



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Natalia Fortunato de Miranda

**Influência da superexpressão da claudina-3 na radiorresposta de
células de câncer de cólon**

Rio de Janeiro

2015

Natalia Fortunato de Miranda

**Influência da superexpressão da claudina-3 na radiorresposta de células de
câncer de cólon**

Dissertação apresentada, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre, ao Programa
de Pós-Graduação em Biociências, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M672 Miranda, Natalia Fortunato de.
Influência da superexpressão da claudina-3 na radiorresposta de células de câncer de cólon/ Natalia Fortunato de Miranda.– 2015.
113 f.

Orientador: José Andrés Morgado Díaz.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Neoplasias colorretais - Radioterapia. 2. Junções íntimas. 3. Claudina-3. 4. Radiação - Teses. 5. Colon (Anatomia) - Câncer - Radioterapia - Teses. I. Díaz, José Andrés Morgado. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.34-006.6

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Natalia Fortunato de Miranda

**Influência da superexpressão da claudina-3 na radiorresposta de células de
câncer de cólon**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de abril de 2015.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz (Orientador)
Instituto Nacional de Câncer

Prof.^a Dra. Verônica Maria Morandi da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Luiz Eurico Nasciutti
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais, Ana e Ivan, e a minha irmã, Duda, por todo o incentivo, amor, e por acreditarem e apoiarem minhas escolhas e sonhos.

Aos meus avós, Regina, Waldir, Euvira, Manoela e Nilson por ajudarem profundamente na formação da pessoa que hoje eu sou.

Aos meus tios, Mara, Dudu, e primas, Taynara e Manuella, pelo apoio e carinho durante a minha vida.

De forma muito especial agradeço ao meu orientador José Morgado, por ter me dado a oportunidade de estagiar no laboratório durante iniciação científica e continuar meus estudos no mestrado. Obrigada por todo apoio durante esse período.

Ao Waldemir, pela paciência, aprendizado, aconselhamento desde a iniciação científica, por todos os momentos de descontração e pelos comentários engraçados em todas as correções.

Aos meus amigos da BioEstrutural, Lili, Julio, Wallace, Pedro, Pri, Leo, PD, Rubem, Obina, Fernanda, Andrea, Hallan, Adriana, Erika, Jessica, Jennifer, Murilo, Anne, Amélia e Pri Dantas por todo conhecimento compartilhado durante todo esse tempo, pelas discussões, pelas risadas e por serem muito mais do que colegas de trabalho.

As minhas amigas Gabi, Fabi, Aninha, Pam, Dani e Thais pelos conselhos, por ouvir todos os meus surtos de pânico durante o mestrado e por tornar todas as conversas mais engraçadas e divertidas.

Aos meus dois cachorros, Benny e Monstrino que alegam meus dias e acabam com o meu estresse sempre.

Aos familiares e amigos que, mesmo sem entender o que eu faço, sempre me incentivaram!

RESUMO

MIRANDA, Natalia Fortunato. *Influência da superexpressão da claudina-3 na radiorresposta de células de câncer de cólon*. 2015. 113f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais incidente no mundo para o sexo masculino, o segundo para o sexo feminino e a radioterapia é um dos tratamentos de primeira linha no combate a este tipo de câncer. Durante a progressão do CCR as células sofrem alterações morfogenéticas, sendo a desorganização do complexo juncional apical (CJA) um dos eventos iniciais desse processo. As junções oclusivas (JTs) são um dos principais componentes da CJA e desempenham papel importante no controle do fluxo paracelular, na determinação da polaridade celular e na transdução de sinais relacionados com a progressão tumoral. As claudinas são proteínas transmembrana, constituintes das JTs e cumprem um importante papel no controle desses eventos. Alterações na expressão das claudinas são observadas em tumores de diferentes órgãos e têm sido relacionadas com a progressão tumoral. No entanto os mecanismos que regulam essas alterações e sua consequência na progressão do CCR são poucos conhecidos. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da superexpressão da claudina-3 na radiorresposta de células CCR. Nossos resultados mostraram que a superexpressão de claudina-3 minimiza alterações morfológicas causadas pela radiação, causa diminuição da resistência elétrica transepitelial e não tem efeito na permeabilidade a macromoléculas após a irradiação. Além disso, observamos que a superexpressão de claudina-3 aumenta o potencial proliferativo das células e que esta característica torna as células mais sensíveis a radiação. Porém quando avaliamos eventos celulares relacionados a progressão tumoral observamos que apesar da radiação diminuir a capacidade migratória das progênes, as células que superexpressam claudina-3 apresentam migração mais elevada. Além disso, verificamos que a superexpressão de claudina-3 diminui a invasão e a capacidade de formação de colônias frente ao tratamento com a radiação. Em seguida fomos avaliar o efeito da inibição das vias de proliferação (MEK/ERK) e sobrevivência (PI3K-Akt) na resposta das células que superexpressam claudina-3 frente a radiação. Observamos que a inibição de MEK é capaz de sensibilizar as células que superexpressam claudina-3 à radiação no ensaio de proliferação celular, no entanto a inibição de MEK e PI3K antes da exposição à radiação é capaz de aumentar a migração e a capacidade de formação de colônias de células que superexpressam claudina-3 contribuindo para o aumento do potencial maligno. Em conjunto nossos resultados mostram que a superexpressão de claudina-3 contribui para um fenótipo mais maligno, no entanto frente ao tratamento com a radiação é capaz de sensibilizar as células.

Palavras-chave: Câncer colorretal. Junções *oclusiva*. Claudina. Radiação.

ABSTRACT

MIRANDA, Natalia Fortunato. *The effect of overexpression of claudin-3 on colon cancer cell response to radiation*. 2015. 113f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Colorectal cancer (CRC) is the third more incident cancer for males, the second for females worldwide and radiotherapy is one of the first-line treatments to fighting this type of cancer. During the progression of CRC cells undergo morphogenetic alterations and the apical junctional complex disorganization (AJC) is one of the initial events of this process. The tight junctions (TJs) is a major component of AJC and play an important role in paracellular flux control, determination of cell polarity and in signal transduction related to tumor progression. Claudins are transmembrane proteins, members of TJs and play an important role on these events. Changes on claudins expression are found in tumors of different organs and have been associated with tumor progression. However the mechanisms that regulate these changes and their consequences in the CRC progression are not completely understood. Thus, this study aimed to evaluate the influence of claudin-3 overexpression on cellular response after radiation treatment of CRC cells. Our results show that claudin-3 overexpression minimizes morphological changes caused by the radiation, decrease transepithelial electrical resistance, and has no effect on macromolecules permeability after irradiation. Moreover, we observed that claudin-3 overexpression increases the proliferation rate of cells and that this feature makes the cells more sensitive to radiation. However, when evaluating the cellular events associated tumor progression we observed that despite decrease on migratory capacity caused by radiation, cells that overexpress claudin-3 have higher migration. In addition, we found that claudin-3 overexpression decreases the invasion and the capacity to form colonies after treatment with radiation. Then we evaluate the effect of inhibition of proliferation (MEK / ERK) and survival (PI3K-Akt) pathways in cells that overexpress claudin-3 in the response to radiation. We observed that inhibition of MEK could sensitize cells overexpressing claudin-3 radiation on cell proliferation assay, but the inhibition of MEK and PI3K before radiation exposure can increase the migration and colony forming ability cells overexpressing claudin-3 contributes to the increase of malignant potential. Altogether, our results show that claudin-3 overexpression contributes to a more malignant phenotype, however, claudin-3 overexpression is able to sensitize the cells to radiation.

Keywords: Colorectal cancer. Tight junctions. Claudin. Radiation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 -	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma.....	14
Figura 1 -	Incidência e mortalidade dos tipos de câncer mais frequentes no Brasil, em ambos os sexos.....	15
Figura 2 -	Marcadores do câncer.....	18
Figura 3 -	Desenvolvimento do câncer colorretal.....	19
Figura 4 -	Vias de sinalização do EGFR.....	22
Figura 5 -	Complexo juncional apical.....	24
Figura 6 -	Junções oclusivas.....	25
Figura 7 -	Estrutura das claudina.....	28
Figura 8 -	Classificação/Estadiamento do câncer pelo sistema TNM.....	33
Tabela 2 -	Medicamentos utilizados no tratamento do CCR.....	35
Figura 9 -	Efeito do EGF na expressão de claudina 1 e 3 em células HT-29.....	52
Figura 10 -	Avaliação do método de transdução para superexpressão de claudina-3 em células HT-29.....	53
Figura 11 -	Efeito da superexpressão de claudina-3 na capacidade migratória, invasiva e de formação de colônia dependente e independente de ancoragem.....	54
Figura 12 -	Análise da expressão proteica de claudina-3 na progênie de células HT-29 derivada de parentais irradiadas.....	55
Figura 13 -	Análise da expressão proteica de claudina-3 na progênie de células HT-29 derivada de parentais irradiadas que superexpressam claudina-3.....	56
Figura 14 -	O efeito da radiação sobre a morfologia de células que superexpressam ou não claudina-3.....	58
Figura 15 -	Análise da distribuição subcelular da claudina-3.....	59
Figura 16 -	Avaliação da resistência elétrica transepitelial na progênie de células que superexpressam ou não claudina-3.....	61

Figura 17 - Análise da permeabilidade a macromoléculas após a irradiação.....	62
Figura 18 - Efeito da radiação sobre a capacidade proliferativa das progênes irradiadas que expressam ou não claudina-3.....	64
Figura 19 - Efeito da radiação na migração das progênes celulares que superexpressam ou não a claudina-3.....	65
Figura 20 - Efeito da radiação sob o potencial invasivo das progênes que superexpressam ou não claudina-3.....	67
Figura 21 - Efeito da radiação na capacidade de formação de colônias dependente de ancoragem das progênes que superexpressam ou não claudina-3..	69
Figura 22 - Efeito da radiação na capacidade de formação de colônias independente de ancoragem das progênes que superexpressam ou não claudina-3.....	71
Figura 23 - O efeito da inibição farmacológica na proliferação celular após a irradiação.....	73
Figura 24 - Efeito dos inibidores de MEK e PI3K na motilidade da progênie irradiada de células que superexpressam ou não a claudina-3.....	75
Figura 25 - Avaliação do efeito dos inibidores MEK e PI3K na capacidade de formação de colônias dependente de ancoragem das progênes irradiadas.....	76
Figura 26 - Avaliação do efeito dos inibidores de MEK e PI3K na capacidade de formação de colônias independente de ancoragem das progênes irradiadas.....	78
Figura 27 - Esquema mostrando os efeitos da superexpressão de claudina-3 em células sobreviventes à radiação e frente ao tratamento com inibidores de vias de sinalização.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5FU	5-Fluoracil
APC	do inglês, <i>Adenomatous Poliposis Coli</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
C-CPE	Porção carboxílica da enterotoxina da bactéria <i>Clostridium perfringens</i>
CCR	Câncer colorretal
CIMP	Fenótipo metilador de ilhas CpG (do inglês <i>CpG Island Methylator Phenotype</i>)
CIN	Instabilidade cromossômica (do inglês <i>Chromosomal Instability</i>)
CJA	Complexo juncional apical
CK1	Caseína quinase I (do inglês, <i>Casein Kinase I</i>)
CPE	Enterotoxina da bactéria <i>Clostridium perfringens</i>
CPE-R	Receptor da enterotoxina da bactéria <i>Clostridium perfringens</i>
EGF	Fator de crescimento epidermal (do inglês, <i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal (do inglês, <i>epidermal growth factor receptor</i>)
EMT	Transição epitélio-mesenquimal (do inglês <i>epitelial-mesenquimal transition</i>)
FAP	Polipose adenomatosa familiar (do inglês <i>Familial Adenomatous Polyposis</i>)
GSK3 β	Glicogênio sintase quinase 3 β (do inglês, <i>glycogen synthase kinase 3β</i>)
HNPCC	do inglês <i>Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer</i>
JAM	Molécula de adesão juncional
JT	Junções oclusivas
MAGUK	Guanilato quinase associada a membrana (do inglês <i>membrane-associated guanylate kinases</i>)
MDCK	do inglês, <i>Madin-Darby canine kidney</i>
MMR	Reparo de pareamento incorreto do DNA (do inglês <i>Mismatch Repair</i>),

MSI	Instabilidade de microssatélites (do inglês <i>Microsatellite Instability</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
QT	Quimioterapia
RNAi	RNA de interferência
RT	Radioterapia
TCF/LEF	do inglês, <i>T-cell Factor - lymphoid enhancer factor</i>
TER	Resistência elétrica transepitelial (do inglês <i>transepithelial electrical resistance</i>)
TNM	Tumor, Nódulo e Metástase
VEGFR	Receptor de fator de crescimento endotelial (do inglês, <i>vascular endothelial growth factor receptor</i>)
ZO	<i>Zonula occludens</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
β	Beta
μg	Micrograma
mM	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
mL	Mililitro
mg	Miligrama
L	Litro
CO_2	Gás carbônico
μm	Micrômetro
ng	Nanograma
h	Horas
Gy	Gray
^{137}Cs	Césio 137
min	Minuto
ph	Potencial hidrogeniônico
x	Multiplicação
μL	Microlitro
M	Molar
g	gravidade
V	Volts
α	Alfa
nm	Nanômetro
Ω	Ohm
cm^2	Centímetro quadrado
ABS	Absorbância

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	REVISÃO DA LITERATURA	14
1.1	Câncer colorretal: Incidência e fatores de risco	14
1.2	Progressão do câncer colorretal: aspectos celulares e moleculares	17
1.3	Junções <i>oclusivas</i>	23
1.3.1	<u>Regulação das claudinas</u>	29
1.3.2	<u>Claudinas e câncer</u>	30
1.4	Visão geral do tratamento do câncer colorretal	32
2	RELEVÂNCIA DO ESTUDO	38
3	OBJETIVO	39
3.1	Objetivo geral	39
3.2	Objetivos específicos	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	Anticorpos	40
4.2	Reagentes	40
4.3	Cultura de células	41
4.4	Tratamentos	42
4.4.1	<u>Tratamento com EGF</u>	42
4.4.2	<u>Tratamento com radiação</u>	42
4.4.3	<u>Tratamento com inibidores</u>	43
4.5	Construção dos vetores retrovirais	43
4.6	Produção do retrovírus recombinante e infecção de células alvo	43
4.7	Construção das linhagens celulares HT-29-pBABE e HT-29-CLD3	44
4.8	Obtenção de lisados celulares	45
4.9	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE) e <i>Imunoblotting</i>	45
4.10	Imunofluorescência	46
4.11	Medição da resistência elétrica transepitelial	46

4.12	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	47
4.13	Ensaio de migração celular (<i>Wound healing assay</i>).....	47
4.14	Ensaio de invasão celular.....	48
4.15	Ensaio de formação de colônia dependente de ancoragem.....	49
4.16	Ensaio de formação de colônia independente de ancoragem.....	49
4.17	Ensaio de proliferação celular.....	50
4.18	Análise Estatística.....	50
5	RESULTADOS.....	51
5.1	EGF regula os níveis proteicos de claudina-3 em células HT-29.....	51
5.2	Superexpressão de claudina-3 contribui para o processo de malignização das células.....	52
5.3	Efeito da radiação sobre a expressão de claudina-3 em progênie de células HT-29 derivadas de parentais irradiadas.....	55
5.4	Superexpressão de claudina 3 minimiza alterações morfológicas causadas pela radiação.....	56
5.5	Superexpressão de claudina-3 diminui a resistência elétrica transepitelial após irradiação, porém não altera o efeito da radiação na permeabilidade à macromoléculas.....	60
5.6	Superexpressão de claudina-3 aumenta o potencial proliferativo das células.....	63
5.7	Radiação diminui o potencial migratório da progênie derivada de células parentais irradiadas.....	64
5.8	A superexpressão da claudina-3 diminui a invasão da progênie de células sobreviventes a radiação.....	66
5.9	Superexpressão de claudina-3 não influencia na redução da formação colônia dependente de ancoragem causada pela radiação.....	68
5.10	Superexpressão de claudina-3 potencializa o efeito da radiação na formação de colônia independente de ancoragem.....	69
5.11	Inibição da via MEK sensibiliza as células que superexpressam claudina-3 à radiação.....	71

5.12	Inibidores das vias MEK e PI3K aumentam a capacidade migratória das células após a radiação independente do padrão de expressão de claudina-3.....	74
5.13	Inibição da MEK aumenta a capacidade de formação de colônia nas células que superexpressam claudina-3.....	75
6	DISCUSSÃO	80
	CONCLUSÕES.....	89
	REFERÊNCIAS.....	90
	ANEXO – Artigo publicado.....	100

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) está entre os tipos de tumores mais comuns que afetam a população mundial. Configura-se como o terceiro tipo de câncer mais incidente no mundo para o sexo masculino e o segundo para o sexo feminino, sendo que o Brasil segue a tendência mundial na incidência deste tipo de câncer.

Durante o processo de carcinogênese colorretal, as células adquirem vantagens devido a fatores genéticos e epigenéticos, que desencadeiam a ativação de vias de sinalização relacionadas à proliferação, sobrevivência e metástase. Durante a progressão do CCR as células sofrem alterações morfogenéticas, sendo a desorganização do complexo juncional apical (CJA) um dos eventos iniciais desse processo. As junções oclusivas (JTs) são um dos principais componentes da CJA e desempenham papel importante no controle do fluxo paracelular, na determinação da polaridade celular e na transdução de sinais relacionados com a progressão tumoral. As claudinas são proteínas transmembrana, constituintes das JTs e cumprem um importante papel no controle desses eventos. Alterações na expressão das claudinas são observadas em tumores de diferentes órgãos e têm sido relacionadas com a progressão tumoral.

Dentre os protocolos clínicos utilizados na terapêutica do câncer, a radioterapia é uma alternativa utilizada como primeira linha de tratamento para diversos tumores sólidos. Entretanto, estudos tem mostrado que apesar da radioterapia ser importante para diminuir a reincidência local do tumor não há alterações na sobrevida global dos pacientes. Além disso, um dos efeitos colaterais causados pela radioterapia são as síndromes gastrointestinais, causadas por alterações nos contatos célula-célula, principalmente nas JTs, gerando desequilíbrio homeostático no intestino.

Uma vez que o aparecimento de metástases tardias e doença refratária ao tratamento radioterápico constituem os principais motivos de insucesso terapêutico, e que durante o processo de carcinogênese colorretal ocorre aumento de expressão das claudinas, torna-se importante avaliar a correlação entre radorresposta e a expressão de determinadas claudinas, uma vez que estas proteínas estão relacionadas à modulação de resposta frente à tratamentos direcionados ao câncer.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Câncer colorretal: Incidência e fatores de risco

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. No Brasil, a estimativa bienal segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) para os anos 2014/15 aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer. O Câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo mais comum de câncer no mundo em ambos os sexos e a segunda causa em países desenvolvidos. Sua incidência foi estimada em aproximadamente 33 mil novos casos para o ano de 2014 na população brasileira (Tabela 1), sendo o terceiro mais incidente tipo de câncer em homens e o segundo em mulheres. Com isso o CCR passa a ser o segundo tipo de câncer mais incidente no país, desconsiderando os tumores de pele não melanoma (INCa, 2014).

Tabela 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma

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

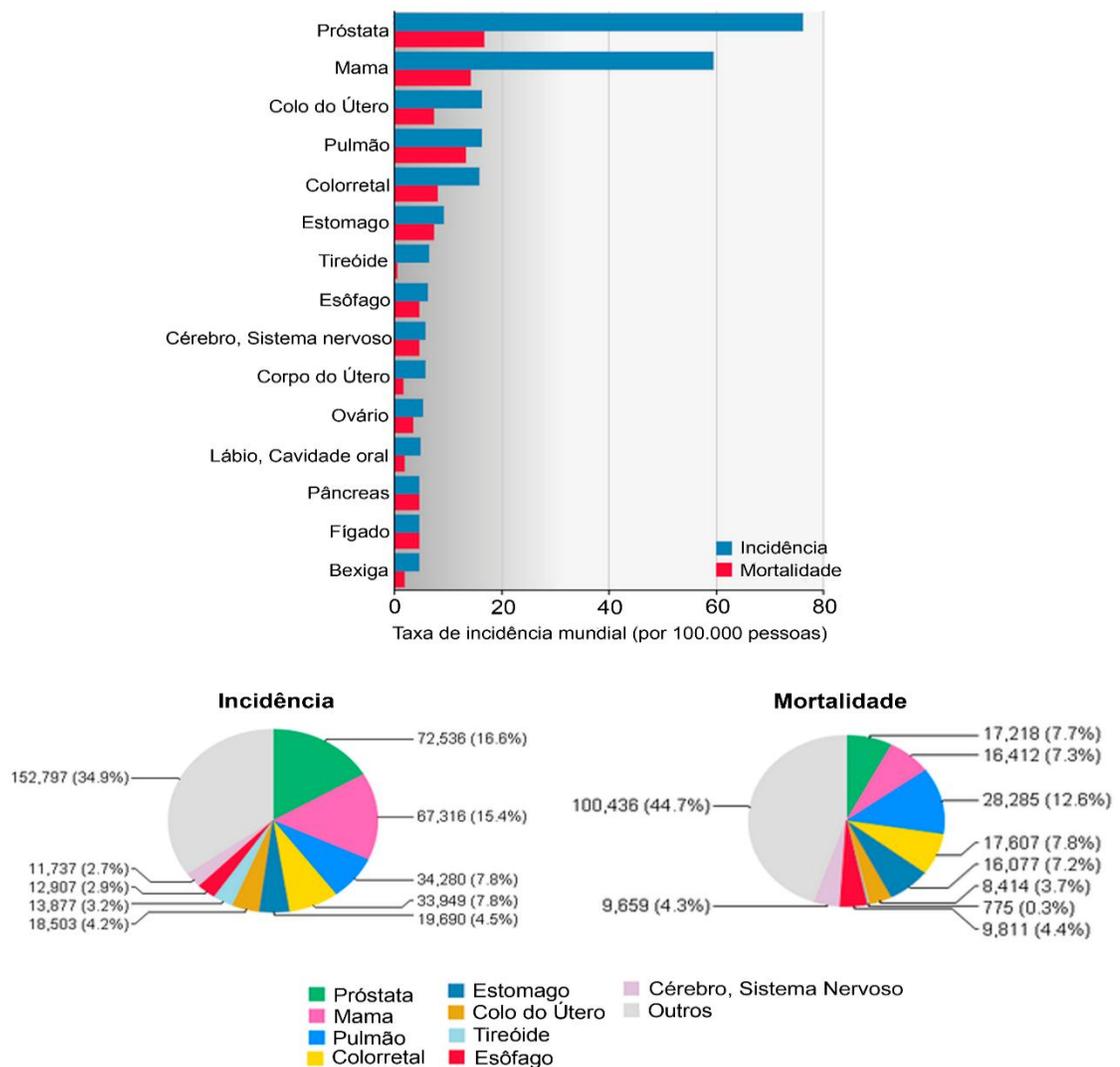
*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: Instituto Nacional do Câncer & Ministério da Saúde, 2014.

Com relação a mortalidade o CCR é a terceira causa de morte por câncer em ambos os sexos (American Cancer Society, 2014), de acordo com os dados do *Globocan 2012* o índice de mortalidade para o CCR configura-se em 7,8%, dentre todas as taxas de morte relacionadas a câncer no Brasil, totalizando aproximadamente 17.500 mortes (Fig. 1). A sobrevivência do paciente com CCR é em torno de 65% em

países desenvolvidos e menos de 50% em países em desenvolvimento, sendo o estágio da doença no diagnóstico o fator prognóstico mais importante (American Cancer Society; DeSantis *et al.*, 2014).

Figura 1 - Incidência e mortalidade dos tipos de câncer mais frequentes no Brasil, em ambos os sexos



Fonte: Adaptado de Globocan 2012 <globocan.iarc.fr>

Diversos fatores estão associados ao aumento do risco de CCR, como predisposição genética a doenças intestinais crônicas, consumo excessivo de carne

vermelha, embutidos e bebidas alcoólicas, o tabagismo e a obesidade (Chan & Giovannucci, 2010; Doubeni, 2012; *American Cancer Society*, 2014). A idade também é considerada um fator de risco, uma vez que tanto a incidência como a mortalidade aumentam com a idade (INCA, 2014).

Estes fatores são relacionados a três formas distintas de manifestação da doença: esporádica, hereditária e familiar. O CCR esporádico representa aproximadamente 75% dos casos desse tipo de câncer e é resultante da ação cumulativa de fatores ambientais, acometendo indivíduos acima de 50 anos (Fearon, 2011). Em torno de 20% dos casos de CCR são associados à um componente familiar, uma vez que os pacientes diagnosticados com a doença possuem familiares de primeiro ou segundo grau que foram previamente diagnosticados com CCR, entretanto não se encaixam em síndromes hereditárias bem conhecidas. Aproximadamente 5% dos casos de CCR são associados à herança de mutações de alta penetrância e manifestações clínicas bem conhecidas, tais como a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP, do inglês *Familial Adenomatous Polyposis*) e a Síndrome de Lynch ou câncer colorretal hereditário não poliposo (HNPCC, do inglês *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*) (Jasperson *et al.*, 2010; Fearon, 2011).

A FAP apresenta incidência de aproximadamente 1% dos casos de CCR e é caracterizada por ser uma doença autossômica dominante causada pela mutação do gene supressor de tumor *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), o que induz a formação de pólipos adenomatosos (Jasperson *et al.*, 2010), dependendo do número de adenomas os pacientes são classificados como FAP clássica (detecção de 100 adenomas ou mais) e a FAP atenuada (10 a 100 adenomas). A FAP quando não tratada apresenta quase 100% de chance desenvolver-se em CCR na terceira década de vida (Jasperson *et al.*, 2010, Fearon, 2011), portanto pacientes diagnosticados com esta doença devem submeter-se a colonoscopia para a retirada dos pólipos a cada 1-2 anos a partir de 10-12 anos de idade (Jasperson *et al.*, 2010; Stoffel & Kastrinos, 2014).

O HNPCC apresenta uma incidência de 3% a 4% dos casos de CCR, cuja base molecular consiste na mutação da linhagem germinativa em genes de reparo de pareamento incorreto do DNA (MMR, do inglês *Mismatch Repair*), como o *hMSH2* e *hMLH1* (90%), *hMSH6* (10%) e *hPMS2* (raro) (Jasperson *et al.*, 2010). Os genes

relacionados ao MMR são responsáveis por manter a fidelidade genômica através da correção de erros no pareamento de base única e de inserções ou deleções que ocorram durante a replicação. Pacientes diagnosticados com esta doença devem submeter-se a colonoscopia para a retirada dos pólipos a cada 1-2 anos a partir de 20-25 anos de idade (Stoffel & Kastrinos, 2014).

O CCR é considerado de bom prognóstico se a doença for diagnosticada em estágios iniciais, no qual a sobrevida média em 5 anos é de 90%, porém a detecção precoce é rara devido as características assintomáticas do CCR no seu estágio *in situ* (0) ou localizada (I e II). Para pacientes com estadiamento III a sobrevida estimada é de 70% e para pacientes detectados em estágio avançado (IV) a sobrevida cai para 12% (American Cancer Society; DeSantis *et al.*, 2014).

1.2 Progressão do câncer colorretal: aspectos celulares e moleculares

O desenvolvimento de carcinomas é um processo de múltiplas etapas, no qual a célula tumoral adquire vantagens sobre as demais devido ao acúmulo de mutações e fatores epigenéticos. Hanahan & Weinberg (2000 e 2012) descreveram este processo como uma série de eventos celulares que incluem a sustentação da sinalização proliferativa, a evasão dos supressores de crescimento, a resistência à apoptose, a imortalidade replicativa, a inflamação promovida pelo tumor, a indução da angiogênese e ativação da invasão e metástase (Fig. 2).

Figura 2 - Marcadores do câncer

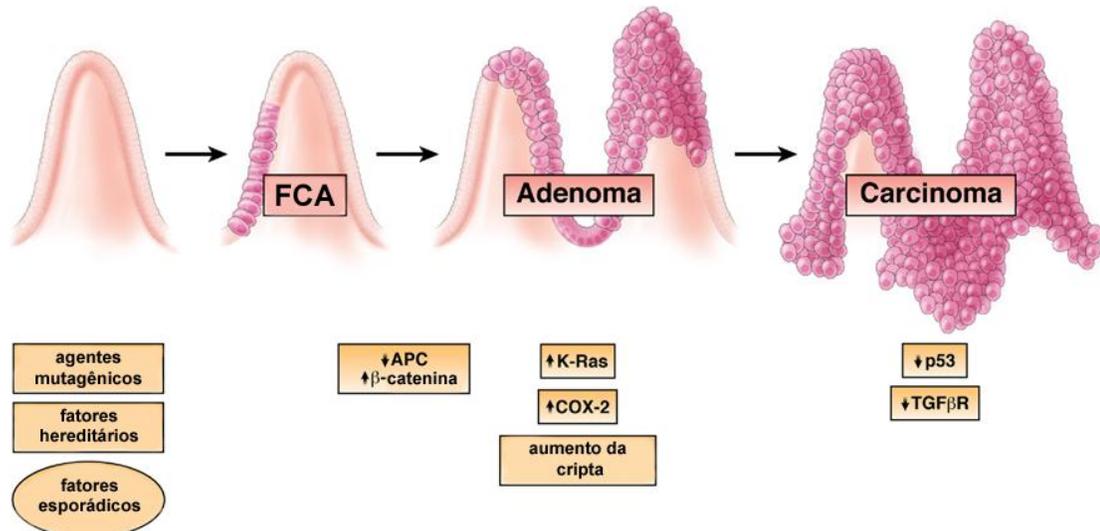


Legenda: Esta figura ilustra os eventos necessários para o desenvolvimento e progressão do câncer. Tais como: manutenção da sinalização proliferativa, evasão da supressão de crescimento, evasão do sistema imune, imortalidade replicativa, inflamação promovida pelo tumor, ativação da invasão e metástase, indução da angiogênese, instabilidade genômica e mutação, e resistência à morte celular e desregulação da energia celular.

Fonte: Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2012.

Em relação ao desenvolvimento do câncer colorretal (CCR), Fearon & Vogelstein (1990) desenvolveram um modelo denominado sequência adenoma-carcinoma, que consiste em alterações genéticas que levam ao desenvolvimento desta neoplasia a partir de pólipos adenomatosos como ilustrados na figura 3.

Figura 3 - Desenvolvimento do câncer colorretal



Legenda: A ilustração representa o modelo de progressão tumoral adenoma-carcinoma. Onde é possível observar os estágios da progressão do CCR: formação de criptas aberrantes (FCA), adenoma e carcinoma. O processo tem início devido a fatores hereditários e/ou ambientais que podem levar a ativação dos oncogenes K-Ras e COX-2, ou a inibição de genes supressores de tumor, como APC, p53 e TGFβR.

Fonte: Adaptado de Terzić et al., 2010.

Atualmente o CCR tem sido caracterizado como uma doença heterogênea, apresentando três principais vias que levam a transformação maligna: via fenótipo metilador de ilhas CpG (CIMP, do inglês *CpG Island Methylator Phenotype*); a via de Instabilidade de microssatélites (MSI, do inglês *Microsatellite Instability*) e a Via de Instabilidade Cromossômica (CIN, do inglês *Chromosomal Instability*) (Harrison & Benziger, 2011; Centelles, 2012).

A CIMP é caracterizada pela instabilidade epigenética que é consequência da hipermetilação de promotores de genes supressores tumorais, que leva ao silenciamento destes genes, e da hipometilação do restante do DNA. Esta hipermetilação ocorre nas ilhas CpG (citosina-guanina) destes promotores levando a compactação do DNA nesta área e impossibilitando a transcrição.

A MSI é um tipo de instabilidade genômica que surge quando ocorrem mutações em sequências repetitivas de nucleotídeos de todo o genoma. Estas sequências repetitivas são conhecidas como microssatélites. Dada a sua natureza repetitiva elas são responsáveis por erros que podem ocorrer durante a replicação do DNA. Porém, quando os genes de reparo de mal pareamento do DNA estão funcionando

normalmente, as proteínas codificadas por esses genes reparam o erro. Falha neste mecanismo de reparo leva a persistência de erros e alterações no tamanho de uma sequência de microssatélites, um processo descrito como instabilidade de microssatélite. Estas mudanças são particularmente importantes quando os microssatélites estão presentes dentro das áreas críticas de genes responsáveis pela regulação do crescimento celular. A persistência de tais erros conduz a mutações com perda da função normal dos genes e na promoção da tumorigênese (Harrison & Benziger, 2011; Bedeir & Krasinskas, 2011; Centelles, 2012).

A CIN é a alteração genética mais comum que ocorre em carcinomas colorretais. Este tipo de anormalidade é conhecido por apresentar aneuploidia e/ou alterações estruturais nos cromossomos. A CIN está associada com a mutação no gene *APC* (do inglês *Adenomatous polyposis coli*) e no oncogene *K-RAS*.

O gene *APC* possui 15 éxons e codifica uma proteína de aproximadamente 312kDa que atua como supressora tumoral e também tem papel importante na diferenciação celular, adesão, formação da polaridade celular, migração, desenvolvimento e apoptose (Senda *et al.*, 2007; Harrison & Benziger, 2011).

A proteína APC atua formando um complexo com as proteínas Axina, GSK3 β (do inglês, *glycogen synthase kinase 3 β*) e CK1 (do inglês, *Casein Kinase I*), que possibilita a fosforilação da proteína β -catenina citoplasmática. A fosforilação da β -catenina a marca para ubiquinação seguida de degradação via proteassoma. Este complexo participa da via de sinalização Wnt. Brevemente, quando esta via está ativa impede a formação do complexo APC-GSK3 β -Axina-CK1 e com isso a β -catenina não é marcada para degradação e se acumula no citoplasma. O acúmulo de β -catenina possibilita a sua translocação ao núcleo e sua associação com o fator de transcrição TCF/LEF (do inglês, *T-cell Factor - lymphoid enhancer factor*) que induz a transcrição de genes relacionados com a proliferação celular e evasão da apoptose (Centelles; Clevers & Nusse, 2012).

