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

Flávia Castello Branco Vidal

Análise da via wnt e seu envolvimento no processo da tumorigênese do câncer colo-retal

Rio de Janeiro
2010

Flávia Castello Branco Vidal

Análise da via wnt e seu envolvimento no processo da tumorigênese do câncer colo-retal

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. José Andrés Morgado Diáz

Rio de Janeiro

2010

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

V649 Vidal, Flávia Castello Branco.
Análise da via wnt e seu envolvimento no processo da tumorigênese do câncer colo / Flávia Castello Branco Vidal. – 2010.
110 f. : il.

Orientador: José Andrés Morgado Diáz.
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Cancer – Teses. 2. Adenocarcinoma – Teses. I. Diáz, José Andrés Morgado. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. III. Título.

CDU 614.24

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

_____ _____
Assinatura Data

Flávia Castello Branco Vidal

Análise da via wnt e seu envolvimento no processo da tumorigênese do câncer colo-retal

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 8 de abril de 2010.

Banca Examinadora:

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

_____
Prof.ª Dra. Maria Augusta Borges Cursino de Freitas Arruda
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

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

_____
Prof.ª Dra. Narcisa Leal da Cunha e Silva
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

_____
Prof. Dr. Ricardo Luis Alves Silva
Instituto Nacional de Câncer - INCA

Rio de Janeiro

2010

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à memória do Prof. Luiz Henrique Monteiro Leal.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar saúde e determinação.

Ao meu marido Antonio Carlos e à minha filha Ana Paula por serem minha luz, minha alegria e meu porto seguro.

À minha mãe, Paulits e meu irmão João Paulo pelos conselhos, ajuda e, às vezes, paciência. Também pelo carinho e amor indispensáveis.

Ao meu pai, Marlene e irmãzinhas por estarem sempre presentes e me darem momentos felizes.

Aos meus avós e tias pelo exemplo, força e alegria.

Ao meu orientador Dr. José Andrés Morgado Díaz por ter me acolhido e por ter me dado as condições para realização deste trabalho.

Ao meu colega de laboratório, doutorando e amigo Wallace pela ajuda indispensável e essencial nos experimentos finais para conclusão desta tese.

Ao amigo e vizinho de laboratório André pelos conselhos científicos e ajuda importantíssima nos experimentos de citometria de fluxo.

Aos integrantes, ex-integrantes e agregados do Grupo de Biologia Estrutural pelo companheirismo, solidariedade além das várias horas de risadas: Andréia Deiró, Cláudia Maia, Fernanda Leve, Lílian Bastos, Júlio César, Marcelo Tanaka, Natalia Fortunato, Paloma Souza, Pedro Obina, Pedro Daniel, Sarah Rabello, Simone Fernandes, Taline Marcondes e Waldemir Souza.

À equipe fundadora do Laboratório de Microscopia e Processamento de Imagens: Ana Paula, Juliana, Karina, Moema, Renata, Vítor e Jonas. Amei nossos anos juntos pessoal.

Ao Prof. Luiz Henrique Monteiro Leal (in memorian) pelos ensinamentos em microscopia e pelos anos muito legais de orientação.

Aos professores e funcionários do Departamento de Histologia e Embriologia da UERJ pelos ótimos anos de convivência e aprendizado.

Ao Lelê (*in memoriam*), Chop (*in memorian*), Escabelinha e Chico pelos anos de brincadeiras.

Aos que de alguma forma contribuíram com este trabalho e não foram citados.

RESUMO

VIDAL, Flávia Castello Branco. *Análise da via wnt e seu envolvimento no processo da tumorigênese do câncer colo-retal.* 2010. 110f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

O câncer colo-retal (CCR) representa o quarto tipo de câncer mais freqüente no Brasil entre homens e mulheres e a sobrevida para esse tipo de neoplasia é considerada boa, se a doença for diagnosticada em estádio inicial. Neste tipo de câncer a progressão do adenoma (tumor benigno) para o adenocarcinoma (tumor maligno) é dependente do acúmulo de mutações em diversos oncogenes e genes supressores de tumor. Estas mutações podem levar a alterações de importantes vias de sinalização que controlam estes eventos como, por exemplo, as vias Wnt e EGFR. No entanto, os mecanismos moleculares e celulares mediados por estas vias durante a progressão do CCR permanecem por serem definidos. Neste trabalho foi avaliada a participação da via Wnt e do EGFR durante a progressão do CCR usando células Caco-2, uma linhagem celular derivada de adenocarcinoma de cólon humano como modelo. As células foram tratadas com EGF, ativador da via EGFR, e cloreto de lítio (LiCl), um conhecido inibidor da enzima GSK-3β e conseqüentemente, ativador da via Wnt, ou alternativamente com a combinação de ambas drogas. Após os tratamentos, foi avaliada a morfologia celular, localização e expressão de proteínas juncionais, os padrões proliferativos e do ciclo celular e o potencial tumorigênico (migração e formação de colônias). Nossos resultados mostram que a localização subcelular das proteínas juncionais claudina-1 e β-catenina foi alterada após tratamento com EGF e LiCl, porém a expressão não foi afetada. A localização nuclear de β-catenina, um marcador da ativação da via Wnt, foi observada após tratamento com ambos os compostos, no entanto estes agentes modularam a enzima GSK-3β de forma diferencial. Além disso, tratamento com EGF aumentou a capacidade proliferativa e migratória da célula, mas não alterou a formação de colônias. LiCl, apesar de ser um conhecido ativador da via Wnt, inibiu o aumento da proliferação e migração causado pelo EGF, como visto pelo tratamento das células com EGF+LiCl, e reduziu a formação de colônias. Nossos resultados revelaram que LiCl possui uma atividade supressora de tumor o que pode representar um novo papel para este composto como um possível agente terapêutico para o tratamento do CCR.

Palavras-chave: Câncer colo-retal. Via Wnt. EGFR. GSK3-β. β-catenina. Claudina-1. Progressão tumoral.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CCR) represents the fourth type of cancer most common in Brazil among men and women and the survival for this tumor type is considered good if the disease is diagnosed at early stage. The progression of an adenoma (benign tumor) to an adenocarcinoma (malign tumor) is dependent on the accumulation of mutations in a variety of oncogenes and tumors suppressors genes. These mutations can lead to alterations of important cell signaling pathways that control these events, such as *Wnt* e EGFR. However, the molecular and cellular mechanisms mediated by these pathways during CCR progression remain to be defined. In the present study we assesses the role that Wnt and EGFR pathway play during CCR progression using Caco-2 cells, a human cell line derived of colorectal cancer, as a model. Cells were treated with EGF, an EGFR pathway activator, and lithium chloride, (LiCl) a known inhibitor of the enzyme GSK-3β and, therefore a Wnt pathway activator or alternatively by using combination of both drugs. After treatments, we monitored cell morphology, localization and expression of junctional proteins, proliferative and cell cycle patterns, and the tumorigenic potential (cell migration and colony formation). We show that subcellular localization of the junctional proteins claudin-1 and β-catenin was altered after treatment with EGF and LiCl, however the expression were not affected. Nuclear localization of β-catenin, a marker of Wnt pathway activation, was observed after treatment with both compounds, however these agents modulated in a differential fashion the enzyme GSK-3β. Furthermore, EGF treatment increased the proliferative and migratory capacity of the cells, but did not alter colony formation potential. LiCl, despite being a known activator of the Wnt pathway, inhibited the increase of proliferation and migration caused by EGF, as demonstrated by the cell treatments with EGF+LiCl, and reduced the cell colony formation. Our results reveal that LiCl present a suppressor tumor activity, which may represent a new role for this compound as potential therapeutic agent in the CCR treatment.

