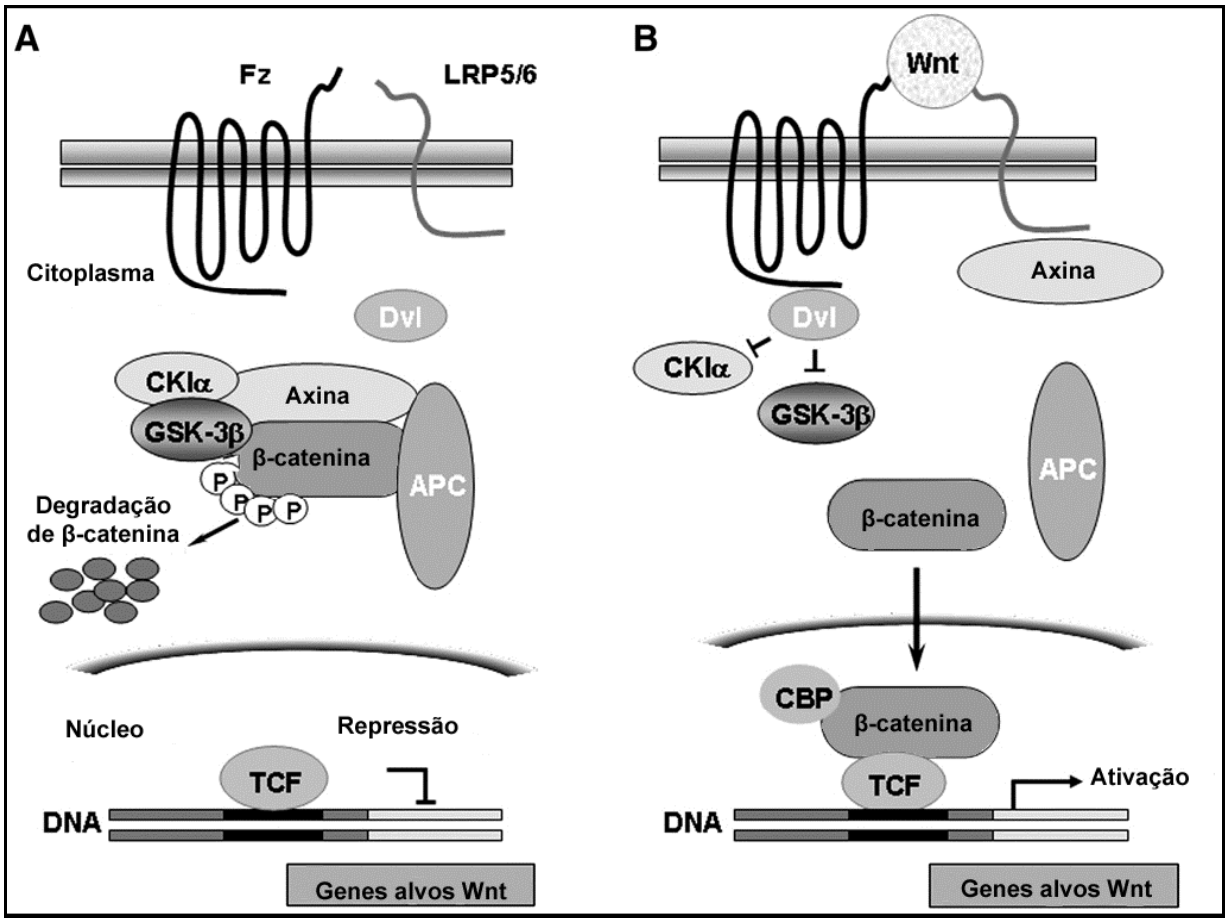


Figura 11: Esquema mostrando a via de sinalização Wnt/β-catenina. A) Na ausência de Wnt, o complexo APC/Axina/CK1α/GSK3β é formado e as proteínas CK1α e GSK3β fosforilam β-catenina, levando-a para degradação via proteassoma. B) Quando Wnt se liga aos receptores Frizzled (FZ) e LRP5/6 desencadeia uma cascata de sinalização que inibe a formação do complexo APC/Axina/CK1α/GSK3β, permitindo a acumulação citoplasmática da β-catenina e posterior translocação para o núcleo, onde se associa a fatores transcricionais para induzir a expressão de genes alvos Wnt. Modificado de Takahashi-Yanaga & Sasaguri, 2008.

1.5 Transição epitélio-mesenquimal e câncer epitelial

O tecido epitelial se organiza em camadas celulares, onde as células se encontram fortemente aderidas umas as outras, através do complexo juncional apical. Em condições normais, o estabelecimento dessa adesão intercelular interfere no movimento das células, dificultando sua motilidade. Por outro lado, células mesenquimais se associam entre si somente nos contatos focais e não formam uma camada celular organizada, o que permite uma maior motilidade celular. No processo morfogenético conhecido como transição epitélio-mesenquimal (TEM), as células perdem suas características epiteliais e passam a apresentar um fenótipo similar àquele das células mesenquimais (Berx *et al*, 2007).

A TEM desempenha um papel crucial durante a organogênese, na manutenção da integridade epitelial e no processo de progressão tumoral. Durante a TEM, as células epiteliais desregulam seu sistema de adesão célula-célula, perdem sua polaridade, e adquirem um fenótipo mesenquimal com reduzida relação intercelular e com a capacidade migratória aumentada. A TEM contribui de maneira significativa na plasticidade da célula tumoral e no aumento do seu potencial invasivo. Em nível molecular, durante a progressão de um carcinoma, as células podem ativar o programa de TEM, caracterizado pela perda ou redistribuição subcelular de marcadores epiteliais (como E-caderina e β-catenina) e expressão de marcadores mesenquimais, como vimentina e N-caderina (Fig. 12). A ativação do programa de TEM nas células tumorais denota um aumento do seu potencial maligno, visto que a TEM está relacionada a processos de invasão tecidual, metástase e resistência à drogas (Sabbah *et al*, 2008).

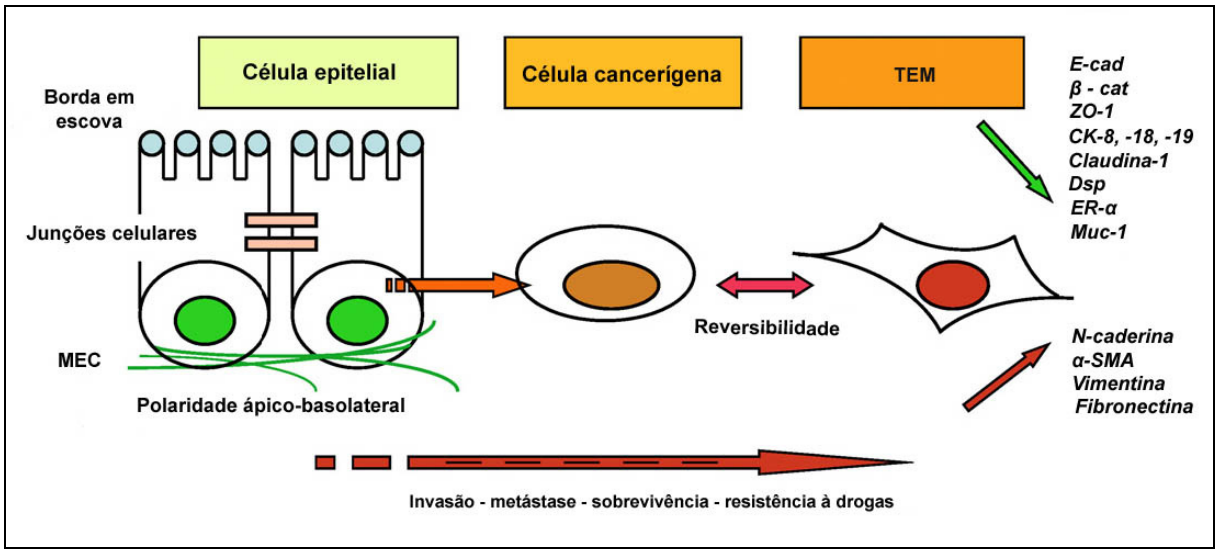


Figura 12: Esquema mostrando alterações celulares ocorridas durante a transição epitélio-mesenquimal (TEM). Num enterócito, ocorre a perda das microvilosidades, desagregação da adesão intercelular e destacamento da matriz extracelular (MEC). Essas células adquirem um fenótipo maligno que pode progredir para um completo programa de TEM, onde marcadores epiteliais são perdidos ou redistribuídos para lugares diferentes da sua localização (exemplo: E-caderina, β-catenina) e passam a expressar marcadores mesenquimais (exemplo: vimentina, fibronectina e N-caderina). α-SMA: Alfa actina de músculo esquelético, Muc-1: Mucina-1, CK: Citoqueratina, Dsp: Desmoplaquina, ER-α: Receptor de estrogênio-α. Adaptado de Sabbah *et al*, 2008.

Durante a TEM, a perda de adesão célula-célula é principalmente dirigida pela E-caderina, que frequentemente se encontra menos expressa ou realocada em células derivadas de carcinomas. A subsequente desorganização do complexo juncional apical atua de maneira primordial no processo de migração e invasão de células individuais, aumentando o potencial metastático (Baum *et al*, 2008; Wells *et al*, 2008). A E-caderina atua como a principal molécula reguladora da TEM, sendo modulada por diversas vias de sinalização, como aquelas desencadeadas pelos receptores de TGF-β (TβR), a via Wnt e a via Src.

O fator de crescimento transformante-β (TGF-β) é um potente indutor de TEM. Ele pode se associar ao TβR-I ou TβR-II e desencadear uma cascata de sinalização dependente de Smad, para ativar fatores transcricionais, como Lef-1/Tcf, conhecidos por atuar em processos como escape da apoptose e degradação da matriz extracelular. TGF-β também pode atuar numa cascata de sinalização independente de Smad, mimetizando um sinal desencadeado por um receptor tirosina quinase e ativar vias de sinalização, como a Ras/MAPK, PI3K, Rho e Rac. A

ativação da via Ras/MAPK por TGF-β é conhecida por acentuar a expressão de *Snail*, um repressor transcricional da E-caderina (Medici *et al*, 2006).

Uma vez que a sinalização Wnt pode induzir a expressão de *Slug*, conhecido por atuar na repressão transcricional da E-caderina, a sinalização Wnt/β-catenina representa uma das principais vias relacionadas com o processo da TEM (Baum *et al*, 2008). Por último, a via Src também tem sido mostrada participar do processo de TEM. Recentes estudos vêm mostrando que a proteína Src pode atuar na fosforilação da proteína β-catenina, causando desorganização do complexo E-caderina/catenina, perda da adesão célula-célula e liberando a β-catenina para o citoplasma, podendo assim atuar na via de sinalização Wnt. Além disso, a proteína Src atua também na fosforilação de diversas proteínas associadas ao citoesqueleto, como a vinculina, paxilina e cortactina, sugerindo sua participação na migração e invasão celular, eventos que requerem a reorganização do citoesqueleto de actina (Baum *et al*, 2008; Guarino *et al*, 2007).

1.6 Justificativa do estudo

Dados recentes na literatura vêm apontando que a TEM é um evento de elevada frequência durante a aquisição de um fenótipo maligno em câncer colo-retal (Natalwala *et al*, 2008; Vincan & Barker, 2008). Como antes mencionado, um dos reguladores chave desse processo é a E-caderina, proteína responsável por atuar no estabelecimento e manutenção da adesão célula-célula. Porém, ainda não estão bem esclarecidos os mecanismos celulares e moleculares que modulam a perda da adesão célula-célula mediada pela E-caderina e sua contribuição no desenvolvimento da TEM. Visto que: a) foi demonstrado que PKC e EGFR estão envolvidas na desorganização da adesão célula-célula mediada pela E-caderina, faltando elucidar a participação das proteínas Src e ERK1/2 nesse processo, em células de câncer colo-retal (Barbosa *et al*, 2003), e b) que a desregulação na expressão da subunidade β1 da Na^+/K^+-ATPase tem sido associada à desestruturação do complexo E-caderina/catenina, em células MDCK (Mijatovic *et al*, 2007), faz-se necessário avaliar os mecanismos moleculares que estariam modulando estes processos. O esclarecimento da regulação do processo de perda

de adesão célula-célula mediada pela E-caderina, contribuirá no entendimento do desenvolvimento da TEM e consequentemente da progressão do câncer colo-retal.

2 OBJETIVOS

Parte I

2.1 Geral

Avaliar o envolvimento das proteínas Src e MAPK na desorganização das junções aderentes e aumento do potencial migratório causado por TPA e EGF, usando como modelo uma linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano, Caco-2.

2.1.1 Objetivos específicos

2.1.1.1 Analisar os efeitos dos tratamentos com TPA e EGF sobre a organização das junções aderentes, dando ênfase à expressão e localização subcelular da proteína E-caderina;

2.1.1.2 Determinar a participação das proteínas ERK1/2 e Src na perda da adesão célula-célula mediada pela E-caderina, induzida pelo tratamento com TPA e EGF;

2.1.1.3 Caracterizar o efeito da perda de adesão célula-célula mediada pela E-caderina na capacidade migratória das células em estudo.

Parte II

2.2 Geral

Caracterizar o envolvimento da Na^+/K^+-ATPase na perda de adesão célula-célula mediada pela E-caderina, em células Caco-2.

2.2.1 Objetivos específicos

2.2.1.1 Analisar o efeito do tratamento com diferentes concentrações de ouabaína na organização das junções aderentes e distribuição da proteína E-caderina;

2.2.1.2 Avaliar o envolvimento das subunidades alfa e beta da Na^+/K^+-ATPase na organização das junções aderentes, sob o tratamento com ouabaína;

2.2.1.3 Determinar a participação da proteína ERK1/2 na transdução de sinal induzida por ouabaína na organização do processo de adesão célula-célula mediada pela E-caderina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Anticorpos e reagentes

Os seguintes anticorpos primários foram usados: monoclonais produzido em camundongo, anti-E-caderina, clone 36 (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) e anti-β1 Na^+/K^+-ATPase, clone M17-P5-F11, e o produzido em coelho, anti-p-Src, ambos obtidos da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA); policlonais produzidos em coelho, anti-p-ERK1/2 (Biomol Research Laboratories Inc, PA, EUA), anti-MAPK (EMD Chemicals Inc, Gibbstown, NJ, EUA) e anti-α- e β-catenina, ambos obtidos da Sigma Chemical Co., e o produzido em camundongo anti-v-Src (EMD Chemicals Inc). Para detecção destas proteínas por quimiluminescência, utilizou-se os anticorpos secundários conjugados à peroxidase anti-camundongo IgG e anti-coelho IgG (Sigma Chemical Co.). Já para detecção da E-caderina por imunofluorescência, foi utilizado o anticorpo secundário anti-camundongo IgG conjugado a Alexa fluor 488 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA).

O éster de forbol 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e o inibidor da subunidade α1 da Na^+,K^+-ATPase (ouabaína) foram obtidos da Sigma Chemical Co. , o fator de crescimento epidermal (EGF) obtido da Invitrogen Co. e o inibidor da proteína Src, o 4-amino-1-tert-butil-3-(1'-naftilmetil) pirazolo [3,4-d] pirimidina (PP1), obtido da EMD Chemicals Inc. Soluções estoque de TPA (1,6 mM), ouabaína (10 mM), EGF (100 μg/mL) e PP1 (1,7 mM) foram preparadas e estocadas a –20º C.

3.2 Cultura de células

Células Caco-2, uma linhagem derivada de adenocarcinoma de cólon humano, foram obtidas da ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA; n° HTB-37). As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), 60 mg/L de estreptomicina, 100 mg/L de penicilina G (todos adquiridos da Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), e mantidas a 37º C em uma atmosfera de 5 % CO_2. Para expansão da cultura, células em confluência foram lavadas com solução

salina (PBS) e soltas da garrafa incubando-se com uma solução de 0,25% de tripsina (Invitrogen Co.) em PBS, por 5 - 7 minutos a 37° C. Posteriormente, as células foram transferidas para garrafas de 25 cm^2 para ensaios bioquímicos, ou placas de 6 poços para ensaios de migração celular, ou sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços para imunofluorescência, ou de 96 poços para o ensaio de proliferação, todas obtidas da TPP (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suíça). Para microscopia eletrônica, as células foram crescidas sobre membranas de policarbonato Transwell, com 6,5 mm de diâmetro e poros de 0,4 µm (Corning Incorporated, NY, EUA). Todos os experimentos foram realizados quando as células atingiram confluência.

3.3 Tratamentos com TPA e EGF

Visando induzir desorganização do sistema de adesão célula-célula mediada pela E-caderina, monocamadas de células Caco-2 crescidas em diferentes substratos, como acima mencionado, foram submetidas ao tratamento com 200 nM de TPA ou 100 ng/mL de EGF por 24 h. Em paralelo, para verificar o papel da proteína Src na modulação deste processo, células foram pré-incubadas com 10 µM do inibidor da proteína Src, PP1, por 1 h a 37° C, antes dos respectivos tratamentos. As células foram cultivadas por 12 h em meio DMEM sem SFB antes dos diferentes tratamentos.