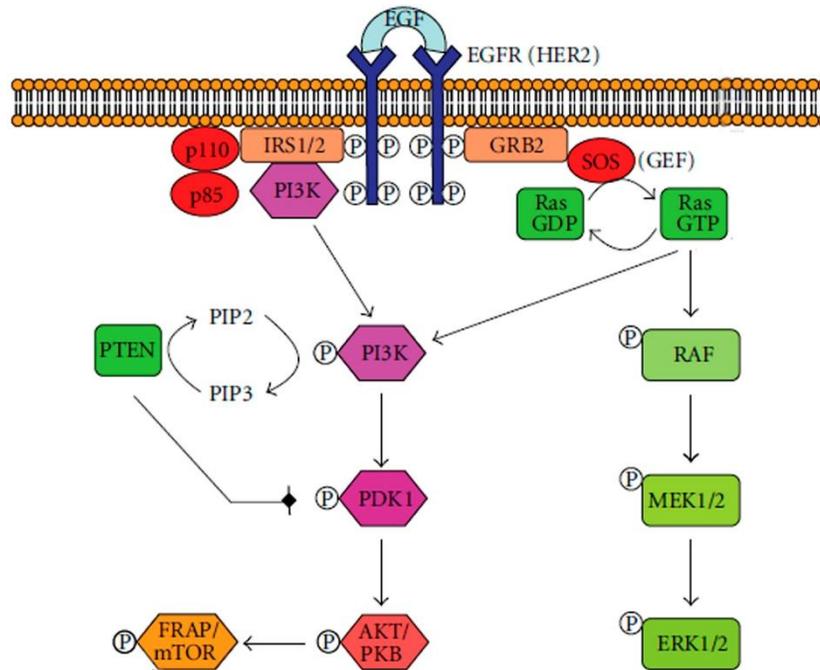
Durante o desenvolvimento do CCR a mutação no gene *APC* é um dos primeiros passos para a formação do adenoma (Fig. 3) e como mencionado anteriormente a principal causa da FAP. A mutação impede a formação do complexo capaz de fosforilar a β -catenina e sem este complexo ocorre o acúmulo de β -catenina que se transloca

para o núcleo induzindo a transcrição de genes relacionados com a proliferação celular e evasão da apoptose, mecanismos fundamentais para a progressão tumoral.

Outra importante via envolvida na progressão do CCR é aquela relacionada a proteína K-Ras. Três genes *Ras* (*H-Ras*, *K-Ras* e *N-Ras*), codificam proteínas de 21kDa que atuam na via Ras/MAPK. A ativação do receptor de crescimento epidermal (EGFR, do inglês, *epidermal growth factor receptor*) pode desencadear a ativação de diversas vias, principalmente, a Ras-Raf-MAPK e a PI3K-Akt (Fig. 4) conhecidas por controlar a progressão do ciclo celular, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Prenzel *et al.*, 2001; Di Fiore *et al.*, 2010)

Mutações no gene *Ras* podem levar a ativação constitutiva da proteína Ras, mantendo a sua via *downstream* continuamente ativa, levando ao aumento da proliferação celular (Adjei, 2001). Mutações em *K-Ras* têm sido observadas em 35-40% dos tumores colorretais. Nestes pacientes, o tratamento utilizando anticorpos e inibidores contra o EGFR foi ineficaz, uma vez que, a via continua constitutivamente ativa devido a mutação em *K-Ras*. Para contornar esta situação, têm sido proposto a utilização de inibidores contra alvos *downstream* a Ras, tais como inibidores de Raf e MEK (Brand & Wheeler, 2012). Neste contexto tem sido observado uma diminuição do crescimento celular em modelos *in vitro* e o crescimento tumoral em modelos *in vivo* quando tratados com inibidor de B-Raf (King *et al.*, 2013) e inibidores de MEK1/2 (Yoon *et al.*, 2011). Nos testes clínicos os inibidores de Raf tem se mostrado eficazes no aumento da sobrevivência apenas em pacientes de melanoma que apresentam B-Raf mutado (Chapman *et al.*, 2011; Brand & Wheeler, 2012) e os inibidores de MEK1/2 apresentaram pouca atividade antitumoral em pacientes de CCR (Rinehart *et al.*, 2004).

Figura 4 - Vias de sinalização do EGFR



Legenda: Esquema representativo mostrando as proteínas que participam das vias de sinalização do EGFR. A via PI3K-Akt está relacionada a sobrevivência celular e a via Ras-ERK tem sido relacionada a proliferação e progressão do ciclo celular.

Fonte: Adaptado de Centelles, 2012.

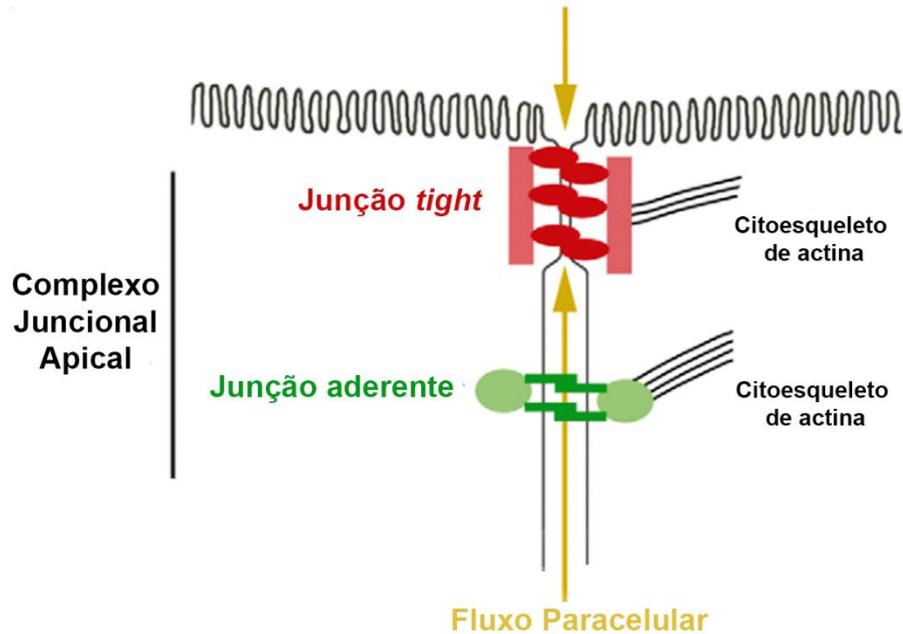
Durante o processo de carcinogênese, as células adquirem vantagens devido a fatores genéticos, epigenéticos e morfológicos. Estudos tem mostrado que a perda da adesão célula-célula está envolvida em eventos relacionados formação e progressão tumoral, e vem sendo associada a aquisição de um fenótipo invasivo e consequentemente metastático (Thierry & Sleeman, 2006; Tsanou *et al.*, 2008; McCaffrey & Macara; 2011). Neste contexto as junções *tight* (JTs) como componente do complexo juncional apical (CJA) cumpre papel fundamental contribuindo no controle do fluxo paracelular, na determinação da polaridade celular e na transdução de sinais relacionados com a progressão tumoral (Furuse, 2010; Steed *et al.*, 2010).

1.3. Junções oclusivas

O epitélio entérico apresenta uma forte adesão célula-célula, a qual atua como barreira eficaz contra moléculas nocivas e microorganismos. Porém, a dinâmica dessa característica possibilita uma alta permeabilidade a nutrientes e macromoléculas, que são importantes para o crescimento e desenvolvimento do organismo (Laukoetter *et al.*, 2008; Bonazzi & Cossart *et al.*, 2011). A manutenção da adesão intercelular é feita principalmente pela presença de uma estrutura dinâmica conhecida como complexo juncional apical (CJA), o qual é constituído por estruturas de membrana especializadas: as junções oclusivas (JT) e as junções aderentes (JA) (Fig. 5).

Estas estruturas não só atuam determinando a polaridade celular e regulando o transporte paracelular de nutrientes, eletrólitos e pequenos solutos, mas também em eventos de sinalização celular relacionados com a progressão tumoral (Hartsock & Nelson, 2008). Constituídas por proteínas da família das caderinas e das cateninas as JAs são estruturas que possuem diversas funções, tais como formação e estabilização da adesão célula-célula; regulação do citoesqueleto de actina; participação na sinalização intracelular e na regulação transcricional (Hartsock & Nelson, 2008; Baum & Georgiou, 2011).

Figura 5 - Complexo juncional apical

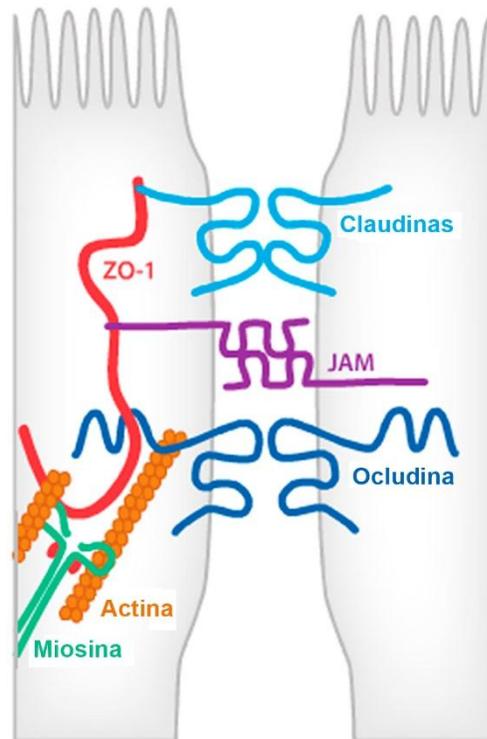


Legenda: Esquema gráfico mostrando o complexo juncional apical e suas duas estruturas de membrana especializadas: junções *tight* e junções aderentes, responsáveis pela manutenção da adesão célula-célula, controle do fluxo paracelular (seta amarela), polaridade celular e modulação de vias de sinalização intracelulares.

Fonte: Adaptado de Steed *et al.*, 2010.

As JTs estão localizadas na porção mais apical do complexo juncional, logo acima das JAs. Constitui um complexo multiproteico altamente organizado que atua na determinação da polaridade celular e na modulação do fluxo paracelular. As JTs são constituídas por proteínas integrais de membrana, que incluem as claudinas, ocludinas, tricelulina e moléculas de adesão juncional (JAM), e proteínas responsáveis pela associação ao citoesqueleto, como as *zonula occludens* (ZO) e por complexos protéicos que atuam na determinação da polaridade celular (Fig. 6) (Furuse, 2010; Steed *et al.*, 2010).

Figura 6 - Junções oclusivas



Legenda: Esquema gráfico representando os principais componentes proteicos das junções oclusivas, tais como as proteínas transmembrana JAM, ocludina e claudina e as proteínas de ligação ao citoesqueleto de actina as proteínas ZOs.

Fonte: Adaptado de Shen et al., 2011.

A determinação da polaridade celular resulta na discriminação entre dois domínios celulares: o domínio apical e o basolateral. Esta separação é observada devido à distribuição assimétrica de proteínas e lipídeos entre a superfície apical e basolateral (Wang & Margolis, 2007). Estes domínios são importantes para regular dois tipos de transporte celular que atuam na passagem do conteúdo luminal através do epitélio: o transporte transcelular e o paracelular. O transporte transcelular é o movimento ativo ou passivo de moléculas e íons através do citoplasma em direção à porção basal da célula. O transporte paracelular consiste no movimento passivo de água e solutos através do espaço entre células adjacentes. A modulação deste fluxo é controlada pelas proteínas das JTs.

A primeira proteína das JTs descoberta foi a **occludina**. Proteína pertencente a superfamília das tetraspaninas, que consiste no grupo de proteínas que possuem quatro domínios transmembrana, duas porções extracelulares e domínios N- e C-terminais citoplasmáticos (Yunta & Lazo, 2003). A região C-terminal das ocludinas possui uma sequência chamada domínio E, responsável pela ligação com as proteínas de ancoragem ao citoesqueleto, tais como ZO e cingulina. No entanto as ocludinas também são capazes de ligar-se aos filamentos de actina sem a necessidade de uma proteína intermediária (Paris *et al.*, 2008). A ocludinas são conhecidas pela sua função no controle do fluxo paracelular, regulando a difusão de solutos pelo seu tamanho. Entretanto, em experimentos usando camundongos que não expressam ocludina (camundongos *knockout*), tem sido demonstrado que essa proteína não desempenha papel essencial na formação e manutenção das JTs (Saitou *et al.*, 2000).

As **trichelulinas** são proteínas com estrutura semelhante a ocludina e pertencente a superfamília de tetraspaninas, apresentam quatro domínios transmembrana, duas porções extracelulares e domínios N- e C-terminais citoplasmáticos. Localizam-se principalmente na região da JT onde ocorre o encontro entre três células adjacentes, podendo ainda serem observadas, em menor quantidade, nos contatos entre duas células (Ikenouchi *et al.*, 2005; Ikenouchi *et al.*, 2008; Furuse, 2010; Mariano *et al.*, 2011; Soini, 2011). Nos contatos entre duas células, a trichelulina diminui a permeabilidade a íons e a moléculas, enquanto na junção entre três células não causa nenhuma alteração na permeabilidade a íons apesar de haver uma diminuição na permeabilidade de macromoléculas (Krug *et al.*, 2009). Mutações recessivas na trichelulina têm sido associadas com a perda da audição (Riazuddin *et al.*, 2006). Entretanto, as mesmas mutações não têm influência significativa nas JTs presentes no tecido renal, respiratório e gastrointestinal (Raleigh *et al.*, 2010). Ikenouchi e colaboradores (2005) têm demonstrado que a supressão da trichelulina, por RNA de interferência (RNAi), em células epiteliais resulta na organização anormal das JT com consequente diminuição da função de barreira. Poucos trabalhos têm correlacionado a expressão da proteína trichelulina e o câncer. Patonai e colaboradores (2011) recentemente mostraram que há uma diminuição na expressão de trichelulina em carcinoma fibrolamelar hepático quando comparado com tecido adjacente normal. De

maneira adicional, tem sido relatada ainda uma diminuição progressiva na expressão da tricelulina em amostras de pacientes com diferentes níveis de diferenciação celular, em adenocarcinoma ductal pancreático (Korompay *et al.*, 2012).

As **JAMs** são glicoproteínas que atravessam a membrana plasmática uma única vez, possuem dois domínios semelhantes a imunoglobulina em sua porção extracelular e uma curta região C-terminal citoplasmática com domínios PDZ. Tem sido mostrado que a diminuição da expressão das JAMs reduz a permeabilidade paracelular (Martin-Padura *et al.*, 1998). Em câncer, o aumento na expressão das JAMs tem sido relacionadas com um pior prognóstico em câncer de mama (McSherry *et al.*, 2009) e em câncer de pulmão de células não pequenas (Zhang *et al.*, 2013).

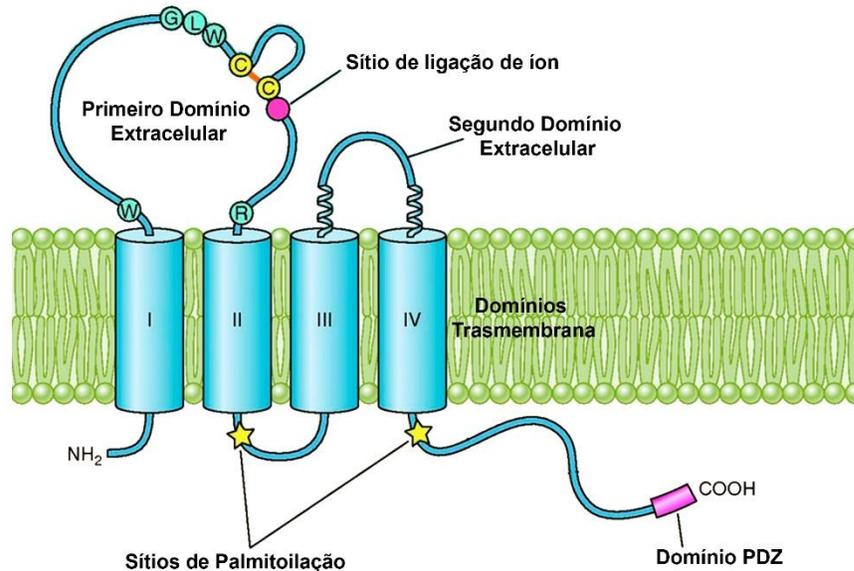
A estabilização das JT requer a interação das proteínas integrais de membrana com moléculas citoplasmáticas que funcionam como suportes para recrutar outras proteínas estruturais, proteínas de sinalização e fazer a ligação com o citoesqueleto de actina (Furuse, 2010). Este papel é feito pelas proteínas ZOs (ZO-1, -2, -3), que fazem parte de uma família de proteínas guanilato quinase associadas à membrana (MAGUK, do inglês *membrane-associated guanylate kinases*). Estas proteínas possuem domínios PDZ, através dos quais as ZOs se associam às proteínas integrais de membrana, ligando as mesmas ao citoesqueleto (Paris *et al.*, 2008).

As **claudinas** compreendem uma família de proteínas que possui atualmente 27 membros descritos (Mineta *et al.*, 2011), também pertencentes a superfamília das tetraspaninas. São proteínas de baixo peso molecular (entre 20-28 kDa), com quatro domínios transmembrana, duas porções extracelulares (também chamados de alças extracelulares) e domínios N- e C-terminais citoplasmáticos. A cauda C-terminal possui uma região conservada chamada PDZ, onde as proteínas de ancoragem ao citoesqueleto de actina se ligam para fazer a ponte entre as proteínas claudinas e os filamentos de actina (González-Mariscal *et al.*, 2003; Van-Itallie & Anderson, 2006 e 2014; Singh *et al.*, 2010, Günzel & Yu, 2013) (Fig. 7).

Os domínios extracelulares destas proteínas são responsáveis por suas interações homo- e heterotípicas na mesma célula ou em células adjacentes (Tsukita & Furuse, 2000; Krause *et al.*, 2008; Günzel & Yu, 2013) e é através desses domínios que as claudinas interagem formando poros capazes de permitir a passagem de água e

determinados íons, entretanto ainda não é possível determinar tais características para todas a claudinas.

Figura 7 - Estrutura básica das claudinas



Legenda: Esquema gráfico representando a estrutura molecular das proteínas claudinas. Estas proteínas possuem quatro domínios transmembrana (representado por I, II, III e IV), dois domínios extracelulares, sendo o primeiro domínio extracelular caracterizado pela presença de uma região altamente conservada (representada por G-L-W) e o sítio de ligação de íon. Caldas N- e C- terminais intracelulares que possuem sítios de palmitoilação importante para direcionamento das claudinas para as TJ e o domínio PDZ que consiste em um domínio altamente conservado que possibilita a ligação a claudina com as proteínas de ancoragem ao citoesqueleto de actina (ZOs).

Fonte: Adaptado de Günzel & Yu, 2013.

Furuse e colaboradores (2001) demonstraram padrões de expressão de claudinas diferentes nas células MDCK I e II (do inglês, *Madin-Darby canine kidney*) e que esta expressão diferenciada está relacionada com alterações na permeabilidade paracelular. Este achado sugere que as propriedades de barreira das JT são reguladas de acordo com as interações homo- e heterotípicas que podem ser realizadas entre os diferentes tipos de claudinas. Nesse sentido, diversos trabalhos têm relatado que o padrão de expressão das claudinas é bastante variável entre os diferentes tipos de células e tecidos, corroborando o fato de que cada claudina tem uma característica própria na determinação da permeabilidade paracelular. Dessa forma, as interações

entre os mais diversos tipos de claudinas são específicas para a necessidade de cada tecido (Tsukita & Furuse, 2000; Van Itallie & Anderson, 2006).

1.3.1 Regulação das claudinas

As alterações no padrão de expressão das proteínas claudinas observadas durante a tumorigênese epitelial, e a desregulação do CJA é um dos passos importantes para a transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês *epithelial-mesenchymal transition*), portanto há a necessidade de compreensão dos mecanismos regulatórios das claudinas.

Como outros genes as claudinas podem ser reguladas por mecanismos epigenéticos como a metilação de ilhas CpG do promotor ou desacetilação de histonas. Além disso, podem sofrer regulação gênica através de fatores de transcrição. Diversos trabalhos têm mostrado o papel dos fatores de transcrição Snail e Slug na repressão dos genes das claudinas 3, 4 e 7 em células epiteliais MDCK e no carcinoma esofágico (Ikenouchi *et al.*, 2003; Martínez-Estrada *et al.*, 2006; Usami *et al.*, 2008). Lee e colaboradores (2012) mostraram que o fator de transcrição Twist1 provoca a repressão transcricional da claudina-4, evento relacionado a um pior prognóstico de pacientes com câncer esofágico. O fator de transcrição RUNX3 tem sido associado a repressão da claudina 1 em células do epitélio gástrico (Chang *et al.*, 2010). Nessa mesma linha de evidências, tem sido demonstrada a atuação do fator de transcrição c-Fos no aumento da expressão da claudina-2 via EGFR/MEK/ERK/c-Fos, em células de adenocarcinoma de pulmão (Ikari *et al.*, 2012). Estudo recente de nosso Grupo vem mostrando que o EGF aumenta a expressão da claudina-3, evento mediado pela ativação das vias de sinalização MEK1/2-ERK1/2 e PI3K-Akt, sendo este evento associado ao aumento do potencial tumorigênico de células de câncer colorretal (de Souza *et al.*, 2013). Entretanto ainda são escassos os trabalhos que avaliam os fatores de transcrição (FT) que atuam induzindo a expressão das claudinas.

Outro mecanismo de regulação envolve a bactéria *Clostridium perfringens*, a principal causadora da intoxicação alimentar. A enterotoxina produzida por esta

bactéria (CPE, do inglês *Clostridium perfringens enterotoxin*) tem sido descrita por sua atuação como ligante de uma região chamada de receptor de CPE (CPE-R) presente no segundo *loop* extracelular das claudinas 3 e 4 (Sonoda *et al.*, 1999; Van Itallie *et al.*, 2008). A ligação do CPE a claudina causa a formação de um complexo entre CPE, claudinas que possuem CPE-R e claudinas que não possuem este domínio e a ocludina. Este complexo forma um poro que causa um aumento no influxo de cálcio seguida de morte celular (Gao & McLane, 2012). Esta propriedade citotóxica tem sido utilizada para propor possível tratamento do câncer de mama (Kominsky *et al.*, 2004) e poderia ser utilizado para outros tumores que apresentam aumento na expressão de claudina 3 ou 4, como por exemplo o câncer ovário (Hough *et al.*, 2000) e o CCR (Oliveira & Morgado-Díaz, 2006). A porção carboxilica do CPE (C-CPE) é capaz de regular expressão proteica das claudinas 3 e 4 sem causar citotoxicidade (Sonoda *et al.*, 1999; Van Itallie *et al.*, 2007; Gao & McLane, 2012; Pruteanu & Shanahan, 2013). Tal mecanismo tem sido utilizado para regular a expressão das claudinas 3 e 4, e a diminuição da expressão destas proteínas tem sido associada ao aumento da sensibilidade a quimioterápicos (Gao *et al.*, 2011). Em busca de uma atuação mais específica Li e colaboradores (2014) têm demonstrado a relevância da utilização de anticorpos contra claudina 3 e 4 como sondas diagnósticas e sua atuação antitumoral nos tumores xenográficos em camundongos.

Portanto compreender os mecanismos de regulação e o papel das proteínas claudinas no contexto do câncer torna-se cada vez mais importante, visto o seu potencial como biomarcador ou alvo terapêutico.

1.3.2 Claudinas e câncer

Desde a descoberta desta família de proteínas e a relação entre a expressão alterada, a desorganização da barreira epitelial e a progressão de alguns tipos de câncer epitelial, a literatura a respeito deste tema está em constante expansão.

A organização da barreira epitelial envolve três elementos mutuamente interrelacionados que tem papel importante no crescimento e desenvolvimento

neoplásico. Primeiro, a polaridade celular, responsável pela separação da membrana plasmática em dois domínios que diferem-se em sua conformação lipídica e proteica. Por exemplo, receptores de fatores de crescimento, são normalmente localizados na superfície basolateral da célula voltado para o fluído intersticial. Segundo, as proteínas ligantes aos receptores de fatores de crescimento, que são frequentemente encontradas em altas concentrações em fluídos luminiais dentro dos tecidos epiteliais (Zeng *et al.*, 2009). E terceiro, alterações nas junções *tight* que ocorrem no início do processo tumorigênico, de tal modo que o fluxo paracelular modifica-se possibilitando a passagem de solutos maiores (Singh *et al.*, 2010). Assim, alterações da barreira epitelial podem causar, um aumento na disponibilidade de proteínas ligantes aos receptores de fatores de crescimento, induzindo assim toda a cascata de sinalização que pode levar ao aumento da proliferação, a evasão da apoptose e eventos relacionadas com o desenvolvimento da transição epitélio-mesenquimal (EMT), tais como, alterações na localização ou expressão de componentes das JTs levando a um aumento do potencial migratório e invasivo. Neste contexto é necessário compreender os mecanismos que causam desorganização das JTs durante a progressão tumoral.

Diversos trabalhos mostram alterações na expressão das proteínas claudinas no tecido tumoral em comparação ao tecido normal adjacente. Oliveira e colaboradores (2005) mostraram aumento na expressão das claudinas 1, 3 e 4 e na permeabilidade paracelular, em amostras de tumores de câncer colorretal moderadamente diferenciados em comparação ao tecido normal adjacente. No câncer de pulmão, Chao e colaboradores (2009) mostraram que a baixa expressão de claudina-1 está ligada ao prognóstico ruim de pacientes com adenocarcinoma de pulmão. No câncer de mama, foram observadas diferenças nos padrões de expressão das claudinas 2 e 5 entre diferentes tipos tumorais: estas proteínas foram vistas aumentadas no carcinoma ductal em relação ao carcinoma lobular (Soini, 2004). Em câncer de ovário tem sido demonstrado uma superexpressão das claudinas 3 e 4 (Hough *et al.*, 2000; Rangel *et al.*, 2003) evento associado ao aumento do potencial invasivo (Agarwal *et al.*, 2005).

Devido a elevada especificidade dos padrões de expressão das claudinas em diferentes tipos de câncer, tem sido sugerida a utilização destas proteínas como marcadores moleculares (Morin, 2005). Soini e colaboradores (2006) mostraram que a

expressão das claudinas pode ser utilizada como ferramenta no diagnóstico diferencial entre mesotelioma e adenocarcinoma metastático da pleura. As claudinas 1, 3, 4 e 7 apresentam marcação significativamente mais fraca em mesotelioma do que no adenocarcinoma metastático de pleura. Recentemente, nosso Grupo mostrou que em células de CCR o EGF é capaz de aumentar a expressão proteica de claudina-3 através da via ERK1/2 e PI3K-Akt. Nesse trabalho observamos ainda que a superexpressão exógena de claudina-3 aumenta o potencial proliferativo, invasivo e migratório das células. Além disso, observamos que estes eventos estavam relacionados com a desregulação da função de barreira, como visto pelo aumento da permeabilidade à macromoléculas (De Souza *et al.*, 2013). Em um trabalho mais recente Sören e colaboradores (2014) demonstraram uma relação entre a diminuição da expressão das claudinas 1, 4 e 7 e uma maior extensão do acometimento do órgão primário, comprometimento de linfonodos regionais, invasão perineural e invasão linfovascular em amostras de pacientes com CCR.

Com isso, torna-se importante caracterizar o padrão tecido-específico de expressão dessas proteínas, uma vez que o mesmo poderia ser utilizado como uma ferramenta útil no diagnóstico e prognóstico de pacientes com câncer. Acredita-se que a marcação imunohistoquímica das claudinas em breve será parte da rotina de trabalho patológica de pacientes com os mais diferentes tipos de malignidades (Ouban & Ahmed, 2010).

1.4 Visão geral do tratamento do câncer colorretal

O tratamento do CCR varia de acordo com o estadiamento do tumor. O estadiamento do tumor é estabelecido de acordo com o sistema TNM (do inglês, *tumor-node-metastasis*) desenvolvido pela *Union for International Cancer Control*, e baseia-se na extensão do acometimento do órgão primário (tumor), na presença de células tumorais nos linfonodos regionais e no acometimento de outros órgãos (Fig. 8A) (Wolpin *et al.*, 2007).

Figura 8 - Classificação/Estadiamento do câncer pelo sistema TNM

A

T - Tumor Primário	
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ: intra-epitelial ou invasão de lâmina própria.
T1	Tumor que invade a submucosa
T2	Tumor que invade a muscular própria
T3	Tumor que invade além da muscular própria, alcançando camadas peri-cólicas ou peri-retais, sem atingir outros tecidos.
T4a	Tumor que invade a superfície do peritônio visceral
T4b	Tumor invade diretamente ou é aderente a outros tecidos ou órgãos.
N - Linfonodos Regionais	
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em 1 a 3 linfonodos regionais
N1a	Metástase em 1 linfonodo regional
N1b	Metástase em 2-3 linfonodos regionais
N1c	Depósito de tumor na subserosa, mesentério ou amadas peri-cólicas ou peri-retais que não são revestidos de peritônio. Sem metástase em linfonodos regionais
N2	Metástase em 4 ou mais linfonodos regionais
N2a	Metástase em 4-6 linfonodos regionais
N2b	Metástases em 7 ou mais linfonodos regionais
M - Metástase a distância	
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância
M1a	Metástase confinada a 1 órgão ou estrutura
M1b	Metástase em mais de 1 órgão/estrutura ou no peritônio.

B

C

D

Estadiamento sistema TNM			
Estádio	Tumor	Nódulo	Metástase
0	Tis	N0	M0
I	T1/T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1/T2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3/T4a	N1/N1c	M0
	T2/T3	N2a	M0
IIIC	T1/T2	N2b	M0
	T4a	N2a	M0
	T3/T4a	N2b	M0
	T4b	N1/N2	M0
IVA	Qualquer T	Qualquer N	M1a
IVB	Qualquer T	Qualquer N	M1b

Legenda: a) Tabela dos critérios utilizados para caracterizar por meio de análise patológica o câncer. b) Imagem representativa das camadas histológicas do cólon, para ilustrar a localização tumoral de acordo com a tabela A. c) Imagem representativa dos linfonodos regionais presentes próximo ao cólon. d) Tabela utilizada para classificação/estadiamento do tumor após análise patológica utilizando a tabela A.

Fonte: Adaptado do site

<<https://cancerstaging.org/referencetools/quickreferences/Documents/ColonSmall.pdf>> acessado em 01 de janeiro de 2015)

O carcinoma *in situ*, estadiamento 0 (zero), é aquele tumor que está confinado a mucosa ou invadiu apenas a lâmina própria. Neoplasias colorretais em estágio I, são aquelas que invadem a submucosa ou a camada muscular própria. Tumores são classificados em estadiamento II quando encaixam-se em uma das três situações: o tumor invade a camada subserosa (IIA), invade a superfície do peritônio visceral (IIB) ou o tumor invade diretamente ou está aderido a outros órgãos (IIC). O estadiamento III inclui os tumores em que há metástase nos linfonodos regionais. E o estágio IV são os tumores que já apresentam metástases em órgãos distantes (Fig. 8D) (Centelles, 2012).

O tipo de tratamento mais comum no CCR é a ressecção do tumor, que pode ser feita durante a colonoscopia (remoção dos pólipos) ou através de uma cirurgia, na qual a parte do órgão acometido é retirada com uma margem de pelo menos 5 cm em cada lado. Durante o procedimento cirúrgico é feito também a ressecção dos linfonodos regionais (pelo menos 12 linfonodos), para que o patologista consiga classificar corretamente o tumor após a cirurgia (Chang *et al.*, 2007), sendo importante para determinar a necessidade de terapia adjuvante (após a cirurgia).

A terapia adjuvante pode consistir em quimioterapia (QT), radioterapia (RT) e terapia-alvo. A Tabela 2 mostra os compostos, mecanismos de ação e as indicações dos medicamentos utilizados no tratamento do CCR. O tratamento quimioterápico baseia-se na utilização e/ou combinação dos compostos: 5-Fluorouracil (5FU), leucovorin, oxiliplatina e irinotecano. Na terapia-alvo, geralmente utiliza-se anticorpos monoclonais contra os receptores EGFR e VEGFR (receptor de fator de crescimento do endotélio vascular), tais como Cetuximab, Panitumumab, Bevacizumab que atuam impedindo a ativação destes receptores e sua cascata de sinalização *downstream*, e com isso diminuindo a proliferação e angiogênese respectivamente (Wolpin *et al.*, 2007; Centelles, 2012). Como mencionado anteriormente, a terapia-alvo beneficia apenas pacientes que não possuem mutação no gene Ras.

Tabela 2 – Medicamentos utilizados no tratamento do CCR

Terapia	Mecanismo de Ação	Indicações
5-Fluorouracil (5FU)	Inibe a enzima timidilato sintase, importante para a síntese de DNA	Múltiplas aplicações em combinação com outros agentes na terapia adjuvante e paliativa
Capecitabina	Pró-droga de administração oral que se converte em 5FU	Múltiplas aplicações em combinação com outros agentes na terapia adjuvante
Leucovorin	Ácido folínico que atua estabilizando a interação do 5FU com a timidilato sintase	Múltiplas aplicações em combinação com outros agentes na terapia adjuvante
Oxaliplatina	Composto que contém platina e age formando adutos no DNA inibindo a sua replicação	Usado em combinação com Leucovorin e 5FU (regime chamado de FOLFOX) na terapia adjuvante
Irinotecano	Inibe a enzima topoisomerase I que é essencial para a replicação do DNA	Usado sozinho ou em combinação com Leucovorin e 5FU (regime chamado de FOLFIRI) na terapia da metástase
Cetuximab	Anticorpo monoclonal que se liga aos EGFR bloqueando o sítio de ligação do EGF.	Usado sozinho ou em combinação com irinotecano na terapia da metástase
Panitumumab	Anticorpo monoclonal (humanizado) que se liga aos EGFR bloqueando o sítio de ligação do EGF.	Usado sozinho na terapia da metástase
Bevacizumab	Anticorpo monoclonal que se liga aos VEGFR bloqueando o sítio de ligação do VEGF.	Usado em combinação com FOLFOX e FOLFIRI na terapia da metástase

Fonte: Adaptado de Wolpin *et al.*, 2007.

A radioterapia é uma modalidade terapêutica utilizada na clínica para o tratamento de tumores desde 1897 (Prise *et al.*, 2005), e é considerada terapia de primeira linha para diversos tumores sólidos, tanto com intenção curativa para cânceres primários como paliativa (Yacoub *et al.*, 2006). No CCR a RT é normalmente utilizada

em pacientes com câncer de reto como terapia neoadjuvante (antes da cirurgia). O câncer de cólon e reto compartilham muitos aspectos como etiologia, diagnóstico, patologia e tratamento de doença metastática, mas devido a questões anatômicas, tanto o tratamento de doença localizada quanto as taxas de recorrência diferem significativamente entre si (*American Cancer Society*, 2014). No entanto um estudo comparando 276 amostras de câncer de cólon e reto mostrou por diversas análises que os tumores de cólon e reto são indistinguíveis a nível molecular (*The Câncer Genome Atlas Network Genotypes*, 2012).

Os protocolos de RT neoadjuvante consistem em doses hiperfracionadas de 1,8 a 2,0 Gy durante 5 a 7 semanas ou doses hipofracionadas de 5Gy durante 5 dias (Van den Brink *et al.*, 2004; Glynne-Jones, 2012; Pach *et al.*, 2012). Ambos os esquemas de fracionamento são importantes para permitir o reestabelecimento dos tecidos normais entre as exposições. Porém, não só as células do tecido normal, mas também as células tumorais podem se reestabelecer e gerar uma nova população de células sobreviventes à radiação. Além disso, metástases refratárias ocorrem frequentemente após a radioterapia (Brink *et al.*, 2004) e a literatura é inconclusiva em relação ao seu real valor nos esquemas terapêuticos (Pach *et al.*, 2011).