Keywords: Colorectal cancer. Wnt/β-catenin pathway. EGFR. GSK3-β. β-catenina. claudin-1. Tumoral progression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Morfologia do epitélio intestinal..... 16

Figura 2 – Renovação celular do epitélio do intestino grosso..... 17

Figura 3 – Junções intercelulares..... 19

Figura 4 – Proteínas integrais de membrana presentes nas Junções *tight* 21

Figura 5 - Complexos multiprotéicos presentes nas Junções *tight*..... 22

Figura 6 - Interações moleculares entre proteínas integrais de membrana e os complexos protéicos citoplasmáticos presentes nas junções *tight*..... 24

Figura 7 - Estrutura molecular das junções aderentes..... 27

Figura 8 - Correlação entre a progressão do CRC e o acúmulo de mutações genéticas..... 33

Figura 9 - Mecanismos de sinalização da via Wnt canônica..... 37

Figura 10 - Via Wnt não canônica..... 38

Figura 11 - Modelo representativo da atividade do complexo β-catenina/Tcf na cripta intestinal e formação de pólipos..... 40

Figura 12 - Transição Epitélio Mesenquimal (TEM)..... 42

Figura 13 - Receptores e ligantes da família de fatores de crescimento epidermal... 45

Figura 14 - Esquema mostrando modulação da enzima GSK3-β por quinases..... 47

Figura 15 - Modulação da atividade da enzima GSK3-β..... 50

Figura 16 - Análise morfológica de culturas densas e esparsas de células Caco-2 incubadas ou não com EGF e LiCl por 24 horas..... 60

Figura 17 – Imunofluorescência da proteína de junção claudina-1 em células Caco-2 incubadas ou não com EGF e LiCl por 24h..... 62

Figura 18 - Imunofluorescência da proteína de junção aderente β-catenina em células Caco-2 incubadas ou não com EGF e LiCl por 24 horas..... 63

Figura 19 - Análise da expressão das proteínas de junção E-caderina, β-catenina e claudina-1..... 64

Figura 20 - Localização das proteínas β-catenina, claudina-1 e E-caderina nas frações solúvel e insolúvel em Triton-X-100..... 66

Figura 21 - Análise da localização de β-catenina em diferentes frações subcelulares..... 68

Figura 22 - Avaliação da atividade de GSK3-β em células Caco-2 após tratamento com EGF e LiCl por 24 h..... 69

Figura 23 – Análise da proliferação celular de células Caco-2 após tratamento com EGF e LiCl por 24, 48 e 72h..... 71

Figura 24 - Ciclo celular de células Caco-2 após tratamento com EGF e LiCl..... 73

Figura 25 - Ensaio de migração..... 76

Figura 26 - Formação de colônia..... 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estimativas para o ano de 2010 dos números de novos casos de câncer, em homens e mulheres no Brasil..... 31

Tabela 2 – Principais fatores de risco para o desenvolvimento de CRC..... 32

Tabela 3 – Substratos que são fosforilados pela enzima GSK3-β..... 48

LISTA DE ABREVIATURAS

ADIP - afadin Dil domain-interacting protein

AJC – complex juncional apical (complexo juncional apical)

AINE – drogas antiinflamatórias não esteroidais

AP-1 - activator protein 1

APC – adenomatous polyposis coli

aPKC - proteína quinase C atípica

AR – anfiregulina

ARVCF - Armadillo Repeat gene deleted in Velo-Cardio-Facial syndrome

BTC – betacelulina

C/EBP - CCAAT-enhancer-binding proteins

CamKII - proteína quinase II dependente da Ca2+-calmodulina

CAR - receptor de coxsackievirus-adenovirus

CCR - câncer colo-retal

CJA - complexo juncional apical

CK1a - tirosina quinase caseína 1

CLMP - receptor-like de membrana coxsackie- e adenovirus

CRB3 - Crumbs3

CRD – domínio rico em cisteína

Dsh – *dishevelled*

Dkk-1 - dickkopf homolog

EGF - fator de crescimento epidermal

EGFR - receptor do fator de crescimento epidermal

EPR – epiregulina

ERK1/2 - extracellular signal-regulated kinases 1 and 2
ESAM - molécula de adesão seletiva endotelial

FAP - adenomatose poliposa familiar

FGF - fator de crescimento fibroblástico (FGF)

FZD – *frizzled*

GSK3-β - glicogênio sintase quinase 3 β

HB – EGF – fator de crescimento epidermal ligante de heparina

HGF - fator de crescimento de hepatócitos

HNPCC - adenomatose não poliposa familiar

JA - junções aderentes

JAM - junction adhesion molecule

JNK - Jun N-terminal Kinase

JT - junções tight

LGR5 - leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5

LiCl - cloreto de lítio

LMO7 - Lim domain only 7

LRP - low density lipoprotein receptor-related protein

MAGI-1 - membrane associated guanylate kinase interacting protein-like1

MAGUK - membrane-associated guanylate kinase-like homologs

MAPK - mitogen-activated protein kinase

MMP – metaloproteinase

NRG – neuregulina

Pals1 - protein Associated with Lin Seven 1

PATJ - PALS1-associated TJ protein

PGE2 - prostaglandina E2

PI - iodeto de propídeo

PI3K - phosphoinositide-3 kinase

PKC - proteína quinase C

PP2- protein phosphatase 2

RTK – receptor tirosina-quinase

SAF-B - scaffold attachment factor B

SFB – soro fetal bovino

Tcf/Lef - T cell factor/ lymphoid enhancing factor

TEM - transição epitélio mesenquimal

TGF-β - transforming growth factor β

VEGF – fator de crescimento vascular endotelial

ZO - zonula ocludens

ZONAB - associated nucleic acid binding proteins

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	15
1	**OBJETIVOS**.....	52
1.1	**Geral**.....	52
1.2	**Específico**.....	52
2	**MATERIAL E MÉTODOS**.....	53
2.1	**Cultura de células**	53
2.2	**Tratamentos com EGF E LiCl**.....	53
2.3	**Obtenção de lisado total e frações solúveis e insolúveis em Triton-X-100**.	53
2.3.1	Lisado total.....	54
2.3.2	Obtenção de frações solúveis e insolúveis em Triton X-100.....	54
2.3.3	Fracionamento subcelular.....	54
2.4	**Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sódio dodecilsulfato (sds-page) e *imunoblotting***.....	55
2.5	**Imunofluorescência**.....	56
2.6	**Ensaio de proliferação**.....	57
2.7	**Ensaio de migração**.....	57
2.8	**Ensaio de formação de colônia**.....	57
2.9	**Análise de ciclo celular por citometria de fluxo**.....	58
2.10	**Analise estatística**.....	58
3	**RESULTADOS**.....	59
3.1	**Efeitos dos tratamentos com egf e cloreto de lítio (licl) sobre a morfologia de culturas densas e esparsas das células caco-2**.....	59
3.2	**Efeitos dos tratamentos com egf e do inibidor de gsk3-β, cloreto de lítio (licl), na localização das proteínas de junção célula-célula**.....	61
3.3	**Análise da expressão das proteínas do complexo juncional apical**.....	65
3.4	**Análise da distribuição das proteínas β-catenina, claudina-1 e e-caderina nas frações solúveis e insolúveis em triton-x-100 (tx-100)**	67
3.5	**Análise da localização da β-catenina em diferentes Frações subcelulares**	69
3.6	**Ativação da via** wnt.....	71
3.7	**Efeitos do tratamento com egf e/ou licl na proliferação, migração e na**	

formação de colônia em células caco-2..... 73
4 **DISCUSSÃO**..... 82
5 **CONCLUSÃO**..... 90
RFERÊNCIAS..... 91
ANEXO..... 111

INTRODUÇÃO

O epitélio intestinal humano e homeostase

O trato intestinal é revestido por uma simples camada de células cilíndricas que têm como principal função a absorção de água e nutrientes, além de funcionar como uma barreira contra patógenos presentes no lúmen. Anatomicamente, o trato intestinal é dividido em intestino delgado (subdividido em duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (ou cólon). Histologicamente é composto por uma parede formada por quatro camadas distintas: mucosa, submucosa, muscular e serosa. A camada mucosa intestinal é formada por um epitélio cilíndrico simples, lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo e muscular da mucosa (Sancho *et al*., 2004; van der Flier & Clevers, 2009).

O epitélio intestinal é organizado em dois compartimentos morfologicamente e funcionalmente distintos: (1) invaginações, conhecidas como criptas de Lieberkühn, e (2) projeções, denominadas vilos ou vilosidades. No epitélio do intestino grosso, as criptas são maiores do que as encontradas no intestino delgado, e não há vilosidades. As criptas correspondem ao compartimento proliferativo do epitélio intestinal sendo composta por alguns tipos celulares, entre eles as células-tronco multipotentes (Pinto & Clevers, 2005). Os vilos representam um compartimento diferenciado com variados tipos celulares derivados das células-tronco das criptas (Fig. 1).

A homeostase do epitélio intestinal é baseada em um delicado balanço entre auto-renovação, migração e diferenciação celular que deve ser mantida durante toda a vida do organismo.