3.4 Tratamento com ouabaína

Com a finalidade de avaliar o papel da Na^+/K^+-ATPase na adesão célula-célula mediada pela E-caderina, células Caco-2, após atingirem a confluência, foram tratadas com ouabaína nos seguintes tempos e concentrações: 100 nM por 15 min e 6 h, e 10 e 100 µM por 5 e 15 min, ou por 6 e 8 h. Para verificar se os efeitos causados pela ouabaína não foram resultantes de um desbalanço iônico, monocamadas de células foram tratadas com 250 mM de NaCl, por 1,5 h. Após os respectivos tratamentos, as células foram lavadas e submetidas às diferentes análises.

3.5 Obtenção de lisados totais e frações solúveis e insolúveis em Triton X-100

Após os respectivos tratamentos, e com a finalidade de determinar a localização subcelular das proteínas em estudo, monocamadas de células foram lavadas três vezes com PBS e homogeneizadas em tampão CSK (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 6,8, $MgCl_2$ 3 mM, Triton X-100 0,5 %, sacarose 300 mM), contendo ortovanatado de sódio 1 mM, fluoreto de sódio 20 mM, e um coquetel de inibidores de proteases (1:100), obtido da Sigma Chemical Co., por 20 minutos a 4° C. Após centrifugação por 10 min (10000 g) a 4° C, o sobrenadante correspondente à fração solúvel em Triton X-100 (proteínas citoplasmáticas) foi cuidadosamente removido e guardado. O pellet resultante foi homogeneizado em tampão SDS (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; EDTA 5 mM e SDS 1 %), fervido a 100° C por 10 min e após centrifugação a 10000 g por 10 min , o sobrenadante correspondente à fração insolúvel em Triton X-100 (proteínas ligadas ao citoesqueleto) foi cuidadosamente removido e estocado.

Para análise dos níveis totais e das formas ativas (fosforiladas) das proteínas em estudo, monocamadas de células foram lavadas três vezes com PBS e homogeneizadas em tampão de extração (Triton X-100 1 %; deoxicolato de sódio 0,5 %; SDS 0,2 %; NaCl 150 mM; Hepes 10 mM, pH 7,3; EDTA 2 mM), contendo ortovanadato de sódio 2 mM, fluoreto de sódio 20 mM e um coquetel de inibidores de proteases (1:100), obtido da Sigma Chemical Co., por 30 min a 4° C. O homogeneizado foi centrifugado a 10000 g por 10 min e o sobrenadante coletado para análise posterior.

3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE), *imunoblotting* e análise densitométrica

Os extratos protéicos totais (60 μg) e as frações solúveis e insolúveis em Triton X-100 (30 μg) foram separados por SDS-PAGE em géis de 7,5; 10 e 12 % (Laemmli, 1970). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando-se o aparelho de transferência semi-seco (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EUA) a 10 V por 60 min, como descrito por Towbin e colaboradores (1979). As membranas foram incubadas em tampão de bloqueio TBS-T: Tris-HCl 20 mM, pH 7,6; NaCl 137 mM e Tween 20 0,1 %, contendo leite desnatado 5 %, durante 60 min. Logo após, foram incubadas por 3 h

ou *overnight* com os anticorpos primários: anti-E-caderina, diluição 1:5000; anti-MAPK, diluição de 1:1000; anti-p-ERK1/2, diluição 1:5000; anti-v-Src, concentração de 2,5 μg/mL; anti-p-Src, diluição 1:250; anti-α-catenina, diluição 1:3000; anti-β-catenina, diluição 1:4000; e anti-α1 Na^+/K^+-ATPase, diluição 1:450. Após sucessivas lavagens com TBS-T, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários correspondentes, anti-camundongo ou anti-coelho conjugados à peroxidase, diluição de 1:50000, por 60 min. As membranas passaram por várias lavagens com TBS-T e a detecção da imunomarcação foi realizada através de reação de quimiluminescência utilizando um kit ECL (Amersham Biosciences GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido).
A quantificação dos níveis protéicos foi realizada por análise densitométrica usando software LabWorks 4.6 (BIO RAD, Upland, CA, EUA).

3.7 Imunofluorescência

Após os respectivos tratamentos, células cultivadas sobre lamínulas de vidro foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4 % durante 10 min a 37° C. Depois foram lavadas com PBS/CM (PBS contendo $CaCl_2$ 100 mM e $MgCl_2$ 100 mM, pH 8,0), incubadas com NH_4Cl 10 mM (preparado em PBS) por 10 min e permeabilizadas com Triton X-100 0,5 % em PBS (pH 8,0) por 5 min à temperatura ambiente e posteriormente em solução de bloqueio (BSA 0,2% em PBS) por 60 min. Logo após, foram incubadas por 2 h com o anticorpo primário monoclonal anti-E-caderina (diluição 1:500), e por mais 1 h com o anticorpo secundário conjugado a Alexa fluor 488 (diluição 1:500). Posteriormente, as células foram lavadas 5 vezes com PBS e montadas em solução contendo N-propril-galacto, e analisadas usando um microscópio invertido AXIOVERT S100 (Carl Zeiss Inc, Alemanha). As imagens foram digitalizadas utilizando uma câmera CCD (VarioCam, PCO Computer Optics, Alemanha) acoplada ao programa de processamento de imagens KS 300 (Carl Zeiss Inc).

3.8 Microscopia eletrônica de transmissão

Monocamadas de células cultivadas em membranas Transwell, após serem submetidas aos diversos tratamentos, foram fixadas em tampão de Karnovsky (glutaraldeído 2,5 %, paraformaldeído 1 %, sacarose 8 % e $CaCl_2$ 2 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2) por 1 hora. Logo após, foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M por 3 vezes, durante 10 min cada, e pós-fixadas por 45 min em uma solução contendo tetróxido de ósmio 1 %, ferrocianeto de potássio 0,8 % e 5 mM de $CaCl_2$ em tampão cacodilato 0,1 M. As membranas foram então lavadas em tampão cacodilato 0,1 M por 3 vezes, durante 10 min cada , desidratadas em concentrações crescentes de acetona (50%, 70%, 90%, 2 vezes em 100% e outras 2 vezes em super seca) por 10 min cada, sendo incluídas posteriormente em resina Epóxi. Cortes ultrafinos, entre 60 – 70 nm, foram obtidos usando um Ultramicrótomo (Leica Microsystem, Wetzlar, Alemanha), contrastados com acetato de uranila 5 % (45 min) e citrato de chumbo (5 min) e analisados usando um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900 (Carl Zeiss Inc).

3.9 Ensaio de migração celular (*Wound healing assay*)

Antes dos respectivos tratamentos, uma região da monocamada celular foi raspada com uma ponteira estéril de 10 μL. Após os tratamentos, a migração das células a partir da região raspada foi acompanhada, usando o microscópio invertido AXIOVERT S100. As imagens foram capturadas usando a câmara CCD VarioCam acoplada ao programa de processamento de imagens KS 300. A distância de migração foi feita a partir de três experimentos independentes e foi medida utilizando o programa Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems Inc, CA, EUA). As medidas foram referentes a média obtida entre as distâncias percorridas pelas células nas bordas e no meio da região raspada.

3.10 Ensaio de proliferação celular

Com a finalidade de analisar o efeito dos tratamentos na proliferação celular, 2×10^4 células foram semeadas em placas de 96 poços. Após o período de aderência (aproximadamente 4 horas), as células foram tratadas ou não com TPA e

EGF por 0, 24 e 48 h. Posteriormente a estes períodos de tratamento, foram lavadas com PBS e fixadas em etanol 100 % por 10 min e incubadas, subsequentemente, com solução contendo cristal violeta (cristal violeta 0,05 % em etanol 20 %) por 10 min. Após lavagem com água destilada e com metanol por 5 min, a quantificação da proliferação celular foi realizada por colorimetria usando um leitor de Elisa Spectra Max 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), a um comprimento de onda de 595 nm.

3.11 Ensaio de ligação da ^{3}H-ouabaína às células Caco-2

Monocamadas de células Caco-2 foram incubadas em meio DMEM suplementado com 10 μM (6 h) ou 100 μM (6 e 8 h) de ouabaína não marcada. Posteriormente, as células foram incubadas por 1 h com novo meio DMEM, contendo 500 μM de ^{3}H-ouabaína (650000 cpms), para permitir a ligação do glicosídio. Ao final do tratamento as células foram raspadas e homogeneizadas, sendo centrifugadas posteriormente a 4000 g. Os valores foram obtidos a partir de três experimentos independentes e são correspondentes à diferença entre a quantidade total de ^{3}H-ouabaína utilizada no tratamento e a ^{3}H-ouabaína quantificada no sobrenadante celular. Controles negativos foram obtidos após lavagens das células tratadas com ouabaína não marcada, mostrando a especificidade da ^{3}H-ouabaína, assim como ausência de dano celular.

3.12 Análise estatística

Análise estatística de três experimentos independentes foi realizada com o programa GrafPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA), utilizando 1-*way* ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni ou Dunnetti. Os dados são expressos como média ± desvio padrão. Diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$.

4 RESULTADOS

PARTE I

4.1 Vias de sinalização envolvidas com a desorganização da junção aderente e aumento do potencial migratório causado por TPA e EGF

4.1.1 Src está envolvida na desorganização da junção aderente causada por TPA e EGF

Num trabalho prévio usando células Caco-2, nosso Grupo mostrou que ambos, TPA e EGF, causavam desorganização das junções aderentes através de um evento que requer a participação das proteínas PKC e EGFR. No entanto, a participação da proteína Src, modulando essa transdução de sinal, ficou por ser caracterizada (Barbosa *et al*, 2003). Para determinar se a proteína Src estaria participando da modulação deste evento, inicialmente células Caco-2 em confluência foram pré-tratadas com o inibidor da proteína Src, PP1, e a estrutura das junções aderentes foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão. Como observado na figura 13, a monocamada epitelial apresenta um complexo juncional apical bem definido, evidenciado pela presença de junções *tight* e aderentes, e inúmeras microvilosidades, características comuns encontradas nos epitélios intestinais (Fig. 13A). Porém, as células tratadas com TPA e EGF (Fig. 13B e 13D, respectivamente) mostraram grandes espaços na região das junções aderentes e microvilosidades com morfologia e distribuição alteradas. Aparentemente, nenhuma mudança foi observada na região de junção *tight*. Quando as células foram pré-incubadas com PP1, antes dos tratamentos com TPA e EGF, observou-se uma prevenção desses efeitos (Fig. 13C e 13E, respectivamente), sendo notado um complexo juncional apical bem definido, semelhante ao das células não tratadas. Esse resultado sugere que a proteína Src estaria envolvida na transdução de sinal, induzida por TPA e EGF, para modular a organização das junções aderentes em células Caco-2.

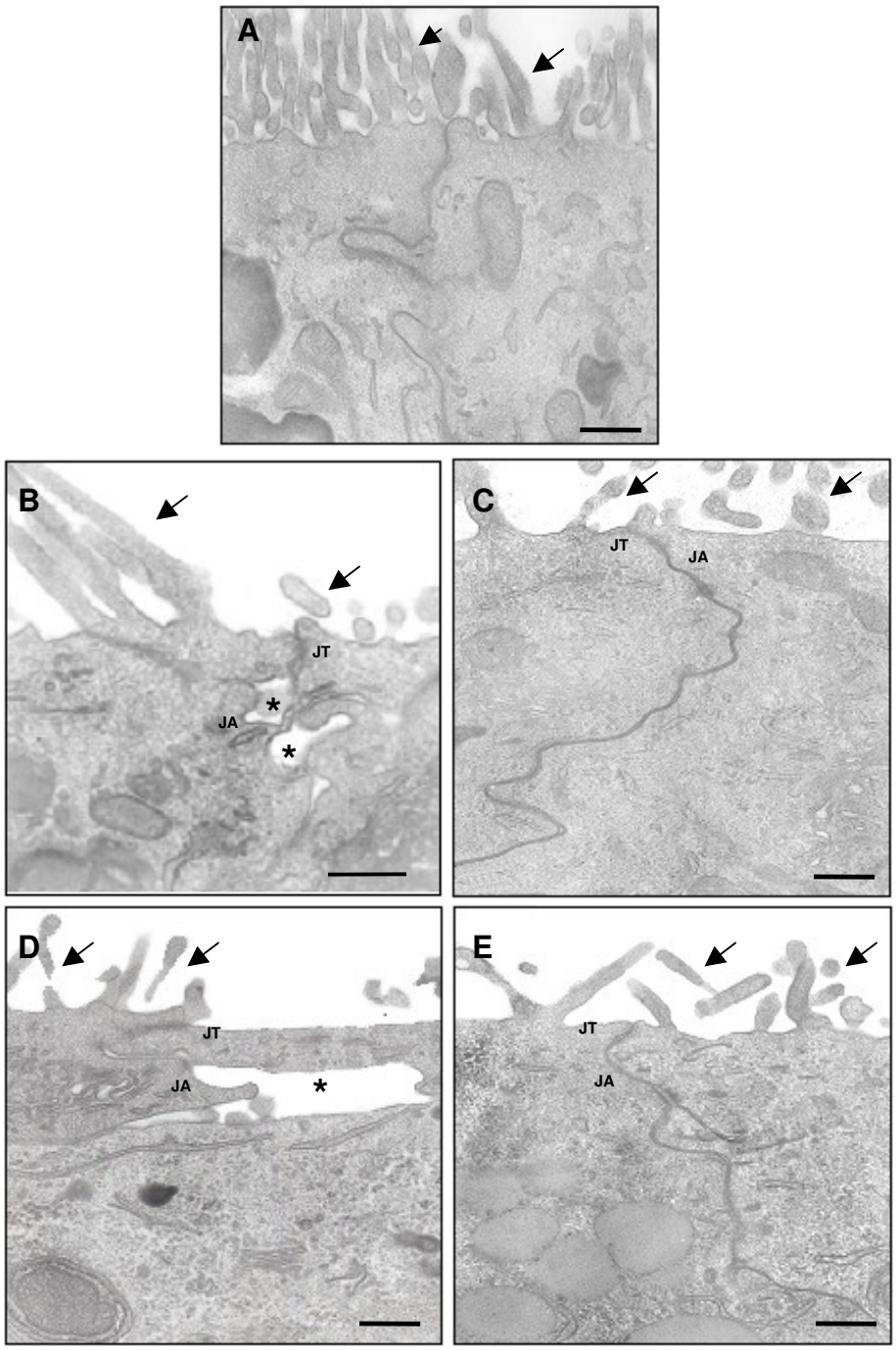


Figura 13: Alterações estruturais nas junções aderentes de células Caco-2 causadas por TPA e EGF são prevenidas pelo inibidor de Src, PP1. Monocamadas de células foram cultivadas em membranas microporosas (Transwell), tratadas ou não com TPA (B) ou EGF (D) por 24 h e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Note que tanto as células tratadas com TPA como EGF apresentam grandes espaços na região da junção aderente (asteriscos) e distribuição alterada de microvilosidades (setas), as quais se apresentam em menor número. O pré-tratamento com o inibidor da proteína Src, PP1, preveniu os efeitos causados por TPA (C) e EGF (E). Barra = 1 µm. JT: Junção *Tight*; JA: Junção Aderente.

4.1.2 Src participa da redistribuição da E-caderina causada por TPA e EGF

A E-caderina é a principal proteína da junção aderente, atuando na organização e manutenção da adesão célula-célula, além de regular diversos eventos intracelulares, como apoptose, proliferação e motilidade celular (Laprise *et al*, 2004b). Ainda não está bem esclarecido o mecanismo molecular pelo qual a E-caderina é regulada no processo de perda da adesão célula-célula, causada por sinais externos. Para determinar se a proteína Src estaria envolvida na perda de adesão célula-célula mediada pela E-caderina, células Caco-2 foram pré-incubadas com PP1 (inibidor de Src) e tratadas com TPA e EGF, e a distribuição da E-caderina foi analisada por microscopia de imunofluorescência. A figura 14A mostra o perfil normal de marcação da E-caderina em células não tratadas, onde pode ser observado que a marcação é majoritariamente restrita aos contatos célula-célula. Os tratamentos com TPA e EGF causaram uma redistribuição dessa proteína. Foi possível observar regiões pontuais mais intensas de marcação nos contatos célula-célula e diminuição da marcação nas regiões intercelulares em células tratadas com TPA (Fig. 14B), assim como a presença de uma marcação descontínua, com projeções citoplasmáticas, nos contatos célula-célula sob o tratamento com EGF (Fig. 14D). Estes efeitos foram prevenidos quando as células foram pré-incubadas com PP1 (Fig. 14C e 14E), antes dos respectivos tratamentos, observando-se uma distribuição da E-caderina semelhante à encontrada nas células sem tratamento.