Estudos mostram que a radiação induz a secreção de fatores de crescimento e citocinas no microambiente. Além disso, sabe-se que as células não morrem imediatamente após a exposição à radiação e as células sobreviventes continuam interagindo com esse microambiente (Barcellos-Hoff *et al.*, 2005; Hamada *et al.*, 2007), podendo desenvolver respostas adaptativas através da ativação de mecanismos de reparo do DNA, sinalizações de estresse celular e ativação de vias de sobrevivência (Ahmed & Li, 2008). Porém, as características fenotípicas e o comportamento dessas células remanescentes e suas progênes é pouco conhecida, uma vez que a grande maioria dos estudos analisam as células diretamente atingidas pela radiação e em tempos curtos, e somente alguns deles que avaliam os efeitos a longo prazo desse tipo de tratamento.

Estudos prévios do nosso laboratório, usando modelos celulares de câncer de cólon, mostraram que a radiação induz desorganização dos contatos intercelulares (De Carvalho *et al.*, 2006). Nesta mesma linha de evidência, recentemente demonstramos

que a progênie de células de CCR sobreviventes a radiação apresenta maior potencial migratório, invasivo e fenótipo semelhante a transição epitélio-mesenquimal (Bastos *et al.*, 2014).

Os avanços na compreensão de mecanismos celulares e moleculares envolvidos na progressão tumoral contribuem para o aprimoramento das estratégias terapêuticas contra o CCR. Para isso os estudos na área de desenvolvimento de novos compostos e identificação de biomarcadores são de grande importância.

2 RELEVÂNCIA DO ESTUDO

O câncer colorretal é a terceira neoplasia mais incidente em ambos os sexos, apresentando a quarta maior taxa de mortalidade dentre os tipos de câncer no mundo. Portanto é de fundamental importância entender os mecanismos que medeiam o desenvolvimento deste tipo de tumor e sua progressão até a metástase.

Durante a progressão deste tipo de câncer as células epiteliais sofrem alterações genéticas e morfológicas, sendo a desorganização do complexo juncional apical um dos eventos iniciais desse processo. As junções *tight* constituem a região mais apical deste complexo em células epiteliais, sendo responsáveis pela regulação do transporte paracelular, determinação da polaridade celular, assim como, eventos de sinalização celular relacionados com o processo tumorigênico, tais como a diferenciação e proliferação celular. As claudinas consistem na principal família de proteínas integrais de membrana que formam as JT. Diversos trabalhos têm demonstrado alterações na expressão das destas proteínas em diferentes tipos de câncer e estas alterações tem sido relacionada com a progressão tumoral.

Neste contexto é importante compreender os mecanismos que regulam a expressão das claudinas, uma vez que estas proteínas encontram-se com sua expressão alterada em diversos tipos de câncer epitelial. Além disso, pouco se sabe sobre os efeitos desta superexpressão na carcinogênese e o seu papel frente aos tratamentos do CCR. Com isso torna-se importante avaliar o papel da superexpressão da claudina após o tratamento com irradiação, para que seja possível fazer uma correlação entre a expressão da claudina e a radiorresposta celular e consequentemente indicar a claudina como um biomarcador indicativo de tratamento ou de prognóstico.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar os eventos celulares e moleculares relacionados a radiorresposta celular da progênie de células irradiadas que superexpressam claudina-3 em câncer colorretal.

3.2 Objetivos específicos

- a) Analisar a expressão e distribuição das proteínas da JT na progênie de células irradiadas que superexpressam claudina-3;
- b) Avaliar o papel da superexpressão da claudina-3 na resposta da progênie de células irradiadas;
- c) Avaliar o comportamento migratório, invasivo e metastático da progênie irradiada de células que superexpressam a claudina-3;
- d) Analisar o efeito da inibição das vias de sinalização de proliferação e sobrevivência na progênie de células irradiadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Anticorpos

Para detecção de proteínas, foram utilizados os seguintes anticorpos primários: policlonais produzidos em coelho anti-claudina-3 obtido da Invitrogen Co. Carlsbad, CA, EUA, monoclonais produzidos em coelho anti- α -tubulina (Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, EUA). Os anticorpos secundários utilizados para detecção de proteínas por quimioluminescência, foram os anti-coelho do tipo IgG conjugados à peroxidase adquiridos da (GE Healthcare Biosciences, Pittsburg, PA, EUA). Para os ensaios de imunofluorescência, foram utilizados anticorpos secundários anti-coelho do tipo IgG conjugado à Alexa fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). O EGF foi obtido da Invitrogen Co. e estocado na concentração de 100 μ g/mL, a -20° C.

4.2 Reagentes

O EGF foi obtido da Invitrogen Co., o 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one (LY294002, inibidor de PI3K) foi obtido da Sigma-Aldrich, e o 2-(2-amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one (PD98059, inibidor de MEK1) foi obtido da Cell Signaling. Soluções estoque de EGF (100 μ g/mL), LY294002 (8 mM) e PD98059 (50 mM) foram preparadas, diluídas em DMSO e estocadas a -20° C.

O Polibreno foi obtido da Fluka Chemie GmbH (Buchs, Suíça), o soro fetal bovino definido foi obtido da Hyclone Laboratories Inc. (Utah, EUA), a Puromicina e o [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (MTT) foram obtidos da Sigma-Aldrich, as colunas de Maxi-Prep da Invitrogen Co. e os insertos Tranwell da Corning Life Sciences (Lowell, MA, EUA).

4.3 Cultura de células

Neste estudo, foi utilizado a linhagem derivada de adenocarcinoma de cólon humano HT-29 obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EUA). Esta linhagem apresenta um fenótipo moderadamente indiferenciado, além de possuir um alto potencial invasivo e metastático (Simon-Assmann *et al.*, 2007). Esta linhagem apresenta mutações em *P53* e superexpressão de *H-Ras* (Halaschek-Wiener *et al.*, 2000). A linhagem embrionária de rim, HEK-293, foi obtida da ATCC. Estas células e a HT-29 foram utilizadas para transfecção e transdução, respectivamente.

As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, estreptomicina (60 mg/L) e penicilina G 100 mg/L, obtidos da Invitrogen Co. As culturas foram mantidas em uma atmosfera de 5% de CO₂, a 37° C. Para expansão da cultura, células em subconfluência foram lavadas com solução salina (PBS) e soltas da garrafa, incubando-as com uma solução de 0,25% de tripsina (Invitrogen Co.) diluída em PBS, por 2 – 5 minutos a 37° C. Em seguida as células foram transferidas para placa de 6 poços para ensaios bioquímicos, de migração celular e ensaios de proliferação, ou placa de 12 poços para ensaios dependentes e independentes de ancoragem, sobre lamínulas de vidro em placa de 24 poços para imunofluorescência, todas obtidas da TPP (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suíça) ou em insertos de membrana de policarbonato Transwell® (poros de 8 µm) (Corning, Inc. Tewksbury MA) revestidas com Matrigel® (BD Biosciences, San Jose, CA).

4.4 Tratamentos

4.4.1 Tratamento com EGF

As células HT-29 foram crescidas até a subconfluência e em seguida tratadas com o fator de crescimento epidermal (EGF) na concentração de 20 ng/mL (Invitrogen Co.) em meio contendo 10% de soro fetal bovino inativado por 24, 48 e 72 h.

4.4.2 Tratamento com radiação

As células HT-29 e HT-29 transduzidas com vetor vazio (pBABE) e vetor para superexpressar claudina-3 foram crescidas até a subconfluência, em seguida foram expostas a uma única dose de radiação (5Gy) a 25 ° C utilizando um irradiador gama de ¹³⁷Cs (IBL 437C da CIS Bio International, Codolet, França) a uma taxa de dose de 2,65 Gy / min. As células controle (não irradiadas) foram mantidas em meio DMEM e as células irradiadas mantidas em confinamento com o mesmo meio irradiado (meio condicionado) durante 24 h. Após este tempo, as células controle e irradiadas foram soltas incubando-se com uma solução contendo tripsina (com 0,05% de tripsina diluída em PBS); cultivadas em baixa densidade e mantidas até a formação de colônias progênes e então submetidas aos experimentos seguintes. A progênie derivada de células não irradiadas foram chamadas de "F1 pBABE CTR" e "F1 CLD3 CTR", e a progênie de células irradiadas foram chamadas de "F1 pBABE 5Gy" e "F1 CLD3 5Gy". Para fins experimentais, as células foram mantidas em garrafas de cultura, placas, lamínulas de vidro ou em insertos de membrana de policarbonato Transwell ®.

4.4.3 Tratamento com Inibidores

As células HT-29 transduzidas com vetor vazio (pBABE) e vetor para superexpressar claudina-3 foram crescidas até a subconfluência, em seguida foram tratadas com os inibidores farmacológicos PD98059 (inibidor da MEK) ou LY294002 (inibidor da PI3K) por 1 h. Em seguida as células foram ou não expostas à radiação como indicado no item 4.4, sendo mantidas no meio condicionado contendo os inibidores por 24 h.

4.5 **Construção dos vetores retrovirais**

O vetor contendo o cDNA para claudina-3, foi cedido gentilmente pelo Dr. Mikio Furuse (Universidade de Kyoto – Japão). Esse vetor foi digerido e o cDNA da claudina-3 foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*), utilizando o *primer forward* 5'-ACGCAGATCTGGTATCGATAAGCTTGATCCAGCAG-3', e o *primer reverse* 5'-AAAAGTCGACCAGTGGTATTTGTGAGCCAG-3'. Os produtos da PCR foram subclonados no vetor retroviral pBABE, sendo obtido o vetor e pBABE-Cld3 (contendo o cDNA para claudina-3).

4.6 **Produção do retrovírus recombinante e infecção de células alvo**

Foi utilizada a linhagem celular HEK-293, transfectada com o plasmídeo de empacotamento viral pCL-Ampho (Imgenex Co., CA, EUA) como célula empacotadora dos retrovírus. Essas células foram transfectadas de forma transiente por precipitação pela técnica do fosfato de cálcio. As células HEK-293 foram plaqueadas em placas de

Petri (10 cm de diâmetro), no total de 2×10^6 células/placa. Após 24 h, essas células foram transfectadas utilizando o DNA dos vetores retrovirais (pBABE e pBABE-Cld3) e de empacotamento (pCLAmpho) purificados por colunas de Maxi-Prep (Invitrogen), gerando as células HEKpBABE e HEK-Cld3, respectivamente. O DNA foi precipitado misturando-se: 10 μg de DNA do pCL-Ampho e 20 μg de DNA dos vetores retrovirais; 250 μL de tampão fosfato 2x (NaCl 280 mM; KCl 10 mM; Na_2HPO_4 1,5 mM; dextrose 12 mM; HEPES 50 mM; pH 7,1); 50 μL de CaCl_2 2,5 M e avolumando para 500 μL com H_2O deionizada. Essa solução foi então misturada avidamente por borbulhamento e incubada por 30 min em temperatura ambiente. Após esse tempo, o precipitado (500 μL) foi adicionado às células HEK-293. Após 24 h, as células HEK-293 transfectadas foram lavadas duas vezes com PBS, sendo adicionado posteriormente DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino definido (Hyclone Laboratories Inc, Utah, EUA). Nesse mesmo dia, as células alvo HT-29 foram cultivadas em placas de 6 poços (5×10^4 células/poço). No dia seguinte, os sobrenadantes das células HEK-293 contendo vírus foram coletados e centrifugados por 5 min a 500 g para retirar os debris celulares, e suplementados com 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de polibreno. A infecção viral das células HT-29 foi realizada incubando as mesmas com o sobrenadante obtido acima e com meio DMEM (1:1). Logo, as células foram centrifugadas duas vezes a 400 g por 45 min com intervalo de 90 min entre as centrifugações.

4.7 Construção das linhagens celulares HT-29-pBABE e HT-29-CLD3

As células HT-29-pBABE (contendo o vetor vazio) e HT-29-CLD3 (superexpressando claudina-3) foram geradas por transdução das células HT-29 com os vetores retrovirais pBABE e pBABE-Cld3. Os sobrenadantes condicionados e concentrados das células HEK-pBABE e HEK-Cld3, transfectadas com os vetores mencionados, foram adicionados às células HT-29 (5×10^4 células), sendo incubados por 24 horas. Depois de infectadas, as células foram selecionadas pelo antibiótico puromicina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 3 dias e posteriormente clones foram isolados para gerar

diversas linhagens clonais. A superexpressão da claudina-3 foi demonstrada por *immunoblotting*.

4.8 Obtenção de lisados celulares

Após os tratamentos, as progênies irradiadas e controle foram lavadas duas vezes com PBS e homogeneizadas em tampão de extração (Triton X-100 1%, Deoxicolato 0,5%, SDS 0,2%, NaCl 150mM, Hepes 10 mM, pH 7,3, EDTA 2 mM, Ortovanadato 2 mM, NaF 20 mM, leupeptin 10 µg/ml e pepstatina 1 mg/mL) e coquetel de inibidores de protease (1:100) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA) durante 30 min a 4°C por 30 min. Em seguida foram submetidas a centrifugação por 10 minutos (10.000 g) a 4°C e o sobrenadante foi coletado para análise posterior. Para quantificação de proteínas foi utilizado o kit comercial BCA (Bioagency, São Paulo, SP, Brasil).

4.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE) e *Imunoblotting*

Para analisar a expressão de proteínas, fez-se uma separação por SDS-PAGE, utilizando géis contendo 13% de bis-acrilamida. Logo, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando-se um aparelho de transferência semi-seco (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EUA), a 10 V por 60 minutos. Para realização do *immunoblotting*, a membrana foi mantida em tampão de bloqueio, contendo TBS-T (20 mM de Tris-HCl pH 7.6, 137 mM de NaCl e 1% de tween 20) e 5% de leite desnatado, durante 60 min e logo incubada por 2h ou *overnight* com anticorpos primários: anti-Claudina-3 (diluição 1:1000) (Invitrogen Co.) e anti- α -tubulina (diluição 1:2000) (Cell Signaling Technology, Inc.). Após sucessivas lavagens com TBS-T, fez-se a incubação com os respectivos anticorpos secundários por 60 min: anti-coelho e

conjugado à peroxidase (HRP), diluição 1:50000. As membranas passaram por várias lavagens com TBS-T antes de serem reveladas por quimioluminescência, utilizando um kit ECL (GE Healthcare), e autoradiografia. A quantificação dos níveis protéticos foi realizada por análise densitométrica usando software LabWorks 4.6 (Bio-Rad, Upland, CA, EUA).

4.10 Imunofluorescência

As células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro até formarem colônias. O meio DMEM foi retirado e as células foram lavadas com PBS e fixadas com metanol 100%, durante 20 min a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após fixação foram lavadas e re-hidratadas com PBS (pH 8,0). Posteriormente, foram bloqueadas com BSA 0,2% por 60 min. Em seguida foram incubadas *overnight* com o anticorpo primário anti-claudina-3 (diluição 1:30), e por mais 1 h com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado à Alexa fluor 488 (diluição 1:500). Posteriormente, as lamínulas foram lavadas 5 vezes com PBS e montadas em solução contendo n-propil-galacto, e analisadas usando um microscópio invertido Axio Observer Z1 (Carl Zeiss Inc, Oberkochen, Alemanha) acoplado a uma câmera Axioacam MRc5, e ao programa de processamento de imagens Axiovision Release 4.8.1 (Carl Zeiss Inc).

4.11 Medição da resistência elétrica transepitelial

Para avaliar a funcionalidade da função de barreira das JTs, 3×10^4 células controle e irradiada foram crescidas em insertos Transwell® até atingirem confluência. Após esse período os valores da resistência elétrica transepitelial (TER, do inglês *transepithelial electrical resistance*) foram determinados usando um sistema Millicel®-ERS (EMD Millipore Co.; Billerica, MA, EUA). Todos os valores da TER foram

normalizados para área do inserto e obtidos após subtração do *background* (TER do inserto contendo meio de cultura).

4.12 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Monocamadas de células controle e irradiada cultivadas em insertos Transwell 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) contendo 6 mg/mL de vermelho de rutênio por 1 h, em agitação protegido da luz. Logo após, foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M contendo 6 mg/mL de vermelho de rutênio por 3 vezes, durante 10 min cada, em agitação e protegido da luz. Em seguida foram pós-fixadas por 45 min em uma solução contendo tetróxido de ósmio 1 %, ferrocianeto de potássio 0,8 %, 5 mM de CaCl_2 e 6 mg/mL de vermelho de rutênio em tampão cacodilato 0,1 M, em agitação protegidas da luz. As membranas foram então lavadas em tampão cacodilato 0,1 M por 3 vezes em agitação e protegidas da luz, durante 10 min cada, desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30%, 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 Ultramicrotomo (Leica Microsystem, Wetzlar, Alemanha), contrastados com citrato de chumbo (5 min) e analisados usando um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900 (Carl Zeiss Inc.).

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

As células controle e irradiada foram cultivadas (7×10^4 células) em placas de 12 poços até atingirem a confluência. Posteriormente, uma região da monocamada celular foi raspada com uma ponteira estéril de 10 μL e a região raspada foi acompanhada por

6 h usando o microscópio invertido Axio Observer Z1 (Carl Zeiss Inc). As imagens foram capturadas usando a câmera AxioCam MRc5, e ao programa de processamento de imagens Axiovision Release 4.8.1 (Carl Zeiss Inc). A distância de migração foi avaliada em três experimentos independentes e foi medida utilizando o software ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA) para quantificar a distância a partir das bordas da região raspada. Os valores obtidos foram utilizados para calcular a porcentagem de migração das células, através da relação entre o tamanho da região raspada após 6 h e o tamanho da região raspada em 0 h. Tais valores foram plotados num gráfico utilizando-se o software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

4.14 Ensaio de invasão celular

3×10^4 células foram cultivadas na superfície superior de insertos de membrana de policarbonato Transwell® (poro de 8 μm ; Corning Inc.), revestido com 30 μL de Matrigel® (BD Biosciences) diluído 1:10 em 200 μL de DMEM isento de SFB. Utilizou-se meio DMEM suplementado com 10% de SFB como um quimioatraente na parte inferior da câmara, e após 24 h de incubação a 37° C, o gel que revestia a superfície superior da membrana foi retirado com uma haste de algodão, uma vez que as células que atravessaram o gel são aquelas que invadiram e conseqüentemente encontram-se na parte inferior da membrana. A membrana foi então fixada com etanol 100% (10 min), coradas com violeta de cristal e analisadas ao microscópio Axio Observer Z1. O número de células que invadiram foi expresso como a média quantificada a partir de quatro campos aleatórios analisados sob o microscópio. Os valores são representados no gráfico como o número de vezes que as células invadiram em relação ao controle (onde os dados do grupo controle foram normalizados para 1) e correspondem a média de ensaios em triplicata, em três experimentos independentes.

4.15 Ensaio de formação de colônia dependente de ancoragem

Células foram cultivadas em densidade baixa ($2,5 \times 10^2$ células) em placas de 12 poços, durante sete dias, para determinar o efeito da irradiação sobre o potencial de formação de colônias. Ao final do experimento, as células foram fixadas com etanol 100% durante 10 minutos e incubadas, subsequentemente, com solução contendo cristal violeta (cristal violeta 0,05% em etanol 20%) por 10 min. Após lavagem com água destilada, metanol 100% foi utilizado para eluir o corante, sendo posteriormente quantificado por espectrofotometria, utilizando o espectrofotômetro Spectra Max 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), a um comprimento de onda de 595 nm. Os valores de absorbância foram utilizados para fazer uma relação com o grupo controle (onde os dados do grupo controle foram normalizados para 1) e correspondem a média de ensaios em triplicata, em três experimentos independentes.

4.16 Ensaio de formação de colônia independente de ancoragem

500 células/poço foi crescida em placas de 12 poços. Essas placas foram previamente revestidas com 0,5 ml de agarose semi sólida 0,6%. Após a solidificação da agarose, as células foram plaqueadas em uma solução contendo meio DMEM com 10% de soro e 0,3% de agarose. Posteriormente, foi adicionado meio com soro na parte superior. As células foram cultivadas por 11 dias à 37° C, em uma atmosfera de 5% CO₂. Ao final do experimento, as colônias formadas foram observadas e contadas no microscópio invertido Axio Observer Z1 (Carl Zeiss Inc). As imagens das colônias representativas foram digitalizadas utilizando uma câmera AxioCam MRc5, acoplada ao programa de processamento de imagens Axiovision Release 4.8.1 (Carl Zeiss Inc). O número de colônias foi expresso como a média quantificada a partir de quatro campos aleatórios analisados sob o microscópio. Os valores são representados no gráfico como

o número de colônias formadas em relação ao controle (onde os dados do grupo controle foram normalizados para 1) e correspondem a média de ensaios em triplicata, em três experimentos independentes.

4.17 Ensaio de proliferação celular

2×10^3 células, foram cultivadas, em placas de 96 poços. Após o período de aderência (aproximadamente 4 horas), as células foram mantidas em cultura no período de 6, 24, 48 e 72 h. A cada dia foi retirada uma placa para ser analisada com o cristal violeta. Cada placa foi lavada com PBS e fixada em etanol 100% por 10 minutos. Posteriormente, foram incubadas com uma solução contendo cristal violeta (cristal violeta 0,05% em etanol 20%) por 10 minutos e, logo após, lavadas com água destilada e em seguida foi colocado metanol por 5 minutos. A quantificação colorimétrica foi realizada no leitor de Elisa (Spectra Max 190, Molecular Devices) a um comprimento de onda de 595 nm. Os valores de absorbância foram utilizados para fazer uma relação com o grupo controle (onde os dados do grupo controle foram normalizados para 1) e correspondem a média de ensaios em triplicata, em três experimentos independentes.

4.18 Análise estatística

Análise estatística foi realizada com o programa GrafPad Prism 4 (GrafphPad Software), utilizando o teste t de Student. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

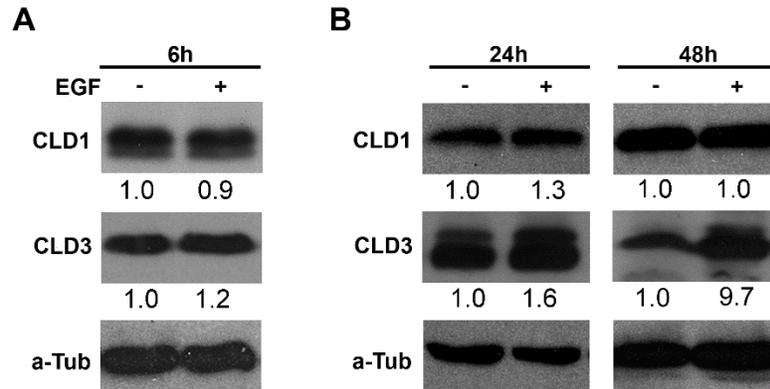
5.1 EGF regula os níveis proteicos de claudina-3 em células HT-29

As claudinas são as principais constituintes das JT, atuam na regulação da permeabilidade paracelular e na polaridade celular sugerindo que estas proteínas contribuem para a supressão de tumores em determinadas neoplasias, como, por exemplo, câncer de pâncreas, adenocarcinoma de pulmão e cólon (Michl *et al*, 2003; Chao *et al*, 2009; Oliveira *et al*, 2005).

Diversos trabalhos têm relacionado o tratamento com EGF a alterações das proteínas das JT. Singh & Harris (2007) mostraram que células MDCK tratadas com EGF apresentam um aumento nos níveis proteicos das claudinas 1, 3 e 4, concomitantemente à diminuição da claudina-2, alterações acompanhadas pelo aumento na resistência elétrica transepitelial (TER, do inglês *transepithelial electrical resistance*). Em células de câncer ovariano, o tratamento com EGF diminuiu a expressão das claudinas 3 e 4, causando aumento da RET. Os efeitos foram revertidos utilizando inibidores de EGFR, MAPK ou PI3K (Ogawa *et al*, 2012).

Com intuito de determinar se o EGFR também estaria envolvido com a regulação das claudinas 1 e 3 em CCR, células HT-29 foram tratadas com EGF, sendo os níveis proteicos da claudina 1 e 3 analisados por *immunoblotting*. Como visualizado na figura 9 em tempos iniciais (6 h) não houve alteração nos níveis de claudina 1 e 3, no entanto o 48 h de tratamento com EGF aumentou nove vezes o nível proteico de claudina-3 em células HT-29. Uma vez que o tratamento demonstrou um efeito mais expressivo nos níveis proteicos de claudina-3, partimos para avaliar qual o efeito do aumento da expressão da claudina-3 nas células.

Figura 9 - Efeito do EGF na expressão das claudinas 1 e 3 em células HT-29

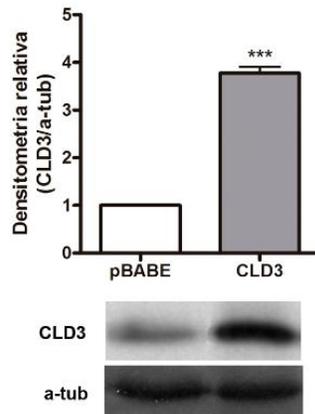


Legenda: Células foram tratadas com EGF e a expressão das claudinas 1 e 3 foi analisada por *imunoblotting*. A) Em tempos iniciais (6 h) de tratamento com EGF e em tempos tardios (24 e 48 h) (B). A α -tubulina foi utilizada como controle endógeno de expressão proteica. Os valores indicados abaixo dos blottings representam a razão de densidade óptica entre a amostra tratada com EGF e a controle (EGF/CTR) após a normalização pela α -tubulina.

5.2 Superexpressão de claudina-3 contribui para o processo de malignização das células

Diversos trabalhos têm demonstrado uma correlação entre o aumento da expressão de claudina-3 e o aumento da capacidade migratória e invasiva de células de ovário (Agarwal *et al.*, 2005), ao pior prognóstico em câncer de ovário (Choi *et al.*, 2007) e em carcinoma urotelial de trato urinário superior (Nakanishi *et al.*, 2008). Em um trabalho prévio o nosso grupo demonstrou aumento na expressão proteica de claudina-3 em pacientes com CCR (Oliveira *et al.*, 2005). Uma vez que o tratamento com EGF provocou um aumento na expressão de claudina-3, decidimos para avaliar o papel da superexpressão de claudina-3 em eventos celulares característicos da malignização celular. Para isso utilizamos células HT-29 transduzidas com vetor vazio (pBABE) ou vetor para superexpressar claudina-3 (CLD3). Primeiramente avaliamos a eficiência do método de transdução por *imunoblotting*. Foi possível observar que após da transdução houve um aumento de mais de três vezes na expressão proteica de claudina-3 (Fig. 10).

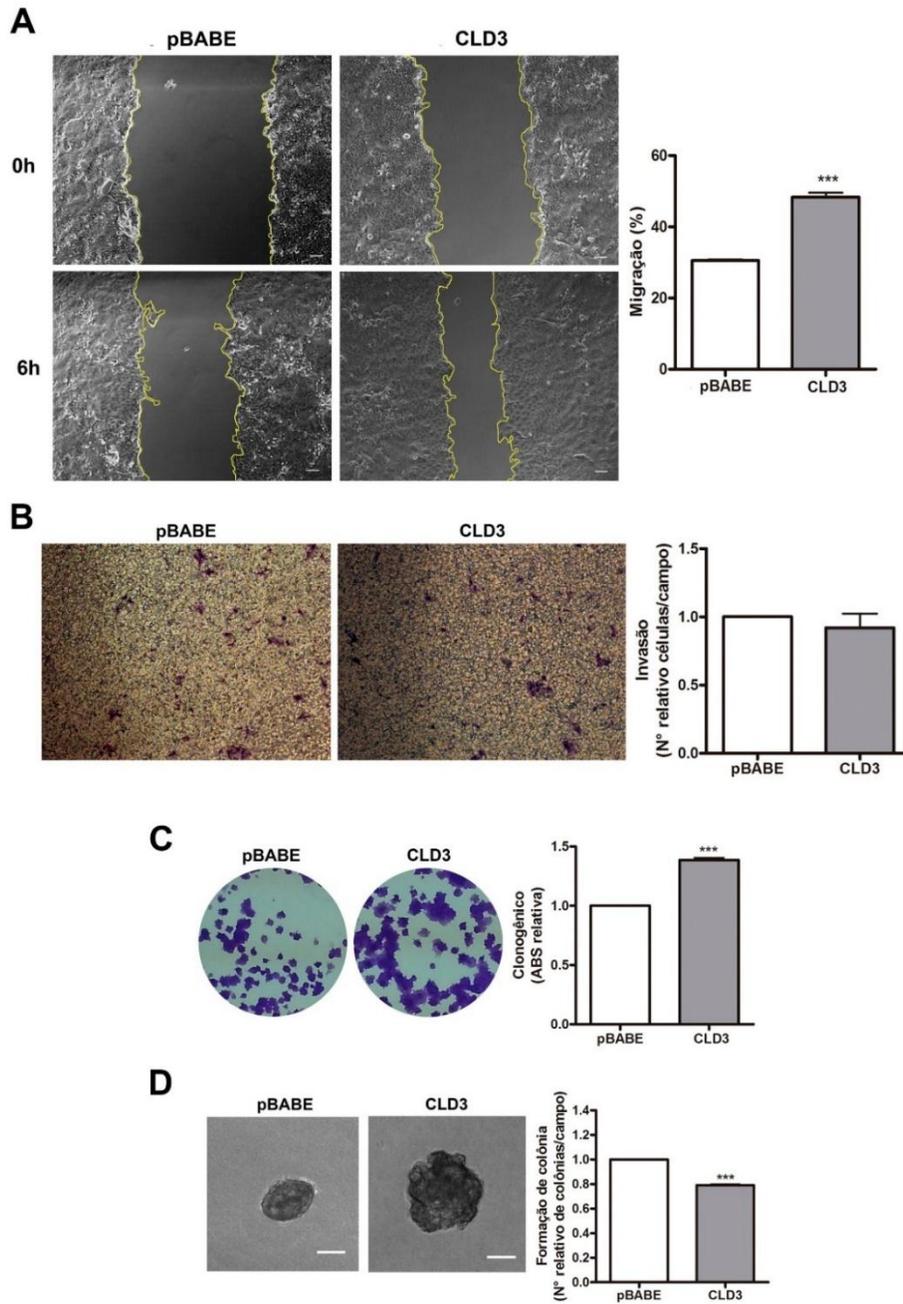
Figura 10 - Avaliação do método de transdução para superexpressão de claudina-3 em células HT-29



Legenda: Células HT-19 foram transduzidas com vetor vazio (pBABE) ou vetor contendo cDNA da claudina-3 e a eficiência do método foi avaliado por *imunoblotting*. O gráfico representa os dados normalizados da expressão da proteína claudina-3 em relação ao controle. A α -tubulina foi utilizada como controle endógeno de expressão proteica. Dados representativos de ensaios em triplicata em três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste-*t* de Student onde, ***, $p < 0,001$ quando comparado com pBABE.

Em seguida foi avaliado o efeito da superexpressão de claudina-3 na migração, invasão, formação de colônia dependente de ancoragem e formação de colônia independente de ancoragem. Foi observado um aumento de 60 % no potencial migratório das células HT-29 que superexpressam claudina-3 (Fig. 11A), no entanto não houve alteração na capacidade invasiva destas células (Fig. 11B). Foi verificado, também, que a superexpressão de claudina-3 aumenta em 30 % a capacidade das células de formar colônia dependente de ancoragem (Fig. 11C), porém quando foi avaliado a capacidade de formar colônias em meio não aderente houve uma diminuição de aproximadamente 20 % no número de colônias formadas. No entanto, as colônias formadas foram maiores do que as colônias formadas por células transduzidas com vetor vazio (Fig.11D). Estes resultados indicam que a superexpressão de claudina-3 contribui para a malignização das células.

Figura 11 - Efeito da superexpressão de claudina-3 na capacidade migratória, invasiva e de formação de colônia dependente e independente de ancoragem

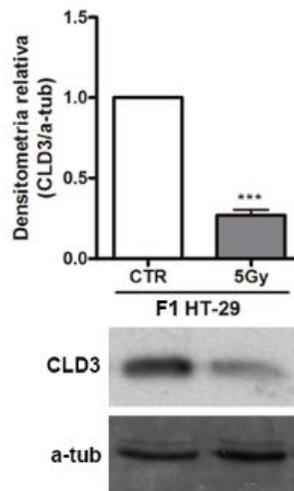


Legenda: A) Ensaio de migração celular. As regiões raspadas foram fotografadas logo após o risco ser feito (0 h) e 6 h depois. Barra = 100 μ m. O gráfico representa os dados da área do risco que foi fechada pelas células (área em 6 h / área em 0 h) em porcentagem. B) Ensaio de invasão. As células foram coradas com cristal violeta. O gráfico representa os valores relativos do número de células/campo. C) Ensaio de formação de colônia dependente de ancoragem. As células foram coradas com cristal violeta. O gráfico representa os valores de densidade óptica relativa do ensaio de formação de colônia. D) Ensaio de formação de colônia independente de ancoragem. O gráfico representa os valores relativos do número de colônias/campo. Barra: 10 μ m. Dados representativos de ensaios em triplicata em três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste-*t* de Student onde, ***, $p < 0,001$.

5.3 Efeito da radiação sobre a expressão de claudina-3 em progênie de células HT-29 derivadas de parentais irradiadas

Considerando que o nível de expressão de claudina-3 encontra-se aumentado em amostra de pacientes de CCR (Oliveira *et al.*, 2005) e que a radiação é um dos tratamentos de primeira linha para o câncer de reto, decidimos avaliar se a radiação altera os níveis proteicos da claudina-3 na progênie sobreviventes de células HT-29. Para isso foi realizado o cultivo da progênie de células HT-29 irradiadas ou não seguido de extração total de proteínas e *immunoblotting*. Como resultado foi observado que a radiação diminui em 73 % a expressão de claudina-3 na progênie de células HT-29 resistentes à radiação (Fig. 12).

Figura 12 - Análise da expressão proteica de claudina-3 na progênie de células HT-29 derivada de parentais irradiadas

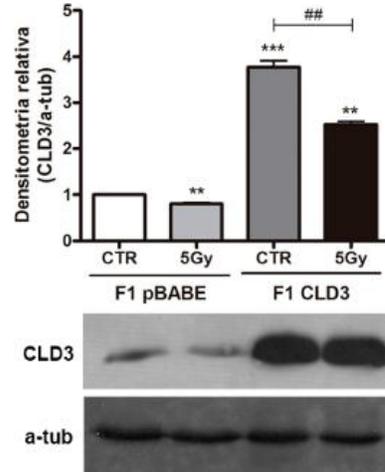


Legenda: As células foram irradiadas, mantidas por 24h, soltas e em seguida plaqueadas para realização do ensaio por *immunoblotting*. O gráfico representa os dados normalizados da expressão da proteína claudina-3 em relação ao controle. A α -tubulina foi utilizada como controle endógeno de expressão proteica. Dados representativos de ensaios em triplicata em três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste-*t* de Student onde, ***, $p < 0,001$ quando comparado com F1 HT-29 CTR

Tendo em vista o papel do aumento da expressão da claudina-3 no aumento do potencial maligno de células de CCR, foi avaliado a influência da superexpressão de claudina-3 na radorresposta celular. A figura 13 mostra que o aumento dos níveis pela expressão forçada da claudina-3 foi reduzido em 33 % após a radiação.

Juntos, estes resultados mostram que a radiação diminui a expressão proteica de claudina-3 em ambas as progênes irradiadas (5Gy).