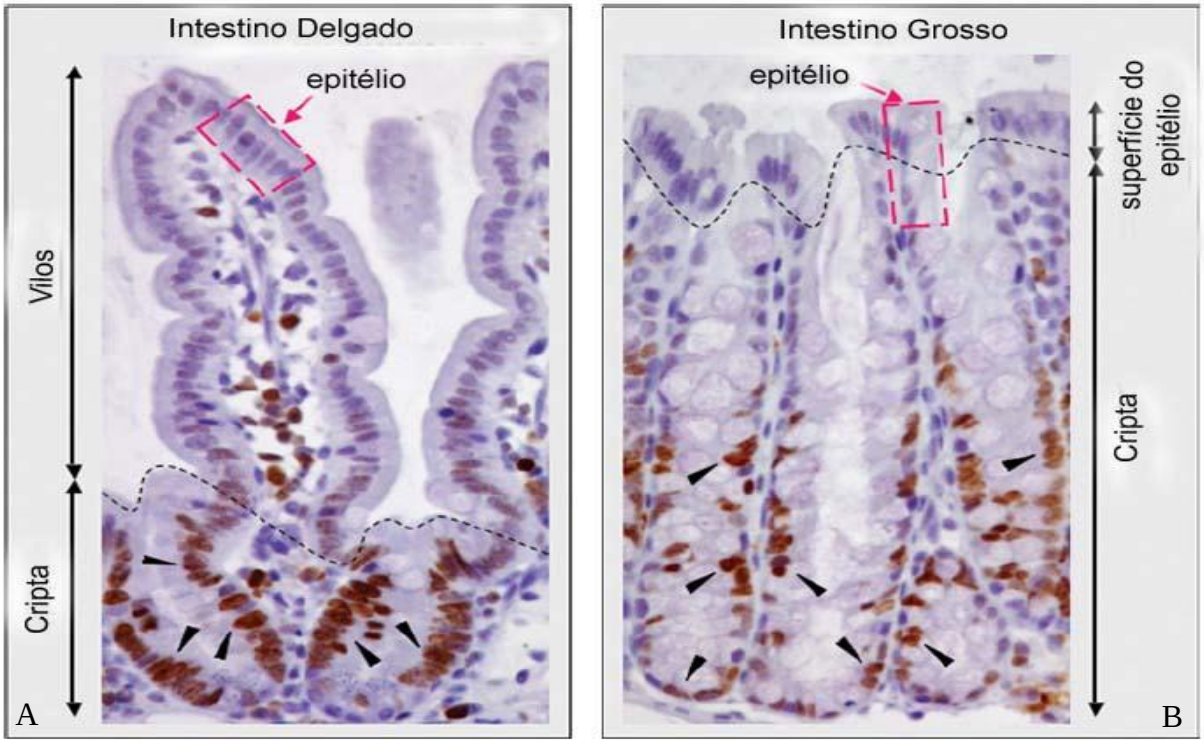


Figura 1: Morfologia do epitélio intestinal. **A.** Intestino delgado. **B.** Intestino grosso (cólon). O epitélio intestinal é constituído por uma camada simples de células epiteliais que reveste as vilosidades e as criptas intestinais. O cólon não possui vilosidades, e as criptas são mais profundas quando comparadas com as criptas do intestino delgado. As setas indicam as células coradas com o marcador de proliferação Ki 67. Adaptado de Pinto & Clevers, 2005.

O epitélio intestinal de mamíferos é renovado continuamente a cada 4-5 dias através da divisão mitótica assimétrica promovida pelas células-tronco adultas presente nas criptas. A divisão é assimétrica porque a célula tronco mãe se divide dando origem a duas células que terão morfologia e funcionalidades distintas. Uma célula-filha consistirá em uma nova célula tronco dando, portanto, continuidade a linhagem, e a outra célula-filha, por sua vez, será denominada de célula transitória amplificadora. A célula amplificadora passa aproximadamente dois dias na cripta durante os quais se divide de 4-5 vezes antes de se diferenciar em um dos tipos especializados de células intestinais. Além disso, à medida que as células transitórias amplificadoras se dividem, elas migram em direção às vilosidades (Pinto & Clevers, 2005) (Fig. 2A).

Nas criptas intestinais são encontrados três tipos de células especializadas: (1) enterócitos (correspondem a 90% da população), responsáveis pela absorção de nutrientes e eletrólitos, (2) células caliciformes, produtoras de muco, e (3) células enteroendócrinas,

produtoras de hormônio. Um tipo celular distinto encontrado nas criptas intestinais são as células de Paneth. Estas células participam do sistema imune inato e da defesa contra bactérias através da produção de defensinas bactericidas e lisozimas. Este tipo celular não é encontrado no epitélio do cólon (van Es & Clevers, 2005; van der Flier & Clevers, 2009).

A perda celular que ocorre na superfície do epitélio onde as células epiteliais tornam-se apoptóticas e são esfoliadas para a luz intestinal é compensada pela contínua produção de células nas criptas (Fig.2B) (Radtke & Clevers, 2005).

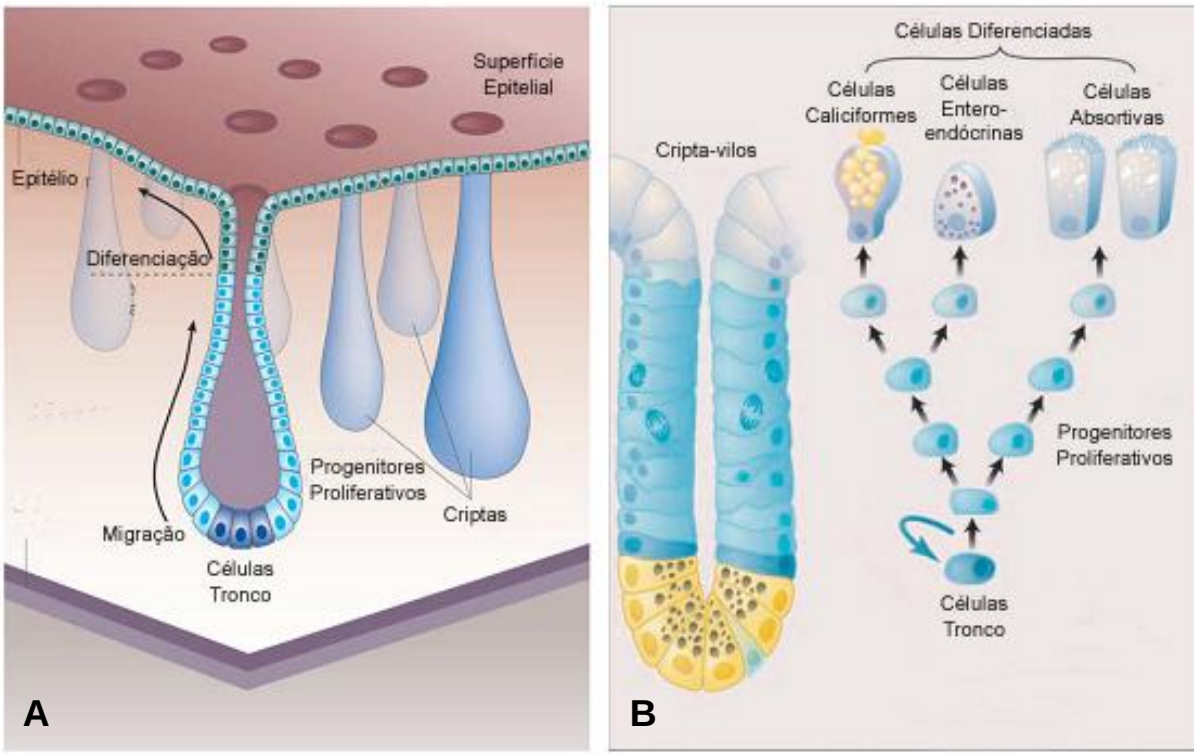


Figura 2 - Renovação celular do epitélio do intestino grosso. A. O epitélio intestinal é renovado continuamente através da divisão mitótica promovida pelas células-tronco adultas presente nas criptas intestinais. À medida que as células migram para a superfície epitelial, elas sofrem diferenciação. **B.** As células-tronco das criptas dividem-se em uma população de células transitórias ou amplificadoras que sofrem intensa proliferação e diferenciação. Adaptado de Radtke & Clevers, 2005.

O epitélio intestinal, portanto, é capaz de manter um balanço entre a proliferação, diferenciação, migração e morte celular, o que garante sua contínua renovação. Este balanço é finamente regulado por mecanismos de sinalização celular e qualquer desregulação pode resultar, por exemplo, em perda de adesão célula-célula, desdiferenciação celular, perda da polaridade, hiperproliferação e evasão de apoptose. Todos estes eventos estão relacionados com o desenvolvimento de tumores intestinais (Sancho *et al*., 2004). Neste contexto, o complexo juncional apical (CJA), estrutura responsável pela manutenção da integridade do epitélio, cumpre uma função importante.