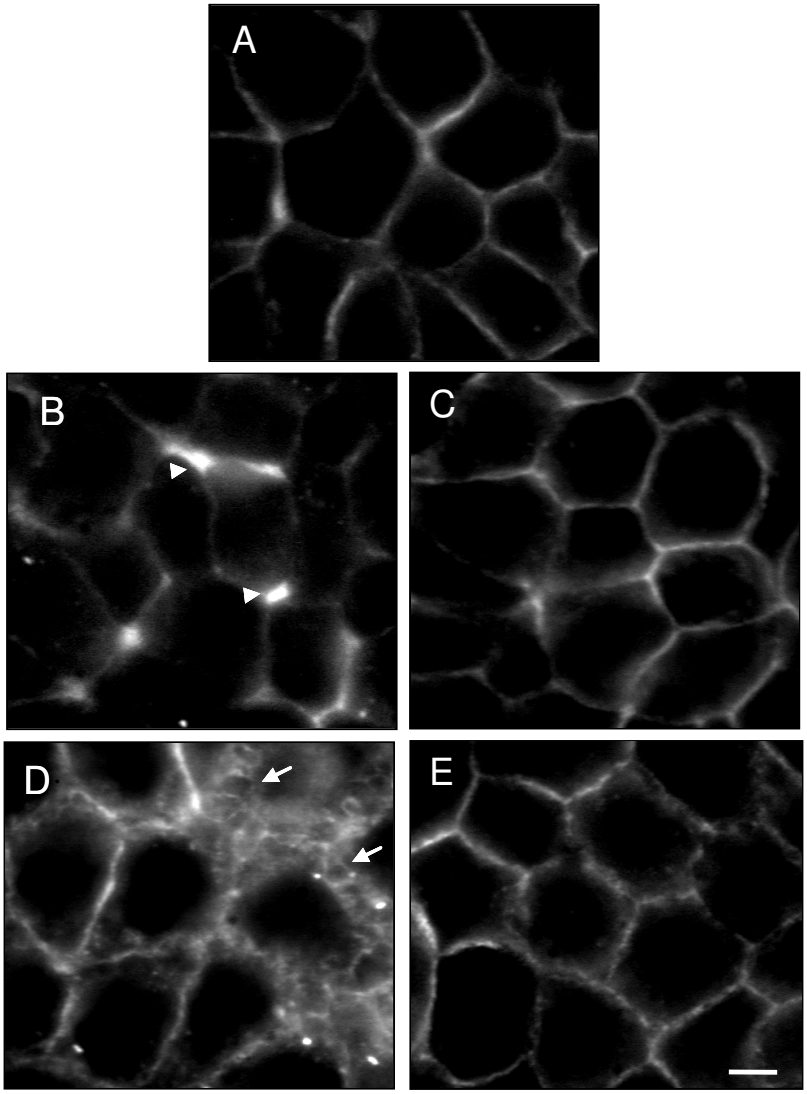


Figura 14: Src participa da redistribuição da E-caderina induzida por TPA e EGF. Monocamadas de células Caco-2 foram crescidas em lamínulas e tratadas com TPA ou EGF por 24 h. Posteriormente, as células foram processadas para imunofluorescência usando o anticorpo anti-E-caderina. Observe a distribuição normal da E-caderina nos contatos intercelulares em células sem tratamento (A) e sua redistribuição após o tratamento com TPA (B), sendo notado um acúmulo pontual (cabeça de seta), e EGF (D), sendo verificado uma marcação pontual e com projeções citoplasmáticas (setas), além de um aumento da marcação citoplasmática. A redistribuição da E-caderina foi prevenida com a utilização do inibidor da proteína Src, PP1, antes dos tratamentos com TPA (C) e EGF (E). Barra = 10 µm.

Considerando os dados observados por imunofluorescência, foi realizada também uma análise por *imunoblotting* da distribuição da E-caderina usando frações solúveis e insolúveis, obtidas através de extração diferencial com o detergente não iônico Triton X-100. A figura 15 mostra o perfil de distribuição da E-caderina após os respectivos tratamentos. Foi possível observar que em células não

tratadas a E-caderina é distribuída aparentemente em níveis iguais na fração insolúvel (correspondente à fração associada ao citoesqueleto) e na fração solúvel (correspondente à fração protéica citoplasmática) em Triton X-100. Os tratamentos com TPA e EGF sozinhos, ou concomitantes com PP1, não causaram alterações significativas na distribuição da E-caderina, em relação aos níveis protéicos encontrados nas células não tratadas.

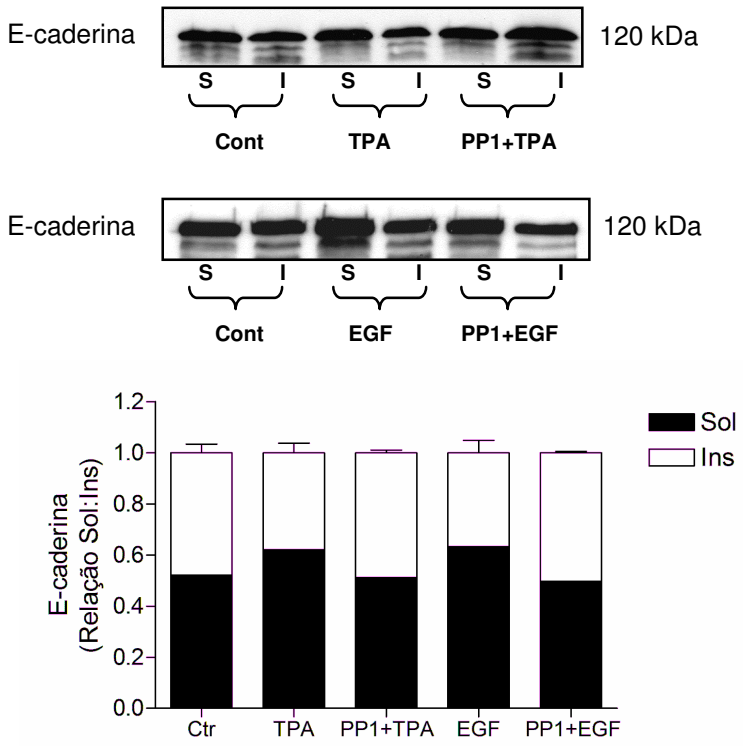


Figura 15: Análise da distribuição subcelular da E-caderina. Monocamadas de células Caco-2 foram crescidas e tratadas ou não com TPA ou EGF por 24 h. Quando indicado, as células foram pré-incubadas com PP1 (inibidor da proteína Src) por 1 h antes dos tratamentos. Frações solúveis (S) e insolúveis (I) em Triton X-100 foram obtidas para análise da localização subcelular da E-caderina por *imunoblotting.* Os tratamentos com TPA e EGF não alteraram significativamente a distribuição desta proteína, quando comparados com as células não tratadas (Cont). As colunas do gráfico representam a média da análise densitométrica de três experimentos independentes, com os respectivos desvios padrão. Os valores densitométricos da relação Sol:Ins são arbitrários, calculados usando a seguinte equação: relação Sol:Ins = quantidade de proteína na fração analisada / soma da quantidade de proteína nas duas frações. A barra representa o desvio padrão. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Sol: solúvel, Ins: insolúvel.

Tendo em vista a alteração na distribuição da E-caderina, sob o tratamento com TPA e EGF observado por imunofluorescência, foi realizada uma análise por *imunoblotting* para verificar se os níveis da expressão da E-caderina haviam sido alterados por estes tratamentos. Como pode ser observado na figura 16, os tratamentos com TPA e EGF, e mesmo o pré-tratamento com PP1, não alteraram significativamente os níveis protéicos da E-caderina, indicando que os tratamentos com TPA e EGF causam somente redistribuição da E-caderina. Juntos, esses resultados indicam que a proteína Src está envolvida na redistribuição da E-caderina provocada por TPA e EGF, corroborando os resultados da análise ultraestrutural e imunofluorescência.

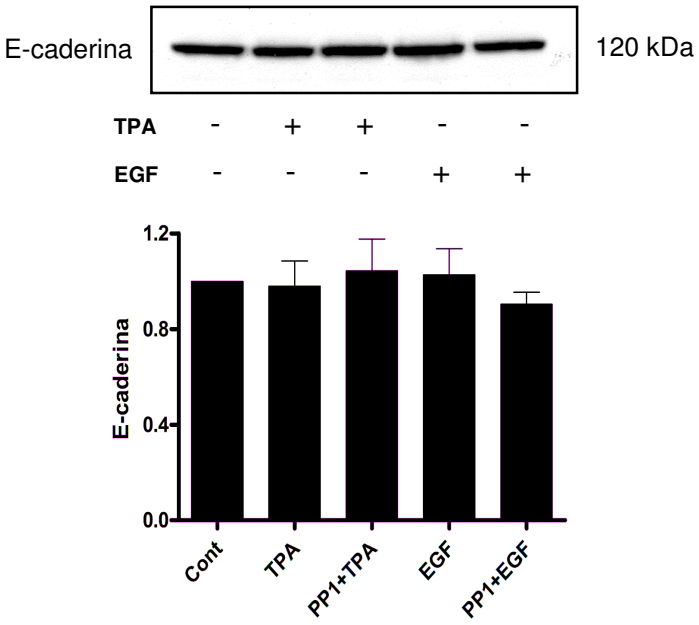


Figura 16: O Nível protéico da E-caderina não é modificado pelos tratamentos com TPA e EGF. Monocamadas de células Caco-2 foram tratadas ou não com TPA ou EGF por 24 h. Quando indicado, as células foram pré-incubadas com PP1 (inibidor da proteína Src) por 1 h antes dos tratamentos. Lisados totais foram obtidos e analisados por *imunoblotting* para determinar a expressão da E-caderina. A análise densitométrica mostra que tanto TPA quanto EGF não alteram os níveis de expressão da E-caderina. As colunas do gráfico representam a média de três experimentos independentes com os respectivos desvios padrão. Os valores foram calculados usando a seguinte equação: quantidade de proteína no tratamento analisado / quantidade de proteína nas células não tratadas. Os valores para células não tratadas (Cont) foram normalizados a 1. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Dunnett.

4.1.3 Src é ativada em resposta tardia ao tratamento com TPA

O aumento da atividade da proteína Src tem sido relacionado com a desestabilização da adesão célula-célula, atuando de maneira crucial na desestabilização do complexo E-caderina/catenina (Coluccia *et al*, 2006). Considerando os dados obtidos anteriormente, onde foi visto o envolvimento da Src na modulação do sinal desencadeado por TPA que provoca a perda da adesão célula-célula mediada pela E-caderina, foi realizada uma análise por *imunoblotting* para verificar a atividade da Src sob o tratamento mencionado. A figura 17 mostra que o TPA aparentemente não alterou a atividade da Src em etapas iniciais do tratamento (até 2 h), sendo observado um aumento da atividade dessa proteína somente após 6 h de tratamento. Dessa forma, este resultado indica que a Src estaria sendo ativada em resposta tardia ao tratamento com TPA, para induzir perda de adesão célula-célula mediada pela E-caderina e justifica os resultados anteriormente observados.

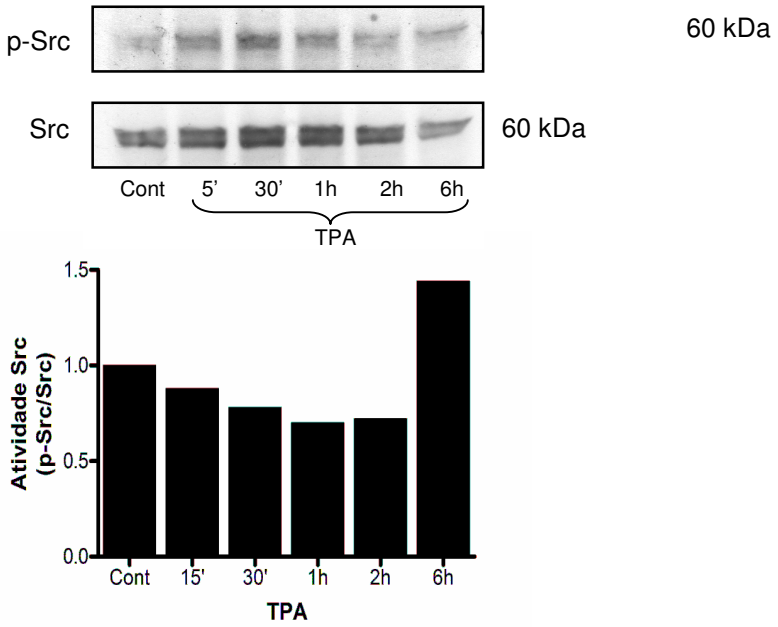


Figura 17: Tratamento com TPA aumenta a atividade de Src. Monocamadas de células Caco-2 foram tratadas ou não com TPA nos tempos indicados. Lisados totais foram obtidos e analisados para determinar a atividade (p-Src) e expressão (Src) da proteína Src por *imunoblotting*. Observe que após 6 h de tratamento com TPA há um aumento da atividade da Src, efeito não observado durante os períodos iniciais (5 min – 2 h). As colunas do gráfico representam os valores densitométricos da atividade da proteína Src, de um único experimento, sendo calculada de acordo com a seguinte equação: Atividade Src = quantidade de proteína fosforilada (p-Src) / quantidade de proteína total (Src) . Os valores para células não tratadas (Cont) foram normalizados a 1.

4.1.4 ERK1/2 é ativada em etapas iniciais do tratamento com TPA e EGF

A ativação da proteína ERK1/2 está bastante relacionada ao câncer colo-retal, podendo atuar na regulação de diversas respostas celulares, inclusive na desorganização das junções aderentes (Medici *et al*, 2006; Fang & Richardson, 2005). Dessa forma, verificamos também o envolvimento dessa proteína na perda de adesão célula-célula causada pelos tratamentos com TPA e EGF. A figura 18 mostra um aumento na atividade da proteína ERK1/2 durante os períodos iniciais de tratamento com TPA ou EGF, alcançando um nível máximo em aproximadamente 2 h de tratamento. A atividade dessa proteína diminui após 6 h de tratamento com ambos indutores tumorais. Esses resultados indicam que a proteína ERK1/2 está envolvida na transdução de sinal induzida por TPA e EGF, durante os períodos iniciais de tratamento, e pode contribuir também na desorganização das junções aderentes nestas etapas.