Figura 13 - Análise da expressão proteica de claudina-3 na progênie de células HT-29 derivada de parentais irradiadas que superexpressam claudina-3



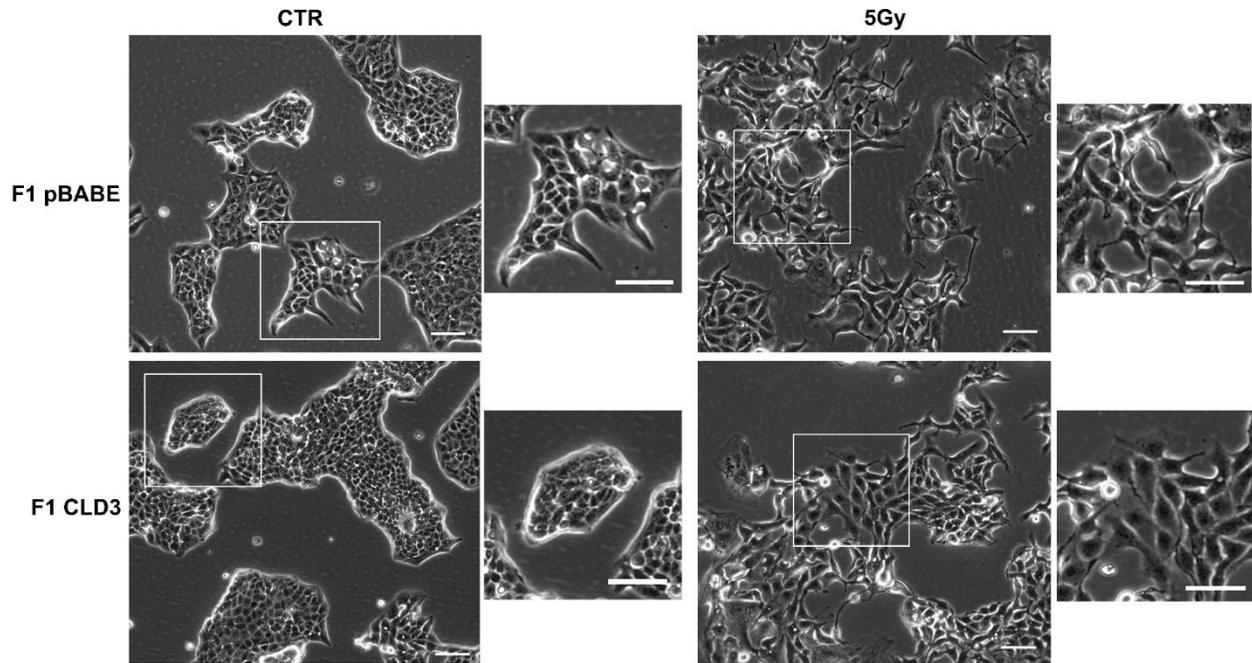
Legenda: O gráfico representa os dados normalizados da expressão da proteína claudina-3 em relação a progênie controle (CTR) de células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABA). A α -tubulina foi utilizada como controle endógeno de expressão proteica. Dados representativos de ensaios em triplicata em três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste-*t* de Student onde, **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ quando comparado com F1 pBABA CTR. ##, $p < 0,01$ quando comparado com F1 CLD3 CTR.

5.4 Superexpressão de claudina 3 minimiza alterações morfológicas causadas pela radiação

Estudos anteriores têm mostrado que a radiação induz alterações morfológicas, em células epiteliais em tempos curtos após o tratamento, tais como a perda dos contatos célula-célula (De Carvalho *et al.*, 2006) e a aquisição de um fenótipo fibroblástico (Nagarajan *et al.*, 2012). No entanto, são raros os estudos que focam na progênie sobrevivente em momentos tardios após o tratamento com a radiação (Bastos *et al.*, 2014). Como observado na figura 14 a progênie irradiada (5Gy) de células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE) apresentou uma morfologia aberrante quando comparada com a progênie controle (CTR) de células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE), deixando de formar colônias coesas e passando a apresentar células mais dispersas e alongadas, com fenótipo similar a um fibroblasto. Por outro lado, a progênie controle de células que superexpressam a claudina-3 (F1 CLD3) aparentaram formar colônias mais compactas e com bordas mais bem definidas do que a progênie controle (CTR) de células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE). E quando irradiadas (5Gy), as células F1 CLD3, apesar de também apresentarem colônias menos coesas, mantiveram um fenótipo mais similar ao de células epiteliais, menos dispersas e alongada.

Estes resultados mostram que em comparação com a progênie irradiada (5Gy) de células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE), a progênie irradiada de células que superexpressam claudina-3 (F1 CLD3) apresentam alterações morfológicas menos acentuadas.

Figura 14 - O efeito da radiação sobre a morfologia de em células que superexpressam ou não claudina-3



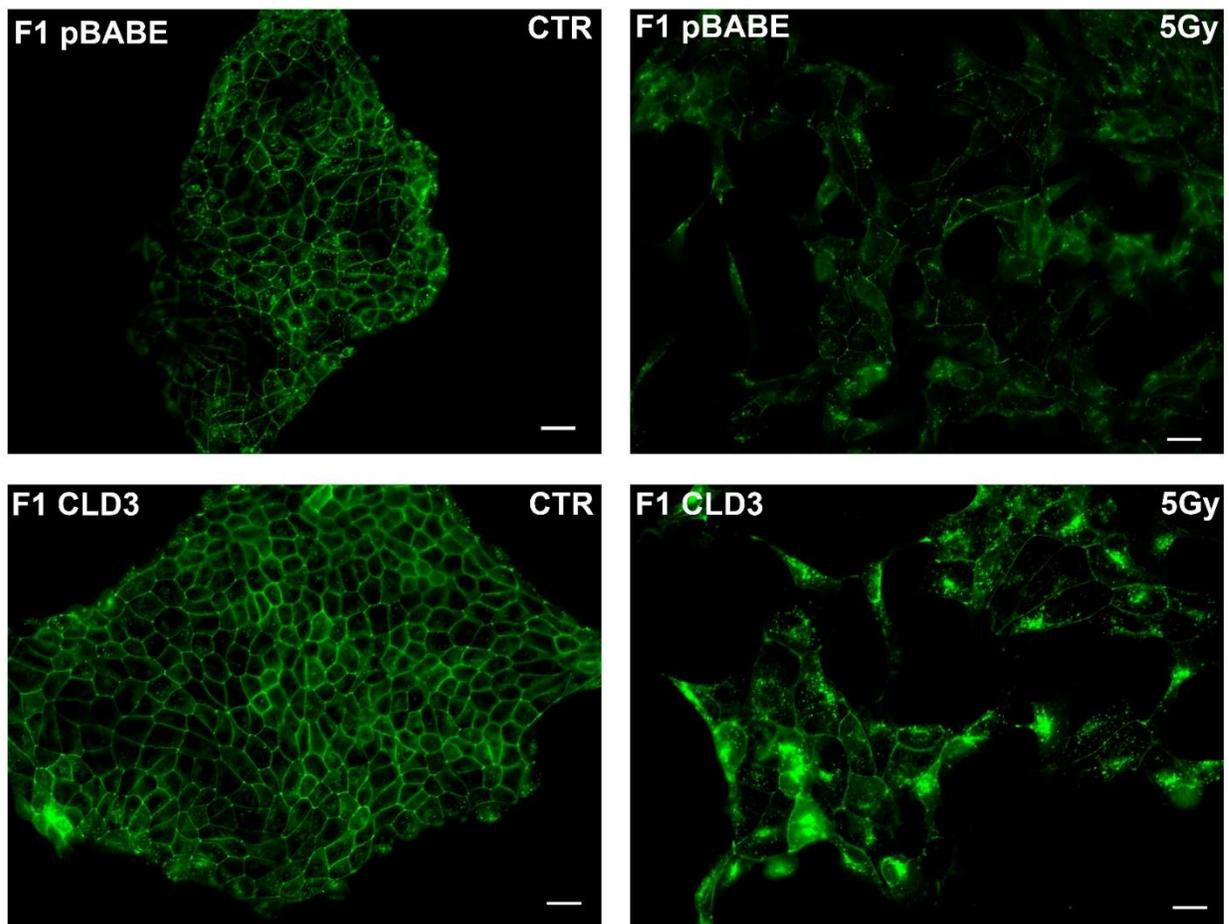
Legenda: As células foram tratadas com indicado e a morfologia celular da F1 pBABE e F1 CLD3 foi analisada por microscopia de contraste de fase. Imagens representativas de 3 experimentos independentes. Barra: 10 μ m.

Em seguida foi realizado o ensaio de imunofluorescência para avaliar a localização subcelular da claudina-3 após a irradiação. Na figura 15 é possível observar que as progêneses controle (CTR) (F1 pBABE e F1 CLD3) apresentam uma distribuição contínua de claudina-3 ao longo das junções com acúmulo na junção entre três células. De acordo com o resultado encontrado na análise da expressão proteica (Fig. 13) visualizamos uma menor intensidade de sinal da claudina-3 na progênie irradiada (5Gy) de células HT-29 transduzidas com vetor vazio (pBABE), além de apresentarem, também, um padrão de distribuição descontínuo das claudinas nas junções remanescentes entre duas células (Fig. 15). A progênie irradiada (5Gy) de células que superexpressam claudina-3 (F1 CLD3) também apresentaram diminuição na intensidade do sinal, no entanto mais claudina-3 manteve-se no contato célula-célula

quando comparada com a progênie irradiada de células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE).

Estes resultados demonstram que comparando, a progênie de células irradiadas (5Gy) que superexpressam claudina-3 (F1 CLD3) com aquelas transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE), as primeiras apresentam alterações morfológicas menos acentuadas e uma maior retenção de claudina-3 nos contatos, sugerindo que superexpressão de claudina-3 poderia estar impedindo a perda dos contatos célula-célula.

Figura 15 - Análise da distribuição subcelular da claudina-3



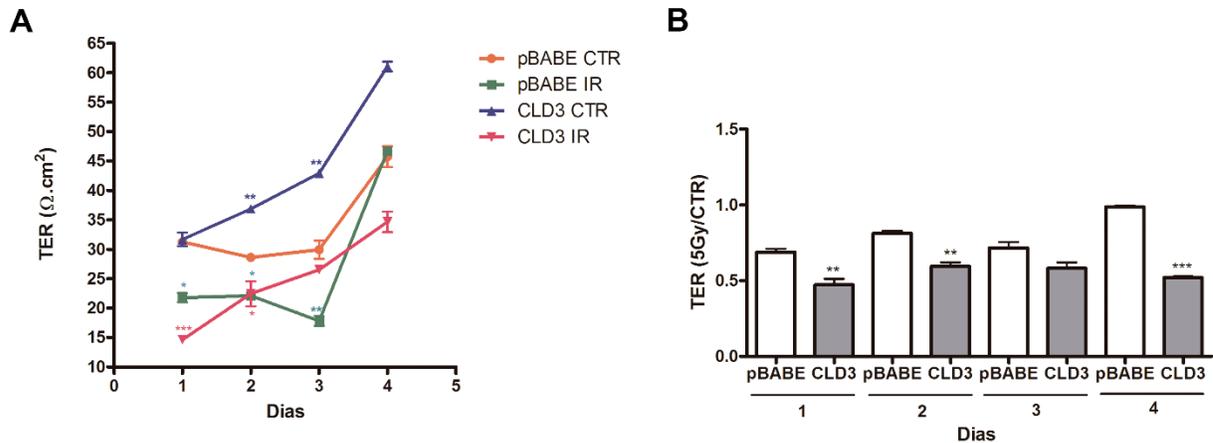
Legenda: As células F1 pBABE e F1 CLD3 foram cultivadas em lamínulas até a formação de colônias e a distribuição de claudina-3 foi analisada por imunofluorescência. Imagens representativas de 3 experimentos independentes. Barra: 10 μ m.

5.5 Superexpressão de claudina-3 diminui a resistência elétrica transepitelial após irradiação, porém não altera o efeito da radiação na permeabilidade à macromoléculas

A função de barreira é de extrema importância para a manutenção da homeostase tecidual, pois regula a passagem de íons e solutos dependendo da necessidade do tecido. Assim, alterações da barreira epitelial podem causar, um aumento na passagem de solutos aumentando a disponibilidade, por exemplo, de proteínas ligantes aos receptores de fatores de crescimento que se encontram na membrana basolateral, induzindo assim toda a cascata de sinalização que pode levar ao aumento da proliferação, a evasão da apoptose e eventos relacionados com o desenvolvimento da transição epitélio-mesenquimal (EMT).

Um dos mecanismos usados para avaliar a funcionalidade das JTs é avaliar a permeabilidade paracelular, para isso foi utilizado o ensaio de resistência elétrica transepitelial (TER) que quantifica resistência das junções à passagem de íons. A figura 16A apresenta os dados absolutos da TER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) e é possível observar que a superexpressão de claudina-3 causa um aumento gradativo, de aproximadamente 30 %, na TER ao longo dos dias na progênie controle (F1 CLD3) quando comparada com a progênie controle de células transduzidas com vetor vazio (pBABE), indicando que a superexpressão de claudina-3 diminui a passagem de íons. Além disso, verificamos que a irradiação causou uma diminuição de aproximadamente 40 % na TER progênie de células que superexpressam claudina-3 (F1 CLD3). A figura 16B apresenta os dados relativos (5Gy/CTR) de cada progênie ao longo dos dias e neste resultado foi possível observar que na progênie irradiada (5Gy) de células que superexpressam claudina-3 a diminuição da TER foi mais evidente.

Figura 16 - Avaliação da resistência elétrica transepitelial na progênie de células que superexpressam ou não claudina-3



Legenda: As células F1 pBABE e F1 CLD3 foram crescidas em inserto Transwell® até atingir a confluência em seguida e foi realizado o ensaio de TER durante 4 dias. A) O gráfico representa os valores absolutos da TER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) de cada progênie. B) Representa o gráfico da TER relativa (5Gy/CTR) em cada dia. Análise estatística realizada pelo teste-*t* de Student onde, *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ quando comparado com F1 pBABE CTR.

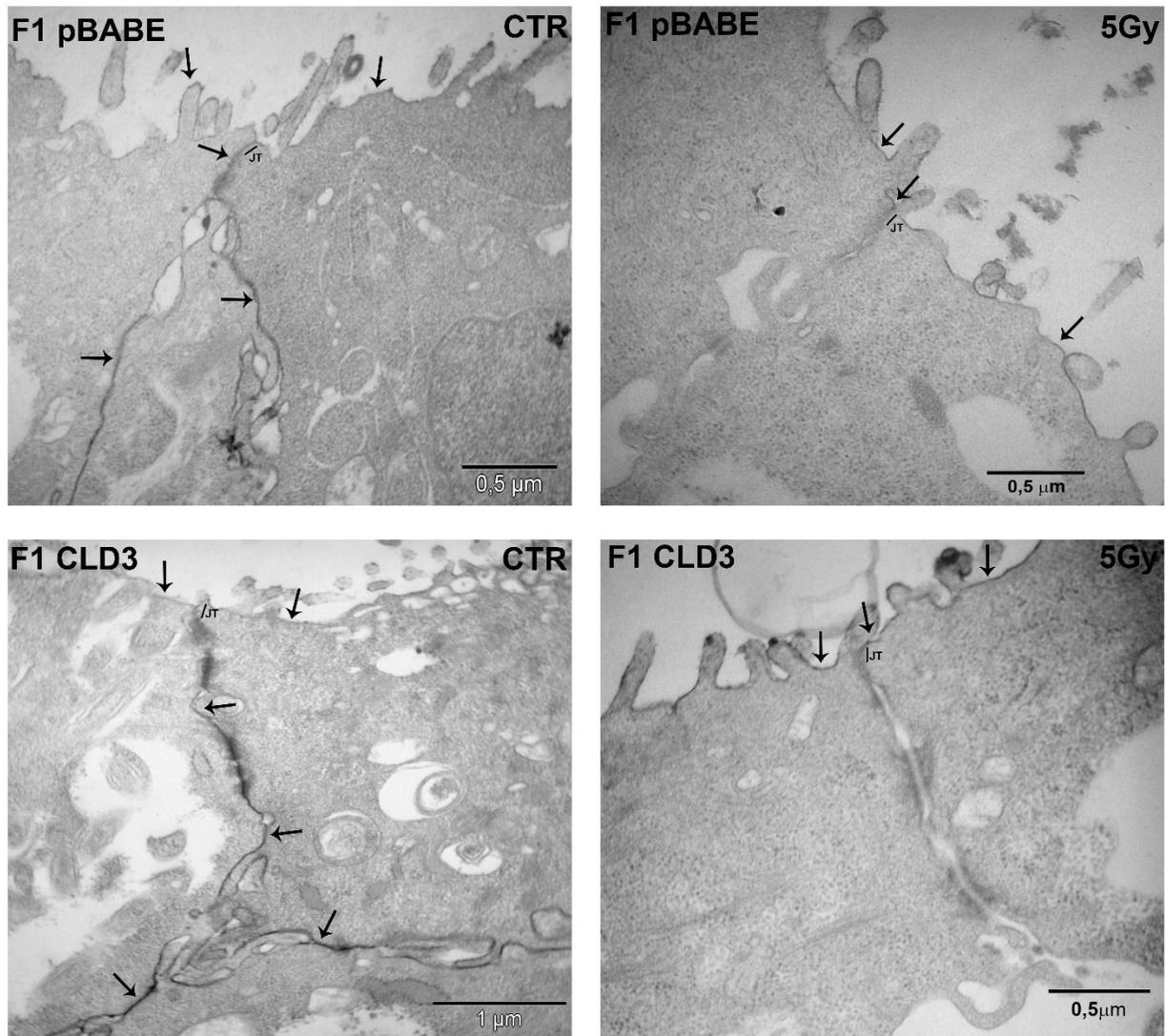
Em seguida foi avaliado a permeabilidade à macromolécula através do ensaio de vermelho de rutênio e análise por microscopia eletrônica. Este ensaio permite verificar a funcionalidade das JTs. Em condições onde as JTs estão funcionais o vermelho de rutênio, que é colocado apenas na região apical da monocamada de células, fica limitado apenas a esta região. Quando a JT não está funcional ou perturbada, o o vermelho de rutênio é capaz de atravessar a barreira paracelular e atingir a superfície basolateral das células. Este corante é visto como um material eletrondenso por microscopia eletrônica.

A figura 17 mostra que em ambas as progênie controle (CTR) as JTs não estão funcionais, deixando assim permear o vermelho de rutênio para a região basolateral. No entanto, a radiação foi capaz de reverter este efeito independente da superexpressão de claudina-3.

Estes resultados indicam que a superexpressão de claudina-3 causa diminuição na passagem de íons em células não irradiadas e provoca um aumento na passagem de íons após a irradiação quando comparadas com células irradiadas que não

superexpressam claudina-3. No que se refere a permeabilidade a macromoléculas a superexpressão de claudina-3 aparentemente não causa efeito após a irradiação.

Figura 17 - Análise da permeabilidade a macromoléculas após a irradiação



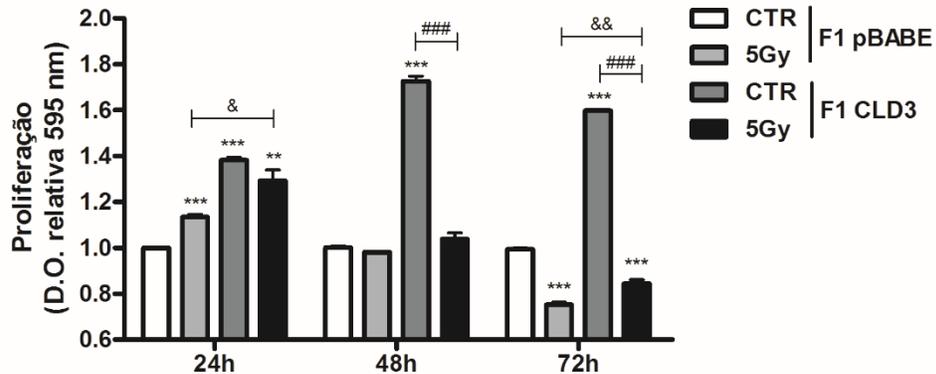
Legenda: As células F1 pBABE e F1 CLD3 foram crescidas em inserto Transwell® por 4 dias após a confluência e a permeabilidade a macromoléculas foi analisada pela técnica de vermelho de rutênio e microscopia eletrônica. Eletromicrografias obtidas a partir de um experimento independente.

5.6 Superexpressão de claudina-3 aumenta o potencial proliferativo das células

Durante a progressão tumoral a evasão dos mecanismos supressores do crescimento e sinalização de proliferação sustentada são considerados marcadores para a tumorigênese (Hanahan & Weinberg, 2012). No presente estudo, para determinar se a superexpressão de claudina-3 altera o potencial proliferativo e avaliar o efeito da radiação na proliferação das progênes sobreviventes à radiação, foi avaliada a proliferação celular. Observamos que na progênie transduzida com vetor vazio (F1 pBABE) a radiação só teve efeito na diminuição de 25 % na proliferação em 72 h quando comparadas com a progênie controle (CTR) de células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE) (Fig. 18). No entanto, quando avaliamos o papel da superexpressão de claudina-3 observamos que há um aumento gradativo (35 %) na taxa proliferativa da progênie controle (CTR) que superexpressa claudina-3 (F1 CLD3) em comparação a progênie controle (CTR) de células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE) em todos os horários (24, 48 e 72 h). Foi verificado, também, que a progênie irradiada (5Gy) de células que superexpressam claudina-3 (F1 CLD3) a radiação tem um efeito mais evidente, uma vez que esta progênie apresenta maior queda na taxa proliferativa, em torno de 50 %, comparada com a progênie controle (CLD3) que superexpressa claudina-3 (F1 CLD3) (Fig. 18). Demonstrando que o aumento da proliferação causada pela superexpressão de claudina-3 pode ser revertido com a radiação.

Estes resultados indicam que em tempos tardios a irradiação é capaz de diminuir a proliferação em ambas as progênes, e este efeito é mais evidente na progênie de células que superexpressam claudina-3.

Figura 18 - Efeito da radiação sobre a capacidade proliferativa das progênies irradiadas que expressam ou não claudina-3



Legenda: As células controle (CTR) e irradiadas (5Gy) F1 pBABE e F1 CLD3 foram cultivadas por 24, 48 e 72 h para realização do ensaio de proliferação celular pela técnica de cristal violeta. Resultados representativos de três experimentos independentes. Análise estatística: Teste t de *Student*. **, p < 0,01; ***, p < 0,001, análise estatística comparando com F1 pBABE CTR; ###, p < 0,001 análise estatística comparando com F1 CLD3 CTR; &, p < 0,05; &&, p < 0,01 análise estatística comparando com F1 pBABE 5Gy.

5.7 Radiação diminui o potencial migratório da progênie derivada de células parentais irradiadas

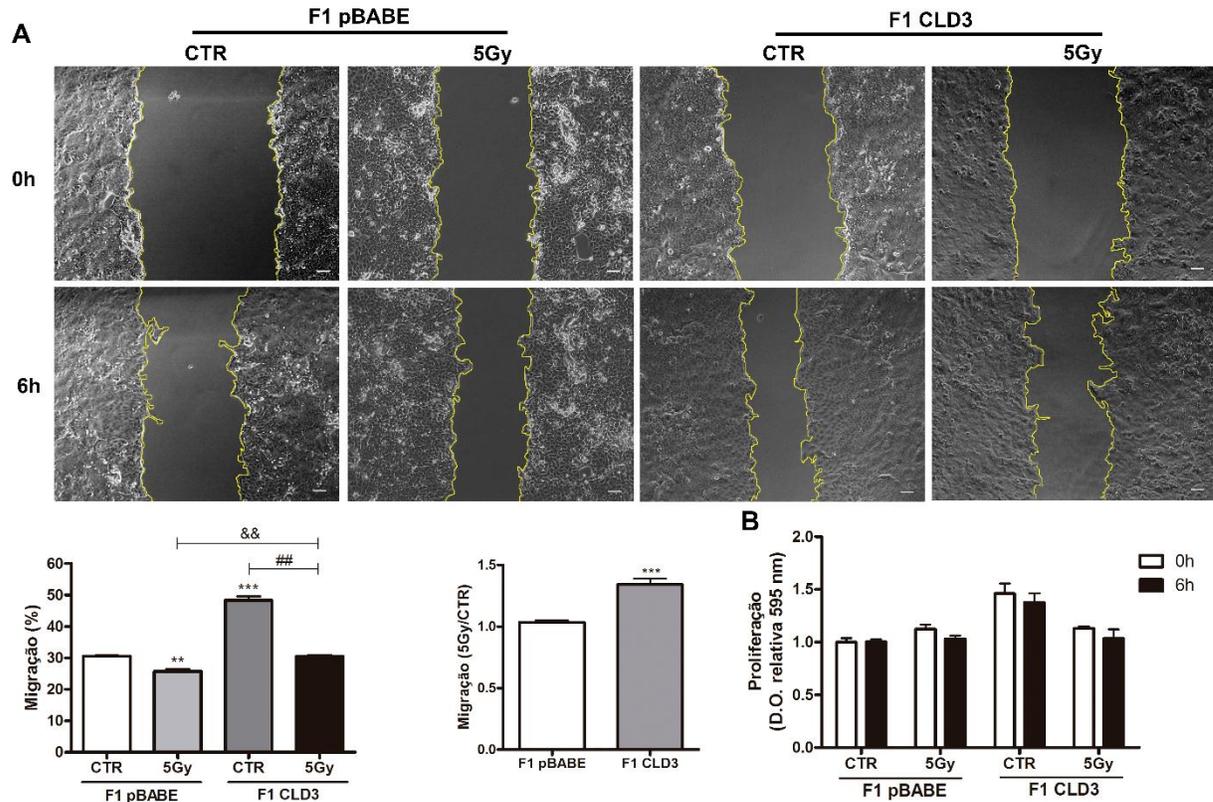
Tem sido relatado que a superexpressão de claudina-4 está relacionada ao aumento da permeabilidade paracelular, diminuição da migração e aumento da invasão em células de adenocarcinoma de cólon (Takehara *et al.*, 2009) e a estimulação da invasão e migração de células humanas de câncer de ovário (Agarwal *et al.*, 2005). Em câncer de mama Escudero-Esparza e colaboradores (2012) observaram um aumento no potencial migratório de células que superexpressam claudina-5.

Com o intuito de avaliar a capacidade migratória da progênie derivada de células irradiadas (5Gy) transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE) e que superexpressam claudina-3 (F1 CLD3) foi realizado o ensaio de *Wound Healing*. Como observado na figura 19A, a progênie controle (CTR) de células que superexpressam claudina-3 (F1 CLD3) apresentam maior capacidade migratória, em torno de 60 %, quando comparadas com a progênie controle (CTR) de células transduzidas com vetor vazio

(F1 pBABE). Pode-se notar ainda que a radiação é capaz de causar diminuição na migração em ambas as progênies, contudo a progênie irradiada (5Gy) de células que superexpressam claudina-3 (F1 CLD3) apresenta migração mais elevada que a progênie irradiada (5Gy) de células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE) (Fig. 19A).

Para confirmar que o efeito observado foi devido a migração das células e não devido a proliferação foi realizado o ensaio de proliferação celular onde foi observado que no mesmo intervalo de tempo do ensaio de migração não houve variação do potencial proliferativo nas progênies (Fig. 19B).

Figura 19 - Efeito da radiação na migração das progênies celulares que superexpressam ou não a claudina-3



Legenda: As células controle (CTR) e irradiadas (5Gy) F1 pBABE e F1 CLD3 foram cultivadas até a confluência e submetidas ao ensaio de *wound healing*. A) Os gráficos representam em porcentagem a área do risco que foi fechada pelas células (área em 6 h / área em 0 h e os dados relativos (5Gy/CTR) Resultados representativos de três experimentos independentes. B) Gráfico representativo dos valores de densidade óptica relativa do ensaio de proliferação celular por cristal violeta. Resultados representativos de dois experimentos independentes. Análise estatística: Teste t de *Student*. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ análise estatística comparando com F1 pBABE CTR; ##, $p < 0,01$ análise estatística comparando com F1 CLD3 CTR; &&, $p < 0,01$ análise estatística comparando com F1 pBABE 5Gy. Barra = 100 μm .

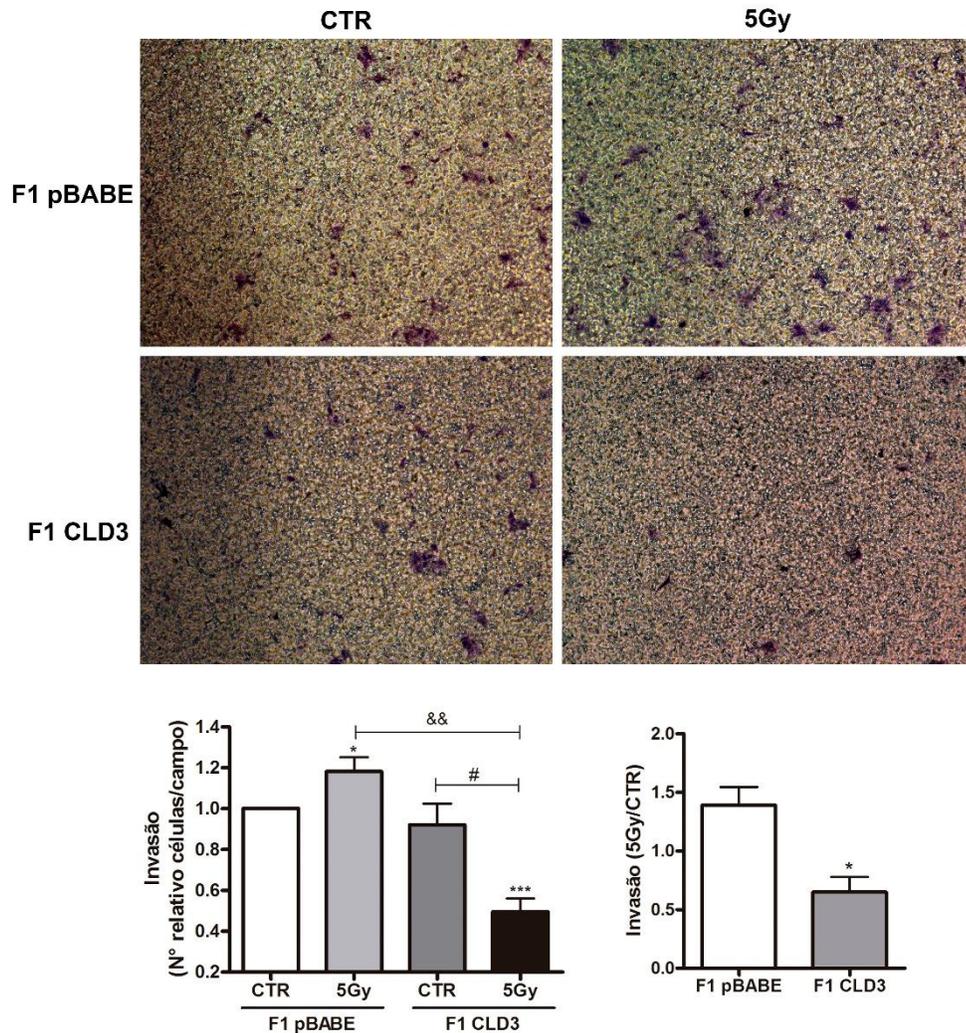
5.8 A superexpressão da claudina-3 diminui a invasão da progênie de células sobreviventes a radiação

Diversos trabalhos relacionam alterações na expressão das claudinas com a capacidade de invadir tecidos adjacentes. Por exemplo, claudina-1 tem sido relacionada com o aumento do potencial invasivo em CCR (Dhawan *et al.*, 2006), carcinoma oral (Oku *et al.*, 2006; dos Reis *et al.*, 2008) e câncer gástrico (Shiozaki *et al.*, 2014). A superexpressão de claudina-4 tem sido relacionada com o aumento da invasão em

células de adenocarcinoma de cólon (Takehara *et al.*, 2009) e células de câncer de ovário (Agarwal *et al.*, 2005), no entanto em células de câncer pancreático a superexpressão de claudina-4 diminui a invasividade (Michl *et al.*, 2003). Estes estudos mostram que o papel das claudinas na invasividade é tecido-dependente. Portanto torna-se importante avaliar o efeito da superexpressão de claudina-3 na invasão celular após a irradiação.

Assim, decidimos avaliar o efeito da radiação na progênie de células que superexpressam claudina-3 no potencial invasivo usando o ensaio de invasão em membranas Transwell. Na figura 20, foi possível observar aumento de 18 % na capacidade invasiva da progênie irradiada (5Gy) de células HT-29 transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE). Por outro lado, a superexpressão de claudina-3 não causa alteração na capacidade invasiva da progênie controle (CTR), porém diminui 62 % a invasividade na progênie irradiada (5Gy) (Fig. 20). Juntos estes resultados indicam que a superexpressão de claudina-3 atua diminuindo a capacidade invasiva das células após a irradiação.

Figura 20 - Efeito da radiação sob o potencial invasivo das progênies que superexpressam ou não claudina-3



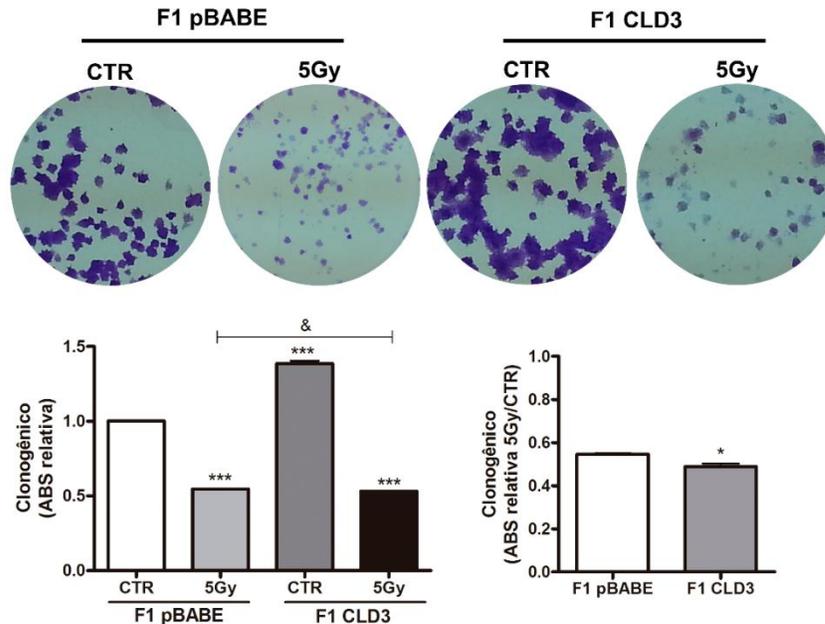
Legenda: As células controle (CTR) e irradiada (5Gy) F1 pBABE e F1 CLD3 foram cultivadas em inserto Transwell® coberto com Matrigel® e o potencial invasivo analisado 24 h após o plaqueamento. O gráfico mostra os valores relativos ao número de células/campo que foram capazes de invadir e, portanto, foram coradas com cristal violeta e os dados expressos na relação (5Gy/CTR). Resultados representativos de três experimentos independentes. Análise estatística: Teste-*t* de Student. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$ análise estatística comparando com F1 pBABE CTR; #, $p < 0,05$ análise estatística comparando com F1 CLD3 CTR; &&, $p < 0,01$ análise estatística comparando com F1 pBABE 5Gy.