Complexo Juncional Apical

O tecido epitelial é constituído por células poliédricas justapostas que aderem firmemente umas às outras e a lamina basal por meio de junções intercelulares. Esta característica permite que as células epiteliais se organizem como folhetos formando uma barreira celular e revestindo as superfícies internas e externas de órgãos como intestino, pele e vasos sanguíneos. As junções intercelulares não são estruturas estáticas. Durante a renovação de tecidos como o do intestino e da pele, eles são constantemente remodelados para permitir a saída de células antigas e a incorporação das novas células sem que a função de barreira do tecido epitelial seja perdida. Além disso, durante o reparo de lesões, as células epiteliais modulam suas junções no intuito de aumentar a migração celular e proliferação para permitir o estabelecimento de novos contatos com células adjacentes (Ebnet, 2008).

Duas estruturas distintas garantem a adesão célula-célula: (a) as junções *tight* (JT), (b) as junções aderentes incluindo os desmossomos (JA). Existem ainda as junções *gap* ou junções comunicantes que não tem função de adesão, mas sim de intercâmbio de moléculas entre células adjacentes. Atualmente, a denominação “complexo juncional apical” tem sido utilizada para designar apenas as JT e JA (Vogelmann & Nelson, 2005). As JT são responsáveis pelo controle da permeabilidade, bloqueando a livre difusão de moléculas e íons através da via paracelular, assim como a difusão de moléculas entre o domínio apical e basolateral participando da manutenção da polaridade celular (Tsukita *et al*., 2001). Já as JA são as responsáveis pela adesão física entre células adjacentes, participando também da

manutenção da polaridade celular e controle da proliferação celular (Balda & Matter, 2003) (Fig. 3).

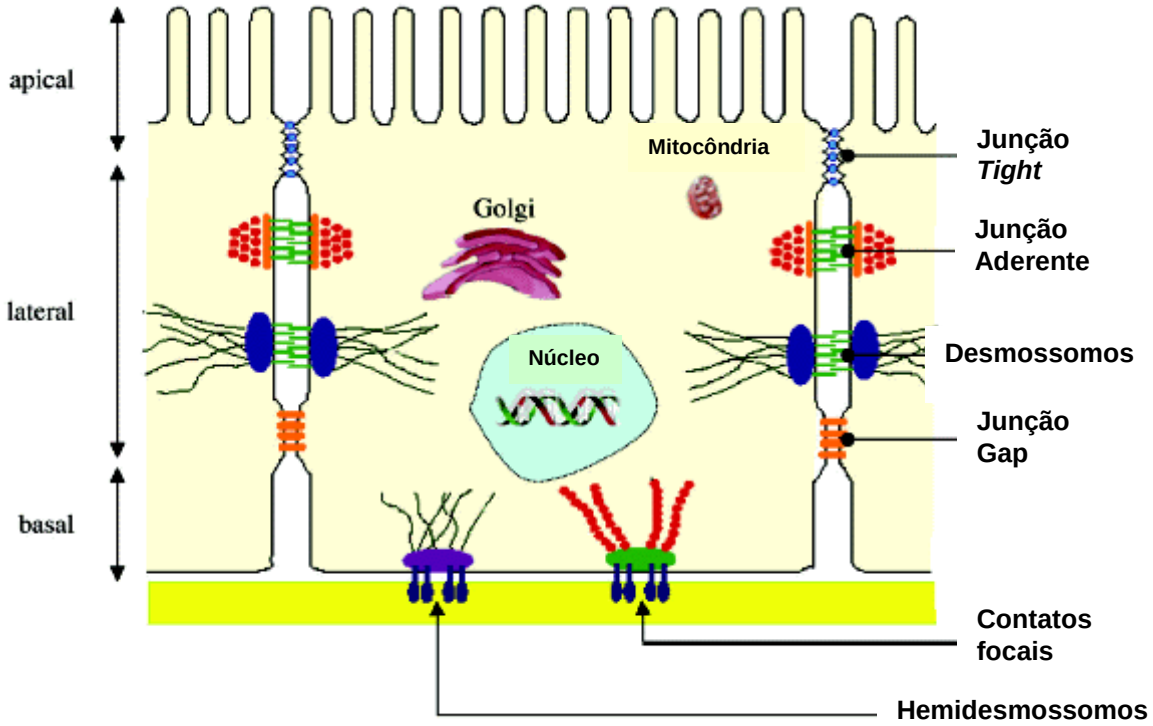


Figura 3 - Junções intercelulares A célula epitelial é polarizada, apresentando uma porção apical, uma porção lateral e uma porção basal. O complexo juncional apical é composto pelas junções tight e junções aderentes. Desmossomos, junções gap e interações célula-matriz formadas pelos hemidesmossomos e pelas adesões focais (ou contatos focais) também são mostradas. Adaptado de Thiery & Sleemam, 2006.

Junções *Tight* (JT):

As junções *tight* estão localizadas na porção mais apical das células epiteliais. Elas funcionam como um regulador da permeabilidade paracelular controlando a passagem de íons e pequenos solutos, e também como uma barreira dividindo a região apical da região basolateral impedindo dessa forma a difusão lateral de componentes da membrana plasmática de uma região para outra (função *fence)* (Tsukita *et al.*, 2001; Ebnet, 2008).

Três classes diferentes de proteínas integrais de membrana compõem as JT. A primeira classe engloba as claudinas, ocludina e a tricelulina. Este grupo contém quatro

domínios transmembrana, dois “loops” extracelulares e os domínios N- e C-terminal estão localizados no citoplasma (Fig.4a). As claudinas são consideradas os principais constituintes das JT. Já foram identificados 24 tipos de claudinas em humanos. Estas proteínas formam através de ligações homo e heterofílicas, poros aquosos selecionando por tamanho e carga os solutos que passam entre células adjacentes (Hamazaki *et al*., 2002). A ocludina foi a primeira proteína integral de membrana das JT a ser identificada em mamíferos (Tsukita *et al*., 2001). A função e a importância da ocludina nas JT ainda são bastante discutidas (Hossain & Hirata 2008; Suzuki *et al*., 2009). Diversos estudos demonstraram que apesar de participar da formação das JT, a ocludina não é essencial para sua função e manutenção (Moroi *et al*., 1998; Saitou *et al*., 1998; Saitou *et al*., 2000). Moroi e colaboradores (1998) observaram a ausência de ocludina nas JT das células de Sertoli de humanos. Saitou e colaboradores (1998) demonstraram que células-tronco embrionárias endodérmicas deficientes para ocludina desenvolviam normalmente as JT. Posteriormente, Saitou e colaboradores (2000) observaram que o epitélio do intestino, rins e fígado de camundongos deficientes para ocludina apresentavam morfologia normal quando comparados aos tecidos controle, além disso, a função de barreira do epitélio também continuou inalterada. A tricelulina é uma proteína encontrada nas JT presentes nas ligações entre três células, denominada ligação tricelular (Ikenouchi *et al*., 2005). Sua função é pouco conhecida. Um único estudo de Riazuddin e colaboradores (2006) mostrou que a presença da tricelulina no epitélio da cóclea e do vestíbulo são indispensáveis para a correta função auditiva.

A segunda classe de proteínas integrais de membrana inclui moléculas da superfamília das imunoglobulinas que possuem dois domínios Ig-*like* (Fig.4b). Essa classe é formada pelas proteínas JAM-A, JAM-B e JAM-C (*junction adhesion molecule*) que medeiam uma adesão Ca^{2+}-independente, e pelas proteínas CAR (receptor de coxsackievirus-adenovirus), CLMP (receptor-like de membrana coxsackie- e adenovirus), ESAM (molécula de adesão seletiva endotelial) e JAM4. Exceto pela JAM-A, existe pouca informação quanto à função destas proteínas na formação ou na função das JT (Ebnet, 2008). A função da proteína JAM-A tem sido relacionada com a polaridade e migração celular (Ebnet *et al*., 2001; Naik & Naik, 2008; Severson *et al*., 2009). JAM-4 interage com a proteína de ancoragem MAGI-1 (*membrane associated guanylate kinase interacting protein-like1*) e parece ser importante para a regulação da permeabilidade do glomérulo renal (Mori *et al*., 2004; Hossain & Hirata, 2008). Estudos vêm sendo realizados para elucidar com mais clareza a função desta segunda classe de proteínas das JT.

A terceira classe inclui apenas a proteína Crumbs3 (CRB3). Esta proteína possui um domínio extracelular muito curto de apenas 36 aminoácidos e uma cauda intracelular também curta com 41 aminoácidos (Fig.4c). Pouco se sabe sobre sua função. Lemmers e colaboradores (2004) observaram que CRB3 se liga a proteínas periféricas de membrana responsáveis pela polaridade celular.