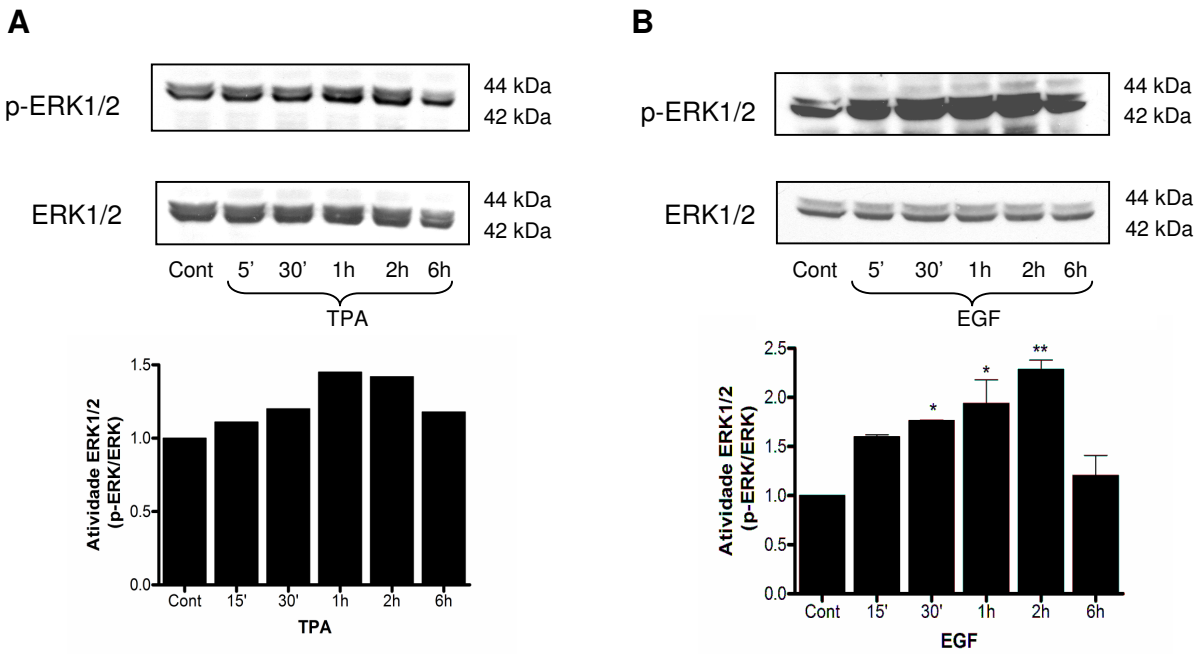
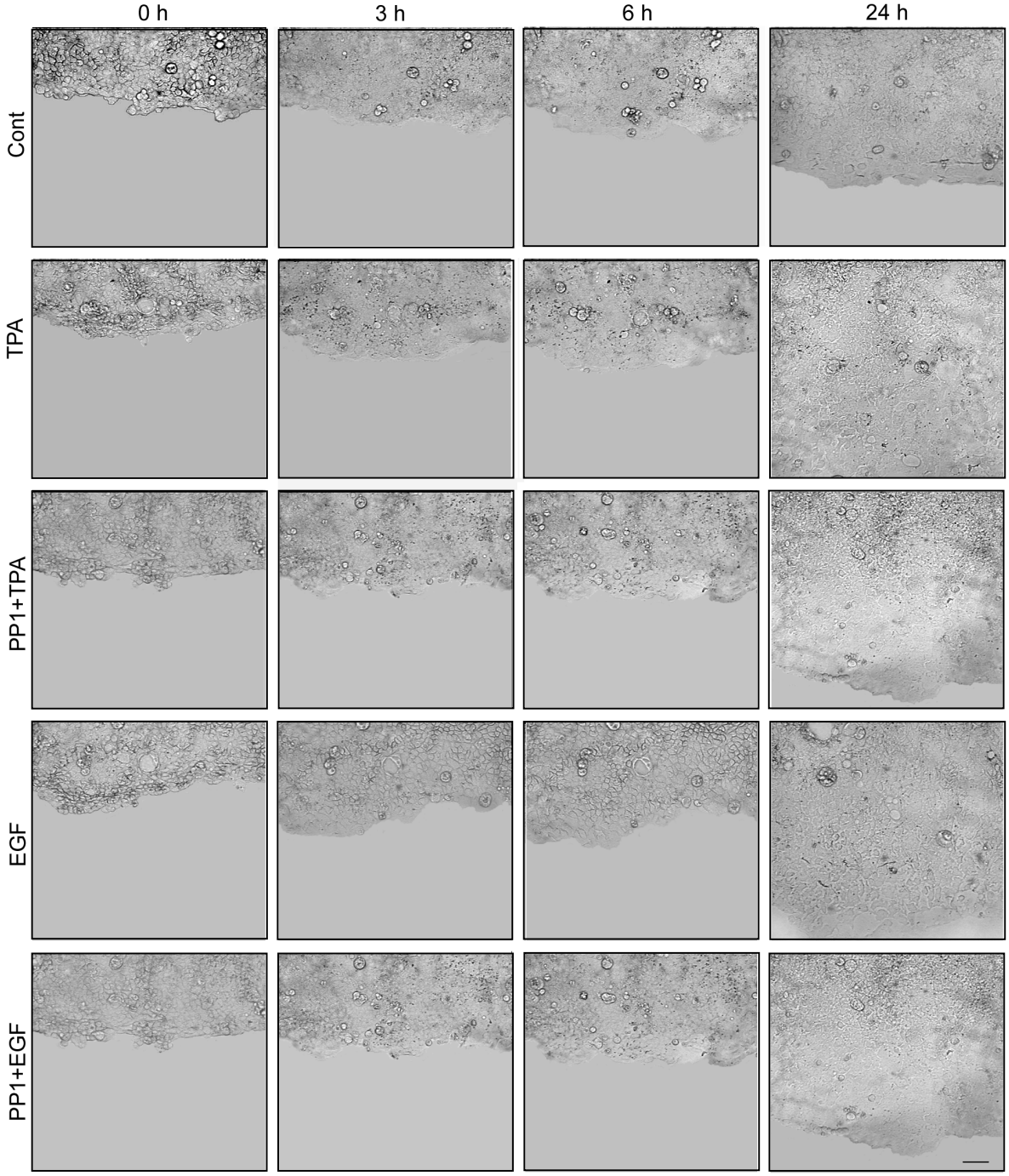


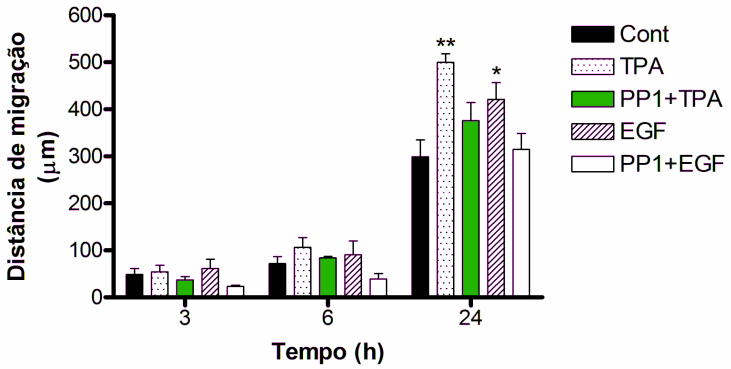
Figura 18: O tratamento com TPA aumenta a atividade da proteína ERK1/2. Monocamadas de células Caco-2 foram tratadas ou não com TPA (A) ou EGF (B) nos tempos indicados. Lisados totais foram obtidos após os tratamentos e analisados para determinar a atividade (p-ERK1/2) da proteína ERK1/2 por *imunoblotting*. Note o aumento da atividade da proteína ERK1/2 durante os períodos iniciais de ambos tratamentos (5 min – 2 h), alcançando uma atividade máxima em aproximadamente 2 h. As colunas do gráfico A representam os valores densitométricos da atividade da proteína ERK1/2 de um único experimento, e as do gráfico B representam a média da análise densitométrica de dois experimentos independentes. Os valores densitométricos da atividade ERK1/2 foram calculados usando a seguinte equação: Atividade ERK1/2 = quantidade de proteína fosforilada (p-ERK1/2) / quantidade de proteína total (ERK1/2). Os valores para células não tratadas (Cont) foram normalizados a 1. *, $p<0,05$; **, $p<0,01$. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Dunnett.

4.1.5 TPA e EGF induzem aumento da motilidade celular e este evento é modulado pela Src

A migração celular desempenha um papel crucial no desencadeamento do processo invasivo e metastático em carcinomas. Após as observações mostrando o envolvimento da Src na cascata de sinalização que resulta na desorganização das junções aderentes provocada por TPA e EGF, verificamos se estes tratamentos também causam aumento da motilidade das células Caco-2 e se Src está envolvida neste evento. A análise do ensaio de migração celular foi feita usando a técnica de *wound healing,* e mostra que no tempo de 24 h ficou evidenciado que as células tratadas com TPA ou EGF apresentaram um aumento significativo da motilidade, quando comparadas com células não tratadas, e o pré-tratamento com o inibidor da proteína Src (PP1) preveniu esses efeitos (Fig. 19).

Figura 19: Envolvimento da Src no aumento da motilidade celular induzida por TPA e EGF. Monocamadas de células Caco-2 foram submetidas à técnica de *wound healing*, e após os tratamentos com TPA e EGF nos tempos indicados, a migração celular foi acompanhada pela distância percorrida pelas células em cada tratamento, como indicado na seção de material e métodos. Quando indicado, as células foram pré-incubadas com PP1 (inibidor da proteína Src) por 1 h antes dos tratamentos. Observe que ambos tratamentos, com TPA ou EGF, provocaram um aumento significativo na motilidade celular (24 h), quando comparado com as células não tratadas (Cont), e o pré-tratamento com PP1 preveniu estes efeitos. Barra = 100 µm. As colunas do gráfico representam a média da distância de migração de três experimentos independentes. *, $p<0,05$; **, $p<0,001$. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Bonferroni.


0 h
3 h
6 h
24 h
Cont
TPA
PP1+TPA
EGF
PP1+EGF


Distância de migração (µm)
600
500
400
300
200
100
0
**
*
3
6
24
Tempo (h)
Cont
TPA
PP1+TPA
EGF
PP1+EGF

Para confirmar que os efeitos observados foram realmente devido a um aumento da migração e não a um aumento da proliferação celular, foi realizado um ensaio de proliferação usando a técnica do cristal violeta. Como mostrado na figura 20, não houve diferença significativa na proliferação celular no tempo de 24 h, quando comparadas células tratadas com TPA ou EGF e células não tratadas, confirmando que o efeito observado anteriormente era decorrente de um aumento na motilidade das células submetidas ao tratamento. Juntos, esses resultados indicam que a Src está envolvida no aumento da migração celular induzida por TPA e EGF, em nosso modelo de estudo.

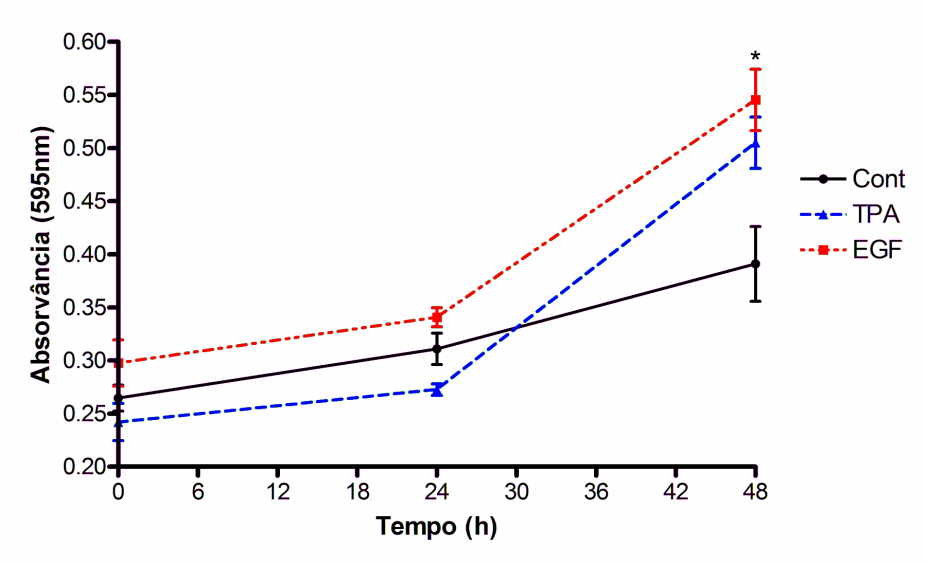


Figura 20: Ensaio de proliferação celular. Células Caco-2 foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas ou não com TPA ou EGF nos tempos indicados. Posteriormente, a proliferação celular foi quantificada usando a técnica do cristal violeta, como descrito em material e métodos. Note que ambos os tratamentos não causaram diferenças significativas sobre a proliferação quando comparados com as células não tratadas (Cont) até 24 h, somente sendo notado um aumento significativo da proliferação celular após 48 h de tratamento com EGF. O gráfico representa a média da quantificação colorimétrica de três experimentos independentes. *, $p<0,05$. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Dunnett.

PARTE II

4.2 Envolvimento da Na^+/K^+-ATPase na perda da adesão célula-célula mediada pela E-caderina

4.2.1 Tratamento com Ouabaína causa alterações morfológicas no complexo juncional apical de células Caco-2

Inicialmente, para determinar se o tratamento com a ouabaína causaria alguma alteração morfológica no complexo juncional apical de células Caco-2, monocamadas foram tratadas com este agente nas concentrações de 10 e 100 μM, por 8 h, e a estrutura do complexo juncional foi analisada a nível ultraestrutural usando microscopia eletrônica de transmissão. Como observado na figura 21, células não tratadas mostraram um complexo juncional bem definido, apresentando junções *tight* e aderentes características de um tecido epitelial (Fig. 21A). Já as células tratadas com ouabaína nas duas concentrações (Fig. 21B e 21C) mostraram amplos espaços intercelulares na região da junção aderente e abaixo dela, sendo este efeito mais evidente na concentração de 100 μM. De forma interessante, nota-se que não houve aparente desorganização na região das junções *tight* após os tratamentos. Este resultado mostra que a ouabaína provoca desestabilização no complexo juncional apical, principalmente na região da junção aderente.

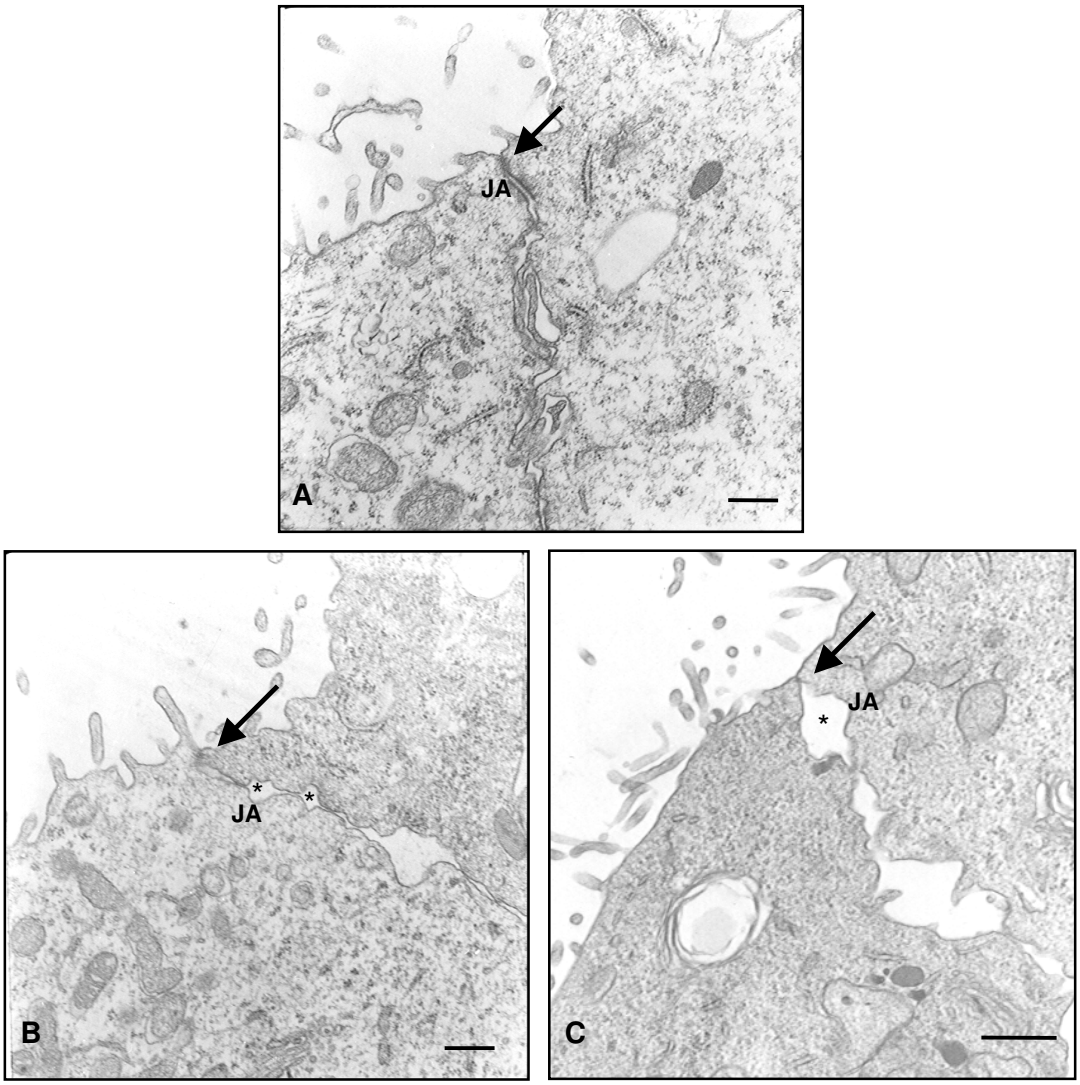


Figura 21: Ouabaína causa desorganização do complexo juncional apical de células Caco-2. Monocamadas de células foram cultivadas em membranas microporosas (Transwell), não tratadas (A) ou tratadas com 10 µM (B) ou 100 µM (C) de ouabaína por 8 h e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Note que as células tratadas com ouabaína apresentam amplos espaços na região da junção aderente (JA), indicada com asteriscos, e este efeito foi maior em células tratadas com 100 µM. No entanto, a região das junções *tight* (seta) aparentemente permanece inalterada. Barra = 1 µm.

4.2.2 Tratamento com Ouabaína causa redistribuição da E-caderina

Estudos utilizando outra linhagem celular, MDCK (derivada de epitélio de rim canino), têm mostrado que a Na^+/K^+-ATPase desempenha um papel importante no estabelecimento do complexo juncional apical quando associada a E-caderina, a principal proteína constituinte da junção aderente (Vagin *et al*, 2007; Rajasekaran *et al*, 2005). Considerando os resultados obtidos pela microscopia

eletrônica de transmissão, foi avaliado o papel da ouabaína na localização da E-caderina por ensaios de imunofluorescência. A figura 22A mostra o perfil de marcação da E-caderina em células não tratadas, podendo-se observar que a proteína está presente nos contatos célula-célula. Por outro lado, quando as células foram tratadas com concentrações de 10 e 100 μM de ouabaína, por 6 e 8 horas, observou-se um arredondamento celular e uma marcação da E-caderina difusa, predominantemente citoplasmática (Fig. 22B - 22E). O mesmo efeito não foi observado em baixa concentração (100 nM) de ouabaína (Fig. 22F). Para confirmar que os efeitos observados na junção aderente ocorreram realmente devido ao tratamento com a ouabaína e não como resultado de um desbalanço iônico, células Caco-2 incubadas em meio contendo alta concentração de cloreto de sódio (250 mM), foram também processadas para imunofluorescência. A figura 22G mostra que este tratamento aparentemente não alterou a distribuição da E-caderina. Esses resultados sugerem que a ouabaína pode atuar numa cascata de sinalização que desencadeia a desorganização da adesão célula-célula mediada pela E-caderina e corrobora os resultados observados na análise por microscopia eletrônica de transmissão, que mostram amplos espaços na região destas junções.