5.9 Superexpressão de claudina-3 não influencia na redução da formação colônia dependente de ancoragem causada pela radiação

O potencial maligno das células pode ser avaliado através do ensaio de formação de colônia dependente e independente de ancoragem. O ensaio de formação de colônia dependente de ancoragem, também chamado de clonogênico, é realizado através do cultivo de uma baixa densidade de células (500 células/poço) e devido a esta baixa densidade é avaliado a capacidade de colonização a partir de uma única célula.

Através deste ensaio pode-se observar que a radiação diminui em 50 % a formação de colônia em ambas as progênies, sendo este efeito independente da expressão de claudina-3. Foi possível observar também que a progênie controle (CTR) que superexpressa claudina-3 (F1 CLD3) apresenta maior capacidade de formar, cerca de 40 % (Fig. 21). Quando analisamos os dados na relação irradiado sobre controle (5Gy/CTR) observamos que a progênie que superexpressa claudina-3 tem uma menor capacidade de formação de colônia pós irradiação. Estes resultados corroboram o resultado encontrado na proliferação celular, no qual mostramos que as células que superexpressam claudina-3 respondem melhor ao tratamento com radiação.

Figura 21 - Efeito da radiação na capacidade de formação de colônias dependente de ancoragem das progênes que superexpressam ou não claudina-3



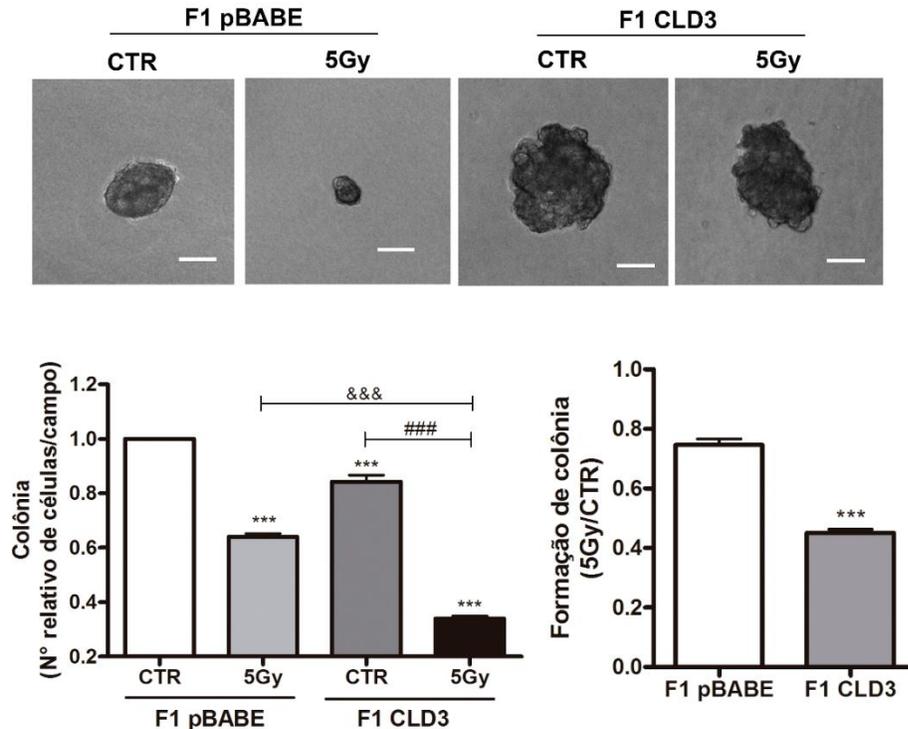
Legenda: As células controle (CTR) e irradiada (5Gy) F1 pBABA e F1 CLD3 foram submetidas ao ensaio de formação de colônia dependente de ancoragem (clonogênico). Os gráficos representam os valores de absorbância relativa e valores de absorbância expressos na relação 5Gy/CTR. Resultados representativos de três experimentos independentes. Análise estatística: Teste t de *Student*. ***, $p < 0,001$ análise estatística comparando com F1 pBABA CTR; &, $p < 0,05$ análise estatística comparando com F1 pBABA 5Gy.

5.10 Superexpressão de claudina-3 potencializa o efeito da radiação na formação de colônia independente de ancoragem

Este ensaio permite avaliar a capacidade sobrevivência e formação de colônia em meio não aderente. Células epiteliais normais, em condições não aderentes ao substrato, ativam vias de morte celular programada, no entanto células tumorais são capazes de evadir os mecanismos de morte programada e, portanto, sobreviver em meio não aderente.

Nossos resultados mostraram que a radiação diminui em a formação de colônias independente de ancoragem em ambas as progênies, sendo o efeito mais evidente (64 %) na progênie irradiada (5Gy) de células HT-29 que superexpressam claudina-3 (F1 CLD3) (Fig. 22). A diminuição da capacidade de formação de colônias independente de ancoragem em células que superexpressam claudina-3 pode ser confirmada quando avaliamos os dados na relação irradiada sobre controle (5Gy/CTR), no qual podemos observar diminuição significativa na formação de colônias. Outro resultado importante é com relação ao tamanho das colônias, nesta avaliação foi possível observar que a progênie controle (CTR) de células que superexpressam claudina 3 (F1 CLD3) apresenta colônias maiores que a da progênie controle (CTR) de células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE). Foi verificado, também, que a radiação causou uma diminuição no tamanho das colônias da progênie de células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE) e este efeito não foi observado na progênie irradiada (5Gy) de células que superexpressam claudina-3 (F1 CLD3) (Fig. 22). Com isso foi possível concluir que a superexpressão de claudina-3 potencializa o efeito da radiação, diminuindo a capacidade de formação de colônia, no entanto a superexpressão de claudina-3 confere a capacidade de formar colônias maiores e esta característica não é alterada pela radiação.

Figura 22 - Efeito da radiação na capacidade de formação de colônias independente de ancoragem das progênes que superexpressam ou não claudina-3



Legenda: As células controle (CTR) e irradiada (5Gy) F1 pBABE e F1 CLD3 foram submetidas ao ensaio de formação de colônia independente de ancoragem. O gráfico representa os valores relativos do número de colônias/campo e os valores de colônias/campo na relação 5Gy/CTR. Resultados representativos de três experimentos independentes. Análise estatística: Teste t de *Student*. ***, $p < 0,001$ análise estatística comparando com F1 pBABE CTR; ###, $p < 0,001$ análise estatística comparando com F1 CLD3 CTR; &&&, $p < 0,001$ análise estatística comparando com F1 pBABE 5Gy.

5.11 Inibição da via MEK potencializa o efeito da radiação nas células que superexpressam claudina-3

Considerando o aumento na taxa proliferativa das células que superexpressam claudina-3 (Fig. 18) decidimos avaliar o efeito dos inibidores farmacológicos das vias PI3K/Akt e MEK/ERK, envolvidas na sobrevivência e proliferação celular, na radorresposta das células que superexpressam claudina-3.

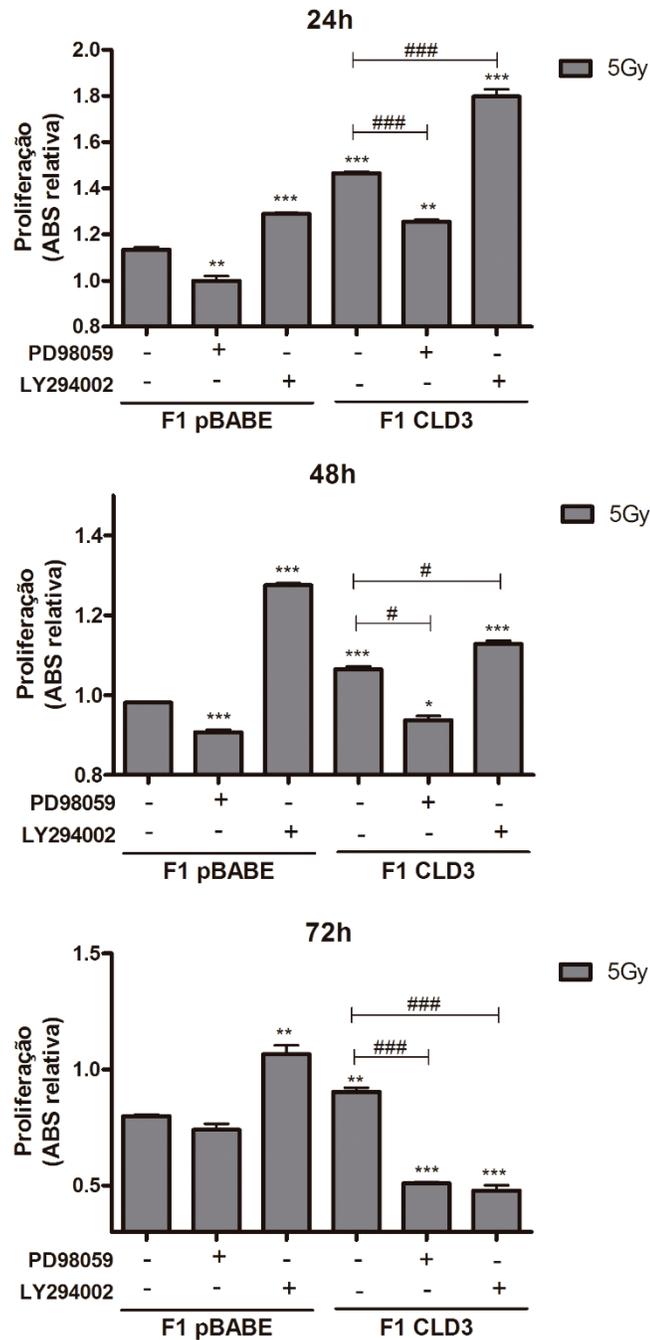
As células foram tratadas com os inibidores durante 1 h antes da exposição à radiação e mantidas no meio condicionado contendo os inibidores por 24 h, após este período a proliferação foi analisada. A figura 23 mostra a comparação dos índices de

proliferação das progênies irradiadas e é possível observar que o inibidor de MEK (PD98059) é capaz de diminuir a proliferação da progênie irradiada (5Gy) de células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE) em 24 e 48h, cerca de 20 % e é capaz de diminuir, aproximadamente 25 % a proliferação da progênie irradiada (5Gy) de células que superexpressam claudina-3 (F1 CLD3) em todos os tempos analisados (24, 48 e 72 h).

O inibidor de PI3K (LY294002) atuou aumentando aproximadamente 30 % a taxa proliferativa da progênie irradiada (5Gy) de células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE) em todos os tempos analisados, no entanto, na progênie irradiada (5Gy) de células que superexpressam claudina-3 o inibidor de PI3K foi capaz de aumentar a proliferação em 24 e 48 h, e diminuir cerca de 50 % a proliferação em 72 h.

Com isso concluímos que a inibição da via MEK é capaz de potencializar o efeito da radiação contribuindo para a diminuição da proliferação celular em ambas as progênies, mas com um efeito mais acentuado nas células que superexpressam claudin-3. Já o inibidor de PI3K tem efeito contrário, a não ser na progênie irradiada de células que superexpressam claudina-3 em tempos tardios.

Figura 23 - O efeito da inibição farmacológica das vias MEK e PI3K na proliferação celular após a irradiação



Legenda: As células F1 pBABE e F1 CLD3 foram cultivadas por 24, 48 e 72 h para realização do ensaio de proliferação celular pela técnica de cristal violeta. Os gráficos representam os valores relativos de absorbância das progênies irradiadas em 24, 48 e 72 h. Resultados representativos de dois experimentos independentes. Análise estatística: Teste t de Student. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$ análise estatística comparando com F1 pBABE 5Gy. #, $p < 0,01$, ###, $p < 0,001$ análise estatística comparando com F1 CLD3 5 Gy.

5.12 Inibidores das vias MEK e PI3K aumentam a capacidade migratória das células após a radiação independente do padrão de expressão de claudina-3

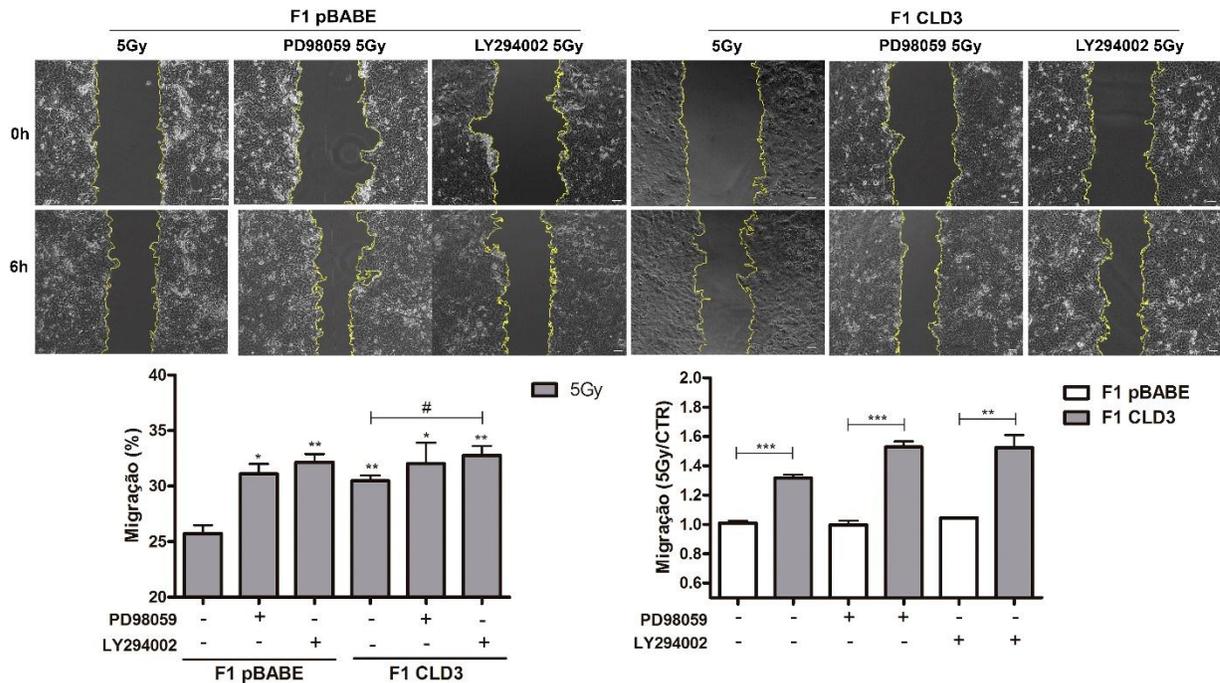
A partir do resultado da proliferação fomos investigar o efeito dos inibidores das proteínas MEK e PI3K em ensaios funcionais. Primeiramente avaliamos a capacidade migratória das progênies irradiadas tratadas ou não pelo ensaio de *Wound healing*.

Na figura 24 é possível observar que ambos o inibidor de MEK (PD98059) aumenta a migração da progênie irradiada (5Gy) transduzida com vetor vazio (F1 pBABE), no entanto não tem efeito significativo progênie irradiada (5Gy) que superexpressa claudina-3. O inibidor de PI3K (LY294002), por sua vez, aumentou a migração em ambas as progênies irradiadas.

Neste ensaio o padrão de expressão da claudina-3 não aparenta ter influência, uma vez que o aumento observado na migração das células apresenta porcentagem semelhante em ambas as progênies.

Com isso podemos concluir que inibidor de MEK apesar de diminuir a proliferação celular de ambas as progênies irradiadas, aumenta a migração da progênie irradiada (5Gy) de células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE). O inibidor de PI3K é capaz de aumentar a proliferação e a migração em ambas as progênies

Figura 24 - Efeito dos inibidores de MEK e PI3K na motilidade da progênie irradiada de células que superexpressam ou não a claudina-3



Legenda: As células F1 pBABE e F1 CLD3 foram cultivadas até a confluência e submetidas ao ensaio de *wound healing*. As regiões raspadas foram fotografadas logo após o risco ser feito (0 h) e 6 h depois. O gráfico representa os dados da área do risco que foi fechada pelas células (área em 6 h / área em 0 h) em porcentagem e os dados relativos (5Gy/CTR). Resultados representativos de dois experimentos independentes. Análise estatística: Teste t de *Student*. *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ análise estatística comparando com F1 pBABE 5Gy; #, $p < 0,05$ análise estatística comparando com F1 CLD3 5Gy. Barra = 100 μm .

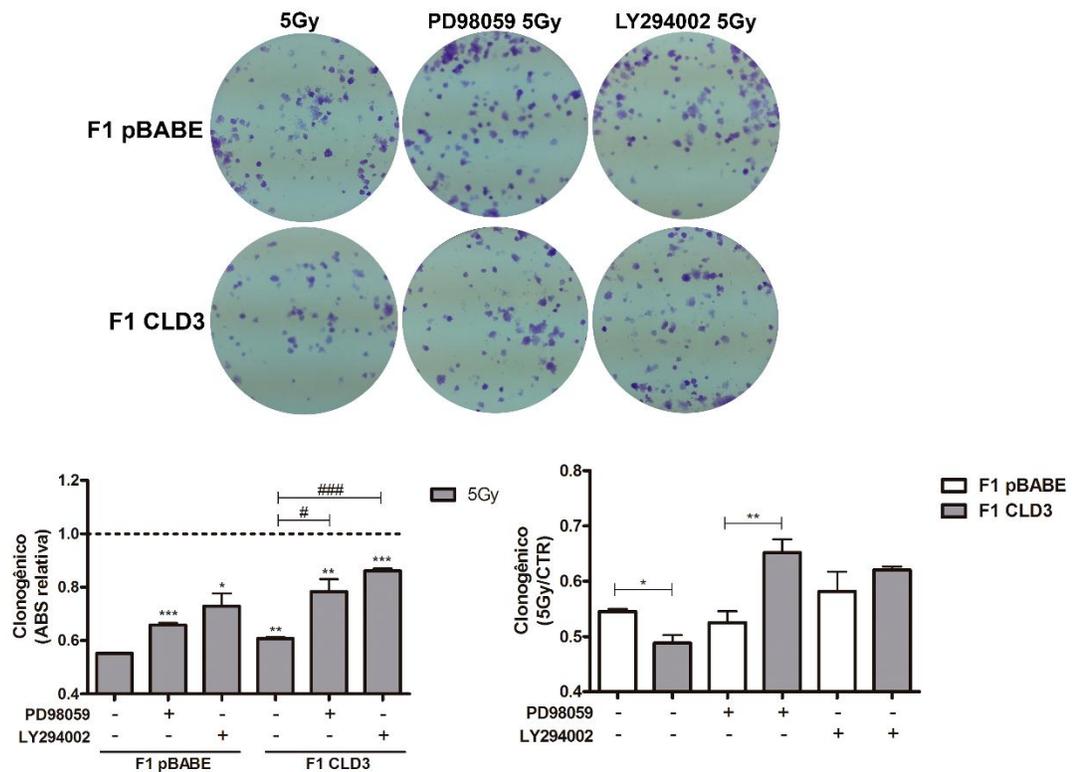
5.13 Inibição da MEK aumenta a capacidade de formação de colônia nas células que superexpressam claudina-3

Avaliamos, então, a capacidade de formação de colônia dependente e independente de ancoragem das progênies irradiadas tratadas com os inibidores de MEK e PI3K. No ensaio de formação de colônia dependente de ancoragem observamos que ambos inibidores provocam aumento de cerca de 15 % na capacidade de formar colônias das progênies irradiadas (F1 pBABE e F1 CLD3). Além disso, nossos resultados mostram que na progênie irradiada (5Gy) de células que superexpressam claudina-3 (F1 CLD3) o aumento provocado pelos inibidores de MEK e PI3K foi mais

acentuado, aumentando cerca 20 % e 30 %, respectivamente, a capacidade de formação de colônia (Fig. 25).

Quando foi avaliado a relação entre o número de colônias da progênie irradiada sobre número de colônias da progênie controle (5Gy/CTR) observamos, inicialmente, que a superexpressão de claudina-3 diminui a capacidade de formação de colônia, no entanto a inibição da MEK aumenta a capacidade de formação de colônia as células que superexpressam claudina-3 (Fig. 25).

Figura 25 - Avaliação do efeito dos inibidores MEK e PI3K na capacidade de formação de colônias dependente de ancoragem das progênies irradiadas



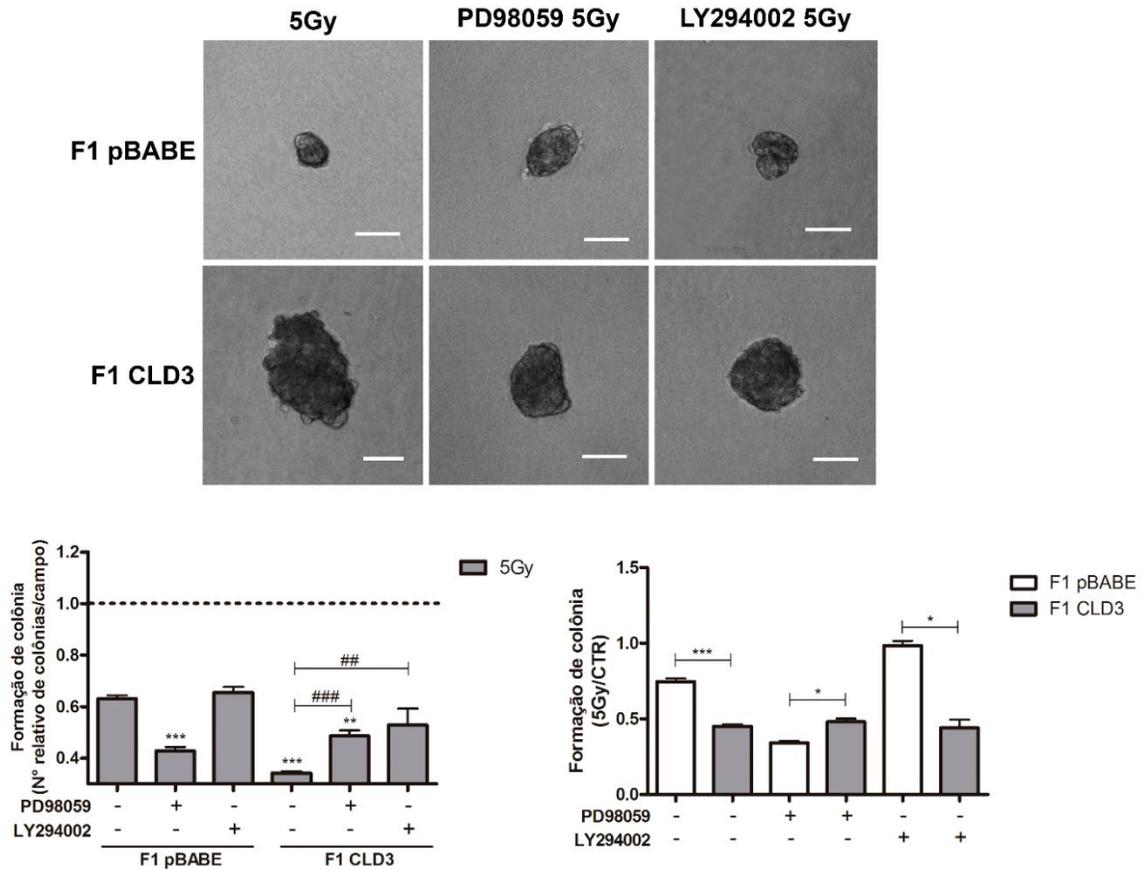
Legenda: As células F1 pBABE e F1 CLD3 foram submetidas ao ensaio de formação de colônia dependente de ancoragem (clonogênico). O gráfico a esquerda representa os valores de absorbância relativa e o gráfico a direita mostra os dados expressos na relação (5Gy/CTR). Resultados representativos de dois experimentos independentes. Análise estatística: Teste t de *Student*. ***, $p < 0,001$ análise estatística comparando com F1 pBABE CTR; &, $p < 0,05$ análise estatística comparando com F1 pBABE 5Gy.

Em seguida foi avaliado o efeito dos inibidores na capacidade de formação de colônia independente de ancoragem. Neste ensaio é possível observar que a inibição de MEK (PD98059) provoca uma diminuição de 20 % na capacidade de formar colônias na progênie irradiada (5Gy) de células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE), contudo na progênie irradiada (5Gy) que superexpressa claudina-3 (F1 CLD3) a inibição de MEK causou um aumento cerca de 18 % na formação de colônias (Fig. 26).

A inibição de PI3K não teve efeito na formação de colônia da progênie irradiada (5Gy) de células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE) e causou um aumento de 20 % na formação de colônia da progênie irradiada (5Gy) de células que superexpressam claudina-3 (F1 CLD3) (Fig. 26).

Quando é avaliado a relação entre o número de colônia da progênie irradiada / número de colônias da progênie controle (5Gy/CTR) observamos a superexpressão de claudina-3 diminui em 35 % a formação de colônia das progênies irradiadas, que, no entanto, a inibição de MEK contribui para o aumento de aproximadamente 10 % na formação de colônia na progênie irradiada que superexpressa claudina-3 e que a inibição de PI3K diminui cerca de 50 % a formação de colônia independente de ancoragem da progênie irradiada que superexpressa claudina-3 (Fig. 26). Em relação ao tamanho das colônias, é possível observar que os tratamentos com os inibidores das vias de proliferação (MEK) e sobrevivência (PI3K) são capazes de diminuir o tamanho das colônias da progênie de células que superexpressam claudina-3, enquanto nas células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE) o tamanho não é alterado.

Figura 26 - Avaliação do efeito dos inibidores de MEK e PI3K na capacidade de formação de colônias independente de ancoragem das progênes irradiadas



Legenda: As células F1 pBABE e F1 CLD3 foram submetidas ao ensaio de formação de colônia independente de ancoragem. O gráfico a esquerda representa os valores relativos do número de colônias/campo e o gráfico a direita mostra os valores na relação 5Gy/CTR. Resultados representativos de dois experimentos independentes. Análise estatística: Teste t de *Student*. *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$ análise estatística comparando com F1 pBABE 5Gy; ##, $p < 0,01$, ###, $p < 0,001$ análise estatística comparando com F1 CLD3 5Gy.

6 DISCUSSÃO

Os diversos tipos de câncer têm, em sua maioria, origem epitelial e são caracterizados pelo crescimento aberrante e perda de diferenciação e arquitetura tecidual. É fundamental para as células cancerígenas que sua adesão a outra célula esteja significativamente mais fraca, pois uma menor interação célula-célula permite que as células de câncer “desobedeçam a ordem social”, resultando na perda da arquitetura do tecido (polaridade celular), controle do crescimento e tardiamente propicia a invasividade e metástase, marcadores do processo de malignização (Martin & Jiang 2009).

As JTs são responsáveis pela determinação da polaridade celular e pelo controle do fluxo paracelular, sendo uma das primeiras estruturas a ser desestruturada durante a transição epitélio-mesenquimal (EMT). Trabalhos mostram que alterações na expressão das proteínas claudinas, principais constituintes da JT, estão relacionadas à desestabilização da adesão célula-célula, facilitando a passagem de nutrientes e o acesso de fatores de crescimento, além de induzir inúmeros processos relacionados com a malignização celular, como aumento da proliferação e do potencial migratório e invasivo (Agarwal *et al*, 2005; Oliveira & Morgado-Díaz, 2006; Takehara *et al*, 2009).

Neste contexto diversos trabalhos tentam identificar os mecanismos de regulação da expressão das proteínas claudinas, sendo o mecanismo mediado pelo fator de crescimento epidermal (EGF) um dos mais estudados. Singh & Harris (2004) descreveram aumento nos níveis proteicos de claudina 1, 3 e 4, concomitantemente à diminuição dos níveis de claudina-2 após o tratamento com EGF em células MDCK. Em células de câncer ovariano, o tratamento com EGF diminuiu a expressão das claudinas 3 e 4 e os efeitos foram revertidos utilizando inibidores de EGFR, MAPK ou PI3K (Ogawa *et al*, 2012).

Em CCR um trabalho prévio do nosso grupo (Oliveira *et al.*, 2005), utilizando amostras de pacientes mostrou que as claudinas 1, 3 e 4 estavam superexpressas, quando comparadas ao tecido adjacente normal. No entanto, poucos trabalhos têm investigado os mecanismos de regulação do perfil de expressão das claudinas neste

tipo de câncer. Além disso, ainda é necessário compreender o papel da alteração da expressão das claudinas na progressão tumoral.

Durante o desenvolvimento desta dissertação avaliamos o efeito do tratamento com EGF na expressão das proteínas claudinas 1 e 3. Foi observado um aumento de nove vezes na expressão de claudina-3 após o tratamento com EGF em tempos tardios (Fig. 9). A partir deste resultado decidimos investigar o papel da claudina-3 no processo de malignização das células e para atingir este objetivo transduzimos células de adenocarcinoma de cólon (HT-29) com vetor vazio (pBABE) ou vetor para superexpressar claudina-3 (CLD3). Nossos resultados mostraram que a superexpressão de claudina-3 cumpre papel fundamental na promoção do potencial maligno de células de CCR (Fig. 11), o qual é potencialmente regulado pelas vias ERK1/2 e PI3K-Akt quando ativadas por EGF (De Souza *et al.*, 2013 – Anexo).

Neste contexto, nossos resultados corroboram em parte os resultados encontrados por Agarwal e colaboradores (2005) no qual foi visto um aumento na expressão de claudina-3 e aumento da capacidade migratória e invasiva em células de câncer de ovário. Outros trabalhos também correlacionam a expressão de claudinas com a migração e invasão das células de CCR (Dhawan *et al.*, 2005; Takehara *et al.*, 2009), de câncer de fígado (Yoon *et al.*, 2010) e de ovário (Shang *et al.*, 2012).

A radioterapia é considerada tratamento de primeira linha para diversos tumores sólidos, tanto com intenção curativa para cânceres primários como paliativa (Yacoub *et al.*, 2006). Estudos mostram que a radiação induz a secreção de fatores de crescimento e citocinas como EGF, TNF α , IL1 (interleucina1), IL6 (interleucina 6) e TGF- β no microambiente. Além disso, sabe-se que as células não morrem imediatamente após a exposição à radiação e as células sobreviventes continuam interagindo com esse microambiente (Barcellos-Hoff *et al.*, 2005; Hamada *et al.*, 2007), podendo desenvolver respostas adaptativas através da ativação de mecanismos de reparo do DNA, sinalizações de estresse celular e ativação de vias de sobrevivência (Ahmed & Li, 2008).

Um dos eventos induzidos pela radiação é a transição epitélio-mesenquimal (EMT) (Jung *et al.*, 2007; Tsukamoto *et al.*, 2007; Nagarajan *et al.*, 2012). Durante a EMT ocorre a desorganização do complexo juncional levando a perda de características

epiteliais seguida da aquisição de um fenótipo mesenquimal proporcionando um aumento na capacidade migratória e invasiva das células (Thiery & Sleeman, 2006).

Nosso grupo mostrou que a radiação induz uma desorganização dos contatos intercelulares em linhagens celulares de CCR diretamente atingidas pela radiação (De Carvalho *et al.*, 2006). Nesta mesma linha de evidência, recentemente demonstramos que a progênie de células de CCR sobreviventes a radiação apresenta maior potencial migratório e invasivo e fenótipo semelhante a transição epitélio-mesenquimal (Bastos *et al.*, 2014). A partir destes trabalhos surgiu o interesse em investigar quais os efeitos celulares e moleculares relacionados a radiorresposta da progênie irradiada de células que superexpressam a claudina-3.

Inicialmente foi avaliado o efeito da radiação na expressão proteica de claudina-3 na progênie de células HT-29 derivada de parentais irradiadas e observamos diminuição de 73 % os níveis proteicos de claudina-3 após a radiação (Fig. 12). Tendo em vista o papel do aumento da expressão da claudina-3 no aumento do potencial maligno de células de CCR (De Souza *et al.*, 2013) utilizamos células transduzidas com vetor vazio (pBABE) ou com vetor contendo cDNA de claudina-3 para avaliar se o aumento na expressão de claudina-3 alteraria a radiorresposta celular. Como pode ser observado na figura 13 as células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE) tiveram comportamento semelhante as células HT-29 não transduzidas, portanto houve uma diminuição na expressão proteica de claudina-3. O mesmo efeito, no entanto, menos acentuado, pode ser observado na progênie de células que superexpressam claudina-3, totalizando uma diminuição de 33 %. Shim e colaboradores (2015) observaram também uma diminuição na expressão de claudina-3 no intestino de ratos submetidos a radiação total do abdômen levando a um aumento da translocação bacteriana para os linfonodos regionais, sugerindo a perda da função de barreira induzida pela radiação.

Em seguida avaliamos o efeito da radiação na morfologia e na localização subcelular de claudina-3. Primeiramente, é possível observar células mais dispersas e alongadas, com fenótipo similar a um fibroblasto na progênie irradiada de células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE), corroborando os efeitos induzidos pela radiação em outros modelos celulares (De Carvalho *et al.*, 2006; Nagarajan *et al.*, 2012). No entanto a progênie irradiada de células que superexpressam claudina-3 (F1

CLD3) apresentaram alterações morfológicas menos proeminentes (Fig. 14), sugerindo que a superexpressão de claudina-3 contribui na prevenção das alterações causadas pela radiação.

Após a irradiação foi verificado uma menor intensidade de marcação da claudina-3 na progênie irradiada de células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE), complementando o resultado encontrado no ensaio de *immunoblotting*, bem como uma marcação descontínua nos contatos célula-célula remanescentes (Fig. 15). A progênie irradiada de células que superexpressam claudina-3 (F1 CLD3) também apresentou diminuição na intensidade do sinal, no entanto, uma quantidade maior de claudina-3 manteve-se no contato célula-célula quando comparada com a progênie irradiada de células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE) (Fig. 15). Com isso propomos que a superexpressão de claudina-3 de alguma maneira poderia contribuir na prevenção da perda da adesão célula-célula.

Partimos, então, para avaliar a funcionalidade das JTs utilizando os ensaios de resistência elétrica transepitelial (TER) e a técnica do vermelho de rutênio associado com a microscopia eletrônica de transmissão. Nossos resultados mostram que a progênie controle que superexpressa claudina-3 (F1 CLD3) apresenta aumento gradativo de 30 % na TER (Fig. 16), portanto uma diminuição na passagem de íons. Takehara e colaboradores (2009), também observaram aumento da TER em células Caco-2 que superexpressam claudinas 3 e 4. Como era esperado, devido a perturbação nas JTs, a irradiação causou uma diminuição na TER em ambas as progênies, no entanto na progênie irradiada de células que superexpressam claudina-3 (F1 CLD3) a diminuição de aproximadamente 40 % da TER foi mais acentuada mostrando um aumento na passagem a íons.