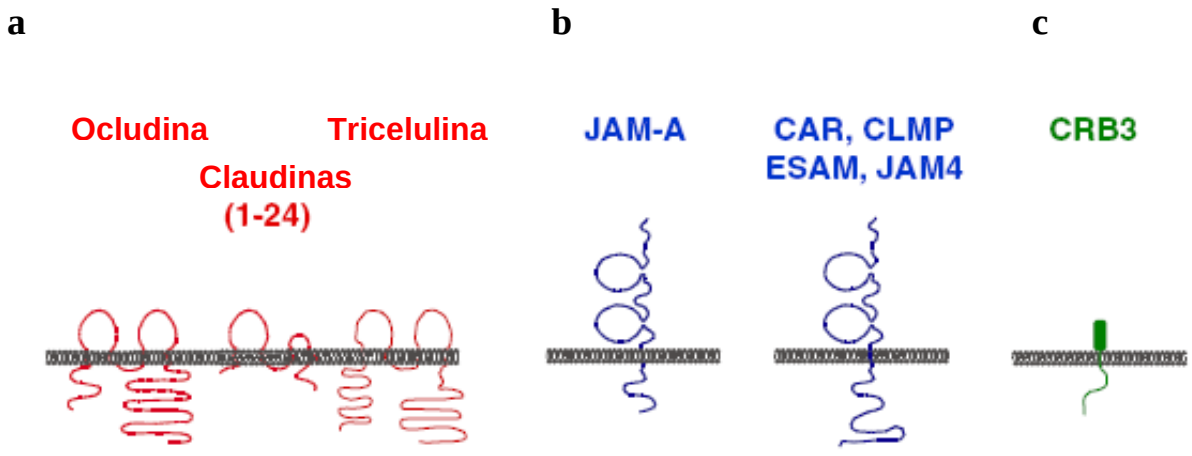


Figura 4: Proteínas integrais de membrana presentes nas Junções *tight*. A figura mostra as três classes de proteínas transmembrana das JT de acordo com sua estrutura. Adaptado de Ebnet, 2008.

Além das proteínas integrais de membrana, três complexos protéicos ligados à região citoplasmática das JT são essenciais para sua manutenção e correta funcionalidade: (1) complexo das proteínas ZOs (*zonula ocludens*), (2) complexo CRB3-Pals1-PATJ e (3) complexo PAR-3-aPKC-PAR-6. Outros componentes protéicos existentes nas JT incluem proteínas de ancoragem, proteínas adaptadoras, GTPases regulatórias, proteínas G, quinases, fosfatases e fatores de transcrição (Ebnet, 2008) (Fig. 5). Estas proteínas têm como função principal mediar a interação das proteínas transmembrana ao citoesqueleto, e participar da sinalização celular regulando a polaridade e a proliferação celular (Shin *et al*., 2006).

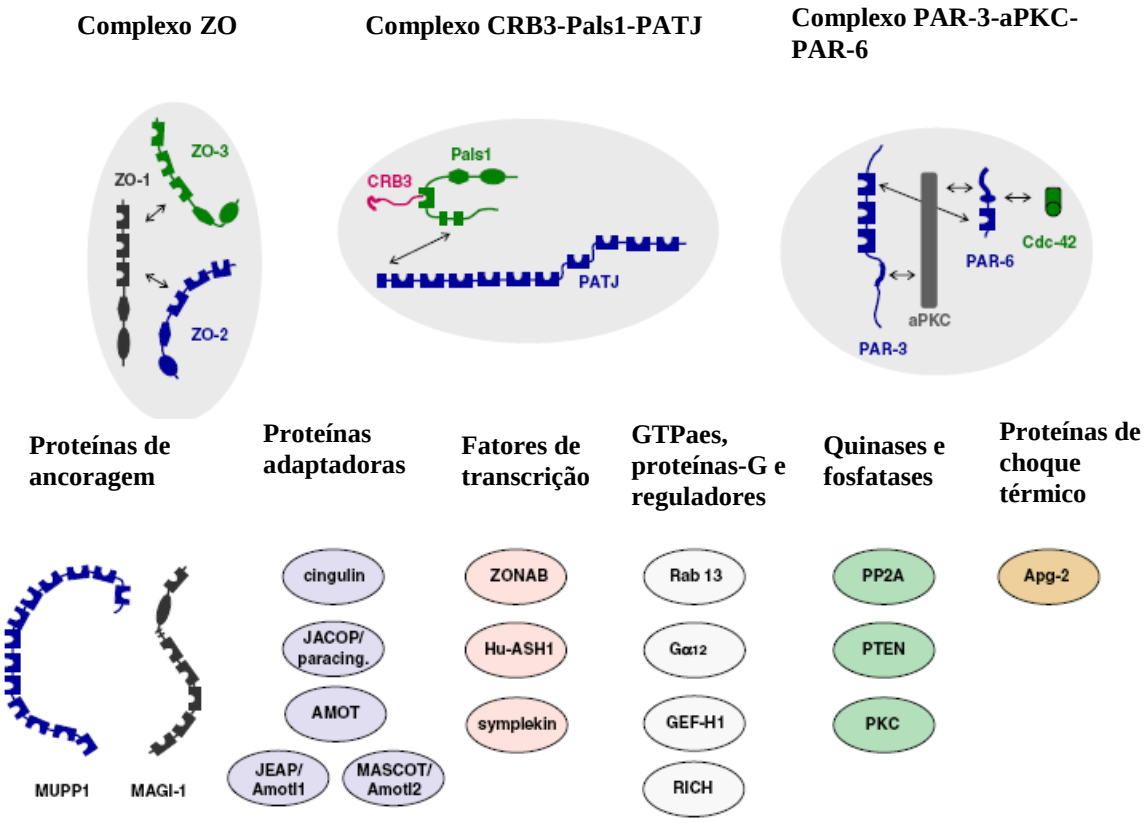


Figura 5: Complexos multiprotéicos presentes nas Junções *tight*. Os complexos são formados por proteínas de ancoragem, proteínas adaptadoras, GTPases regulatórias, proteínas G, quinases, fosfatases e fatores de transcrição. Adaptado de Ebnet, 2008.

O complexo das proteínas ZO é formado pela ZO-1, ZO-2 e ZO-3. Estas proteínas fazem parte da família MAGUK (*membrane-associated guanylate kinase-like homologs*) e a principal representante, ZO-1, interage diretamente com diversas proteínas integrais de membrana como a ocludina, as claudinas, JAMs e CAR, através de domínios independentes. Além disso, as proteínas ZOs interagem entre si e promovem a principal ligação das JT com o citoesqueleto de actina (Fig.6) (Shin et al., 2006). Apesar da importância individual de cada proteína ZO, alguns trabalhos relatam uma redundância funcional entre elas. Foi observado em duas linhagens celulares epiteliais de mama e rim que a ausência de ZO-1 atrasava, mas não impedia a formação das JT (Umeda *et al*., 2004; McNeil *et al*., 2006). Apenas a ausência

das três proteínas ZO resultou no bloqueio da formação das JT e perda da sua função de barreira (Umeda *et al*., 2006).

O complexo CRB3-Pals1-PATJ foi descrito originalmente em *Drosophila* e está envolvido na regulação da polaridade apico-basal da célula. A localização deste complexo nas JT é mediada através de uma interação direta de Pals1 (*protein associated with lin seven 1*) com a porção C-terminal de CRB3, e uma ligação direta entre Pals1 e PATJ (*PALS1-associated TJ protein*) (Fig.6) (Tepass *et al*., 2001). O silenciamento de Pals1 utilizando RNAi leva a um defeito na formação das JT acompanhada por uma perda na expressão de PATJ (Straight *et al*., 2004). Por sua vez, o bloqueio de PATJ prejudica a formação de barreira das JT, perda de expressão de Pals1, internalização de CRB3 e redistribuição de outros componentes protéicos das JT como ocludina e ZO-3 (Michel *et al*., 2005; Shin *et al*., 2005).

No complexo PAR-3-α-PKC-PAR-6, PAR-3 e PAR-6 interagem diretamente com a PKC (proteína quinase C) regulando sua localização e atividade (Fig.6) (Ohno, 2001). Foi demonstrado que PAR-3 se liga especificamente a JAM-A, -B e –C, e que a ligação com JAM-A serve como âncora para ligação do complexo PAR-3-aPKC-PAR-6 com a JT (Ebnet *et al*., 2003) (Fig. 6). A função deste complexo protéico nas JT parece ser mais importante na sua formação do que na sua manutenção (Ooshio *et al*., 2007). Estudos aplicando mutantes negativos de cada uma das proteínas deste complexo revelaram que os efeitos negativos são observados apenas durante o processo de formação dos contatos célula-célula, não tendo efeito em células epiteliais polarizadas e com as JT já formadas. (Gao *et al*., 2002; Nagai-Tamai *et al*., 2002).