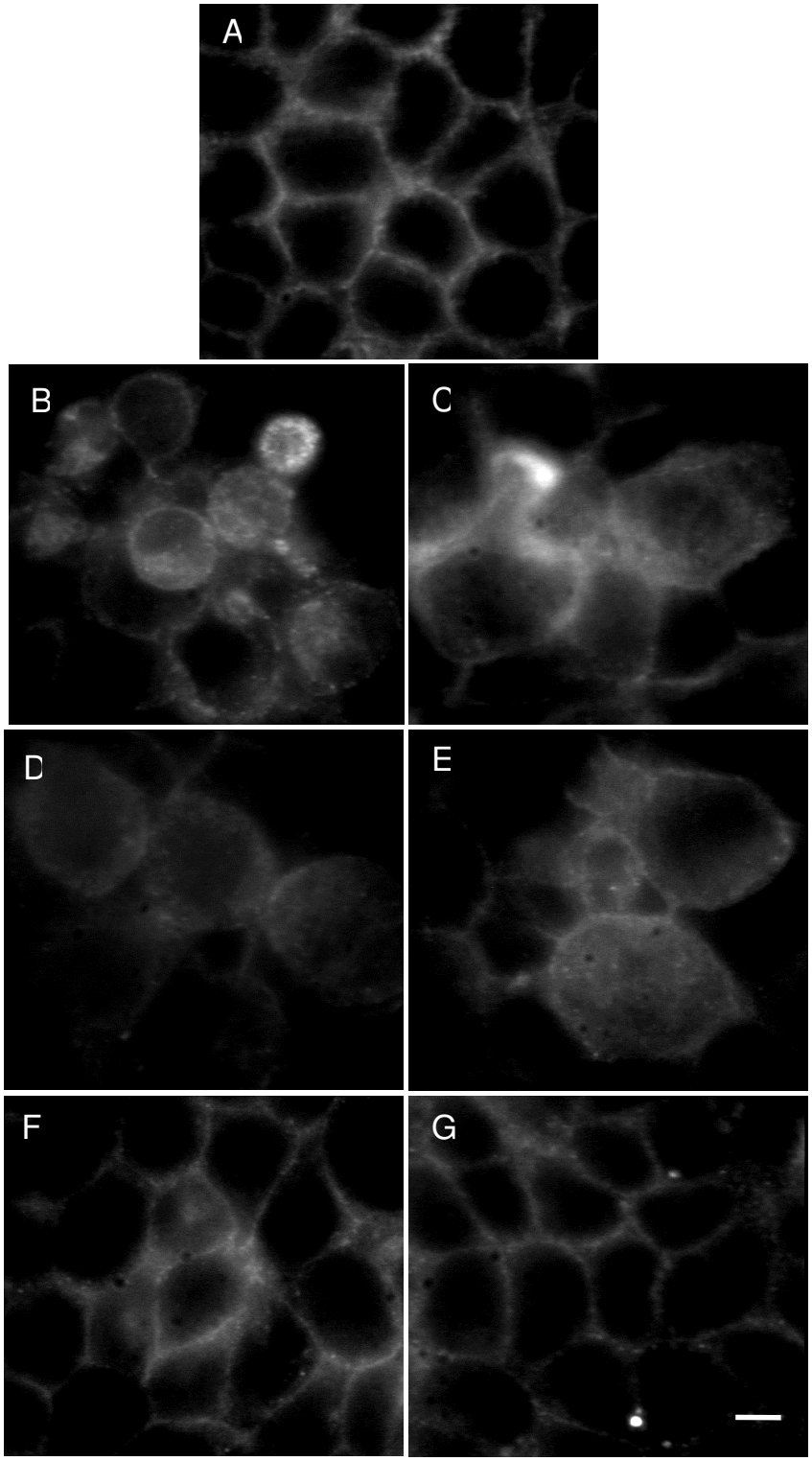
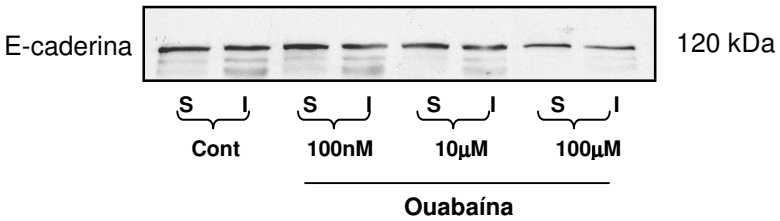


Figura 22: Tratamento com ouabaína induz a redistribuição da E-caderina. Monocamadas de células Caco-2 foram crescidas sobre lamínulas e não tratadas (A) ou tratadas com ouabaína nas concentrações de 10 µM por 6 h (B) ou 8 h (C), 100 µM por 6 h (D) ou 8 h (E) e com 100 nM por 6 h (F) ou com 250 mM de cloreto de sódio (G) por 1,5 h. Posteriormente, as células foram processadas para imunofluorescência usando o anticorpo anti-E-caderina. Observe a redistribuição da E-caderina sob os tratamentos com concentração de 10 µM, e 100 µM de ouabaína. Estes efeitos não foram observados em baixa concentração de ouabaína (100 nM), e sob o tratamento com cloreto de sódio. Barra = 10 µm.

Tendo em vista os resultados anteriores mostrando que a ouabaína induziu redistribuição da E-caderina foi realizado também uma análise por imunoblotting utilizando frações solúveis e insolúveis em Triton X-100 (Fig. 23). Nas células não tratadas foi possível observar que a E-caderina foi distribuída aparentemente em níveis iguais na fração insolúvel (correspondente ao citoesqueleto) e na fração solúvel (correspondente à fração protéica citoplasmática) em Triton X-100. Os tratamentos com diferentes concentrações de ouabaína não causaram alterações significativas na distribuição da E-caderina, em relação aos níveis protéicos encontrados nas células não tratadas.



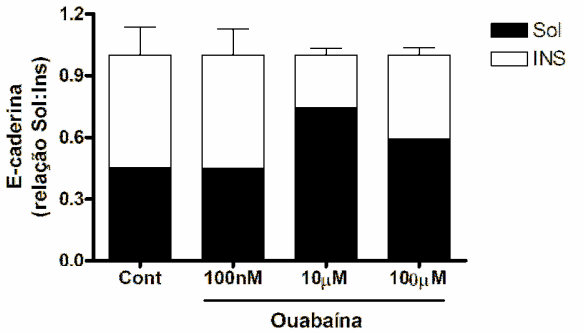


Figura 23: Análise da distribuição subcelular da E-caderina após tratamento com ouabaína. Monocamadas de células Caco-2 foram tratadas ou não com 100 nM, 10 μM ou 100 μM de ouabaína por 6h. Frações solúveis (S) e insolúveis (I) em Triton X-100 foram obtidas para análise da localização subcelular da E-caderina por *imunoblotting.* Os tratamentos com ouabaína não alteraram significativamente a distribuição desta proteína, quando comparados com as células não tratadas (Cont). As colunas do gráfico representam valores arbitrários da média da análise densitométrica de três experimentos independentes. Os valores densitométricos da relação Sol:Ins foram calculados usando a seguinte equação: relação Sol:Ins = quantidade de proteína na fração analisada / soma da quantidade de proteína nas duas frações. A barra representa o desvio padrão. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Sol: solúvel, Ins: insolúvel.

4.2.3 O tratamento com Ouabaína reduz os níveis protéicos da subunidade β1 da Na^+/K^+-ATPase

Sabendo-se que a subunidade β1 da Na^+/K^+-ATPase desempenha um papel importante na interação entre a Na^+/K^+-ATPase e a E-caderina para conferir estabilidade às junções aderentes (Vagin *et al*, 2007; Rajasekaran *et al*, 2005), foi realizada uma análise por *imunoblotting* para verificar se os níveis da subunidade β1 seriam alterados pelo tratamento com a ouabaína. Na figura 24 observa-se que os níveis protéicos da subunidade β1 diminuíram significativamente após 6 e 8 h de tratamento com 10 μM de ouabaína. Já o tratamento com 100 μM causou diminuição desta subunidade em tempos menores, 5 e 15 min, e após 6 e 8 h. Este mesmo resultado foi observado após o tratamento com 100 nM de ouabaína por 15 min. Esses resultados indicam que o tratamento com ouabaína causa uma redução nos níveis da subunidade β1 da Na^+/K^+-ATPase, de forma concomitante com a desestabilização da adesão célula-célula mediada pela E-caderina.

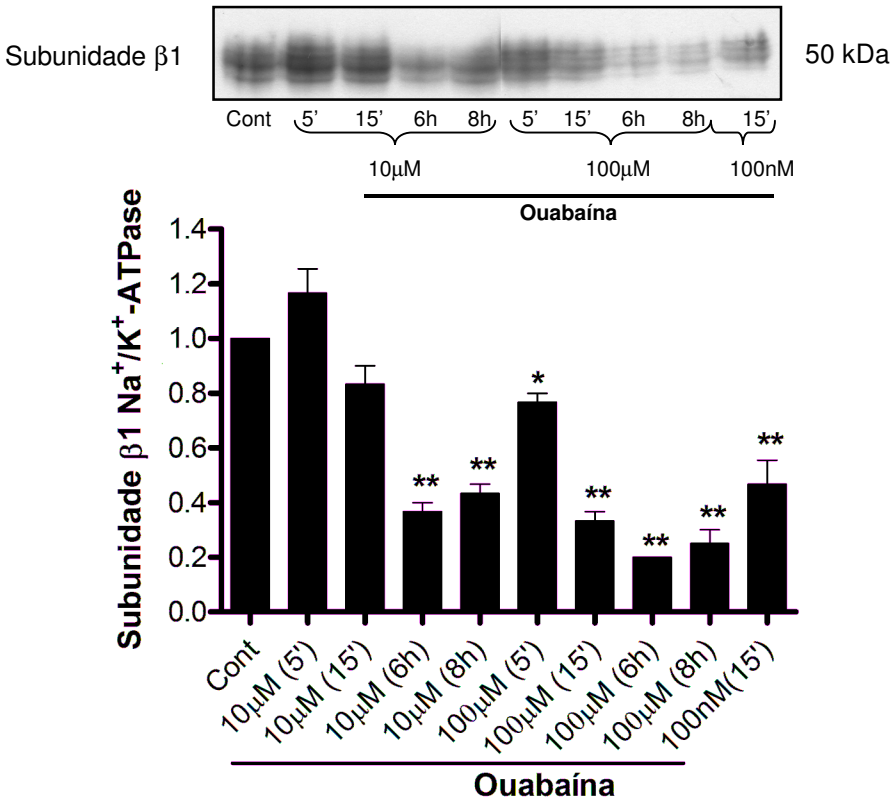


Figura 24: Ouabaína reduz os níveis protéicos da subunidade β1 da Na^+/K^+-ATPase. Monocamadas de células Caco-2 foram tratadas ou não com 100 nM, 10 μM ou 100 μM de ouabaína nos tempos indicados. Lisados totais foram obtidos após os tratamentos e analisados para determinar a expressão da subunidade β1 da Na^+/K^+-ATPase por *imunoblotting*. Note que os tratamentos com 10 μM (6h e 8h), 100 μM ou 100 nM de ouabaína causaram uma redução significativa nos níveis da subunidade β1, quando comparadas com as células não tratadas (Cont), sendo observada uma maior redução após 6h de tratamento com 10 μM e 100 μM de ouabaína. As colunas do gráfico representam a média da análise densitométrica de três experimentos independentes. Os valores foram calculados usando a seguinte equação: quantidade de proteína no tratamento analisado / quantidade de proteína nas células não tratadas. Os valores para células controle foram normalizados a 1. *, $p<0,05$; **, $p<0,01$. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Dunnett.

Considerando esses resultados, fizemos um teste de ligação da ^{3}H-ouabaína em células Caco-2 após o tratamento com ouabaína fria, para verificar a especificidade de ligação desse glicosídio e sua atuação na expressão da Na^+/K^+-ATPase presente na superfície celular. Como observado na figura 25, a ligação da ^{3}H-ouabaína foi diminuída após o pré-tratamento com 100 μM de ouabaína fria (6 e 8 h), sendo notada uma inibição de aproximadamente 61% da ligação da ouabaína radiomarcada. O mesmo efeito foi observado após o pré-tratamento com 10 μM de ouabaína fria, sendo possível notar uma inibição da radiomarcação de cerca de 36%. Torna-se importante observar que esses experimentos foram realizados com excesso molar de ^{3}H-ouabaína em relação ao glicosídio não marcado, indicando que

os níveis da Na^+/K^+-ATPase presente na superfície celular parecem reduzir após o tratamento com ouabaína, corroborando os efeitos observados anteriormente sobre a subunidade β1.

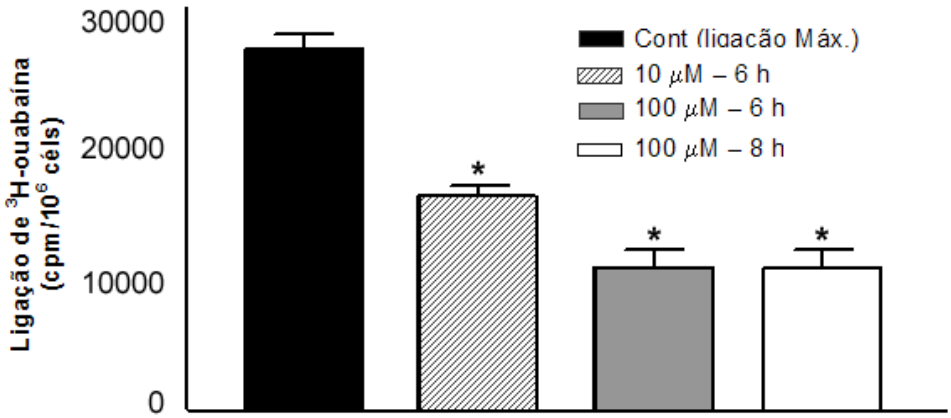


Figura 25: **Tratamento com ouabaína reduz a expressão da Na^+/K^+-ATPase presente na superfície celular.** Monocamadas de células Caco-2 foram pré-tratadas ou não com 10 μM ou 100 μM de ouabaína fria nos tempos indicados. Posteriormente, as células foram incubadas com 500 μM de ^{3}H-ouabaína (650000 cpms) por 1h. Após centrifugação, a detecção da radiomarcação foi realizada por cintilação líquida utilizando o sobrenadante celular. Note que o pré-tratamento com 10 μM ou 100 μM de ouabaína reduziu significantemente a ligação da ^{3}H-ouabaína, quando comparada com células que não sofreram o pré-tratamento (Cont). As colunas do gráfico representam a média de três experimentos independentes. Os valores da ligação de ^{3}H-ouabaína foram calculados usando a seguinte equação: ligação de ^{3}H-ouabaína = ^{3}H-ouabaína total - ^{3}H-ouabaína obtida do sobrenadante após centrifugação. *, $p<0,01$. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Dunnett.

4.2.4 ERK1/2 parece modular os efeitos da ouabaína sobre a desorganização da adesão intercelular mediada pela E-caderina

Prévios estudos relataram que a ligação da ouabaína na Na^+/K^+-ATPase induz a ativação da cascata de sinalização Ras/MAPK (Rajasekaran *et al*, 2005). Por outro lado, recentemente foi mostrado que a redução da expressão da subunidade β1 desta ATPase está correlacionada com o aumento da ativação da proteína ERK1/2, em células MDCK (Inge *et al*, 2008). Tendo em vista essas considerações, foi avaliado o efeito do tratamento com a ouabaína sobre a atividade da proteína ERK1/2 em nosso modelo de estudo. A figura 26 mostra que o tratamento com 10 μM de ouabaína resultou num aumento significativo de atividade da proteína ERK1/2, após 6 e 8 h de tratamento. Este mesmo efeito foi observado

após 6 h de tratamento com 100 μM de ouabaína. Estes resultados sugerem que a diminuição dos níveis protéicos da subunidade β1 da Na^+/K^+-ATPase, após 6h de tratamento com 10 μM e 100 μM de ouabaína observado por imunoblotting (Fig. 24), pode ser mediada pela proteína ERK1/2 em células Caco-2. O tratamento com 100 nM de ouabaína não causou nenhum efeito significativo sobre a proteína ERK1/2 (Fig. 26).