As células HT-29 são conhecidas por serem pouco diferenciadas, porém esta linhagem tem a característica de ter sua diferenciação modulada alterando os componentes do meio de cultivo das células (Chantret *et al.*, 1988; Gout *et al.*, 2004). Neste trabalho foi utilizado as células HT-29 transduzidas cultivadas em meio comum, portanto apresentam características de células pouco diferenciadas, com isso apesar de serem capazes de formar contatos célula-célula estes contatos não são completamente funcionais. No ensaio de vermelho de rutênio avaliamos a passagem de

macromoléculas através do fluxo paracelular. Nossos resultados mostram que em condições normais ocorre a passagem do corante na progênie controle de células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE). O mesmo foi observado na progênie controle de células que superexpressam claudina-3 (Fig. 17), mostrando que apesar de diminuir a TER, não são capazes de impedir a passagem de macromoléculas. De Souza e colaboradores (2013) demonstraram efeito semelhante ao observar a passagem de anticorpos que reconhecem a porção extracelular da proteína E-caderina através das JTs por imunofluorescência em condições não permeabilizantes. Este efeito dual na permeabilidade a íons e moléculas contribui para o conceito de que cada claudina tem sua função e é a partir da expressão de diferentes claudinas que o tecido consegue regular o fluxo paracelular dependendo da sua necessidade (Turkesen & Troy, 201; Günzel & Yu, 2013; Krug & Schulzke, 2014; Tamura & Tsukita, 2014).

No que diz respeito ao efeito da radiação na permeabilidade a macromoléculas obtivemos um resultado surpreendente. Como mencionado anteriormente a radiação é conhecida por alterar e desestabilizar as JTs, portanto esperávamos continuar observando permeabilidade a macromoléculas, no entanto podemos observar que após a irradiação as JTs passaram a impedir a permeabilidade do vermelho de rutênio. Este resultado pode ser justificado pela alteração na composição das JTs, uma vez que a radiação não regula apenas a claudina-3 (De Carvalho *et al.*, 2006). Portanto outras claudinas ou proteínas das JTs como a tricelulina (Krug *et al.*, 2009) ou a ocludina (Shen *et al.*, 2011; Krug & Schulzke, 2014) que poderiam ter sido moduladas e por fim induzir diminuição na permeabilidade a macromoléculas. No entanto mais experimentos precisam ser realizados com o intuito de comprovar esta possibilidade.

Como o desenvolvimento tumoral é um processo de múltiplas etapas (Hanahan & Weinberg, 2000 e 2012) torna-se necessário avaliar cada etapa frente a um tratamento ou condição para que seja possível determinar se o tratamento / condição atua promovendo ou impedindo a progressão tumoral. Para atingir este objetivo analisamos o papel da superexpressão de claudina-3 frente a radiação, em eventos celulares relacionados com o desenvolvimento tumoral, tais como: proliferação, migração, invasão e formação de colônia.

Inicialmente verificamos que a superexpressão de claudina-3 é capaz de aumentar em 35 % a proliferação celular em todos os tempos testados e que a radiação é capaz de reverter este efeito a partir de 48 h (Fig. 18). Dhawan e colaboradores (2011) mostraram que a superexpressão de claudina-2 em células de CCR (SW480 e HCT-116), induziu aumento na proliferação celular. Além disso, neste trabalho, os autores propuseram uma relação entre a superexpressão de claudina-2 e o aumento da permeabilidade paracelular, que causaria uma maior passagem de EGF através das JTs e com isso haveria um aumento na ativação do EGFR, que se encontra na membrana basolateral das células, favorecendo a proliferação celular.

Neste contexto têm sido proposto a utilização de inibidores contra alvos das vias de sinalização do EGFR, tais como inibidores de Raf e MEK (Brand & Wheeler, 2012). Ensaio *in vitro* mostraram uma diminuição do crescimento celular e o crescimento tumoral em modelos *in vivo* quando tratados com inibidor de MEK1/2 (Yoon *et al.*, 2011). Nos testes clínicos o inibidor de MEK1/2 apresentou pouca atividade antitumoral em pacientes de CCR (Rinehart *et al.*, 2004) de câncer de pulmão (Haura *et al.*, 2010), entretanto ambos os trabalhos sugerem a combinação de tratamentos para a obtenção de uma melhor resposta dos pacientes. No caso do inibidor de PI3K um estudo clínico de fase II mostrou pouca atividade antitumoral em tumores sólidos avançados (Yap *et al.*, 2011) e novamente foi apontada a necessidade de combinação entre diferentes tratamentos para maior eficácia.

Com isso avaliamos o efeito do pré-tratamento com inibidores das vias de MEK e PI3K na radiorresposta das progênes no contexto da na proliferação celular e foi observado que a inibição de MEK potencializou o efeito da radiação, diminuindo a proliferação, independente do padrão de expressão da claudina-3. O inibidor de PI3K, no entanto, foi capaz de reverter o efeito causado pela radiação independente do padrão de expressão de claudina-3 em 24 e 48 h. No entanto, em 72 h o tratamento com o inibidor da via PI3K foi capaz de potencializar o efeito da radiação, diminuindo cerca de 50 % a proliferação, na progênie de células que superexpressam claudina-3 (Fig. 23). Pickhard e colaboradores (2011) demonstraram que a inibição contínua das vias MEK e PI3K, separadamente, são capazes de reduzir a proliferação em 24 e 72 h em células de adenocarcinoma de cabeça e pescoço.

No presente trabalho, nossos resultados mostram que a superexpressão de claudina-3 é capaz de aumentar a migração celular em 60 % e que a radiação diminui a migração de ambas as progênies quando comparadas com as progênies controles, porém a superexpressão de claudina-3 parece conferir uma vantagem a migração celular, pois mesmo havendo a diminuição na migração após a irradiação, a capacidade migratória das células que superexpressam claudina-3 (F1 CLD3) ainda é aproximadamente 13 % maior que a das células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE) (Fig. 19). Com relação ao efeito dos inibidores das vias de proliferação (MEK) e sobrevivência (PI3K) observamos que ambos os inibidores contribuíram aumentando a migração celular das progênies irradiadas. No trabalho publicado por Pickhard e colaboradores (2011) foi observado o efeito contrário, células de carcinoma de cabeça e pescoço quando tratadas com inibidores das vias MEK e PI3K e expostas a radiação apresentam diminuição na capacidade migratória, porém neste trabalho o tratamento com os inibidores é contínuo e talvez por isso nossos resultados não sejam os mesmos. Estes resultados indicam que neste contexto realizar um pré-tratamento com os inibidores das vias de proliferação e sobrevivência não contribui para a diminuição da migração celular. Na avaliação da capacidade invasiva das células demonstramos que houve um aumento de 18% na invasão na progênie irradiada de células transduzidas com vetor vazio (F1 pBABE). Foi observado, também, que a superexpressão de claudina-3 não causa alteração na capacidade invasiva da progênie controle, porém em combinação com a radiação é capaz de diminuir em 62 % a invasão das células (Fig. 20).

Li e colaboradores (2013) demonstraram, em células de adenocarcinoma de pulmão, que a radiação é capaz de aumentar a invasividade dependente de integrina $\alpha 1\beta 2$ e EGFR. Portanto, estes resultados e os nossos sugerem que o efeito da superexpressão de claudina-3 na invasão das células aparenta ser tecido específico. Na literatura, diversos trabalhos correlacionam a expressão de claudinas com a migração e invasão das células. A claudina-1, quando superexpressa, causa aumento na migração e invasão em carcinoma hepatocelular (Yoon *et al.*, 2010) e quando downreguladas apresentam o efeito contrário em células de adenocarcinoma de cólon (Dhawan *et al.*, 2005). A claudina-2 tem sido relacionada ao aumento da migração

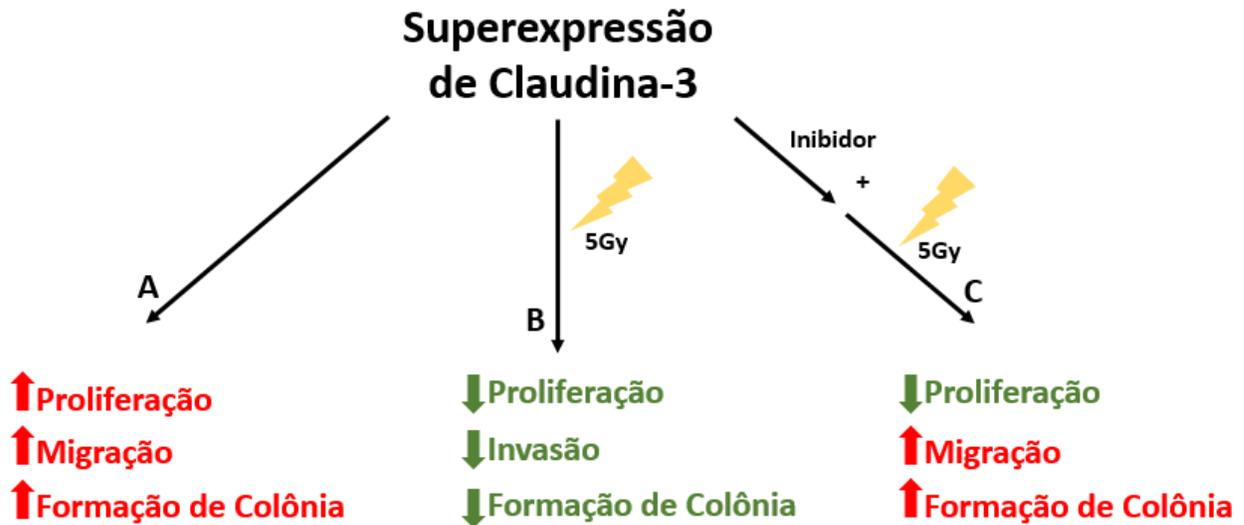
células epiteliais normais de rim canino (MDCK) quando downreguladas (Ikari *et al.*, 2011). A claudina-3 tem sido relacionada com o aumento da migração e invasão quando downreguladas (Shang *et al.*, 2012). Alguns trabalhos correlacionam também a superexpressão claudina-4 com a diminuição da invasão em células de câncer pancreático (Michl *et al.*, 2003) e a estimulação da migração e invasão em células de câncer do ovário (Agarwal *et al.*, 2005). Takehara e colaboradores (2009) correlacionaram a expressão de claudinas com a migração celular. Estes autores observaram, em células de CCR, aumento da migração com a superexpressão de claudina-2, diminuição da migração com a superexpressão de claudina 3 e 4, e verificaram, também, aumento da invasão em células que superexpressam claudina-4.

Além disso, observamos que a superexpressão de claudina-3 aumenta em 40 % a capacidade de formar colônias e que a radiação provoca diminuição de 50 % na formação de colônia das progênes irradiadas (Fig. 21). A inibição das vias de proliferação (MEK) e sobrevivência (PI3K) contribuem aumentando a capacidade de formar colônias de ambas as progênes irradiadas, sugerindo que a combinação deste tratamento com a radiação contribui para o aumento na formação de colônia da progênie sobrevivente de células que superexpressam claudina-3 (Fig. 24). Os ensaios de formação de colônia dependente ou independente de ancoragem são utilizados em estudos *in vitro* para avaliar potencial tumorigênico das células. Alguns trabalhos já foram publicados associando a expressão de claudinas e a capacidade das células de formar colônias. Agarwal e colaboradores (2005) demonstraram que a superexpressão de claudina 3 e 4 são capazes de aumentar a formação de colônia em células de câncer de ovário. A claudina-2 tem sido associada ao aumento na formação de colônia dependente e independente de ancoragem em células de adenocarcinoma de cólon (Dhawn *et al.*, 2011). Contudo a superexpressão (De Souza *et al.*, 2013) e a downregulação (Huang *et al.*, 2014) de claudina-1 não tem influência sobre a formação de colônias dependente de ancoragem, porém diminui a formação de colônia independente de ancoragem. Assim, nossos resultados corroboram a noção que alterações na expressão das claudinas contribuem para o aumento do potencial tumorigênico das células.

Neste contexto essa proteína seria indicador de mal prognóstico. Contudo a superexpressão de claudina-3 também é capaz de melhorar a resposta das células à radiação, tornando-a marcador de indicação de tratamento. Além disso a claudina-3 poderia ser utilizada como alvo terapêutico. Kominsky e colaboradores (2004) demonstraram em células e amostras pacientes de câncer mama que a superexpressão de claudina-3 pode ser um bom marcador indicativo de tratamento com a enterotoxina produzida pela bactéria *Clostridium perfringens*. É bem conhecido que esta enterotoxina possui propriedades citotóxicas e tem como receptores específicos as claudinas 3 e 4 (Gao & McLane, 2012). Portanto poderia ser utilizada no tratamento de outros tumores que apresentam aumento na expressão destas claudinas, como por exemplo o câncer ovário (Hough *et al.*, 2000) e o CCR (Oliveira & Morgado-Díaz, 2006).

Finalmente, os resultados obtidos neste trabalho contribuem para uma maior compreensão do papel da claudina-3 no CCR e com isso enfatizamos a possibilidade de utilização da claudina-3 como biomarcador.

Figura 27 - Esquema mostrando os efeitos da superexpressão de claudina-3 em células sobreviventes à radiação e frente ao tratamento com inibidores de vias de sinalização



Legenda: A) Células HT-29 que superexpressam claudina-3 apresentam aumento na proliferação, migração e formação de colônias; B) A progênie de células HT-29 que superexpressam claudina-3 sobreviventes a radiação apresentam diminuição na proliferação, invasão e formação de colônias; C) A progênie de células HT-29 que superexpressam claudina-3 sobreviventes ao pré-tratamento com os inibidores de MEK ou PI3K e a radiação apresentam diminuição na proliferação celular e aumento na migração e formação de colônia.

CONCLUSÕES

- a) O EGF regula a expressão proteica de claudina-3;
- b) A indução da superexpressão de claudina-3 contribui para o processo de malignização das células;
- c) A radiação tem a capacidade de diminuir a expressão de claudina-3;
- d) A superexpressão de claudina-3 é capaz de melhorar a resposta das células à radiação, revertendo o processo de malignização;
- e) O pré-tratamento com inibidores das vias de proliferação (MEK/ERK) e sobrevivência (PI3K-Akt) são capazes de reverter a melhora na resposta à radiação das células que superexpressam claudina-3, contribuindo para um potencial mais agressivo das células;
- f) A claudina-3 pode ser um bom marcador de prognóstico, preditivo de tratamento e alvo terapêutico, a fim de proporcionar aos pacientes de câncer um tratamento mais individualizado / personalizado;

REFERÊNCIAS

Adjei AA. K-ras as a target for lung cancer therapy. *J Thorac Oncol* 2008; 3(6): 160-163.

Agarwal R, D'Souza T, Morin PJ. Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer Research* 2005; 65(16): 7378-7385.

Ahmed K, Li J. NF- κ B-mediated adaptive resistance to ionizing radiation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008; 44, 113.

American Cancer Society. American Cancer Society Cancer Facts & Figures. 2015.

Barcellos-Hoff M, Park C, Wright E. Radiation and the microenvironment – tumorigenesis and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5, 867–875.

Bastos LG, de Marcondes PG, de-Freitas-Junior JC, Leve F, Mencialha AL, de Souza WF, de Araújo WM, Tanaka MN, Abdelhay ES, Morgado-Díaz JA. Progeny from irradiated colorectal cancer cells acquire an EMT-like phenotype and activate Wnt/ β -catenin pathway. *J Cell Biochem*. 2014; 115, 2175–2187.

Baum B, Georgiou M. Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J Cell Biol*. 2011; 192, 907-17.

Bedeir A, Krasinskas. A Molecular diagnostics of colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2011; 135, 578–587.

Bonazzi M, Cossart P. Impenetrable barriers or entry portals? The role of cell-cell adhesion during infection. *J Cell Biol*. 2011; 195, 349-58.

Brand T, Wheeler D. KRAS mutant colorectal tumors. *Small GTPases*. 2011; 3, 34-9.

Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol*. 2012; 13, 790–801.

Brink M, Stiggelbout A, Hout W, Kievit J, Kranenbarg E, Marijnen C, Nagtegaal I, Rutten H, Wiggers T, Velde C. Clinical Nature and Prognosis of Locally Recurrent Rectal Cancer After Total Mesorectal Excision With or Without Preoperative Radiotherapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2004; 22, 3958–3964.

Centelles J. General Aspects of Colorectal Cancer. *ISRN Oncol*. 2012; 2012.

Chan A, Giovannucci E. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2012; 138, 2029–2043.e10.

Chang TL, Ito K, Ko TK, Liu Q, Salto-Tellez M, Yeoh KG, Fukamachi H, Ito Y. Claudin-1 has tumor suppressive activity and is a direct target of RUNX3 in gastric epithelial cells. *Gastroenterology*. 2010; 138, 255–65.e1–3.

Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res*. 1988; 48, 1936-42.

Chao YC, Pan SH, Yang SC, Yu SL, Che TF, Lin CW, Tsai MS, Chang GC, Wu CH, Wu YY, Lee YC, Hong TM, Yang PC. Claudin-1 is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 179, 123–133.

Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA; BRIM-3 Study Group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011; 364, 2507–2516.

Clevers, H, and Nusse, R. Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease. *Cell*. 2012; 149, 1192-205.

De Carvalho AD, de Souza W, Morgado-Díaz JÁ. Morphological and molecular alterations at the junctional complex in irradiated human colon adenocarcinoma cells, Caco-2. *Int J Radiat Biol*. 2006; 82, 658–668.

De Souza WF, Fortunato-Miranda N, Robbs BK, de Araujo WM, de-Freitas-Junior JC, Bastos LG, Viola JP, Morgado-Díaz JA. Claudin-3 overexpression increases the malignant potential of colorectal cancer cells: roles of ERK1/2 and PI3K-Akt as modulators of EGFR signaling. *PLoS ONE*. 2013; 8, e74994.

DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, Alteri R, Robbins AS, Jemal A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014; 64, 252–271.

Dhawan P Ahmad R, Chaturvedi R, Smith JJ, Midha R, Mittal MK, Krishnan M, Chen X, Eschrich S, Yeatman TJ, Harris RC, Washington MK, Wilson KT, Beauchamp RD, Singh, AB. Claudin-2 expression increases tumorigenicity of colon cancer cells: role of epidermal growth factor receptor activation. *Oncogene*. 2011; 30, 3234–3247.

Dhawan P, Singh A, Deane N, No Y, Shiou SR, Schmidt C, Neff J, Washington M, Beauchamp R. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *Journal of Clinical Investigation*. 2005; 115, 1765-1776.

Doubeni C, Major J, Laiyemo A, Schootman M, Zauber A, Hollenbeck A, Sinha R, Allison J. Contribution of Behavioral Risk Factors and Obesity to Socioeconomic Differences in Colorectal Cancer Incidence. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2012; 104, 1353–1362.

Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol*. 2011; 6, 479–507.

Fearon E, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990; 61, 759–767.

Fiore F, Sesboüé R, Michel P, Sabourin J, Frebourg T. Molecular determinants of anti-EGFR sensitivity and resistance in metastatic colorectal cancer. *BR J Cancer*. 2010; 103, 1765–1772.

Furuse M, Furuse K, Sasaki H, and Tsukita S. Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Bio*. 2001; 153, 263–72.

Furuse M. Molecular Basis of the Core Structure of Tight Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010; 2, a002907.

Gao Z, McClane BA. Use of *Clostridium perfringens* Enterotoxin and the Enterotoxin Receptor-Binding Domain (C-CPE) for Cancer Treatment: Opportunities and Challenges. *J Toxicol*. 2012; 2012, 981626.

Gao Z, Xu X, McClane B, Zeng Q, Litkouhi B, Welch WR, Berkowitz RS, Mok SC, Garner EI. C terminus of *Clostridium perfringens* enterotoxin downregulates CLDN4 and sensitizes ovarian cancer cells to Taxol and Carboplatin. *Clin Cancer Res*. 2011; 17, 1065–1074.

Gout S, Marie C, Lainé M, Tavernier G, Block M, Jacquier-Sarlin M. Early enterocytic differentiation of HT-29 cells: biochemical changes and strength increases of adherens junctions. *Experimental Cell Research*. 2004; 299, 498510.

Glynne-Jones R. Neoadjuvant treatment in rectal cancer: do we always need radiotherapy-or can we risk assess locally advanced rectal cancer better? *Recent Results. Cancer Res*. 2012; 196, 21–36.

González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo B. Tight junction proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2003; 81, 1–44.

Günzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*. 2013; 93, 525–569.

- Halaschek-Wiener J, Wacheck V, Schlagbauer-Wadl H, Wolff K, Kloog Y, Jansen B. A novel Ras antagonist regulates both oncogenic Ras and the tumor suppressor p53 in colon cancer cells. *Mol Med*. 2000; 6, 693–704.
- Hamada N, Matsumoto H, Hara T, Kobayashi Y. Intercellular and Intracellular Signaling Pathways Mediating Ionizing Radiation-Induced Bystander Effects. *JRR*. 2007; 48, 87–95.
- Hanahan D, Weinberg R. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000; 100.
- Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011; 144.
- Harrison S, Benziger H. The molecular biology of colorectal carcinoma and its implications: a review. *Surgeon*. 2011; 9, 200–210.
- Hartsock A, Nelson W. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1778, 660-9.
- Haura EB, Ricart AD, Larson TG, Stella PJ, Bazhenova L, Miller VA, Cohen RB, Eisenberg PD, Selaru P, Wilner KD, Gadgeel SM. A phase II study of PD-0325901, an oral MEK inhibitor, in previously treated patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2010; 16(8):2450-7
- Hough CD, Sherman-Baust CA, Pizer ES, Montz FJ, Im DD, Rosenshein NB, Cho KR, Riggins GJ, Morin PJ. Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res*. 2000; 60, 6281–6287.
- Huang J, Zhang L, He C, Qu Y, Li J, Zhang J, Du T, Chen X, Yu Y, Liu B, Zhu Z. Claudin-1 enhances tumor proliferation and metastasis by regulating cell anoikis in gastric cancer. *Oncotarget*. 2014; 6, 1652-65.
- Ikari A, Sato T, Takiguchi A, Atomi K, Yamazaki Y, Sugatani J. Claudin-2 knockdown decreases matrix metalloproteinase-9 activity and cell migration via suppression of nuclear Sp1 in A549 cells. *Life Sci*. 2011; 88, 628–633.
- Ikari A, Sato T, Watanabe R, Yamazaki Y, Sugatani J. Increase in claudin-2 expression by an EGFR/MEK/ERK/c-Fos pathway in lung adenocarcinoma A549 cells. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1823, 1110–1118.
- Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol*. 2005; 171, 939-45.
- Ikenouchi J, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M, and Tsukita S (2008). Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin *Mol Biol Cell* 19, 4687-93.

Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci.* 2003; 116, 1959–1967.

INCa. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer & Ministério da Saúde. 2014.

Itallie C, Anderson J. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol.* 2006; 68, 403–429.

Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology.* 2010; 138, 2044–2058

Jung JW, Hwang SY, Hwang JS, Oh ES, Park S, Han IO. Ionising radiation induces changes associated with epithelial-mesenchymal transdifferentiation and increased cell motility of A549 lung epithelial cells. *European Journal of Cancer.* 2007; 43, 12141224.

King AJ, Arnone MR, Bleam MR, Moss KG, Yang J, Fedorowicz KE, Smitheman KN, Erhardt JA, Hughes-Earle A, Kane-Carson LS, Sinnamon RH, Qi H, Rheault TR, Uehling DE, Laquerre SG. Dabrafenib; preclinical characterization, increased efficacy when combined with trametinib, while BRAF/MEK tool combination reduced skin lesions. *PLoS ONE.* 2013; 8, e67583.

Kominsky SL, Vali M, Korz D, Gabig TG, Weitzman SA, Argani P, Sukumar S. Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol.* 2004; 164, 1627–1633.

Korompay A, Borka K, Lotz G, Somorác A, Törzsök P, Erdélyi-Belle B, Kenessey I, Baranyai Z, Zsoldos F, Kupcsulik P, Bodoky G, Schaff Z, Kiss A. Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. *Histopathology.* 2012; 60, E76-86.

Krause G, Winkler L, Mueller S, Haseloff R, Piontek J, Blasig I. Structure and function of claudins. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2008; 1778, 631-645.

Krug S, Amasheh S, Richter J, Milatz S, Günzel D, Westphal J, Huber O, Schulzke J, Fromm M. Tricellulin Forms a Barrier to Macromolecules in Tricellular Tight Junctions without Affecting Ion Permeability. *Molecular Biology of the Cell.* 2009; 20, 3713–3724.

Krug SM, Schulzke JD, Fromm M. Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Semin Cell Dev Biol.* 2014; 36, 166–176.

Laukoetter M, Nava P, Nusrat A. Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008; 14, 401-7.

Lee K, Shim J, Bae J, Kim YJ, Lee J. Stabilization of RNT-1 protein, runt-related transcription factor (RUNX) protein homolog of *Caenorhabditis elegans*, by oxidative

stress through mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*. 2012; 287, 10444–52.

Li X, Lida M, Tada M, Watari A, Kawahigashi Y, Kimura Y, Yamashita T, Ishii-Watabe A, Uno T, Fukasawa M, Kuniyasu H, Yagi K, Kondoh M. Development of an anti-claudin-3 and -4 bispecific monoclonal antibody for cancer diagnosis and therapy. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014; 351, 206–213.

Li, X, Ishihara, S, Yasuda, M, Nishioka, T, Mizutani, T, Ishikawa, M, Kawabata, K, Shirato, H, Haga, H. Lung cancer cells that survive ionizing radiation show increased integrin $\alpha 2\beta 1$ - and EGFR-dependent invasiveness. *PLoS ONE*. 2013; 8, e70905.

Lu KH, Patterson AP, Wang L, Marquez RT, Atkinson EN, Baggerly KA, Ramoth LR, Rosen DG, Liu J, Hellstrom I, Smith D, Hartmann L, Fishman D, Berchuck A, Schmandt R, Whitaker R, Gershenson DM, Mills GB, Bast RC. Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recursive descent partition analysis. *Clin Cancer Res*. 2004; 10, 3291–3300.

Mariano C, Sasaki H, Brites D, Brito M. A look at tricellulin and its role in tight junction formation and maintenance. *European Journal of Cell Biology*. 2011; 90, 787–796.

Martin T, Jiang W. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1788, 872–891.

Martínez-Estrada OM, Cullerés A, Soriano FX, Peinado H, Bolós V, Martínez FO, Reina M, Cano A, Fabre M, Vilaró S. The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochem J*. 2008; 394:449.

Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol*. 1998; 142, 117-27.

McCaffrey L, Macara I. Epithelial organization, cell polarity and tumorigenesis. *Trends Cell Biol*. 2011; 21, 727–735.

McSherry EA, McGee SF, Jirstrom K, Doyle EM, Brennan DJ, Landberg G, Dervan PA, Hopkins AM, Gallagher W. JAM-A expression positively correlates with poor prognosis in breast cancer patients. *Int J Cancer*. 2009; 125, 1343–1351.

Mineta, K Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, Tamura A, Igarashi M, Endo T, Takeuchi K, Tsukita S. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett*. 2011; 585, 606-12

Michl P, Barth C, Buchholz M, Lerch MM, Rolke M, Holzmann KH, Menke A, Fensterer H, Giehl K, Löhr M, Leder G, Iwamura T, Adler G, Gress, TM. Claudin-4 expression

decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2003; 63, 6265–6271.

Mitchell LA, Koval M. Specificity of interaction between clostridium perfringens enterotoxin and claudin-family tight junction proteins. *Toxins (Basel)*. 2010; 2, 1595-611.

Morin PJ. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res.* 2005; 65, 9603–9606.

Nagarajan D, Melo T, Deng Z, Almeida C, Zhao W. ERK/GSK3 β /Snail signaling mediates radiation-induced alveolar epithelial-to-mesenchymal transition. *Free Radic Biol Med.* 2012; 52, 983–992.

Oliveira S, Morgado-Díaz J. Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2006; 64, 1728.

Oliveira S, Oliveira I, Souza W, Morgado-Díaz J. Claudins upregulation in human colorectal cancer. *FEBS Lett.* 2005; 579.

Ogawa M, Kojima T, Someya M, Nomura K, Takasawa A, Murata M, Tanaka S, Saito T, Sawada N. Epidermal growth factor modulates claudins and tight junctional functions in ovarian cancer cell lines. *Histochem Cell Biol.* 2012; 138, 323-38.

Ouban A, Ahmed A. Claudins in human cancer: a review. *Histol Histopathol.* 2010; 25, 83–90.

Pach R, Kulig J, Richter P, Gach T, Szura M, Kowalska T. Randomized clinical trial on preoperative radiotherapy 25 Gy in rectal cancer—treatment results at 5-year follow-up. *Langenbecks Arch Surg.* 2011; 397, 801–807.

Paris L, Tonutti L, Vannini C, Bazzoni G. Structural organization of the tight junctions. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1778, 646-59.

Patonai A, Erdélyi-Belle B, Korompay A, Somorác Á, Straub B, Schirmacher P, Kovalszky I, Lotz G, Kiss A, Schaff Z. Claudins and tricellulin in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Virchows Arch.* 2011; 458, 679–688.

Pickhard AC, Margraf J, Knopf A, Stark T, Piontek G, Beck C, Boulesteix AL, Scherer EQ, Pigorsch S, Schlegel J, Arnold W, Reiter R. Inhibition of radiation induced migration of human head and neck squamous cell carcinoma cells by blocking of EGF receptor pathways. *BMC Cancer.* 2011; 11, 388.

Prenzel N, Fischer O, Streit S, Hart S, Ullrich A. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer.* 2001; 8, 11–31.

Prise K, Schettino G, Folkard M, Held K. New insights on cell death from radiation exposure. *The Lancet Oncology*. 2005; 6, 520528.

Pruteanu M, Shanahan F. Digestion of epithelial tight junction proteins by the commensal *Clostridium perfringens*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013; 305, G740–8.

Raleigh D, Marchiando A, Zhang Y, Shen L, Sasaki H, Wang Y, Long M, Turner J. Tight Junction-associated MARVEL Proteins MarvelD3, Tricellulin, and Occludin Have Distinct but Overlapping Functions. *Molecular Biology of the Cell*. 2001; 21, 1200–1213

Rangel, LB, Agarwal R, D'Souza T, Pizer ES, Alò PL, Lancaster WD, Gregoire L, Schwartz DR, Cho KR, Morin PJ. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clin Cancer Res*. 2003; 9, 2567–2575.

Riazuddin S, Ahmed ZM, Fanning AS, Lagziel A, Kitajiri S, Ramzan K, Khan SN, Chattaraj P, Friedman PL, Anderson JM, Belyantseva IA, Forge A, Riazuddin S, Friedman TB. Tricellulin Is a Tight-Junction Protein Necessary for Hearing. *The American Journal of Human Genetics*. 2006; 79, 10401051.

Rinehart J, Adjei AA, Lorusso PM, Waterhouse D, Hecht JR, Natale RB, Hamid O, Varterasian M, Asbury P, Kaldjian EP, Gulyas S, Mitchell DY, Herrera R, Sebolt-Leopold JS, Meyer MB. Multicenter phase II study of the oral MEK inhibitor, CI-1040, in patients with advanced non-small-cell lung, breast, colon, and pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22, 4456–4462.

Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke J D, Fromm M, Takano H, Noda T, and Tsukita S. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell*. 2000; 11, 4131-42.

Senda T, Iizuka-Kogo A, Onouchi T, Shimomura A. Adenomatous polyposis coli (APC) plays multiple roles in the intestinal and colorectal epithelia. *Med Mol Morphol*. 2007; 40, 6881.

Shang X, Lin X, Alvarez E, Manorek G, Howell SB. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 control tumor growth and metastases. *Neoplasia*. 2012; 14, 974–985.

Shen L, Weber C, Raleigh D, Yu D, Turner J. Tight Junction Pore and Leak Pathways: A Dynamic Duo. *Annu Rev Physiol*. 2001; 73, 283–309.

Shim S, Lee JG, Bae CH, Lee SB, Jang WS, Lee SJ, Lee SS, Park S. Claudin-3 expression in radiation-exposed rat models: a potential marker for radiation-induced intestinal barrier failure. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 456, 351–354.

Simon-Assmann P, Turck N, Sidhoum-Jenny M, Gradwohl G, Kedinger M. In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell Biol Toxicol*. 2007; 23, 241-56.

Singh A, Sharma A, Dhawan P. Claudin Family of Proteins and Cancer: An Overview. *Journal of Oncology* 2010.

Singh AB, Harris RC. Epidermal growth factor receptor activation differentially regulates claudin expression and enhances transepithelial resistance in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem*. 2004; 279, 3543–3552.

Soini Y. Claudins in lung diseases. *Respir Res*. 2011; 12:70.

Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y, Tsukita S. Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol*. 1999; 147, 195–204.

Steed E, Balda M, Matter K. Dynamics and functions of tight junctions. *Trends Cell Biol*. 2010; 20, 142–149.

Stoffel EM, Kastrinos F. Familial colorectal cancer, beyond Lynch syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014; 12, 1059–1068.

Süren D, Yıldırım M, Kaya V, Alikanoğlu AS, Bülbüller N, Yıldız M, Sezer C. Loss of tight junction proteins (Claudin 1, 4, and 7) correlates with aggressive behavior in colorectal carcinoma. *Med Sci Monit*. 2014; 20, 1255–1262.

Tamura A, Tsukita S. Paracellular barrier and channel functions of TJ claudins in organizing biological systems: advances in the field of barrierology revealed in knockout mice. *Semin Cell Dev Biol*. 2014; 36, 177–185.

Takehara M, Nishimura T, Mima S, Hoshino T, Mizushima T. Effect of claudin expression on paracellular permeability, migration and invasion of colonic cancer cells. *Biol Pharm Bull*. 2009; 32, 825–831.

Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 2010; 138, 2101–2114.e5.

Thiery J, Sleeman J. Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7, 131–142.

Turksen K, Troy T. Junctions gone bad: claudins and loss of the barrier in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1816, 73–79.

Tsanou E, Peschos D, Batistatou A, Charalabopoulos A, Charalabopoulos, K. The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach. *Anticancer Res*. 2008; 28, 3815–3826.

Tsukamoto H, Shibata K, Kajiyama H, Terauchi M, Nawa A, Kikkawa F. Irradiation-induced epithelial–mesenchymal transition (EMT) related to invasive potential in endometrial carcinoma cells. *Gynecologic Oncology*. 2007; 107, 500504.

Tsukita S, Furuse M. The Structure and Function of Claudins, Cell Adhesion Molecules at Tight Junctions. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 915:129–135.

Usami Y, Satake S, Nakayama F, Matsumoto M, Ohnuma K, Komori T, Semba S, Ito A, Yokozaki H. Snail-associated epithelial-mesenchymal transition promotes oesophageal squamous cell carcinoma motility and progression. *J Pathol*. 2008; 215, 330–9.

Van Itallie CM, Anderson JM. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin Cell Dev Biol*. 2014; 36, 157–165.

Van Itallie CM, Betts L, Smedley JG, McClane BA, Anderson JM. Structure of the claudin-binding domain of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J Biol Chem*. 2008; 283, 268–274.

Wang Q, Margolis B. Apical junctional complexes and cell polarity. *Kidney Int*. 2007; 72, 1448-58.

Wolpin B, Meyerhardt J, Mamon H, Mayer R. Adjuvant Treatment of Colorectal Cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2007; 57, 168–185.

Yacoub A, Miller A, Caron R, Qiao L, Curiel D, Fisher P, Hagan M, Grant S, Dent P. Radiotherapy-induced signal transduction. *Endocrine Related Cancer*. 2006; 13, S99–S114.