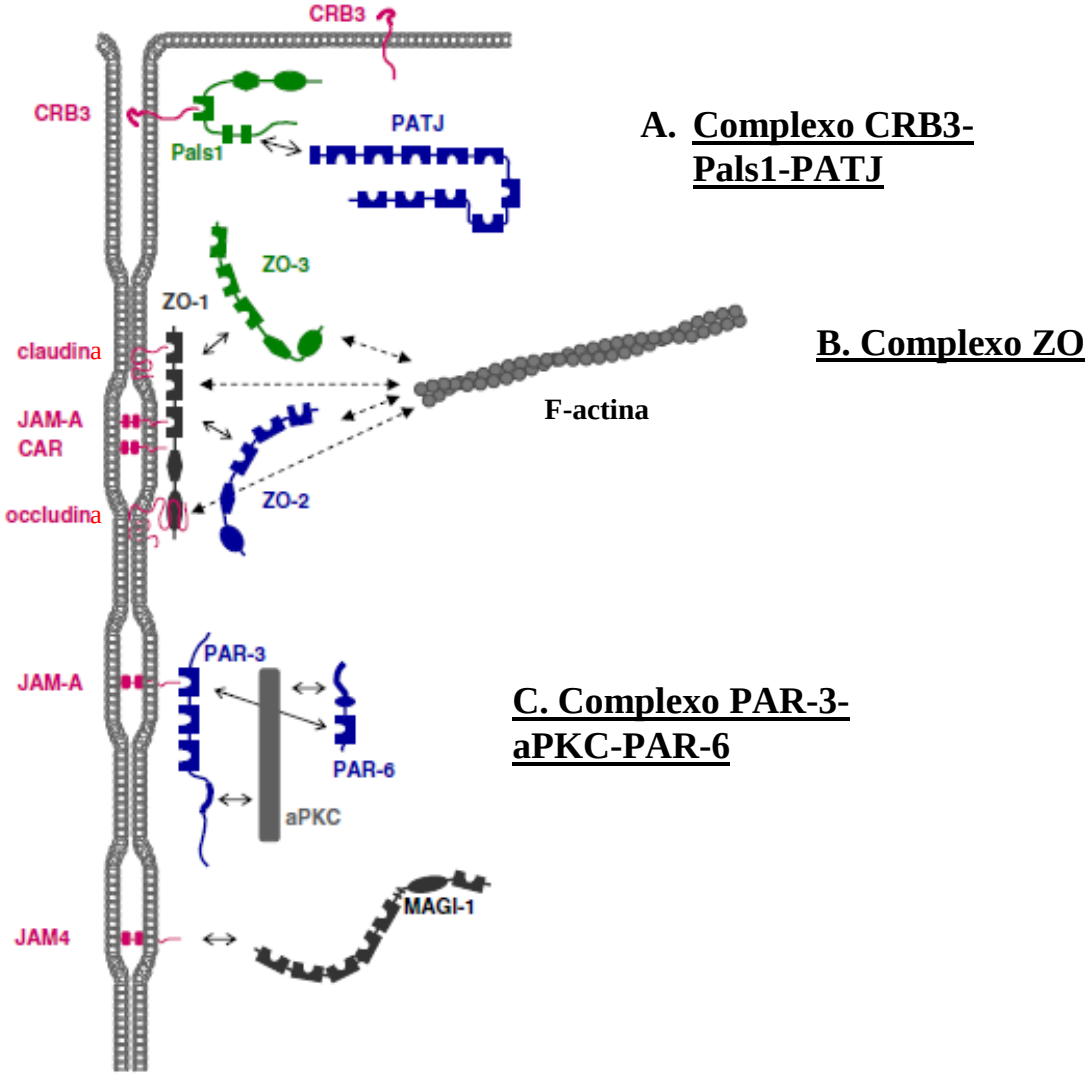


Figura 6: Interações moleculares entre proteínas integrais de membrana e os complexos protéicos citoplasmáticos presentes nas junções *tight*. A. Complexo CRB3-Pals1-PATJ regula a formação das JT. **B.** Complexo das proteínas ZO interage com diversas proteínas integrais de membrana servindo como ligação entre as JT e o citoesqueleto. **C.** Complexo PAR-3-aPKC-PAR-6 está associado à membrana através da ligação de PAR-3 com JAM-A. É importante na formação das JT e na manutenção da polaridade apico-basal. Adaptado de Ebnet, 2008.

Junções Aderentes (JA):

As JA são estruturas juncionais com importante função na manutenção da adesão célula-célula e sua dinâmica de organização/desorganização é rigorosamente controlada durante a morfogênese e homeostase tecidual. A principal molécula de adesão das JA é a caderina. Esta proteína faz parte de uma grande família de moléculas de adesão célula-célula dependentes de Ca^{2+}. A E-caderina é o membro melhor caracterizado desta família e está expresso principalmente no epitélio. Esta proteína é uma glicoproteína transmembrana de passagem única que interage de forma homofílica com E-caderinas de células vizinhas. A porção extracelular da E-caderina possui cinco domínios que contém sítios de ligação para o Ca^{2+}. Diferentes proteínas interagem com a porção citoplasmática da E-caderina realizando sua ligação com o citoesqueleto de actina. Essas proteínas de ligação compreendem os membros da família das cateninas: α-catenina, β-catenina, γ-catenina e p120 catenina (D'Souza-Schorey, 2005).

A β-catenina e a p120 catenina se associam diretamente à porção membranar mais distal e proximal da E-caderina, respectivamente (Fig.7). Quando a β-catenina não está expressa ou apresenta-se em baixa expressão, seu sítio de ligação na E-caderina pode ser ocupado pela γ-catenina/placoglobina que por sua vez se liga preferencialmente à caderina desmossomal (desmocolina e desmogleína) (Zhurinsky *et al*., 2000; Perez-Moreno & Fuchs, 2006). Estudos mostraram que modificações pós-traducionais em β-catenina, como fosforilações, alteram sua afinidade pela E-caderina, causando perda da atividade adesiva desta proteína (Pokutta & Weis, 2007). A associação E-caderina/β-catenina também é necessária para estabilizar β-catenina na membrana, pois, no citoplasma ela é rapidamente degradada pela via ubiquitina-proteassoma ou se não degradada, é translocada para o núcleo ativando uma importante via de sinalização, a via Wnt, a qual será descrita com detalhes mais adiante (Nelson & Nusse, 2004).

A associação de p120 catenina à região justamembranar de E-caderina possui um papel recíproco de estabilização e localização destas proteínas nos contatos célula-célula. Qualquer alteração desta associação é capaz de promover desestabilização dos contatos célula-célula, onde p120 livre no citoplasma pode modular proteínas Rho GTPases e subseqüentemente induzir aumento de migração celular (van Roy & McCrea, 2005; Fukumoto *et al*., 2008). Outro importante papel desempenhado pela p120 catenina é a sua

capacidade de regulação da transcrição de alguns genes através de sua interação com fatores de transcrição, como KAISO (Davis *et al*., 2003).

A função da α-catenina é pouco esclarecida. Por muito tempo considerou-se que α-catenina era a responsável pela ligação das JA ao citoesqueleto de actina através da sua ligação com a β-catenina e com a F-actina (Fig.7). Porém, estudos demonstraram que α-catenina se apresenta como um monômero ou um homodímero com diferentes propriedades de interação. A α-catenina monomérica se liga mais fortemente ao complexo E-caderina-β-catenina, já o dímero se liga preferencialmente aos filamentos de actina (Drees *et al*., 2005; Yamada *et al*., 2005). Uma hipótese sugerida por Ebnet (2008) seria a presença de uma terceira proteína que faria a ponte entre a α-catenina presente no complexo heterodimérico β-catenina-α-catenina associado a E-caderina e o citoesqueleto de actina. Portanto, os detalhes moleculares da estrutura que faz a ligação da JA com o citoesqueleto de actina permanece ainda desconhecido.

Outro importante complexo protéico presente nas JA consiste nos membros da família das nectinas e sua ligante citoplasmática AF-6/afadina (Takai & Nakanishi, 2003). As nectinas são proteínas *imunoglobulinas-like* formadas por quatro membros: nectina-1, -2, -3, e –4. A afadina é uma proteína de ancoragem que interage com as nectinas e com o citoesqueleto de actina através de domínios independentes, sugerindo que ela seria a responsável pela ligação da nectina ao citoesqueleto de actina (Fig.7) (Mandai *et al.,* 1997).