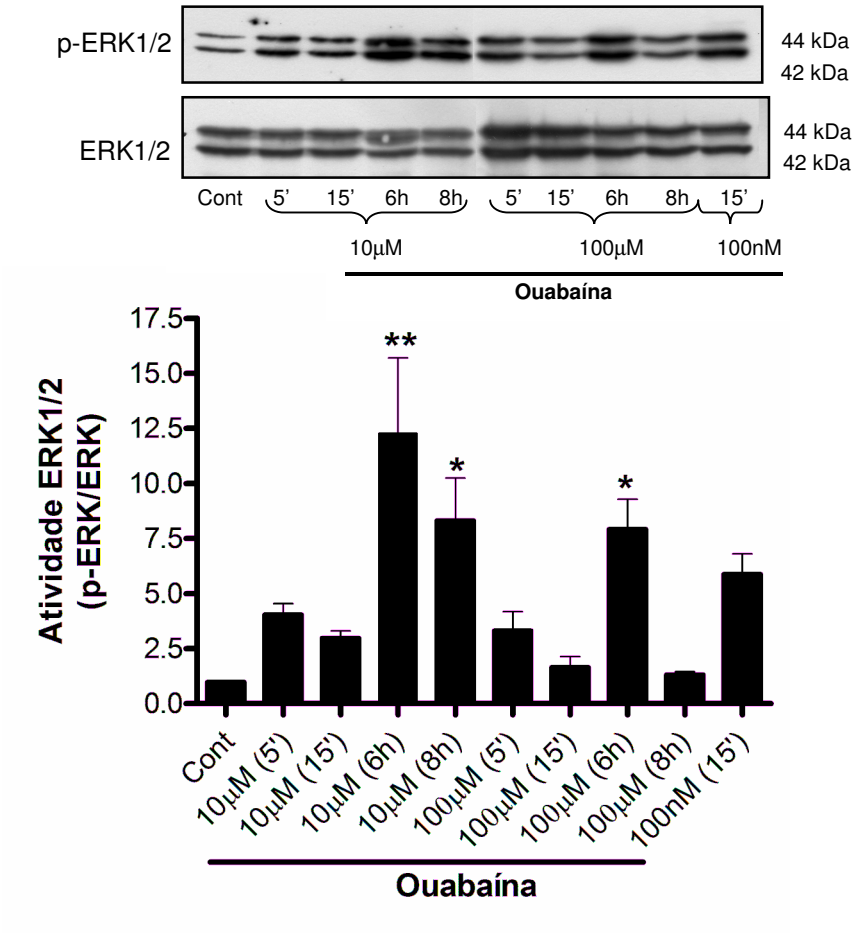


Figura 26: Ouabaína induz a ativação de ERK1/2. Monocamadas de células Caco-2 foram tratadas ou não com 100 nM, 10 μM ou 100 μM de ouabaína nos tempos indicados. Lisados totais foram obtidos após os tratamentos e analisados para determinar a atividade (p-ERK1/2) das proteínas ERK1/2 por *imunoblotting*. Observe que os tratamentos com 10 μM (6 e 8 h) e 100 μM (6 h) de ouabaína causaram um aumento significativo da atividade das ERK1/2, quando comparadas com as células não tratadas (Cont). As colunas do gráfico representam a média da análise densitométrica de três experimentos independentes. Os valores densitométricos da atividade ERK1/2 foram calculados usando a seguinte equação: atividade ERK1/2 = quantidade de proteína fosforilada (p-ERK1/2) / quantidade de proteína total (ERK1/2). Os valores para células não tratadas (Cont) foram normalizados a 1. *, $p<0,05$; **, $p<0,01$. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Dunnett.

4.2.5 Ouabaína induz uma aparente redistribuição da β- mas não da α-catenina

Tendo em vista que o tratamento com ouabaína causou desorganização na adesão célula-célula mediada pela E-caderina, foi realizada uma análise por *imunoblotting* da distribuição das proteínas β- e α-catenina, após o tratamento com esse glicosídio. Verificamos um maior nível protéico de β-catenina na fração associada ao citoesqueleto (insolúvel em Triton X-100) que na fração citoplasmática (solúvel em Triton X-100) nas células não tratadas. Já em células tratadas com 10 μM de ouabaína, foi observado um aumento nos níveis citoplasmáticos (Fig. 27A). Observamos também que a α-catenina apresentava praticamente os mesmos níveis protéicos quando comparadas as frações solúveis e insolúveis em Triton X-100 (Fig. 27B). O tratamento com ouabaína não causou alteração nos níveis desta proteína em ambas frações. Juntos, esses dados indicam que a ouabaína pode induzir a desorganização das junções aderentes através da redistribuição da E-caderina, como mostrado anteriormente, em paralelo à redistribuição da β-catenina.

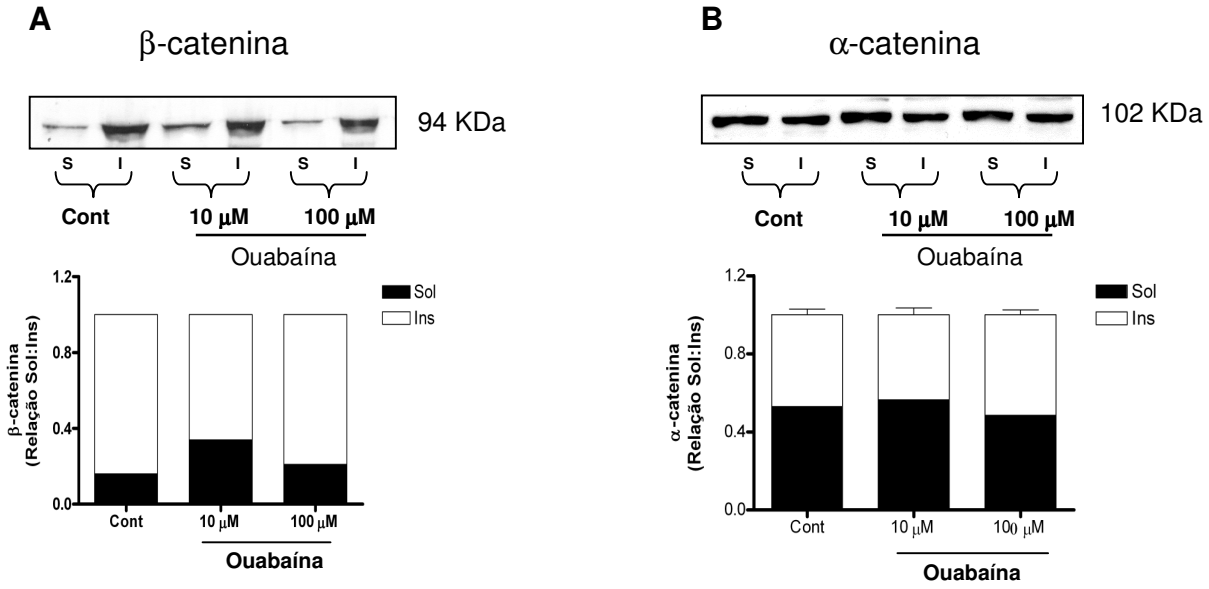


Figura 27: Tratamento com ouabaína altera distribuição da β- mas não da α-catenina. Monocamadas de células Caco-2 foram tratadas ou não com 10 μM ou 100 μM de ouabaína por 6h. Frações solúveis (S) e insolúveis (I) em Triton X-100 foram obtidas para análise da localização subcelular das proteínas β- e α-catenina por *imunoblotting.* Observe que o tratamento com 10 μM de ouabaína causou um aumento substancial dos níveis protéicos da β-catenina (A) na fração citoplasmática (S). Nenhum efeito evidente foi notado na α-catenina (B). Em A, as colunas do gráfico representam os valores densitométricos de um único experimento e, em B, as colunas do gráfico representam a média da análise densitométrica de dois experimentos independentes. Os valores foram calculados usando a seguinte equação: quantidade de proteína no tratamento analisado / quantidade de proteína nas células não tratadas. Os valores para células não tratadas (Cont) foram normalizados a 1. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

5 DISCUSSÃO

As junções aderentes, componentes importantes do complexo juncional apical (CJA), atuam de uma forma crucial na formação e manutenção da adesão intercelular, participando ainda do estabelecimento da polaridade ápico-basolateral e de importantes vias de sinalização celular (Niessen & Gottardi, 2008). A perda da adesão célula-célula mediada pela E-caderina, principal proteína das junções aderentes, vem sendo relacionada à aquisição de um fenótipo maligno e ao aumento do potencial metastático durante a progressão do carcinoma. A desestabilização da adesão intercelular pode favorecer o desenvolvimento do tumor, facilitando o acesso de nutrientes e fatores de crescimento a seus receptores, e consequentemente induzir o aumento da proliferação e do potencial migratório e invasivo das células. Atualmente, todos esses eventos são característicos de um processo patológico conhecido como transição epitélio-mesenquimal (TEM), um programa morfogenético que pode dirigir a progressão tumoral em carcinomas colo-retais (Wells *et al*, 2008; Perrais *et al*, 2007). Uma série de estudos vêm mostrando que essas características estão relacionadas com o aumento do potencial metastático, no entanto os mecanismos moleculares que medeiam estes eventos no câncer colo-retal ainda não estão definidos. Nesse sentido, avaliar o papel das proteínas Src, ERK1/2 e da Na^+/K^+-ATPase na desorganização da adesão célula-célula mediada pela E-caderina é importante para um melhor entendimento da progressão tumoral neste tipo de câncer.

5.1 Vias de sinalização envolvidas com a desorganização das junções aderentes e aumento do potencial migratório causado por TPA e EGF

Nesse estudo, utilizando tratamento de células Caco-2 com TPA e EGF, e pré-tratamento com um inibidor específico de Src, o PP1, verificamos que: a) Src participa da modulação do processo da desorganização da adesão célula-célula mediada pela E-caderina, como mostrado por MET e imunofluorescência, b) Os níveis protéicos da E-caderina não são alterados, c) a perda de adesão célula-célula pode ser regulada de maneira diferencial pelas proteínas ERK1/2 e Src: ERK1/2

modulando esse processo nos períodos iniciais e a proteína Src atuando em resposta tardia ao tratamento com TPA, como observado por *imunoblotting*, e d) Src pode regular o aumento do potencial migratório induzido por TPA e EGF, como visualizado pela técnica de *wound healing*.

As análises por MET e imunofluorescência (Fig. 13 e 14, respectivamente) mostraram que os tratamentos com TPA e EGF causavam desagregação dos contatos intercelulares, como evidenciado pela presença de aberturas do CJA na região das junções aderentes e redistribuição da proteína E-caderina nos contatos célula-célula. Interessantemente, uma aparente internalização para o citoplasma foi observada sob o tratamento com EGF. Todas essas alterações foram prevenidas quando as células foram pré-tratadas com PP1, um inibidor específico da proteína Src. Juntos, estes resultados sugerem o envolvimento desta proteína na regulação da organização das junções aderentes, e particularmente na redistribuição da E-caderina. Porém, não foi possível evidenciar alterações na distribuição da E-caderina, através da extração diferencial em Triton X-100 (Fig. 15). Estudos têm mostrado que a internalização dessa proteína pode acontecer através de vesículas endocíticas (Ivanov *et al*, 2004), o que pode explicar o resultado mostrando que o tratamento com TPA e EGF não alterou seu nível protéico na fração solúvel (proteínas citoplasmáticas) em Triton X-100. A técnica de extração diferencial, que utiliza uma concentração de 0,5% de Triton X-100 por 20 min, não possibilita a solubilização de proteínas presentes em membranas intracelulares. Dessa forma, não seria possível detectar a E-caderina internalizada em vesículas endocíticas. Alguns estudos têm relatado ainda que a endocitose da E-caderina pode ser regulada tanto pela proteína Src como pela PKC, em células MDCK (Fujita *et al*, 2002; Le *et al*, 2002).

Também observamos que a perda da adesão célula-célula provocada pelo tratamento com TPA pode ser modulada de maneira diferencial pelas proteínas ERK1/2 e Src. Enquanto ERK1/2 atua nos períodos iniciais de tratamento (Fig. 18), a Src regula esse processo em resposta tardia ao tratamento (Fig. 17). Existem poucos dados na literatura mostrando o envolvimento da proteína Src na desagregação da adesão célula-célula mediada pela E-caderina. Em trabalho publicado por Coluccia e colaboradores (2006) foi relatado que a utilização do inibidor de Src, o SKI-606, causava um aumento dos níveis protéicos da β-catenina na membrana, resultando na estabilização da E-caderina nos sítios de contato

célula-célula, em câncer colo-retal. Além disso, tem sido descrito o papel de Src na indução da ubiquitinização da E-caderina e β-catenina, dirigindo a endocitose dessas proteínas, em células MDCK (Fujita *et al*, 2002). Recentemente, Shen e colaboradores (2008) relataram que a ubiquitinização da E-caderina induzia sua degradação por lisossomas e que esse evento era regulado pela via de sinalização EGFR/Src, em células de câncer de mama. Os resultados aqui apresentados corroboram o envolvimento da proteína Src na organização das junções aderentes e mostram que ela regula a perda da adesão célula-célula mediada pela E-caderina, em nosso modelo de estudo.

Em relação à proteína ERK1/2, alguns estudos têm mostrado sua participação na desorganização das junções aderentes. Foi relatado que a ativação da proteína ERK1/2 está bastante relacionada ao câncer colo-retal, podendo atuar na regulação de diversas respostas celulares, inclusive na desorganização das junções aderentes (Medici *et al*, 2006; Fang & Richardson, 2005). Recentemente, Li & Mattingly (2008) relataram que a via de sinalização Ras-MAPK pode regular a redistribuição da E-caderina da superfície celular para o interior da célula, em câncer de mama. No presente trabalho mostramos um aumento na atividade da proteína ERK1/2, durante os períodos iniciais de tratamento com TPA ou EGF (2 h), e essa ativação diminui após 6 h (Fig. 18), indicando que esta proteína está envolvida na transdução de sinal induzida por TPA e EGF, durante os períodos iniciais de tratamento, e pode contribuir na desorganização das junções aderentes. Não foi observada diminuição dos níveis protéicos da E-caderina, após os tratamentos com TPA e EGF (Fig.16). No entanto, a alteração na redistribuição desta proteína foi suficiente para causar desestabilização das junções aderentes, em um evento que seria modulado por ERK1/2.

Ésteres de forbol, como o TPA, têm sido descritos por atuar tanto na ativação de PKC quanto de EGFR, e induzir perda da adesão célula-célula mediada pela E-caderina, em células de adenocarcinoma de cólon humano, Caco-2 (Barbosa *et al*, 2003). Ainda, outros estudos têm mostrado que a Src pode ser ativada pelo tratamento com o éster de forbol 12-miristato-13-acetato-forbol (PMA), indicando a participação da via PKC/Src em eventos associados ao processo tumorigênico. Estes eventos incluíam desorganização das junções aderentes, acentuada degradação de componentes da matriz extracelular, formação de podossomas e aumento da motilidade celular (Kang *et al*, 2008; Nomura *et al*, 2007; Tatin *et al*,

2006). Foi mostrado também que a ativação de EGFR também pode atuar na desestabilização da junção aderente em células epiteliais, levando a diminuição da afinidade entre a E-caderina e β-catenina (Nelson, 2008). Além disso, estudos têm relatado a participação de EGFR na ativação da proteína Src, evento que pode desencadear o aumento da proliferação e invasão em células de glioblastoma e de câncer de ovário (Paugh *et al*, 2008; e Aponte *et al*, 2008; respectivamente). Trabalhos recentes de nosso Grupo vêm mostrando os intrincados mecanismos de sinalização celular que regulam a perda da adesão célula-célula em câncer de cólon. Tanaka e colaboradores (2008), relataram o envolvimento de uma via de sinalização que medeia a perda da adesão célula-célula em células tratadas com PGE_2. Esta via envolvia a participação de receptores EP1 e EP2 e a proteína PKC como moduladores da proteína de junção *tight*, claudina-1. Em outro estudo (Leve *et al*, 2008), foi mostrado que a perda da organização do complexo juncional apical, em paralelo à desorganização do citoesqueleto de actina, era mediado por uma via de sinalização que envolve a proteína PKA e GTPases da família Rho (Rho e Rac). Os resultados do presente estudo mostram o envolvimento do EGFR na regulação da adesão célula-célula mediada pela E-caderina, e contribui na compreensão dos intricados mecanismos moleculares que regulam a perda de adesão célula-célula, em câncer colo-retal.

No presente trabalho, através do ensaio de migração celular, constatamos que o tratamento com TPA e EGF induziu também o aumento da motilidade celular, e que este evento era mediado pela proteína Src (Fig. 19). Alguns estudos têm associado a ativação da proteína Src, através da cascata de sinalização desencadeada por PKC, com a regulação da migração e da invasividade, em células de glioblastomas (Nomura *et al*, 2007) e de câncer de cólon (Kang *et al*, 2008). Além disso, Lee e colaboradores (2005) relataram ainda que o tratamento com EGF induzia o aumento da proliferação e da migração celular, em queratinócitos.

Em conjunto, nossos resultados indicam que, em células Caco-2, a desestabilização da adesão intercelular mediada pela E-caderina, através do tratamento com TPA e EGF anteriormente relatado por Barbosa e colaboradores (2003), envolve a proteína Src e ERK1/2, além de PKC e EGFR. Além disso, sugerem que este efeito é modulado inicialmente pela proteína ERK1/2 e

posteriormente pela Src. Este mecanismo pode induzir alterações na dinâmica do citoesqueleto de actina, contribuindo assim com o aumento da motilidade celular.