Yap TA, Yan L, Patnaik A, Fearen I, Olmos D, Papadopoulos K, Baird RD, Delgado L, Taylor A, Lupinacci L, Riisnaes R, Pope LL, Heaton SP, Thomas G, Garrett MD, Sullivan DM, de Bono JS, Tolcher AW. First-in-man clinical trial of the oral pan-AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. 2011; 29(35):4688-95

Yoon J, Koo K, Choi K. MEK1/2 inhibitors AS703026 and AZD6244 may be potential therapies for KRAS mutated colorectal cancer that is resistant to EGFR monoclonal antibody therapy. *Cancer Res*. 2011; 71, 445–453.

Yunta M, Lazo PA. Tetraspanin proteins as organisers of membrane microdomains and signalling complexes. *Cell Signal*. 2003; 15(6):559-64.

Zeng F, Singh A, Harris R. The role of the EGF family of ligands and receptors in renal development, physiology and pathophysiology. *Exp Cell Res*. 2009; 315, 602–610.

Zhang M, Luo W, Huang B, Liu Z, Sun L, Zhang Q, Qiu X, Xu K, Wang E. Overexpression of JAM-A in non-small cell lung cancer correlates with tumor progression. *PLoS ONE*. 2013; 8, e79173.

Claudin-3 Overexpression Increases the Malignant Potential of Colorectal Cancer Cells: Roles of ERK1/2 and PI3K-Akt as Modulators of EGFR signaling

Waldemir F. de Souza¹, Natalia Fortunato-Miranda¹, Bruno K. Robbs², Wallace M. de Araujo¹, Julio C. de Freitas-Junior¹, Lillian G. Bastos¹, João P. B. Viola², José A. Morgado-Díaz^{1*}

¹ Grupo de Biologia Estrutural, Programa de Biologia Celular, Centro de Pesquisas, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil, ² Grupo de Regulação Gênica, Programa de Biologia Celular, Centro de Pesquisas, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract

The altered expressions of claudin proteins have been reported during the tumorigenesis of colorectal cancer. However, the molecular mechanisms that regulate these events in this cancer type are poorly understood. Here, we report that epidermal growth factor (EGF) increases the expression of claudin-3 in human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells. This increase was related to increased cell migration and the formation of anchorage-dependent and anchorage-independent colonies. We further showed that the ERK1/2 and PI3K-Akt pathways were involved in the regulation of these effects because specific pharmacological inhibition blocked these events. Genetic manipulation of claudin-1 and claudin-3 in HT-29 cells showed that the overexpression of claudin-1 resulted in decreased cell migration; however, migration was not altered in cells that overexpressed claudin-3. Furthermore, the overexpression of claudin-3, but not that of claudin-1, increased the tight junction-related paracellular flux of macromolecules. Additionally, an increased formation of anchorage-dependent and anchorage-independent colonies were observed in cells that overexpressed claudin-3, while no such changes were observed when claudin-1 was overexpressed. Finally, claudin-3 silencing alone despite induce increase proliferation, and the formation of anchoredependent and -independent colonies, it was able to prevent the EGF-induced increased malignant potential. In conclusion, our results show a novel role for claudin-3 overexpression in promoting the malignant potential of colorectal cancer cells, which is potentially regulated by the EGF-activated ERK1/2 and PI3K-Akt pathways.

Citation: de Souza WF, Fortunato-Miranda N, Robbs BK, de Araujo WM, de-Freitas-Junior JC, et al. (2013) Claudin-3 Overexpression Increases the Malignant Potential of Colorectal Cancer Cells: Roles of ERK1/2 and PI3K-Akt as Modulators of EGFR signaling. PLoS ONE 8(9): e74994. doi:10.1371/journal.pone.0074994

Editor: Jung Weon Lee, Seoul National University, Republic of Korea

Received: January 3, 2013; **Accepted:** August 9, 2013; **Published:** September 19, 2013

Copyright: © 2013 de Souza et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was sponsored by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Ministério da Saúde - Brasil, Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado de Rio de Janeiro (FAPERJ) and Instituto nacional de Ciência e Tecnologia em Câncer (573806/2008-0 and 170.026/2008). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jmorgado@inca.gov.br

Introduction

Tight junctions (TJs) are important structural components of the apical junctional complex in the epithelium, where they regulate various intracellular processes such as the establishment of apical-basal polarity and the flow of substances across the intercellular space [1]. Claudins are the main proteins that regulate the functions of TJs and are classified as a family of tetraspan integral membrane proteins, which currently comprises 27 members [2]. A myriad of diseases, including cancer, have been associated with alterations in the expression, stability and subcellular localization of claudin family members [3,4,5,6]. However, the precise molecular mechanisms that regulate the expression and function of these proteins, particularly in colorectal cancer, are poorly understood.

The epidermal growth factor receptor (EGFR) is dimerized and activated by its extracellular ligand, EGF, which triggers a signaling cascade that leads to the activation of cytoplasmic pathways such as MAPK and PI3K-Akt [7,8]; these pathways are known to modulate proliferation, differentiation and resistance to cell death [9,10]. Studies have shown that these pathways are

involved in events related to the carcinogenic processes in mouse epidermal and human gastric cancer cells [11,12], as well as in the increased migratory and invasive potential during the epithelial-mesenchymal transition in human ovarian cells [13]. EGF-mediated signaling pathways are also known to play important roles in the organization of TJs, in which they regulate the expression and localization of claudin proteins. For instance, EGF was reported to induce the upregulation of claudins 1, 3 and 4, and the EGF-induced downregulation of claudin-2 increases the force of the intercellular barrier, as determined by an increased transepithelial electrical resistance (TER) in MDCK-II cells [14,15]. However, using the same model (MDCK cells), other authors have reported that the downregulation of claudin-2 induced higher cell motility, even with increased TER [16]. Recently, the EGFR/ERK/c-Fos pathway was shown to up-regulate claudin-2, an increase that was correlated with increased intercellular permeability and cell migration in human lung adenocarcinoma cells [17,18].

Little information is known about the molecular mechanisms underlying the alterations in claudin expression that are associated with colorectal tumorigenesis. We have shown that patients with

colorectal cancer presented increased expression levels of claudins 1, 3 and 4, which altered the barrier function of IJs [19]. Recent studies have reported a controversial role for claudin-1 during colorectal carcinogenesis; increased claudin-1 expression was observed in hepatic metastatic lesions of colorectal cancer, but this expression was decreased in the lymph node metastases of colon carcinomas [20,21]. Additionally, the ERK1/2 and PI3K pathways have been reported to mediate increases in EGF-induced claudin-2 expression in colon cancer cells; this event was accompanied by increases in proliferation, anchorage-independent growth and tumor growth *in vivo* [22]. Therefore, it is important to understand the molecular mechanisms that regulate the expression of other claudin family members and the implications of claudin overexpression in colorectal cancer progression.

In the present study, we show that the EGF-mediated increased expression of claudin-3 is related to increased cell migration and the formation of anchorage-dependent and anchorage-independent colonies in human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells. Furthermore, we show that these events were mediated by the ERK1/2 and PI3K-Akt pathways. We also demonstrated that the forced overexpression of claudin-3 in HT-29 cells by genetic manipulation increased the malignant potential, while the overexpression of claudin-1 decreased cell migration. Most importantly, our results reveal that claudin-3 plays a role as tumor promoter when its expression is imbalanced and implicate the ERK1/2 and PI3K-Akt signaling pathways as modulators of claudin-3 upregulation-related tumor progression in colorectal cancer cells.

Materials and Methods

Materials

Anti-claudin-1 (Cat. no. 51-9000) and anti-claudin-3 (Cat. no. 34-1700) rabbit polyclonal antibodies as well as an anti- α -tubulin mouse monoclonal antibody (Cat. no. 32 2500) were obtained from Invitrogen Inc. (Carlsbad, CA, USA). Anti-Akt (Cat. no. 1691) and anti-p-Akt (Cat. no. 4058) rabbit monoclonal antibodies as well as an anti-ERK mouse monoclonal (Cat. no. 9107) antibody were purchased from Cell Signaling (Beverly, MA, USA). The anti-uvomorulin/E-cadherin rat monoclonal (Cat. no. U3254) and anti-p-ERK1/2 mouse monoclonal (Cat. no. M3159) antibodies were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). An anti-E-cadherin mouse monoclonal antibody (clone 36, Cat. no. 610182) was purchased from BD Biosciences (San Diego, CA, USA). Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit and anti-mouse IgG were purchased from GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK). Alex-fluor-488 anti-rabbit (Cat. no. A11003) and Alex-fluor-546 anti-rat (Cat. no. A11010) were obtained from Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA). The 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one LY294002 (PI3K inhibitor) (Cat. no. L9908) was obtained from Sigma-Aldrich, the 2-(2-amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one PD98059 (MEK1 inhibitor) (Cat. no. 9900) was obtained from Cell Signaling, and EGF (Cat. no. PHG0311) was purchased from Invitrogen Inc.

Cell Culture

The human colorectal adenocarcinoma cell lines Caco-2 (Cat. no. HTB-37) and HT-29 (Cat. no. HTB-38) as well as the human embryonic kidney cell line HEK-293 (Cat. no. CRL-1573) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Caco-2 cells present with a differentiated phenotype at the monolayer stage and possess a low invasive and metastatic potential [23,24,25], while the HT-29 cells present with an

undifferentiated phenotype and a high tumorigenic potential [26]. The cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) that was supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), penicillin G (60 mg/L), and streptomycin (100 mg/L) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/air. For experimental purposes, the cells were seeded into culture plates or onto glass coverslips.

Treatment with EGF and Pharmacological Inhibitors

Cell cultures were treated with 20 ng/mL of EGF, a concentration that we have used in a previous study [27]. The effects of EGF treatment on claudin-1 and claudin-3 expression in Caco-2 and HT-29 cells were assessed in cells growing in DMEM medium supplemented with 10% FBS after 6, 24 and 48 h. For pharmacological inhibition, cells were serum starved overnight and selective inhibitors were added to the cell cultures 1 h before EGF treatment to inhibit the intrinsic kinase activity. The cells were then incubated with fresh culture medium supplemented with 10% FBS containing EGF and selective inhibitors, which were maintained throughout the experiments. The inhibitors were diluted in DMSO and stored at -20°C. Each concentrated solution was diluted immediately before each experiment to yield final concentrations of 50 μ M (PD98059) and 8 μ M (LY294002).

Plasmid Construction, Production of Recombinant Retroviruses and the Infection of HT-29 Cells

Constructs that contain claudin-1 and claudin-3 murine cDNA have been previously described [28,29] and were kindly provided by Dr. Mikio Furuse (Division of Cell Biology, Department of Physiology and Cell Biology, Kobe University, Japan). The cDNAs contained in these constructs were subcloned into the pBABE-Puro backbone retroviral plasmid to generate the pBABE-Cld1 (BamHI-XhoI) and pBABE-Cld3 (BglII-XhoI) constructs. HEK-293 cells were used as retroviral packaging cells after a transient co-transfection by calcium phosphate precipitation for 24 h with the pCL-Ampho retroviral packaging vector (Cat. no. 10046P; Imgenex, CA, USA) and one of the following constructs: pBABE-Cld1, pBABE-Cld3 or empty retroviral vectors. The cell-free supernatant that contained the virus was collected 48 h after transfection, mixed 1:1 with fresh medium, supplemented with 8 μ g/ml polybrene (Cat. no. 107689; Sigma-Aldrich), and immediately used for the spin-infection (2 \times 45 min at 400 \times g at room temperature) of 5 \times 10⁴ HT-29 cells. Infected cells were incubated at 37°C for an additional 24 h, trypsinized and used as indicated.

HT-29^{Cld1} and HT-29^{Cld3} Cell Construction

HT-29^{Cld1}, HT-29^{Cld3} or empty-vector (HT-29^{pBABE}) cells were generated by transducing HT-29 wild-type cells with pBABE-Cld1, pBABE-Cld3 or empty vectors and selecting successfully transduced cells with 7.5 μ g/ml puromycin (Cat. no. P8833; Sigma-Aldrich) for at least 5 days. The clones were isolated and the overexpression of claudins 1 and 3 was confirmed by immunoblotting.

Claudin-3 Silencing

HT-29 cells were transfected with either a non-targeting control siRNA (siRNA negative control # 1; Cat. no. 4390844; Ambion, TX, USA), scramble as a control for non-sequence-specific effects, or a claudin-3-specific siRNA sequence (Silencer Pre-designed siRNA CLDN3, Cat. no. SI03101623; Qiagen, MD, USA). The cells (10⁶) were resuspended in 100 μ L of 1SM buffer [30], kindly provided by Dr. Martin Bonamino (INCA, Brazil), containing

either the scrambled or CLDN3-specific duplex. The cells were transferred in a 0.2 cm cuvette (Cat. no. MIR 50121; Mirus Biotech, Madison, WI, USA) and electroporated using the W-17 program of the Lonza Nucleofector II electroporation system for HT-29 cells (Lonza Group Ltd, Basel, Switzerland). The cells were then gently resuspended in DMEM supplemented with 10% FBS to a final siRNA concentration of 25 or 45 nM. The attenuation of CLDN3 expression was verified by immunoblotting cell lysates and probing them with an antibody against claudin-3.

Cell Extraction and Immunoblotting

Caco-2 (3×10^5) and HT-29 (2×10^5) cells were seeded into 6-well plates and incubated until confluence. The cell monolayers were then scraped and homogenized in lysis buffer (1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.2% SDS, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM HEPES, pH 7.3) that contained 20 mM NaF, 1 mM orthovanadate and a protease inhibitor cocktail (1:100 dilution) to obtain total cell lysates. The homogenized lysates were centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min at 4°C. The supernatants were collected and stored at -20°C for later analysis. Equal amounts of protein (30 µg/lane) per sample were separated by SDS-PAGE electrophoresis on 13% gels and transferred to nitrocellulose sheets. The membranes were blocked and incubated with primary antibodies against claudin-1 (1:500), claudin-3 (2 µg/mL), or α -tubulin (1:1000). After washing, the membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies. The proteins were visualized using an enhanced chemiluminescence kit (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). The bands were quantified according to their optical densities using LabWorks 4.6 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Immunofluorescence

Caco-2 (2×10^5) and HT-29 (10^5) cells were seeded on glass coverslips in 24-well plates and incubated until confluence. The cell monolayers were subsequently washed with PBS and fixed with methanol for 10 min at -20°C. Next, the cells were blocked with 0.2% BSA in PBS for 1 h and permeabilized with 0.1% Triton X-100. The cells were incubated overnight with anti-claudin-1, anti-claudin-3 (1:40), anti-E-cadherin (1:300) antibodies, followed by 1 h incubations with the appropriate Alexa 488-conjugated secondary antibodies (1:500). Following the incubations, the cells were mounted using n-propyl-gallate to allow for visualization with either an Axio Observer.Z1 microscope that was equipped with an AxioCam HRC and the AxioVision Release 4.3 digital image processing software (Carl Zeiss Inc., Jena, Germany) or a confocal laser scanning microscope **FV10i-O**, from which images were analyzed using the FV10-ASW software (Olympus, Tokyo, Japan).

Wound Healing Assay

HT-29 cells (2×10^5) were seeded into 6-well plates and incubated until confluence. To perform wound-healing assays, cell monolayers were manually wounded by scraping with pipette tips. After different treatments, the cells were permitted to migrate into the denuded areas and photographed immediately after wounding (0 h) and at 6 h or 24 h after wounding. The distance between the two edges of a denuded area was quantified in triplicate and repeated independently three times. Migration is represented as the percentage of cell migration and plotted on a graph.

Cell Proliferation Assays

The relative viable cell numbers were determined using crystal violet or trypan blue dyes. The crystal violet method was conducted as described previously [31]. Briefly, the HT-29 cells (10^5) were seeded into 96-well plates and incubated in culture medium with or without EGF for 24 and 48 h before ethanol fixation for 10 min. A crystal violet solution (0.05% crystal violet and 20% methanol) was added to the cells for 10 min. The cells were washed and solubilized with methanol. The absorbances at 595 nm were measured with a Spectra Max 190 spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). For the trypan blue method, transduced HT-29 cells (2×10^5) were seeded into 6-well plates and incubated in culture medium for 6 h. After the incubations, the cells were trypsinized (0.05% trypsin/0.02% EDTA in PBS solution) and counted on an Axio Observer.Z1 microscope (Zeiss) with a Neubauer chamber hemacytometer and trypan blue dye (0.4% trypan blue in PBS solution).

Anchorage-dependent and -independent Colony Formation

For anchorage-dependent colony formation assays, HT-29 cells were seeded at a low density (2.5×10^3) for 4 h in 12-well plates and treated with EGF for 5 days or left untreated. After 5 days, the cells were fixed with ethanol for 10 min and stained with a crystal violet solution (0.05% crystal violet and 20% methanol). The cells were washed twice with water and solubilized with methanol. The colonies were either counted with an Axio Observer.Z1 microscope (Zeiss) or the absorbances were measured at 595 nm with a Spectra Max 190 spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

For anchorage-independent colony formation assays, 12-well plates were coated with growth medium supplemented with 10% FBS containing 0.6% agarose to avoid cell adhesion to the substrate. HT-29 cells (5×10^3) were then resuspended in culture medium containing 10% FBS plus 0.3% agarose, seeded on the substrate described above and submitted to different treatments for 11 days (as indicated). At the endpoint, the colonies were counted with an Axio Observer.Z1 microscope (Zeiss).

Measurement of the Transepithelial Electrical Resistance (TER)

TJ functionality was also assessed by measuring the TER to evaluate the paracellular flux to ions, as previously described by Contreras and colleagues [32] with slight modifications. Briefly, transduced HT-29 cells (10^5) were seeded at confluence onto Transwell polyester membrane cell culture inserts with a 0.4 µm pore size and 0.33 cm² surface area (Cat. no. CLS3470; Sigma-Aldrich). The TER values were determined using a Millicell-ERS system (Millipore Co., Billerica, MA, USA). The values plotted on the graph were normalized for the area of the insert and the blank value (bath solution incubated with insert without cells) was subtracted. The TER was thus measured in Ohms \times cm² ($\Omega \cdot \text{cm}^2$).

Macromolecule Permeability Assay

To further test the TJ functionality, the macromolecular permeability was assessed using an antibody permeability assay, as described previously [33]. Transduced HT-29 cells (10^5) were seeded on glass coverslips in 24-well plates and incubated until confluence. The cell monolayers were then fixed in 2% paraformaldehyde and incubated with anti-uvomorulin/E-cadherin antibody for 2 h under nonpermeabilization conditions, followed by 1 h incubation with the respective secondary antibody

at 37°C. The uvomorulin/E-cadherin staining was visualized with an Axio Observer.Z1 microscope (Zeiss).

Statistical Analysis

A statistical analysis was performed with a one-way ANOVA, followed by Dunnett's post-tests or the t-test using the GraphPad Prism 4.02 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The graphs represent the means \pm the standard error (SEM) of three independent experiments. A difference of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

EGF Increases the Protein Levels of Claudin-3 in HT-29 Cells but not in Caco-2 Cells

Initially, we examined changes in the expression levels of claudin-1 and claudin-3 after EGF treatment in two colorectal adenocarcinoma cell lines, Caco-2 and HT-29, which differ in differentiation status and metastatic potential. We observed that EGF-treatment did not significantly alter the protein levels of claudins 1 and 3 in Caco-2 and HT-29 cells at an early time point (6 h) (Fig. 1A). Following prolonged EGF-treatment times (24 and 48 h), the protein levels of claudins 1 and 3 were not altered significantly in Caco-2 cells. However, HT-29 cells showed significantly increased levels of claudin-3, while the levels of claudin-1 remained unchanged in this same time point of treatment (Fig. 1B). Furthermore, immunofluorescence analysis indicated that EGF treatment for 48 h did not alter the distribution patterns of claudins 1 and 3 in Caco-2 cells (Fig. 2A). Nevertheless, a discontinuous staining pattern and the punctual accumulation of these proteins were observed in some cell-cell contact regions of HT-29 cells (Fig. 2B). Because EGF did not alter the protein levels of claudins 1 and 3 in Caco-2 cells, we examined whether EGF can activate effector pathways in this cell line. We verified that EGF treatment increased the phosphorylation levels of ERK1/2 (Fig. S1), a known signaling effector triggered by EGF. These results indicate that EGF treatment differentially regulates claudins 1 and 3 depending on the cellular context. Based on these results, we chose HT-29 cells for subsequent functional analyses due to the alterations observed in the expression and subcellular distribution of the claudin proteins after EGF treatment.

EGF Treatment Increases the Migration and Anchorage-Dependent and Anchorage-Independent Colony Formation of HT-29 Cells

We have shown that increased cell migration is related to mechanisms of tumor progression in cancer cells [10,31] and that EGF treatment increased the migration of Caco-2 cells [34]. To determine whether EGF altered the migration of HT-29 cells, we performed wound-healing assays after EGF treatment. We observed that after 24 h of EGF treatment, the cell migratory potential was increased compared with that of untreated cells (Fig. 3A and 3B). To further investigate whether the wound closure was indeed due to the migration status and not cell proliferation, we verified the relative number of viable cells. Figure 3C shows that cell proliferation was not altered in EGF-treated cells when compared with untreated cells at the same time-point that was observed in the wound-healing assay. An increase in cell proliferation was observed only 48 h after EGF treatment.

It is known that cell transformation is an important parameter to evaluate the malignant potential, which may also be assessed by the ability of cells to form anchorage-dependent and anchorage-independent colonies [35,36]. In this context, we evaluated the

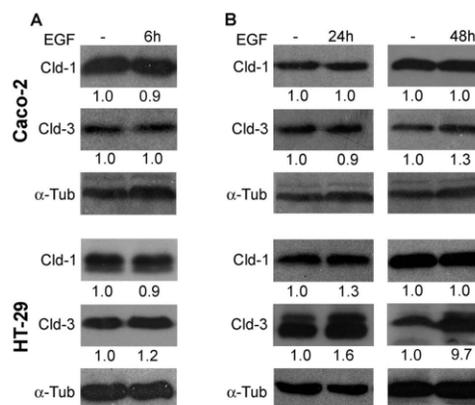


Figure 1. Effect of EGF on the claudins 1 and 3 expression in Caco-2 and HT-29 cells. Cultured Caco-2 and HT-29 cells were treated with EGF (20 ng/mL) for 6 h (A), 24 h and 48 h (B). Following EGF treatment, total cell lysates were harvested and analyzed by immunoblotting for the expression of claudins 1 and 3. α -tubulin was used as a loading control. The numbers represent the ratio of the optical density of EGF-treated to untreated cells normalized by α -tubulin. *Claudin*; Cld. α -tubulin; α -tub. doi:10.1371/journal.pone.0074994.g001

cell-transforming potential of EGF in HT-29 cells. As observed in figure 4A, EGF-treated cells displayed higher numbers of anchorage-dependent colonies when compared with untreated cells. Furthermore, EGF treatment increased the number of anchorage-independent colonies and the colony sizes compared to control cells (Fig. 4B). Together, these data show that EGF enhances events related to the malignant potential of undifferentiated colorectal cancer cells.

ERK1/2 and PI3K-Akt Signaling Mediate EGF-Induced Increases in Cell Migration and the Colony Formation of HT-29 Cells

EGF is well known to activate signaling pathways, such as ERK1/2 and PI3K-Akt, to regulate cell proliferation, survival and differentiation in various tumor cell models. Therefore, we analyzed whether these pathways could also modulate the underlying EGF-induced events that we had observed here, including the increase in claudin-3 expression. As seen in figure 5A, EGF treatment increased the phosphorylation levels of ERK1/2 and Akt, indicating the activation of these proteins. Next, we pharmacologically inhibited the MEK1/2-ERK1/2 and PI3K-Akt pathways with PD98059 and LY294002, respectively, to verify whether these pathways could modulate the EGF-induced increase in claudin-3 expression levels in HT-29 cells. We observed that treatment with these inhibitors alone or in combination prevented the EGF-induced increase in claudin-3 expression levels (Fig. 5B). Furthermore, we observed that inhibition of the ERK1/2 and PI3K-Akt signaling pathways prevented the EGF-induced increase in cell migration (Fig. 5C). In figures 5D and 5E, we further verified that the inhibition of both pathways prevented EGF-induced increases in the numbers of anchorage-dependent and anchorage-independent colonies. Interestingly, pretreatment with the PI3k inhibitor alone and in combination with the ERK1/2 inhibitor decreased the anchorage-dependent colony formation.

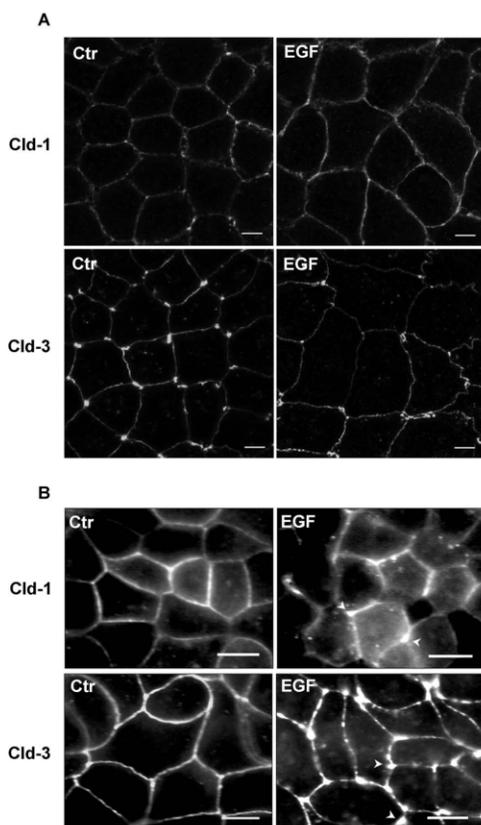


Figure 2. The effect of EGF treatment on the subcellular distribution of claudins 1 and 3. Cell monolayers were grown on glass coverslips and processed for immunofluorescence analysis of claudin-1 and claudin-3 distribution after EGF treatment (48 h). The stained cells were viewed with confocal *FV10i-O* or Axio Observe.Z1 microscopes. (A) Caco-2 cells; *bar*: 5 μ m. (B) HT-29 cells; *bar*: 10 μ m. *Arrowheads*; punctual accumulation of claudins. *Ctrl*; control. doi:10.1371/journal.pone.0074994.g002

Together, these data strongly support the notion that the ERK1/2 and PI3K-Akt pathways are also involved in increased claudin-3 expression levels, concomitant to the increased malignant potential that is induced by EGF in HT-29 cells.

Forced Overexpression of Claudin-1 and Claudin-3 increases the TER, but Claudin-3 Overexpression Facilitates the Paracellular Flux to Macromolecules

Based on the results described above, we postulated that the differential expression levels of claudin-1 and claudin-3 play important roles in colorectal cancer progression. To further test this hypothesis, we forced the expression of claudin-1 and claudin-3 cDNA in HT-29 cells, and the resulting cells were named HT-29^{Cld-1} and HT-29^{Cld-3}, respectively. Immunoblot analysis confirmed robust claudin-1 (HT-29^{Cld-1}) and claudin-3 (HT-29^{Cld-3})

overexpression compared with cells that were transfected with the empty vector (HT-29^{pBABE}) (Fig. 6A). Furthermore, cells that overexpressed these proteins displayed increased cytoplasmic staining; however, the labeling was maintained at cell-cell contacts (Fig. 6B).

In a previous study, we showed that the upregulation of claudins 1, 3 and 4 was associated with the disorganization of TJ fibrils, leading to the increased permeability of the paracellular barrier in tissue samples of human colorectal cancer [19]. Accordingly, we measured the TER to evaluate the effects of claudin-1 and claudin-3 overexpression on the paracellular flux to ions. As observed in figure 6C, claudin-1 and claudin-3 overexpression increased the TER of HT-29 cells, indicating a strengthening of the barrier to ions. It is also known that the rearrangement of TJ strands may favor the paracellular flux of macromolecules, thus impairing the barrier function of TJs [37]. We and other authors have assessed the TJ function using an antibody permeability assay, which also evaluates the paracellular permeability to macromolecules [27,33]. Using this assay, we observed an absence of uvomorulin/E-cadherin staining in HT-29^{Cld-1} cells, which indicated that cells overexpressing claudin-1 maintained an intact TJs-regulated paracellular flux of macromolecules. On the contrary, cells that overexpressed claudin-3 (HT-29^{Cld-3}) showed a normal pattern of uvomorulin/E-cadherin staining on the plasma membrane, which indicated that the macromolecular flux, was impaired because the cells were not permeabilized prior to staining (Fig. 6D). To confirm that this labeling pattern did not result from the claudin overexpression-induced cellular redistribution of E-cadherin, we assessed the distribution of this protein in permeabilized cells by immunofluorescence and confocal microscopy. We observed that claudin-1 and claudin-3 overexpression did not alter the cellular distribution of the E-cadherin, which was mostly present in the basolateral region (Fig. 6E). Together, these data indicate that claudin-1 and claudin-3 overexpression increases the TER, but claudin-3 overexpression facilitates the macromolecular flux in HT-29 cells.

Forced Overexpression of Claudin-3 but not of Claudin-1 Increases the Malignant Potential of HT-29 Cells

We observed that EGF treatment did not cause statistically significant changes in claudin-1 expression but increased claudin-3 expression concomitantly with the malignant potential in HT-29 cells (Fig. 1B, 3, 4 and 5). Based on these findings, we further examined the effects of the forced claudin-1 and claudin-3 overexpression on cell migration, proliferation and colony formation. Interestingly, we observed that the overexpression of claudin-1 but not that of claudin-3 decreased cell migration (Fig. 7A and 7B). Conversely, cell proliferation was not altered by the overexpression of either claudin at the same time point (Fig. 7C). Furthermore, we observed increases in the anchorage-dependent and anchorage-independent colonies formation after the overexpression of claudin-3 but not claudin-1 (Fig. 8 and 9, respectively). Because claudin-3 overexpression increased the colony formation in HT-29 cells, we assessed whether the forced overexpression of claudin-3 could increase cell proliferation at later time points (24, 48 and 72 h). We verified that claudin-3 overexpression increased cell proliferation at these times (Fig. S2), which could contribute to the increased malignant potential of HT-29 cells. These results indicate that the differential expression of claudins 1 and 3 plays a crucial role in the malignant phenotype of the HT-29 colorectal cancer cells.

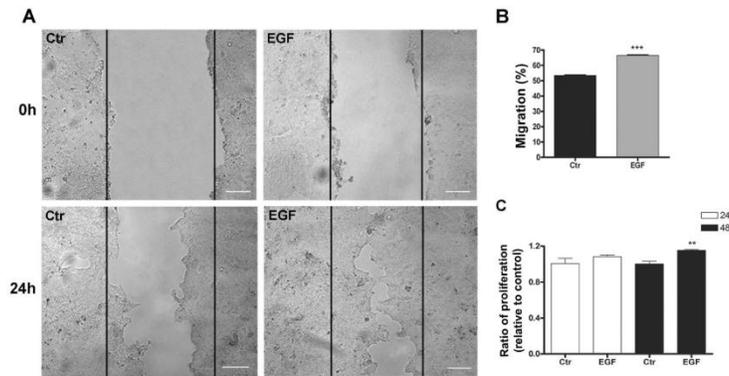


Figure 3. The impact of EGF treatment on the migration and proliferation of HT-29 cells. (A, B) HT-29 cells were grown in 6-well plates until confluent. Next, cell monolayers were wounded and treated with EGF, and cell migration in these regions was monitored for 24 h. (C) HT-29 cells were seeded in 96-well plates and treated with EGF at the indicated times, and proliferation was quantified using the crystal violet technique. The bar graph shows the ratio of the absorbance of EGF-treated to untreated cells (control). Bar: 100 μ m. Error bars indicate the means \pm SEM (n = 3); **p<0.01, ***p<0.001 as determined by t test. doi:10.1371/journal.pone.0074994.g003

Claudin-3 Silencing Prevents the EGF-induced Malignant Potential of HT-29 Cells

Because EGF treatment increased claudin-3 expression (Fig. 1B), and the overexpression of this claudin is related to the increased malignant potential of HT-29 cells (Figs. 8 and 9), we investigated whether the downregulation of claudin-3 could prevent the EGF-induced effects in HT-29 cells using claudin-3 siRNA. Using immunoblot analysis, we confirmed a robust downregulation of claudin-3 24 h after transfection using both 25 and 45 nM of claudin-3 siRNA (Fig. 10A). Based on these results, we chose

25 nM of claudin-3 siRNA for subsequent functional analyses. Because claudin-3 overexpression-regulated colony formation is analyzed at late time points (more than 5 days), we evaluated whether the early downregulation of claudin-3 induced by siRNA (at 24 h) would be sufficient to prevent the events regulated by prolonged treatment with EGF. Accordingly, we performed a proliferation assay after 48 h of treatment with EGF because we had observed that this agent increased cell proliferation at this time point (Fig. 3C). We observed that claudin-3 siRNA prevented the increase in EGF-induced proliferation, indicating that the early

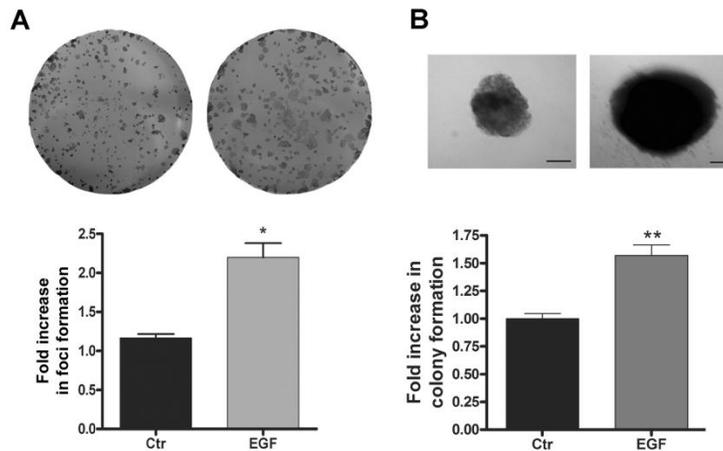


Figure 4. The effect of EGF treatment on anchorage-dependent and anchorage-independent colony formation in HT-29 cells. (A) Representative photographs of anchorage-dependent colonies that were stained with crystal violet after EGF treatment. The bar graphs show the ratio of fold increase in foci formation of EGF-treated to untreated cells (control). (B) Representative images of anchorage-independent colonies that show the differences in size between EGF-treated and untreated cells. The bar graphs show the ratio of fold increase in colony formation of EGF-treated to untreated cells (control). Bar: 10 μ m. Error bars indicate the means \pm SEM (n = 3); *p<0.05, **p<0.01 as determined by t test. doi:10.1371/journal.pone.0074994.g004

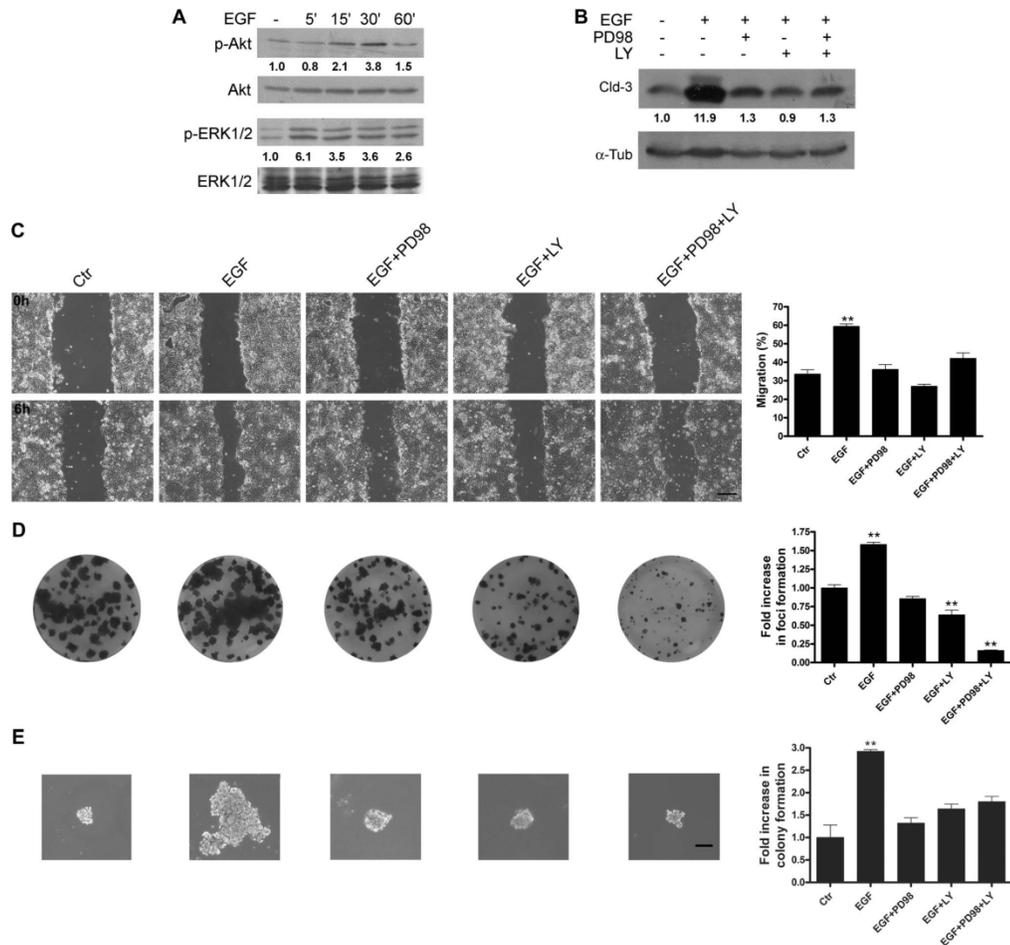


Figure 5. The impact of MEK1/2-ERK1/2 and PI3K-Akt inhibition on EGF-induced effects in HT-29 cells. (A) HT-29 cells were grown and treated with EGF for 5, 15, 30 and 60 min, after which the total cell lysates were harvested and analyzed by immunoblotting for p-ERK1/2, ERK1/2, p-Akt, and Akt. (B) Cells were grown and pretreated for 1 h with the indicated inhibitors before incubation with EGF for 48 h. Total cell lysates were harvested and analyzed by immunoblotting for claudin-3. α -Tubulin was used as a loading control. The numbers represent the ratio of the optical density of treated to untreated cells normalized by total protein or α -tubulin. Representative images of wound healing (C), anchorage-dependent colony formation (D) and anchorage-independent colony formation (E) assays. The cells were pretreated with the inhibitors as indicated, and the assays were performed as described in the Materials and Methods. For the anchorage-dependent assay, the bar graph shows the ratio of the fold increase in foci formation of treated to untreated cells (control). For the anchorage-independent assay, the bar graphs show the ratio of the fold increase in colony formation of treated to untreated cells (control). Bar: 200 μ m. Error bars indicate the means \pm SEM (n = 3); **p < 0.01 as determined by an ANOVA.

doi:10.1371/journal.pone.0074994.g005

downregulation of claudin-3 may regulate EGF-induced late events (Fig. 10B). In addition, claudin-3 siRNA also prevented the increase in EGF-induced anchorage-dependent and -independent colony formation (Figs. 10C and D, respectively). Interestingly, a higher proliferation rate and more colony formation were observed using only the claudin-3 siRNA. Together, these data indicate that claudin-3 downregulation alone increases the malignant potential but may also prevent the EGF-induced

malignant potential of HT-29 cells. These findings suggest that an imbalance in the levels of this claudin plays an important role in the development of the tumorigenic process.