Estudos vêm mostrando que os dois complexos protéicos presentes nas JA podem interagir entre si através de diversas interações moleculares. A afadina liga-se diretamente a α-catenina e proteínas como ponsina/SH3P12, LMO7 (*Lim domain only 7*)e ADIP (*afadin Dil domain-interacting protein*) medeiam a ligação da afadina com as proteínas ligantes de F-actina, vinculina e α-actinina. No entanto, a existência de uma ligação direta da F-actina entre afadina com α-catenina, permanece por ser definida (Fig.7) (Asada *et al.,* 2003; Ooshio *et al*., 2004).

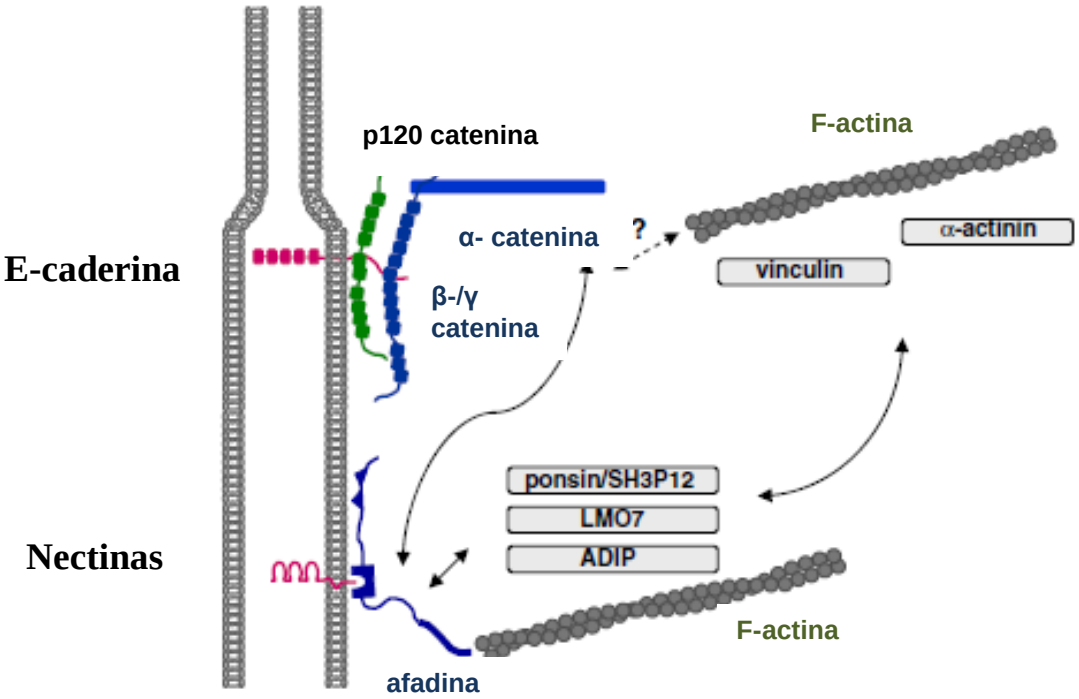


Figura 7: Estrutura molecular das junções aderentes. A figura mostra também as interações protéicas nas junções aderentes**:** Existem dois importantes complexos protéicos encontrados nas junções aderentes. O complexo E-caderina-catenina representado pelas proteínas E-caderina, β-catenina e α-catenina. Promovem uma adesão Ca^{2+}-dependente. O complexo nectina-afadina promove uma adesão Ca^{2+}-independente. A afadina se liga diretamente ao citoesqueleto de actina e, portanto, promove a interação do complexo nectina/afadina ao citoesqueleto da célula. Adaptado de Ebnet, 2008.

Proteínas do complexo juncional apical e câncer: vias de sinalização celular envolvidas:

Além da importante função de manter as células epiteliais unidas, as proteínas juncionais também estão envolvidas em mecanismos de sinalização celular que medeiam eventos relacionados com o desenvolvimento tumoral, tais como, perda da polaridade, proliferação, migração e sobrevivência (Perez-Moreno & Fuchs, 2006). Dessa forma, alterações estruturais destas proteínas podem resultar em diminuição da adesão, perda de polaridade, aumento de atividade migratória, da capacidade invasiva e proliferação desordenada. Uma das conseqüências dessas alterações consiste na formação de tumores malignos.

A perda da estrutura e função das proteínas que compõem as JT é constantemente observada em tumores epiteliais. Oliveira & Morgado-Díaz (2007) relataram uma revisão detalhada sobre alterações da expressão de diferentes tipos de claudinas e a função no desenvolvimento de diversos tipos de câncer epiteliais, incluindo o câncer colo-retal (CCR). Alterações na expressão das claudinas são freqüentes em diversos tipos de tumores como cólon, mama, pâncreas, próstata, útero e ovário (Dhawan *et al*., 2005; Oliveira *et al*., 2005; Hewitt *et al*., 2006; Mees *et al*., 2009; Takehara *et al*., 2009). Estas alterações geralmente causam aumento da permeabilidade paracelular, da migração e da invasividade do tumor. No entanto, os mecanismos moleculares que regulam a expressão diferencial destas proteínas e seu relacionamento com a progressão tumoral permanecem por ser definidos.

O complexo protéico PAR-3-a-PKC-PAR-6, responsável pela manutenção da polaridade celular, também se mostra alterado durante processos tumorigênicos. Um estudo utilizando células epiteliais de glândula mamária demonstrou que este complexo é um alvo do receptor oncogênico ErbB2. A sinalização alterada da via ErbB2 resulta na interação deste receptor com o complexo PAR-3-a-PKC-PAR-6 ocasionando perda da polaridade celular, hiperproliferação e bloqueio da apoptose (Aranda *et al*., 2006).

As proteínas ZOs servem como ancoragem para proteínas sinalizadoras que regulam a proliferação epitelial e morfogênese. Kaihara e colaboradores (2003) observaram que os níveis de expressão de ZO-1 encontravam-se bastante diminuídos em tumores colo-retais e em metástases de fígado. A diminuição da expressão de ZO-1 constitui um problema já que ZO-1 se associa ao fator de transcrição ZONAB inibindo a transição da fase G1 de ciclo celular para a fase S, controlando dessa forma a proliferação celular (Sourisseau *et al*., 2006). Além disso, foi observado que a interação da proteína ZO-1 ao ZONAB é importante na regulação do proto-oncogene ErbB2 em células da linhagem MDCK II (Balda & Matter, 2000). ZO-2, diferentemente de ZO-1, parece estar sempre migrando entre o núcleo e as JT. Esta proteína interage com diversos fatores transcricionais como AP-1 (*activator protein 1*), C/EBP (*CCAAT-enhancer-binding proteins*), SAF-B (*scaffold attachment factor B*) e ARVCF (*Armadillo Repeat gene deleted in Velo-Cardio-Facial syndrome*) que regulam a expressão de genes responsáveis pela proliferação e diferenciação celular (Traweger *et al*., 2003; Betanzos *et al*., 2004, Kausalya *et al*., 2004).

A participação da ocludina no processo de sinalização celular não é bem definida. Sabe-se que a regulação da sua fosforilação/desfosforilação por fosfatases interfere na permeabilidade paracelular (Sallee & Burridge, 2009). Além disso, sua expressão pode ser

alterada pela ação de diferentes vias de sinalização como TGF-β e Ras ocasionando alterações na função de barreira paracelular (Zhong *et al.*, 2008; Ronaldson *et al*., 2009).

A participação das proteínas JAM em vias de sinalização celular é mais bem descrita em células sanguíneas, onde apresentam importante função na migração de leucócitos e na ativação de plaquetas (Bazzoni, 2003). Em células epiteliais MDCK II, foi descrito que JAM-4 ativa a via Rac aumentando o potencial de HGF (fator de crescimento de hepatócitos) de causar o espalhamento de células (Mori *et al*., 2004). Wang e colaboradores (2009) sugeriram que JAM-A juntamente com claudina-7 estão envolvidas no controle da expressão do antígeno prostático (PSA) na linhagem celular de próstata LNCaP.

As proteínas que compõem as JA, β-catenina, α-catenina e p120 catenina participam da sinalização celular funcionando como co-fatores transcricionais (Perez-Moreno e Fuchs, 2006). A β-catenina está envolvida em uma importante via de sinalização, a via Wnt. Em condições de ativação desta via, a β-catenina funciona como um co-ativador transcricional interagindo com o complexo transcricional Tcf/Lef (*T cell factor/ lymphoid enhancing factor*) ativando a transcrição de genes específicos relacionados, dentre outros eventos, com aumento da proliferação celular e da atividade migratória da célula (Hurlstone & Clevers, 2002; Nelson & Nusse, 2004; Bienz, 2005). Ainda, a presença de β-catenina no núcleo das células tumorais indica um mau prognóstico e está relacionado com uma maior invasividade tumoral (Cheng *et al*., 2005). Mees e colaboradores (2009) observaram que o aumento de expressão de β-catenina está associado à tumorigênese colo-retal. α-catenina parece estar envolvida com a via *Sonic hedgehog* (Shh) controlando o balanço entre proliferação celular e diferenciação. Mutações no gene de α-catenina têm sido observadas em células derivadas de tumores de pulmão, ovário, próstata e em carcinomas de células escamosas (Kobielak & Fuchs, 2006).