Já é bem conhecido que a perda da adesão célula-célula e o aumento da migração celular são eventos fundamentais que ocorrem durante a TEM. A indução desses eventos permite a célula cancerígena se destacar de seu tecido de origem, e potencialmente migrar, aumentando sua malignidade (Guarino *et al*, 2007). Nossos resultados mostraram uma cascata de sinalização envolvendo as proteínas PKC, EGFR, Src e ERK1/2 na perda da adesão célula-célula mediada pela E-caderina e o aumento da motilidade, no entanto mais estudos são necessários para demonstrar que os eventos aqui relatados podem contribuir no desenvolvimento da TEM, em câncer colo-retal.

5.2 Envolvimento da Na^+/K^+-ATPase na perda da adesão célula-célula mediada pela E-caderina

Neste estudo, também mostramos a participação da subunidade β1 da Na^+/K^+-ATPase na manutenção da adesão célula-célula mediada pela E-caderina, em Células Caco-2, através do tratamento com o inibidor específico da Na^+/K^+-ATPase, ouabaína. Nossos resultados mostraram que o tratamento com a ouabaína causou: a) desorganização das junções aderentes e redistribuição da E-caderina, como observado por MET e imunofluorescência, b) redução dos níveis protéicos da subunidade β1 da Na^+/K^+-ATPase, como visualizado por imunoblotting, c) diminuição da expressão da Na^+/K^+-ATPase, presente na superfície celular, como observado pelo ensaio de ligação da ^{3}H-ouabaína a células Caco-2, d) aumento da atividade da proteína ERK1/2, como visualizado por *imunoblotting*, e e) redistribuição da β- mas não da α-catenina, como evidenciado por *imunoblotting*, após extração diferencial com Triton X-100.

A presença da Na^+/K^+-ATPase nos sítios de adesão célula-célula tem sido correlacionada com o aumento da estabilidade das junções aderentes (Vagin *et al*, 2007). No presente estudo, usando ouabaína como inibidor desta ATPase, evidenciamos que a desagregação dos contatos intercelulares na região da junção aderente (Fig. 21 e 22) pode envolver as subunidades da Na^+/K^+-ATPase. De forma similar ao tratamento com TPA e EGF, também não foi possível evidenciar

alterações significativas na redistribuição da E-caderina, usando frações solúveis e insolúveis em Triton X-100 (Fig. 23). Como discutido anteriormente, é provável que a internalização da E-caderina possa acontecer através de um mecanismo de endocitose, onde o detergente não consegue solubilizar a proteína.

É conhecido que a subunidade β atua no recrutamento da subunidade α da Na^+/K^+-ATPase para a membrana plasmática, desempenhando ainda um papel importante como reguladora da atividade da subunidade α, a qual atua como subunidade catalítica (Lefranc & Kiss, 2008; Espineda *et al*, 2004). No presente estudo, observamos que o tratamento com ouabaína reduziu os níveis protéicos da subunidade β1 da Na^+/K^+-ATPase (Fig. 24), de forma concomitante com a desorganização dos contatos célula-célula mediado pela E-caderina. Estes resultados foram confirmados por ensaios de ligação da ^{3}H-ouabaína, mostrando uma redução dos níveis protéicos da Na^+/K^+-ATPase presente na superfície de célula Caco-2 (Fig. 25). Alguns estudos têm mostrado que a interação da Na^+/K^+-ATPase com a E-caderina é feita através da subunidade β1, no entanto esses achados foram feitos em células MDCK (Vagin *et al*, 2007-2008; Rajasekaran *et al*, 2005). Em modelos de adenocarcinoma de cólon humano não existem dados a este respeito, e os resultados aqui apresentados mostram pela primeira vez que a subunidade β1 pode estar participando da estabilidade das junções aderentes, através da sua ligação com a E-caderina.

A ligação de glicosídios na Na^+/K^+-ATPase tem sido associada à formação de uma estrutura conhecida como “sinalossoma”. A formação desta estrutura acontece quando os glicosídios induzem o direcionamento da Na^+/K^+-ATPase para cavéolas, onde ela pode interagir com diversas outras proteínas, atuando na ativação de várias vias de sinalização intracelular (Lefranc & Kiss, 2008; Mijatovic *et al*, 2007). Em nosso trabalho, observamos que os tratamentos com 10 e 100 μM de ouabaína resultaram num aumento da atividade da proteína ERK1/2 (Fig. 26), correlacionando com a diminuição dos níveis protéicos da subunidade β1 da Na^+/K^+-ATPase. Esses dados estão de acordo com aqueles recentemente relatados por Inge e colaboradores (2008), onde foi encontrado uma correlação inversa entre a atividade da proteína ERK1/2 e os níveis da subunidade β1 da Na^+/K^+-ATPase, em células MDCK. Além disso, em nosso estudo confirmamos que o efeito da ouabaína sobre as junções aderentes foi devido a um disparo de uma cascata de sinalização,

e não a um desbalanço iônico, posto que o tratamento com alta concentração de cloreto de sódio não alterou a distribuição da E-caderina, como visto em ensaios de imunofluorescência (Fig. 22).

Por análise de *imunoblotting*, observamos que o tratamento com ouabaína causou um aumento da β-catenina no citoplasma, como evidenciado pelo aumento dos níveis protéicos desta proteína nas frações solúveis em Triton-X 100 (Fig. 27). No entanto, não foi observado nenhum efeito aparente na distribuição da α-catenina. Contreras e colaboradores (2004), relataram também que o tratamento com ouabaína em células MDCK desencadeava um aumento de marcação nuclear da β-catenina. Este evento foi associado a uma ativação da via de sinalização Wnt, a qual também é caracterizada pela estabilização citoplasmática da β-catenina. Nossos resultados mostrando o aumento da atividade da ERK1/2, causado pelo tratamento com a ouabaína, assim como o aumento da β-catenina no citoplasma, podem sugerir uma inibição da proteína GSK-3β, uma quinase importante da via canônica Wnt, amplamente conhecida por regular os níveis desta proteína em câncer colo-retal, além de regular negativamente a via MAPK (Wang *et al*, 2006). Juntos, esses resultados sugerem que a inibição da subunidade α da Na^+/K^+-ATPase (inibida pelo tratamento com a ouabaína) pode induzir a desorganização da adesão célula-célula mediada pela E-caderina, de forma concomitante à redução dos níveis protéicos da subunidade β1, através de uma cascata de sinalização celular envolvendo a ativação da proteína ERK1/2.

Dados recentes têm mostrado que a formação do "sinalossoma" está associada à transativação da via EGFR/Ras/MAPK através da proteína Src, sendo a subunidade α1 da Na^+/K^+-ATPase responsável pelo disparo desse sinal (Lefranc & Kiss, 2008). Por outro lado, a via de sinalização ERK1/2 pode atuar na desregulação das junções aderentes, através do deslocamento da E-caderina da membrana para o citoplasma, ou ainda através da diminuição da sua expressão, sendo esse último efeito regulado pelo aumento da expressão de Snail e Slug, conhecidos repressores transcricionais da E-caderina (Li & Mattingly, 2008; Christiansen & Rajasekaran, 2006). Ainda, tem sido relatada a atuação de Snail na repressão transcricional da subunidade β1 da Na^+/K^+-ATPase de maneira concomitante à redução da expressão de E-caderina, levando a indução da TEM, em carcinomas (Espineda *et al*, 2004). Nesse contexto, é possível sugerir que a inibição da subunidade α pode levar à

redução da expressão da subunidade β1 da Na^+/K^+-ATPase e causar desorganização da adesão célula-célula mediada pela E-caderina, através da via ERK1/2. No entanto, mais experimentos são necessárias para confirmar se este mecanismo de sinalização pode induzir o programa de TEM, em carcinomas colo-retais.

5.3 Considerações finais

Em nosso estudo, mostramos que TPA e EGF induzem a desorganização da adesão célula-célula mediada pela E-caderina, evento modulado pelas vias de sinalização das proteínas ERK1/2 e Src, sendo esta última responsável também por dirigir o aumento da motilidade celular. Apesar de não avaliar o envolvimento direto de PKC e EGFR, sugerimos que TPA esteja ativando ambas proteínas, como mostrado por Barbosa e colaboradores (2003). Subsequente ao tratamento com TPA, a ativação dessas proteínas poderia desencadear uma cascata de sinalização que culminaria na ativação das proteínas ERK1/2 e Src para mediar os eventos de desorganização da adesão célula-célula mediada pela E-caderina, concomitantemente ao aumento da motilidade celular. Tendo em vistas estas observações, podemos sugerir que estes mecanismos podem contribuir com o aumento da malignidade celular do câncer colo-retal, devido ao fato desses eventos serem característicos do programa de TEM.

Observamos também que a inibição da subunidade α da Na^+/K^+-ATPase, pelo tratamento com a ouabaína, induziu a desorganização da adesão célula-célula mediada pela E-caderina e diminuição da expressão da subunidade β1 da Na^+/K^+-ATPase. Observamos ainda que a ocorrência desses eventos envolveu a ativação da proteína ERK1/2. Considerando que a desorganização da adesão célula-célula mediada pela E-caderina é uma das características evidenciadas durante a TEM, podemos especular que os eventos observados no presente estudo também poderiam contribuir para a progressão do câncer colo-retal.

Finalmente, como ambos os tratamentos, TPA e a ouabaína, resultaram na desorganização das junções aderentes, é possível sugerir que a proteína Src desempenha um papel crucial no controle da organização da adesão célula-célula mediada pela E-caderina. TPA ativaria tanto PKC quanto EGFR, que

por sua vez atuariam na ativação de Src e ERK1/2 (Fig. 28). Por outro lado, Src poderia ser também ativada pela subunidade α da Na^+/K^+-ATPase, contida no "sinalossoma". Esses eventos teriam como resposta final a desorganização da adesão célula-célula mediada pela E-caderina e a diminuição dos níveis protéicos da subunidade β1 da Na^+/K^+-ATPase, que levariam a um aumento subsequente da motilidade celular. Contudo, experimentos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese.

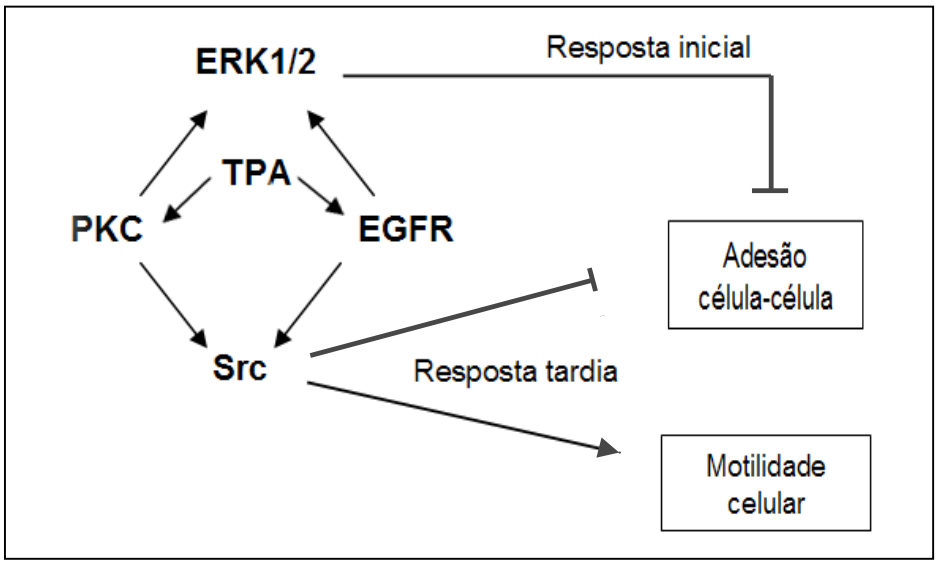


Figura 28: Modelo proposto para a regulação da desorganização da adesão célula-célula mediada pela E-caderina e aumento da motilidade celular em células Caco-2. TPA ativaria tanto PKC quanto EGFR (Barbosa *et al*, 2003) e, subsequentemente, induziria de maneira diferencial ERK1/2 e Src. Num estágio inicial, a ativação de ERK1/2 causaria desorganização da adesão célula-célula mediada pela E-caderina, e em resposta tardia ativaria Src, para contribuir com este evento e ainda induzir aumento da motilidade celular.

6 CONCLUSÕES

6.1 Parte I

- Src está envolvida na desorganização da junção aderente causada por TPA e EGF;

- Src e ERK1/2 podem regular de maneira diferencial a desorganização da junção aderente provocada por TPA e EGF, com ERK1/2 atuando nos períodos iniciais e Src em resposta tardia aos tratamentos;

- TPA e EGF induzem aumento da motilidade celular, evento modulado pela Src.

6.2 Parte II

- Ouabaína causa alterações morfológicas no complexo juncional apical e redistribuição da E-caderina, em células Caco-2;

- Ouabaína reduz os níveis protéicos da subunidade β1 da Na^+/K^+-ATPase;

- ERK1/2 parece mediar os efeitos da ouabaína sobre a desorganização das junções intercelulares, mediada pela E-caderina;

- Ouabaína induz um aparente acúmulo citoplasmático da β- mas não da α-catenina.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, K. & Takeichi, M. (2008). EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. Proc Natl Acad Sci USA. 105(1): 13-19.

Amit, I., Wides, R., Yarden, Y. (2007). Evolvable signaling networks of receptor tyrosine kinases: relevance of robustness to malignancy and to cancer therapy. Mol Syst Biol. 3: 151.

Aponte, M., Jiang, W., Lakkis, M., et al. (2008). Activation of platelet-activating factor receptor and pleiotropic effects on tyrosine phospho-EGFR/Src/FAK/paxillin in ovarian cancer. Cancer Res. 68(14): 5839-48.

Assémat, E., Bazellières, E., Pallesi-Pocachard, E., *et al*. (2008). Polarity complex proteins. Biochim Biphys Acta. 1778: 614-30.

Barbosa, L.A., Goto-Silva, L., Redondo, P.A., *et al*. (2003). TPA-induced signal transduction: a link between PKC and EGFR signaling modulates the assembly of intercellular junctions in Caco-2 cells. Cell Tissue Res. 312: 319-31.

Barker, N. & Clevers, H. (2006). Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. Nat Rev Drug Discov. 5(12):997-1014.

Barrios-Rodiles, M., Brown, K.R., *et al*. (2005). High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. Science. 307(5715): 1621-5.

Baum, B., Settleman, J., Quinlan, M.P. (2008). Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. Semin Cell Dev Biol. 19(3):294-308.

Berx, G., Raspé, E., Christofori, G., *et al*. (2007). Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. Clin Exp Metastasis. 24: 587-97.

Braga, V.M. (2002). Cell-cell adhesion and signaling. Curr Opin Cell Biol. 14(5): 546-56.

Bremm, A., Walch, A., Fuchs, M., *et al*. (2008). Enhanced activation of epidermal growth factor receptor caused by tumor-derived E-cadherin mutations. Cancer Res. 68(3): 707-14.

Casasco, A., Casasco, M., Cornaglia, A.I., Riva, F., Calligaro, A. (2007). Models of epithelial histogenesis. Eur J Hist. 51(sup1): 93-9.

Cereijido, M., Contreras, R.G., Shoshani, L., Florez-Benitez, D., Larre, I. (2008). Tight junction and polarity interaction in the transporting epithelial phenotype. Biochim Biphys Acta. 1778: 770-93.

Chen, J. (2008). Is Src the key to understanding metastasis and developing new treatments for colon cancer? Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 5(6):306-7.

Chiba, H., Osanai, M., Murata, M., Kojima, T., Sawada, N. (2008). Transmembrane proteins of tight junctions. Biochim Biphys Acta. 1778: 588-600.

Christiansen, J.J. & Rajasekaran, A.K. (2006). Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. Cancer Res. 66(17): 8319-26.

Coluccia, A.M.L., Benati, D., Dekhil, H., *et al*. (2006). SKI-606 decreases growth and motility of colorectal cancer cells by preventing pp60(c-Src)–dependent tyrosine phosphorylation of β-catenin and its nuclear signaling. Cancer Res. 66(4): 2279-86.

Contreras, R.G., Flores-Maldonado, C., Lazaro, A., *et al*. (2004). Ouabain Binding to Na^+,K^+-ATPase Relaxes Cell Attachment and Sends a Specific Signal (NACos) to the Nucleus. J Membrane Biol. 198: 147-58.

D'Souza, T., Agarwal, R., Morin, P.J. (2005). Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. J Bio Chem. 280: 26233-40.

Espineda, C.E., Chang, J.H., Twiss, J., *et al*. (2004). Repression of Na,K-ATPase β1-subunit by the transcription factor snail in carcinoma. Mol Biol Cell. 15: 1364-73.

Fang, J.Y. & Richardson, B. (2005). The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. Lancet Oncol. 6: 322-27.

Fearnhead, N.S., Briton, M.P., Bodmer, W.F. (2001). The ABC of APC. Hum Mol Genet. 10(7): 721-33.

Feldman, G.J., Mullin, J.M., Ryan, M.P. (2005). Occludin: Structure, function and regulation. Adv Drug Deliv Rev. 57: 883-917.