Discussion

Changes in the expression and subcellular distribution of claudin proteins have been reported in different epithelial cancers

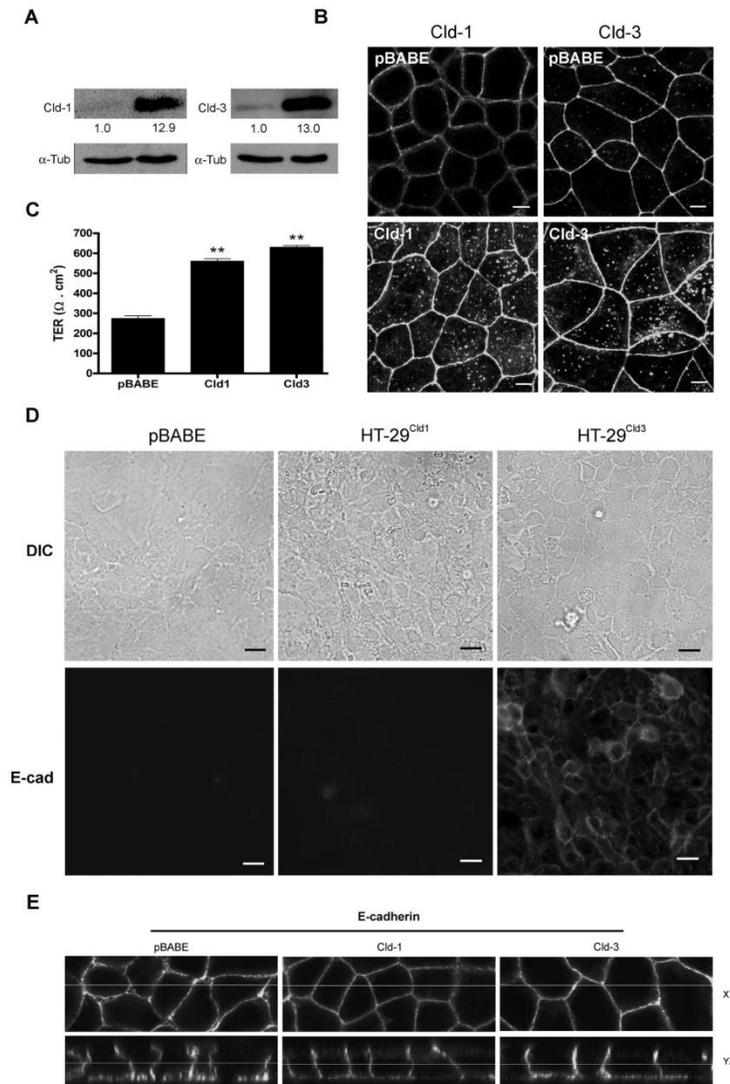


Figure 6. Effects of the forced expression of claudins 1 and 3 on their subcellular distribution, TER and macromolecular permeability. HT-29 cells were transduced with retroviral vectors that contained claudin-1, claudin-3, or empty vector (pBABE). (A) The cells were grown and total cell lysates were harvested and analyzed by immunoblotting for the expression of claudin-1 and claudin-3. The numbers represent the ratio of the optical density of claudin-transduced to empty vector-transduced cells normalized by α -tubulin. (B) Cells were grown on glass coverslips and processed under permeabilizing conditions for the immunofluorescence analysis of claudin-1 and claudin-3 distribution; bar: 5 μm . (C) Cells were grown on Transwell inserts and the TER was measured using the Millicell-ERS system. The bar graphs show the TER values normalized for the area of the insert with the blank value subtracted. (D) The cells were grown on glass coverslips and processed for immunofluorescence under non-permeabilizing conditions to evaluate macromolecular permeability using the anti-uvomorulin/E-cadherin antibody; bar: 10 μm . (E) Cells were grown on glass coverslips and processed under permeabilizing conditions for immunofluorescence analysis of E-cadherin distribution. The stained cells were viewed with *FV10i-O* confocal microscope. Error bars indicate the means \pm SEM ($n=3$); ** $p<0.01$ as determined by an ANOVA.
doi:10.1371/journal.pone.0074994.g006

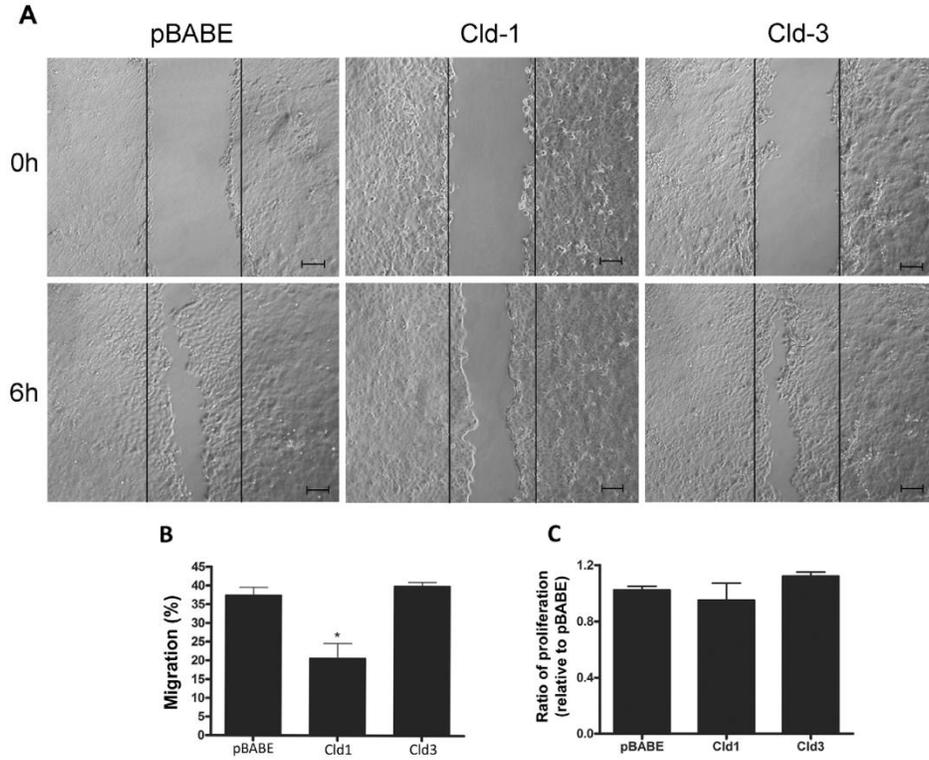


Figure 7. The effect of claudin-1 and claudin-3 overexpression on migration and proliferation. (A, B) HT-29^{pBABE}, HT-29^{Cld-1} and HT-29^{Cld-3} cells were grown in 6-well plates until confluent. Next, cell monolayers were wounded and the cell migration in the wounded regions were monitored after 6 h. (C) Transduced cells were seeded into 6-well plates for 6 h, and the numbers of cells were quantified by optical microscopy using trypan blue dye as described in the Materials and Methods. The bar graph shows the ratio of the number of claudin-transduced to the empty vector-transduced (pBABE) cells. Bar: 100 μ m. Error bars indicate the means \pm SEM (n=3); *p<0.05 as determined by an ANOVA. doi:10.1371/journal.pone.0074994.g007

in which EGF signaling is involved. However, the roles that EGF plays in modulating the expression of these proteins are different and depend of the cell type and tumor. In a previous study using

tissue samples of patients with colorectal cancer, we showed the increased expression of claudins 1, 3 and 4, which was associated with a significant disorganization of the TJ strands and increased

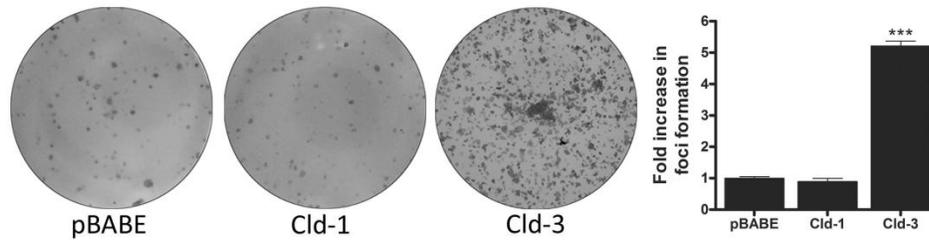


Figure 8. The impact of claudin-1 and claudin-3 overexpression on anchorage-dependent colony formation. Representative photographs of anchorage-dependent colonies of transduced HT-29 cells (HT-29^{pBABE}, HT-29^{Cld-1} and HT-29^{Cld-3}) that were stained with crystal violet. The bar graph shows the ratio of the fold increase in foci formation of claudin-transduced to empty vector-transduced (pBABE) cells. Error bars indicate the means \pm SEM (n=3); ***p<0.001, as determined by an ANOVA. doi:10.1371/journal.pone.0074994.g008

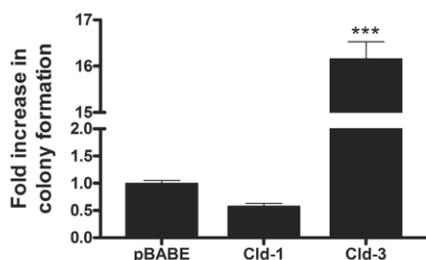


Figure 9. The impact of claudin-1 and claudin-3 overexpression on anchorage-independent colony formation. HT-29^{pBABE}, HT-29^{Cld-1} and HT-29^{Cld-3} cells were seeded for an anchorage-independent colony formation assay as described in the Materials and Methods. The bar graph shows the ratio of the fold increase in colony formation of claudin-transduced cells to empty vector-transduced (pBABE) cells. Error bars indicate the means \pm SEM (n=3); ***p<0.001, as determined by an ANOVA.
doi:10.1371/journal.pone.0074994.g009

paracellular permeability [19]. However, the molecular mechanisms involved in the regulation of this overexpression and its implications during the progression of this cancer type remained undefined. In the present study, we demonstrated that EGF increased the expression of claudin-3 protein, an event that was mediated by the ERK1/2 and PI3K-Akt pathways. We further demonstrated that the increased expression of claudin-1 and claudin-3 differentially affected colorectal cancer cells; in HT-29 cells, the forced expression of claudin-1 decreased cell migration, whereas the forced expression of claudin-3 increased the malignant potential. Moreover, claudin-3 silencing prevented the EGF-induced increase in the malignant potential of HT-29 cells.

Our study reveals that EGF treatment did not alter the protein levels of claudin-1 and claudin-3 in Caco-2 cells; however, HT-29 cells treated with this agent displayed differential changes in the expression of these proteins. Claudin-1 levels were not significantly altered after 6, 24 or 48 h, while the expression levels of claudin-3 did not change significantly at 6 h of treatment but were increased at 24 and 48 h, and the increase was more evident in this later time (Fig. 1A and 1B). The differentiation grades and metastatic behaviors of the cell lines used in the study may explain these results. Claudin-2 overexpression has been shown to relate to epithelial weakening in lung and colorectal cancer cells, and these events are regulated by EGF-mediated signaling pathways [18,22]. Here, we observed changes in the redistribution of claudins 1 and 3 after prolonged EGF treatment in HT-29 cells but not in Caco-2 cells (Fig. 2A and 2B), even though EGF signaling was triggered in this cell line as shown by increased ERK1/2 phosphorylation (Fig. S1). The EGF-induced changes observed in this study could be attributed to impaired TJ function, which facilitated access to the EGF receptor, EGFR. This receptor is mainly present in the basolateral region and can thus potentially induce neoplastic transformation, as suggested previously [14,19,38]. Controversially to our observations, a recent study showed that EGF decreased claudin-3 and -4 via MEK/ERK and/or PI3K/Akt signaling pathways in ovarian cancer cell lines [39]. The reasons for the discrepancy observed are currently unclear but may be related to tissue-specific differences in claudin function or even the tissue microenvironment features, as previously discussed [40].

In earlier studies, we showed a correlation between increased cell migration and malignant potential in colorectal cancer cells [10,31,34]. Here, we showed increased cell migration in HT-29

cells that were treated with EGF (Fig. 3A and 3B), which confirms that EGF is a potential tumor promoter. Furthermore, we observed that inhibitors of the ERK1/2 and PI3K-Akt pathways both prevented and decreased the EGF treatment-induced migration of HT-29 cells (Fig. 5C), suggesting that these pathways participate as modulators of EGF-mediated responses. In addition, to verify the importance of claudins 1 and 3 in this process, we forced the overexpression of these proteins in HT-29 cells. Compared to HT-29^{pBABE} cells, our results showed that HT-29^{Cld-1} cells displayed decreased cell migration, whereas the migration of HT-29^{Cld-3} cells was unaltered (Fig. 7A and 7B). These results suggest that claudin-1 expression plays an important role in cell migration and that this migration decreases with claudin-1 upregulation. Conversely, overexpressed claudin-3 *per se* was not sufficient to alter cell migration. It is possible that EGF may induce other pathways that are involved in the regulation of cell migration; however, further studies are necessary to confirm this hypothesis.

We further evaluated the malignant potential of EGF-treated HT-29 cells with colony formation assays [35,41] and observed that EGF treatment increased the numbers of anchorage-dependent and anchorage-independent colonies (Fig. 4A and 4B). Additionally, the inhibition of PI3K-Akt and ERK1/2, alone or in combination prevented these effects induced by EGF (Fig. 5D and 5E). Furthermore, we showed that forced claudin-3 overexpression increased colony formation, while claudin-1 overexpression did not alter the colony formation potential (Fig. 8 and 9). These findings agree with previous reports, which showed that the upregulation of claudins 3 and 4 was related to increased tumorigenic potential in ovarian epithelial cells [42,43]. Nevertheless, our findings show that claudin-1-overexpressing cells displayed decreased malignant potential, as determined by the prevention of cell migration, and this finding is in contrast with previously published reports in which claudin-1 upregulation increased metastatic potential in colorectal cancer [44,45]. We do not know the reason for these different observations, but they may be a result of cell type differences; we used HT-29 cells, which are less differentiated than the SW480 and SW620 cells used by the previous authors [46]. Additionally, earlier studies have shown that claudin-1 downregulation was related to disease recurrence and poor patient survival in stage II colon cancer [47] and that the decreased expression of this protein was also observed in lymph node metastases of colon carcinomas. We postulate that claudin-1 expression and colon cancer progression correlate negatively, as previously suggested [21]. Based on our findings, we suspect that the differential regulation of claudins 1 and 3 expression may define a more aggressive phenotype in colorectal cancer cells. Currently, we are examining the differential regulation of these claudins in colorectal cancer in detail.

We also showed that the forced overexpression of claudin-1 and claudin-3 increased the cytoplasmic content of these proteins but did not alter their localization at cell-cell contacts (Fig. 6B). Moreover, we observed that claudin-1 and claudin-3 overexpression increased the TER, indicating a higher retention of the paracellular flux to ions (Fig. 6C). However, the HT-29 cells that overexpressed claudin-3 increased the macromolecular permeability, indicating a higher paracellular flux to macromolecules (Fig. 6D). It is known that the paracellular flux is performed differentially, depending on the type of claudin and is cell specific. For instance, upregulation of claudin-3 decreased the barrier function, while the overexpression of claudin-4 improved the alveolar TER [48]. On the other hand, H₂O₂-induced downregulation of claudin-3 decreased the TER and increased the FITC-dextran permeability in gastric epithelial cells [49]. Additionally,

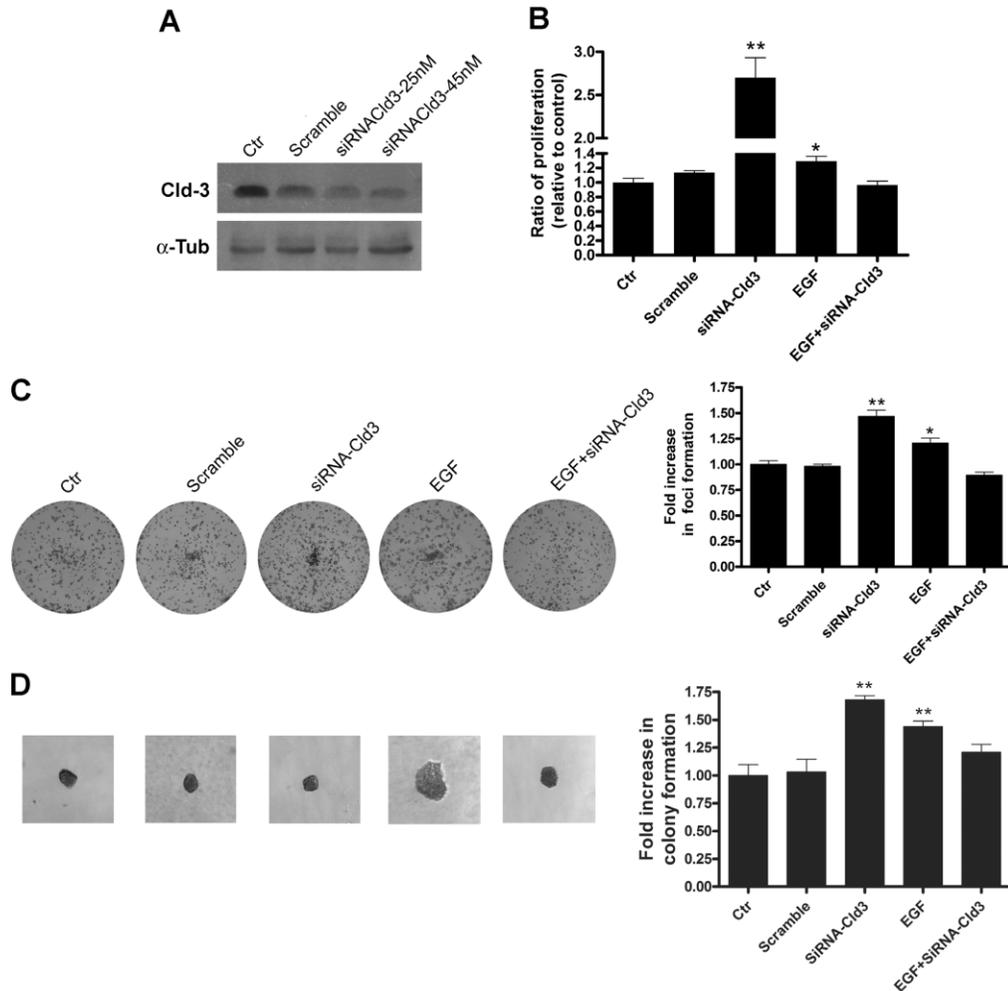


Figure 10. The impact of claudin-3 silencing on EGF-induced effects in HT-29 cells. HT-29 cells were transfected with non-targeting control siRNA (scramble) or claudin-3 siRNA and treated with EGF as indicated. (A) Cells were grown for 24 h and the total cell lysates were obtained and analyzed for the expression of claudin-3 by immunoblotting; α -tubulin was used as a loading control. (B) Cells were seeded in 96-well plates for 48 h and proliferation was quantified using the crystal violet technique. The bar graph shows the ratio of the absorbance of transfected and/or EGF-treated cells to the control cells. (C) Representative photographs of anchorage-dependent colonies that were stained with crystal violet. The bar graph shows the proportion of fold increase in foci formation of the transfected and/or EGF-treated cells to control cells. (D) Representative images of anchorage-independent colonies. The bar graph shows the ratio of the fold increase in colony formation of transfected and/or EGF-treated cells to control cells. Error bars indicate the means \pm SEM (n = 3); *p < 0.05, **p < 0.01, as determined by an ANOVA. *Claudin*; Cld. α -tubulin; α -tub. doi:10.1371/journal.pone.0074994.g010

claudin-2 was suggested have a role in the regulation of ion-selective passage, while other TJ proteins, such as occludin and tricellulin, appear to regulate the macromolecular flux [50]. In our study, we verified that claudin-3 overexpression did not alter the E-cadherin subcellular redistribution, indicating that the altered macromolecular permeability, as assessed by the labeling of Uvomorulin/E-cadherin, is a consequence of impaired TJ

function and not the redistribution of this protein (Fig. 6E). These findings indicate that claudin-3 overexpression regulates of dual manner the barrier function of TJs, strengthening the barrier to ions while facilitating the macromolecular flux, which may be a reflex of the redistribution of occludin e/or tricellulin to the cytoplasm. However, further studies are necessary to better

understand the role played by interactions between claudins and other TJ proteins to regulate TJ barrier function.

We further investigated the importance of claudin-3 as regulator of EGF-induced events in HT-29 cells by using siRNA for this claudin. We showed that the silencing of claudin-3 prevents the EGF-induced cell proliferation increases and anchorage-dependent and -independent colony formation (Fig. 10B, 10C and 10D). Interestingly, we verified that claudin-3 silencing alone caused increased cell proliferation and colony formation more than EGF treatment. Based these findings, it is possible suggest that both claudin-3 overexpression and claudin-3 downregulation may cause the disorganization of TJs, which could contribute to the malignant potential of these cells. In addition, our data indicate that equilibrium of the claudin-3 level maintains the homeostasis of the intestinal epithelium and that both claudin-3 upregulation or downregulation may result in increased malignant potential. However, additional experiments are needed to confirm this mechanism.

In conclusion, we have shown that claudin-3 overexpression is associated with the increased malignant potential of HT-29 cells and that the ERK1/2 and PI3K-Akt pathways, activated by EGF, are important regulators of this event. Additionally, the impaired paracellular flux of macromolecules in HT-29 cells that overexpress claudin-3 confirms the correlation between impaired epithelial barrier function and colorectal tumorigenesis. Furthermore, we showed that claudin-3 silencing can prevent the EGF-induced increase of the malignant potential. However claudin-3 silencing alone can enhance this event, indicating a fine balance that controls the expression of this claudin to maintain intestinal homeostasis. Most importantly, our study contributes to a better understanding of the molecular mechanisms that regulate the expression of claudins and the relationship of these proteins with the malignant process. Lastly, our study indicates possible molecular targets for future applications in the treatment of colorectal cancer.

References

- Correijido M, Contreras RG, Shoshani L, Perez-Benitez D, Larre I (2008) Tight junction and polarity interaction in the transporting epithelial phenotype. *Biochim Biophys Acta* 1778: 770–793.
- Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, et al. (2011) Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett* 585: 606–612.
- Takitawa Y, Kusunimoto H, Kitazato T, Iomita M, Hayashi M (2012) Changes in protein and mRNA expression levels of claudin family after mucosal lesion by intestinal ischemia/reperfusion. *Int J Pharmacol* 426: 82–89.
- Ibari A, Takiguchi A, Atomi K, Sugatani J (2011) Epidermal growth factor increases slatrin dependent endocytosis and degradation of claudin 2 protein in MDCK II cells. *J Cell Physiol* 126: 2443–2456.
- Assia M, Hirase T, Hashimoto-Komatsu A, Node K (2011) Rab1a-mediated localization of claudin-1 is regulated by proteasomes in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 300: C67–C76.
- Yoon CH, Kim MJ, Park MJ, Park IC, Hwang SG, et al. (2010) Claudin 1 acts through c-Abl-protein kinase C delta (PKCdelta) signaling and has a causal role in the acquisition of invasive capacity in human liver cells. *J Biol Chem* 285: 226–233.
- Lalzy JM, Wilken JA, Baron AT, Mailhe NJ (2008) Clinical implications of the ErbB/epidermal growth factor (EGF) receptor family and its ligands in ovarian cancer. *Biochim Biophys Acta* 1785: 232–265.
- Vivekanand P, Rebay I (2006) Intersection of signal transduction pathways and development. *Annu Rev Gene* 40: 139–157.
- Ciardello F, Tortora G (2008) EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 358: 1160–1174.
- de Araujo WM, Vidal ZC, de Souza WF, de Freitas JC Jr, de Souza W, et al. (2010) PI3K/Akt and GSK-3 β prevents in a differential fashion the malignant phenotype of colorectal cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 136: 1773–1782.
- Ma C, Wang J, Gao Y, Gao TW, Chen G, et al. (2007) The role of glycogen synthase kinase-3 β in the transformation of epidermal cells. *Cancer Res* 67: 7756–7764.
- Yoon YK, Kim HP, Han SW, Hur HS, Oh do Y, et al. (2009) Combination of EGF and MEK1/2 inhibitor shows synergistic effects by suppressing EGFR/HER3-dependent Akt activation in human gastric cancer cells. *Mol Cancer Ther* 8: 2526–2536.

Supporting Information

Figure S1 Effect of EGF on the activation of ERK1/2 proteins in Caco-2 cells. Cells were grown and treated with EGF for 15 and 30 min, 1, 2 and 6 h, after which total cell lysates were harvested and analyzed by immunoblotting for p-ERK1/2 and ERK1/2. The numbers represent the ratio of optical density of the pERK1/2 of EGF-treated to untreated cells normalized by ERK1/2.

(TIF)

Figure S2 Effect of claudin-3 overexpression on proliferation for prolonged times. Transduced cells were seeded into 6-well plates, and the numbers of cells were quantified by optical microscopy after 24, 48 or 72 h using trypan blue dye as described in the Materials and Methods. The bar graph shows the ratio of the number of claudin-transduced cells to empty vector-transduced (pBABE) cells. Error bars indicate the means \pm SEM ($n = 3$); ** $p < 0.01$ as determined by a t-test.

(TIF)

Acknowledgments

We are especially grateful to Dr. Misio Furuse for kindly providing the claudin-1 and claudin-3 constructs. We would also like to thank Dr. Marina Bonacino and MSc. Leonardo Chicayban for kindly helping with claudin-3 silencing. This text was reviewed by American Journal Experts.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: WFDS JAMD. Performed the experiments: WFDS NFD M BK R WMDA JCDFJ LGB. Analyzed the data: WFDS NFD M JAMD. Contributed reagents/materials/analysis tools: JAMD JPBV. Wrote the paper: WFDS JAMD.

24. Mariadason JM, Rickard KL, Barkla DH, Augenlicht LH, Gibson PR (2000) Divergent phenotypic patterns and commitment to apoptosis of Caco-2 cells during spontaneous and butyrate-induced differentiation. *J Cell Physiol* 183: 347–354.
25. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scariou ML, Stamatii A, et al. (2005) The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell- and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Bio Toxicol* 31: 1–26.
26. Halder SK, Beauchamp RD, Datta PK (2005) A specific inhibitor of TGF-beta receptor kinase, SB-421542, as a potent antitumor agent for human cancers. *Neoplasia* 7: 509–521.
27. Barbosa LA, Goto-Silva L, Redondo PA, Oliveira S, Montesano G, 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: 319–331.
28. Furuse M, Fujita K, Hiragi T, Fujimoto K, Tsukita S (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141: 1533–1550.
29. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S (1999) Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 511–516.
30. Chiczayam L, Sodre A, Garzio BA, Bonamino M (2013). An efficient low cost method for gene transfer to T lymphocytes. *Plos One* 8: e60298.
31. Leve F, Marcondes TG, Bastos LG, Rabello SV, Tanaka MN, et al. (2011) Lysophosphatidic acid induces a migratory phenotype through a crosstalk between RhoA-Rock and Src-FAK signalling in colon cancer cells. *Eur J Pharmacol* 671: 7–17.
32. Contreras RG, Flores-Maldonado C, Lazaro A, Shoshani L, et al. (2004) Ouabain binding to Na⁺/K⁺-ATPase relaxes cell attachment and sends a specific signal (NACos) to the nucleus. *J Membr Biol* 198: 147–58.
33. Rajasekaran SA, Palmer LG, Quan X, Harper JF, Ball WJ Jr, et al. (2001) Na⁺/K⁺-ATPase beta-subunit is required for epithelial polarization, expression of invasion, and cell motility. *Mol Biol Cell* 12: 279–293.
34. Vidal F, de Araujo WM, Cruz AL, Tanaka MN, Viola JP, et al. (2011) Lithium reduces tumorigenic potential in response to EGF signaling in human colorectal cancer cells. *Int J Oncol* 38: 1365–1373.
35. Robbs BK, Cruz AL, Werneck MB, Mogno GJ, Viola JP (2008) Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors. *Mol Cell Biol* 28: 7168–7181.
36. Onmori K, Kawamura Y (2009) Cell transformation activities of abietic acid and dihydroabietic acid: safety assessment of possible contaminants in paper and paperboard for food contact use. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 26: 568–573.
37. Marria MA, Madico JF (1987) Analysis of absorptive cell occluding junction structure-function relationships in a state of enhanced junctional permeability. *Lab Invest* 56: 424–434.
38. Bezdekova M, Brychtova S, Sedlakova E, Langova K, Brychta T, et al. (2012) Analysis of snail 1, E-cadherin and claudin 1 expression in colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Mol Sci* 13: 1632–1643.
39. Ogawa M, Kojima T, Someya M, Nomura K, Takasawa A, et al. (2012) Epidermal growth factor modulates claudins and tight junctional functions in ovarian cancer cell lines. *Histochem Cell Biol* 138: 323–328.
40. Oliveira SS, Morgado-Diaz JA (2007) Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. *Cell Mol Life Sci* 64: 17–28.
41. de-Freitas-Junior JC, Bastos LG, Freire-Neto CA, Roeder BD, Abdelhay ES, et al. (2012) N-glycan biosynthesis inhibitors induce in vitro anticancer activity in colorectal cancer cells. *J Cell Biochem* 113: 2957–2966.
42. Agarwal R, D'Souza T, Morin ZJ (2005) Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer Res* 65: 7376–7385.
43. Kwon MJ, Kim SS, Choi YL, Jung HS, Balch C, et al. (2010) Derepression of CLDN3 and CLDN4 during ovarian tumorigenesis is associated with loss of repressive histone modifications. *Carcinogenesis* 31: 974–983.
44. Daswan P, Singh AB, Deane NG, No Y, Shiu SR, et al. (2005) Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest* 115: 1765–1776.
45. Stoga AB, Sharma A, Smith JJ, Krisnan M, Chen X, et al. (2011) Claudin-1 upregulates the repressor ZEB 1 to inhibit E-cadherin expression in colon cancer cells. *Gastroenterology* 141: 2140–2152.
46. Chantret I, Barbat A, Dussault E, Brattain MG, Zweibaum A (1988) Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: A survey of twenty cell lines. *Cancer Res* 48: 1936–1942.
47. Resnick MB, Konkitt T, Routhier J, Sabo E, Fricolo VE (2005) Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Mod Pathol* 18: 511–518.
48. Mitchell LA, Overgaard GJ, Ward C, Margalies SS, Koval M (2011) Differential effects of claudin-3 and claudin-4 on alveolar epithelial barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 301: L40–49.
49. Hashimoto K, Oshima T, Tomita T, Kim Y, Matsumoto T, et al. (2008) Oxidative stress induces gastric epithelial permeability through claudin 3. *Biochem Biophys Res Commun* 376: 154–157.
50. Weber CR (2012) Dynamic properties of the tight junction barrier. *Ann N Y Acad Sci* 1257: 77–84.