Fodde, R., Smits, R., Clevers, H. (2001). *APC*, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. Nat Rev Cancer. 1(1): 55-67.

Fuchs, S.Y., Ougolkov, A.V., Spiegelman, V.S., Minamoto, T. (2005). Oncogenic β-catenin signaling networks in colorectal cancer. Cell Cycle. 4(11): 1522-39.

Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., *et al*. (2002). Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. Nat Cell Biol. 4(3): 222-31.

Gloushankova, N.A. (2008). Changes in regulation of cell-cell adhesion during tumor transformation. Biochemistry. 73(7): 742-50.

González-Mariscal, L., Tapia, R., Chamorro, D. (2008). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. Biochim Biphys Acta. 1778: 729-56.

Gopalakrishnan, S., Hallett, M.A., Atkinson, S.J., Marrs, J.A. (2007). aPKC-PAR complex dysfunction and tight junction disassembly in renal epithelial cells during ATP depletion. Am J Physiol. 292: C1094–102.

Guarino, M., Rubino, B., Ballabio, G. (2007). The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. Pathology. 39(3): 305-18.

Guo, X., Ma, N., Wang, J., *et al*. (2008). Increased p38-MAPK is responsible for chemotherapy resistance in human gastric cancer cells. BMC Cancer. 8(1): 375 (*In Press*)

Hartsock, A. & Nelson, W.J. (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. Biochim Biphys Acta. 1778: 660- 69.

Hornberg, J.J., Bruggeman, F.J., Westerhoff, H. V., Lankelma, J. (2006). Cancer: A Systems Biology disease. BioSystem. 83: 81-90.

Houlston, R.S. & Tomlinson, I.P. (2001). Polymorphisms and colorectal tumor risk. Gastroenterology. 121(2): 282-301.

Huerta, M., Muñoz, R., Tapia, R., *et al*. (2007). Cyclin D1 is transcriptionally down-regulated by ZO-2 via an E Box and the transcription factor c-Myc. Mol Biol Cell. 18: 4826-36.

Ii, M., Yamamoto, H., Adachi, Y., *et al*. (2006). Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. Exp Biol Med. 231(1): 20-27.

Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., *et al*. (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. J Cell Biol. 171(6): 939-45.

Ikenouchi, J., Sasaki, H., Tsukita, S., *et al*. (2008). Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. Mol Biol Cell. 19(11): 4687-93.

Inge, L.J., Rajasekaran, S.A., Wolle, D., *et al*. (2008). α-Catenin overrides Src-dependent activation of β-catenin oncogenic signaling. Mol Cancer Ther. 7(6): 1386-97.

Ingley, E. (2008). Src family kinases: Regulation of their activities, levels and identification of new pathways. Biochim Biphys Acta. 1784: 56-65.

Instituto Nacional de Câncer & Ministério da Saúde. (2007). Estimativas 2008: incidência de câncer no Brasil. INCa-RJ.

Ivanov, A.I., Nusrat, A., Parkos, C.A. (2004). Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. Mol Biol Cell. 15(1): 176-88.

Jeanes, A., Gottardi, C.J., Yap, A.S. (2008). Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? Oncogene. 27: 6920-29.

Johnson, G.L. & Nakamura, K. (2007). The c-Jun Kinase/Stress-activated Pathway: Regulation, Function and Role in Human Disease. Biochim Biophys Acta. 1773(8): 1341–48.

Kang, D.W., Park, M.H., Lee, Y.J., *et al*. (2008). Phorbol ester up-regulates phospholipase D1 but not phospholipase D2 expression through a PKC/Ras/ERK/NFκB-dependent pathway and enhances matrix metalloproteinase-9 secretion in colon cancer cells. J Biol Chem. 283(7): 4094-104.

Kim, M.J., Byun, J.Y., Yun, C.H., *et al*. (2008). c-Src-p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Is Required for Akt Activation in Response to Ionizing Radiation. Mol Cancer Res. 6(12): 1872-80.

Kitisin, K. & Mishra, L. (2006). Molecular biology of colorectal cancer: new targets. Semin Oncol. 33: S14-23.

Kwak, J.M., Min, B.W., Lee, J.H., et al. (2007). The prognostic significance of E-cadherin and liver intestine-cadherin expression in colorectal cancer. Dis Colon Rectum. 50(11): 1873-80.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

Lafky, J.M., Wilken, J.A., Baron, A.T., Maihle, N.J. (2008). Clinical implications of the ErbB/epidermal growth factor (EGF) receptor family and its ligands in ovarian cancer. Biochim Biphys Acta. 1785: 232-65.

Laprise, P., Langlois, M.J., Boucher, M.J., *et al*. (2004a). Down-regulation of MEK-ERK signaling by E-cadherin-dependent PI3K/Akt pathway in differentiating intestinal epithelial cells. J Cell Physiol. 199: 32-39.

Laprise, P., Viel, A., Rivard, N. (2004b). Human homolog of disc-large is required for adherens junction assembly and differentiation of human intestinal epithelial cells. J Biol Chem. 279(11): 10157-66.

Le, T.L., Joseph, S.R., Yap, A.S., Stow, J.L. (2002). Protein kinase C regulates endocytosis and recycling of E-cadherin. Am J Physiol Cell Physiol. 283: C489–99.

Lefranc, F. & Kiss, R. (2008). The sodium pump α1 subunit as a potential target to combat apoptosis-resistant glioblastomas1. Neoplasia. 10: 198–206.

Leve, F., De Souza, W., Morgado-Díaz, J.A. (2008). A cross-link between protein kinase A and Rho-family GTPases signaling mediates cell-cell adhesion and actin cytoskeleton organization in epithelial cancer cells. J Pharmacol Exp Ther. 327(3): 777-88.

Li, Q. & Mattingly, R.R. (2008). Restoration of E-cadherin cell-cell junctions requires both expression of E-cadherin and suppression of ERK MAP Kinase activation in Ras-transformed breast epithelial cells. Neoplasia. 10: 1444-58.

Liberali, P., Rämö, P., Pelkmans, L. (2008). Protein kinases: starting a molecular systems view of endocytosis. Annu Rev Cell Dev Biol. 24: 501-23.

Liu, Y., Hong, Y., Zhao, Y., *et al*. (2008). Histone H3 (lys-9) deacetylation is associated with transcriptional silencing of E-cadherin in colorectal cancer cell lines. Cancer Invest. 26(6): 575-82.

Lyu, J., Lee, K.S., Joo, C.K. (2006). Transactivation of EGFR mediates insulin-stimulated ERK1/2 activation and enhanced cell migration in human corneal epithelial cells. Mol Vision. 12: 1403-10.

Mackay, H.J. & Twelves, C.J. (2007). Targeting the protein kinase C family: are we there yet? Nat Rev Cancer. 7(7): 554-62.

Mathew, S., George, S.P., Wang, Y., *et al*. (2008). Potential Molecular Mechanism for c-Src Kinase-mediated Regulation of Intestinal Cell Migration. J Biol Chem. 283(33): 22709-22.

Matsushima, H., Utani, A., Endo, H., *et al*. (2003). The expression of nectin-1alpha in normal human skin and various skin tumours. Br J Dermatol. 148(4): 755-62.

Medici, D., Hay, E.D., Goodenough, D.A. (2006). Cooperation between Snail and LEF-1 transcription factors is essential for TGF-β1–induced epithelial–mesenchymal transition. Mol Biol Cell. 17: 1871-79.

Michel, D., Arsanto, J.P., Massey-Harroche, D., *et al*. (2005). PATJ connects and stabilizes apical and lateral components of tight junctions in human intestinal cells. J Cell Sci. 118: 4049-57.

Michor, F., Iwasa, Y., Lengauer, C., Nowak, M.A. (2005). Dynamics of colorectal cancer. Semin Cancer Biol. 15: 484-93.

Mijatovic, T., Quaquebeke, E.V., Delest, B., *et al*. (2007). Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. Biochim Biophys Acta. 1776: 32-57.

Mitra, S.K. & Schlaepfer, D.D. (2006). Integrin-regulated FAK–Src signaling in normal and cancer cells. Curr Opin Cell Biol. 18(5):516-23.

Miyoshi, J. & Takai, Y. (2008). Structural and functional associations of apical junctions with cytoskeleton. Biochim Biphys Acta. 1778: 670-691.

Miyoshi, J. & Takai, Y. (2005). Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. Adv Drug Deliv Rev. 57: 815-855.

Murata, M., Kojima, T., Yamamoto, T., *et al*. (2005). Down-regulation of survival signaling through MAPK and Akt in occludin-deficient mouse hepatocytes in vitro. Exp Cell Res. 310: 140-51.

Natalwala, A., Spychal, R., Tselepis, C. (2008). Epithelial-mesenchymal transition mediated tumourigenesis in the gastrointestinal tract. World J Gastroenterol. 14(24): 3792-97.

Nelson, W.J. (2008). Regulation of cell–cell adhesion by the cadherin–catenin complex. Biochem Soc Trans. 36: 149-155.

Niessen, C.M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. J Invest Dermatol. 127: 2525-32.

Niessen, C.M. & Gottardi, C.J. (2008). Molecular components of the adherens junction. Biochim Biphys Acta. 1778: 562-71.

Nomura, N., Nomura, M., Sugiyama, K., Hamada, J. (2007). Src regulates phorbol 12-myristate 13-acetate-activated PKC-induced migration via Cas/Crk/Rac1 signaling pathway in glioblastoma cells. Int J Mol Med. 20(4):511-19.

Okamoto, R., Irie, K., Yamada, A., *et al*. (2005). Recruitment of E-cadherin associated with α- and β-catenins and $p120^{ctn}$ to the nectin-based cell-cell adhesion sites by the action of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in MDCK cells. Genes Cell. 10: 435-45.

Oliveira, S.S., Oliveira, I.M., Souza, W., Morgado-Díaz, J.A. (2005). Claudins upregulation in human colorectal cancer. FEBS Letters. 6179-85.

Oliveira, S.S. & Morgado-Díaz, J.A. (2007). Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. Cell Mol Life Sci. 64(1): 17-28.

Paugh, B.S., Paugh, S.W., Bryan, L., et al. (2008). EGF regulates plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) by a pathway involving c-Src, PKCdelta, and sphingosine kinase 1 in glioblastoma cells. FASEB J. 22(2): 455-65.

Pederson, P.L. (2007). Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. J Bioenerg Biomembr. 39:349–355.

Peng, Y.F., Mandai, K., Nakanishi, H., *et al*. (2002). Restoration of E-cadherin-based cell-cell adhesion by overexpression of nectin in HSC-39 cells, a human signet ring cell gastric cancer cell line. Oncogene. 21(26): 4108-19.

Perrais, M., Chen, X., Perez-Moreno, M., Gumbiner, B.M. (2007). E-Cadherin homophilic ligation inhibits cell growth and epidermal growth factor receptor signaling independently of other cell interactions. Mol Biol Cell. 18: 2013-25.

Pimienta, G. & Pascual, J. (2007). Canonical and alternative MAPK signaling. Cell cycle. 6(21): 2628-32.

Pokutta, S. & Weis, W.I. (2007). Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. Annu Rev Cell Dev Biol. 23: 237-61.

Rajasekaran, S.A., Barwe, S.P., Rajasekaran, A.K. (2005). Multiple functions of Na, K-ATPase in epithelial cells. Semin Nephrol. 25(5): 328-34.

Rajasekaran, S.A., Beyenbach, K.W., Rajasekaran, A.K. (2008). Interactions of tight junctions with membrane channels and transporters. Biochim Biophys Acta. 1778: 757-69.

Rehder, D., Iden, S., Nasdala, I., *et al*. (2006). Junctional adhesion molecule-A participates in the formation of apico-basal polarity through different domains. Exp Cell Res. 312: 3389-3403.

Rodriguez-Boulan, E., Kreitzer, G., Müsch, A. (2005). Organization of vesicular trafficking in epithelia. Mol Cel Biol. 6: 233-47.

Rowley, P.T. (2005). Inherited susceptibility to colorectal cancer. Annu Rev Med. 56:539-554.

Sabbah, M., Emami, S., Redeuilh, G., *et al*. (2008). Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers. Drug Resist Updat. 11(4-5): 123-51.

Saito, K., Enya, K., Oneyama, C., et al. (2008). Proteomic identification of ZO-1/2 as a novel scaffold for Src/Csk regulatory circuit. Biochem Biophys Res Commun. 366(4):969-75.

Salahsho, S., Naidoo, R., Serra, S., *et al*. (2007). Frequent accumulation of nuclear E-cadherin and alterations in the Wnt signaling pathway in esophageal squamous cell carcinomas. Mod Pathol. 21(3): 271-81.

Sancho, E., Batle, E., Clevers, H. (2004). Signaling pathways in intestinal development and cancer. Annu Rev Cell Dev Biol. 20:695-723.

Shen, Y., Hirsch, D.S., Sasiela, C.A., Wu, W.J. (2008). Cdc42 regulates E-cadherin ubiquitination and degradation through an epidermal growth factor receptor to Src-mediated pathway. J Biol Chem. 283(8): 5127-37.

Shin, K., Straight, S., Margolis, B. (2005). PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells. J Cell Biol. 168: 705–11.

Shindo, M., Wada, H., Kaido, M., *et al*. (2008). Dual function of Src in the maintenance of adherens junctions during tracheal epithelial morphogenesis. Development. 135: 1355-64.

Shitashige, M., Hirohashi, S., Yamada, T. (2008). Wnt signaling inside the nucleus. Cancer Sci. 99(4): 631-37.

Standaert, M.L., Bandyopadhyay, G., Perez, L., *et al*. (1999). Insulin activates protein kinases C-zeta and C-lambda by an autophosphorylation-dependent mechanism and stimulates their translocation to GLUT4 vesicles and other membrane fractions in rat adipocytes. J Biol Chem. 274: 25308–16.

Stemmler, M.P. (2008). Cadherins in development and cancer. Mol BioSyst. 4: 835-50.

Symowicz, J., Adley, B.P., Gleason, K.J., *et al*. (2007). Engagement of collagen-binding integrins promotes matrix metalloproteinase-9–dependent E-cadherin ectodomain shedding in ovarian carcinoma cells. Cancer Res. 67(5): 2030-39.

Takahashi-Yanaga, F. & Sasaguri, T. (2008). GSK-3β regulates cyclin D1 expression: A new target for chemotherapy. Cell Signal. 20: 581-89.

Tanaka, M.N., Diaz, B.L., De Souza, W., Morgado-Diaz, J.A. (2008). Prostaglandin E2-EP1 and EP2 receptor signaling promotes apical junctional complex disassembly of Caco-2 human colorectal cancer cells. BMC Cell Biol .9(1): 63 (*In Press*).

Tatin, F., Varon, C., Génot, E., Moreau, V. (2006). A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol Ester. J Cell Science. 119: 769-781.

Thiery, J.P. & Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. Nat Rev Mol Cell Biol. 7(2): 131-42.

Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. *76*, 4350-4354.

Vagin, O., Tokhtaeva, E., Yakubov, I., Shevchenko, E., Sachs, G. (2008). Inverse correlation between the extent of N-glycan branching and intercellular adhesion in epithelia: contribution of the Na,KATPase β1 subunit. J Biol Chem. 283(4): 2192-2202.

Vagin, O., Sachs, G., Tokhtaeva, E. (2007). The roles of the Na,K-ATPase beta 1 subunit in pump sorting and epithelial integrity. J Bioenerg Biomembr. 39: 367–72.

Van den Brandt, P.A. & Goldbohm, R.A. (2006). Nutrition in the prevention of gastrointestinal cancer. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 20(3):589-603.

Van Roy, F. & Berx, G. (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. Cell Mol Life Sci. 65(23): 3756-88.

Vincan, E. & Barker, N. (2008). The upstream components of the Wnt signalling pathway in the dynamic EMT and MET associated with colorectal cancer progression. Clin Exp Metastasis. 25:657–663.

Wang, Q., Zhou, W., Wang, X., Evers, B.M. (2006). Glycogen synthase kinase-3 is a negative regulator of extracellular signal-regulated kinase. Oncogene. 25(1): 43-50.

Wells, A., Yates, C., Shepad, C.R. (2008). E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas. Clin Exp Metastasis. 25: 621-28.

World Health Organization. (2008). World Health Statistics. Disponível em: <http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS08_Full.pdf>. Acesso em: 6 jan 2009.

Wu, W.S., Wu, J.R., Hu, C.T. (2008). Signal cross talks for sustained MAPK activation and cell migration: the potential role of reactive oxygen species. Cancer Metastasis Rev. 27(2): 303-14.

Yap, A.S., Crampton, M.S., Hardin, J. (2007). Making and breaking contacts: the cellular biology of cadherin regulation. Curr Opin Cell Biol. 19(5): 508-14.

Yeatman, T.J. (2004). A Renaissance for Src. Nat Rev Cancer. 4(6): 470-80.

Yoshida, K., Kanaoka, S., Takai, T., *et al*. (2005). EGF rapidly translocates tight junction proteins from the cytoplasm to the cell–cell contact via protein kinase C activation in TMK-1 gastric cancer cells. Exp Cell Res. 309(2): 397-409.