A localização nuclear de p120 catenina é freqüentemente observada em tumores gástricos (Mayerle *et al*., 2003). No núcleo, p120 catenina interage com o repressor transcricional *Kaiso* fazendo com que genes que eram antes reprimidos, passem a ser expressos como, por exemplo, MMP-7 (metaloproteinase 7) e ciclina-D1, ambos implicados na tumorigênese (Ogden *et al*., 2008). Kim e colaboradores (2004) observaram que o complexo p120 catenina/Kaiso pode modular a via Wnt controlando a expressões de genes favoráveis a propagação de tumores. Liu e colaboradores (2009) analisaram amostras de câncer de pulmão e observaram que p120 catenina e E-caderina encontravam-se ectopicamente expressas no citoplasma das células. Além disso, observaram que a perda de p120 catenina em células derivadas de câncer pulmonar aumentava a invasividade e o

potencial metastático do tumor. Bellovin e colaboradores (2005) demonstraram que a localização alterada de p120 catenina em amostras de adenocarcinomas colo-retais consistiam um indicativo de agressividade tumoral. Além disso, p120 catenina está envolvida na ativação e inativação das Rho GTPases regulando a dinâmica do citoesqueleto de actina e conseqüentemente controlando a migração celular (Perez-Moreno e Fuchs, 2006).

A proteína E-caderina é essencial para a determinação do fenótipo epitelial da célula visto que diversos estudos vêm demonstrando que a perda de expressão de E-caderina acarreta uma série de eventos moleculares induzindo uma modificação fenotípica da célula epitelial para um fenótipo mesenquimal. Este fenômeno é denominado transição epitélio-mesenquimal (TEM). As células epiteliais que sofrem TEM perdem a adesão com células adjacentes e adquirem um potencial migratório e invasivo (Radisky, 2005). Ambos os fenômenos são necessários à disseminação da célula tumoral e, por esta razão, a TEM está sendo apontada como um importante indutor da progressão tumoral (Spaderna *et al*., 2008). A perda de expressão de E-caderina é observada em uma grande variedade de tumores, incluindo o CCR e representa um mau prognóstico para o paciente (Chen *et al*., 2005; Cheng *et al*., 2005).

A perda de função das proteínas de junção devido a mutações ou diminuição da sua expressão pode levar, portanto, à ativação inadequada de vias de sinalização e conseqüentemente, ao desenvolvimento da tumorigênese em diferentes órgãos. Neste contexto, alterações na via Wnt estão implicadas na tumorigênese do câncer de mama, próstata, pulmão, câncer esofágico de células escamosas, câncer gástrico e principalmente no câncer colo-retal (Akiri *et al*., 2009; Jiang *et al*., 2009; Matsuda *et al*., 2009). Mutações em proteínas que participam da via Wnt, como a β-catenina, iniciam a transformação do epitélio intestinal normal em um adenocarcinoma colo-retal. Fearon & Vogelstein (1990) propuseram que a tumorigênese colo-retal se inicia invariavelmente através de uma mutação na via Wnt levando à formação de um adenoma benigno e conseqüentemente, outras mutações como nos genes Kras, Smad4 e p53, levando a transformação do adenoma benigno para um adenocarcinoma metastático.

O câncer colo-retal (CCR)

O CCR é uma das principais causas de morte por câncer em países desenvolvidos e é o 4º tipo de câncer mais comum entre homens e o 3º mais comum entre as mulheres no Brasil

(Tabela 1). Em todo mundo, cerca de 850.000 pessoas desenvolvem CCR anualmente e em torno de 500.000 vem a óbito. Tanto para homens como para mulheres, a incidência de CCR aumenta a partir dos 40 anos e cerca de 90% dos indivíduos diagnosticados com CCR possuem mais de 50 anos de idade (Benson, 2007). Entre os pacientes que desenvolvem CCR, 30-40% apresentam metástase de fígado.

Tabela 1: Estimativas para o ano de 2010 dos números de novos casos de câncer, em homens e mulheres no Brasil. Fonte: Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Ministério da Saúde. INCa

Localização Primária	Estimativa de Casos Novos		
Neoplasia Maligna	Masculino	Feminino	Total
Próstata	52.350	-	52.350
Mama Feminina	-	49.240	49.240
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.800	9.830	27.630
Cólon e Reto	13.310	14.800	28.110
Estômago	13.820	7.680	21.500
Colo do Útero	-	18.430	18.430
Cavidade Oral	10.330	3.790	14.120
Esôfago	7.890	2.740	10.630
Leucemias	5.240	4.340	9.580
Pele Melanoma	2.960	2.970	5.930
Outras Localizações	59.130	78.770	137.900
Subtotal	**182.830**	**192.590**	**375.420**
Pele não Melanoma	53.410	60.440	113.850
Todas as Neoplasias	**236.240**	**253.030**	**489.270**

Os fatores de risco para o desenvolvimento de câncer colo-retal estão apresentados na Tabela 2. Além da idade, outros fatores como pré-disposição genética, doenças intestinais pré-existentes e agentes externos, representam importantes fatores de risco para o desenvolvimento do CCR. Dentre os fatores externos estão alimentação inadequada, tabagismo, álcool, sedentarismo e obesidade. O CCR acomete igualmente, em termos de incidência e mortalidade, todos os grupos étnicos. A incidência de CCR entre homens é ligeiramente maior do que nas mulheres. Estudos têm sugerido que drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINE) (como ibuprofeno) e inibidores de COX-2 (como celecoxibe) podem reduzir o risco de desenvolvimento de CCR. Além disso, foi demonstrado que a mortalidade relacionada ao CCR é reduzida em cerca de 40-50% em indivíduos que tomam aspirina ou outras AINE (Benson, 2007).

Tabela 2: Principais fatores de risco para o desenvolvimento de CCR. Adaptado de Benson, 2007.

FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER COLO-RETAL (CCR)
Idade < 50 anos
Presença de pólipos intestinais
Histórico familiar de CCR
Colite ulcerativa
Doença de Crohn's
Dieta rica em gordura
Dieta pobre em frutas e vegetais
Sedentarismo
Obesidade
Tabagismo
Álcool

Aproximadamente 20% dos casos de CCR são hereditários e 70% são ditos esporádicos, ou seja, não têm relação familiar. As duas síndromes hereditárias incluem a polipose adenomatosa familiar (FAP) e a não poliposa (HNPCC).

A FAP é caracterizada pela presença de centenas e até milhares de pólipos ou adenomas (tumores benignos) no epitélio intestinal que surgem antes dos 30 anos de idade. Os adenomas se desenvolvem a partir de mutações herdadas no gene supressor de tumor APC (*adenomatous polyposis coli*) e, inevitavelmente, 100% dos pacientes com FAP desenvolvem CCR aos 40 anos de idade aproximadamente. A FAP representa 1-2% dos casos de CCR e possui um comportamento agressivo em termos de invasividade e metástase. HNPCC ou síndrome de Lynch é causada por uma mutação herdada em qualquer um dos 5 genes de reparo MMR (*mismatch repair*) de DNA e representa 3-5% dos casos de CCR. Apesar da nomenclatura "síndrome não poliposa", pacientes com HNPCC desenvolvem pólipos que em 70-80% dos casos evolui para um CCR (Sancho *et al.,* 2004; Benson, 2007).

Cerca de 70-90% dos casos de CCR evoluem a partir de um pólipo adenomatoso. A progressão do adenoma para o adenocarcinoma (tumor maligno) é dependente do acúmulo de mutações gênicas associadas aos fatores ambientais citados na tabela 2 e é caracterizado como um sistema de vários passos (*multisteps*). As mutações envolvem diversos oncogenes e genes supressores de tumor. O evento primário para o desenvolvimento do CCR é a mutação no gene supressor de tumor APC. Esta mutação ocorre em cerca de 60-80% dos casos

esporádicos de CCR. Outros eventos necessários para a progressão maligna dos tumores intestinais envolvem mutações nos genes da β-catenina (10% dos casos), Axina (5%), Kirsten-ras (K-ras) (40%) e p53 (75%) (Pinto & Clevers, 2005; Benson, 2007). A figura 8 ilustra as diversas seqüências de mutações necessárias para o desenvolvimento do CCR.

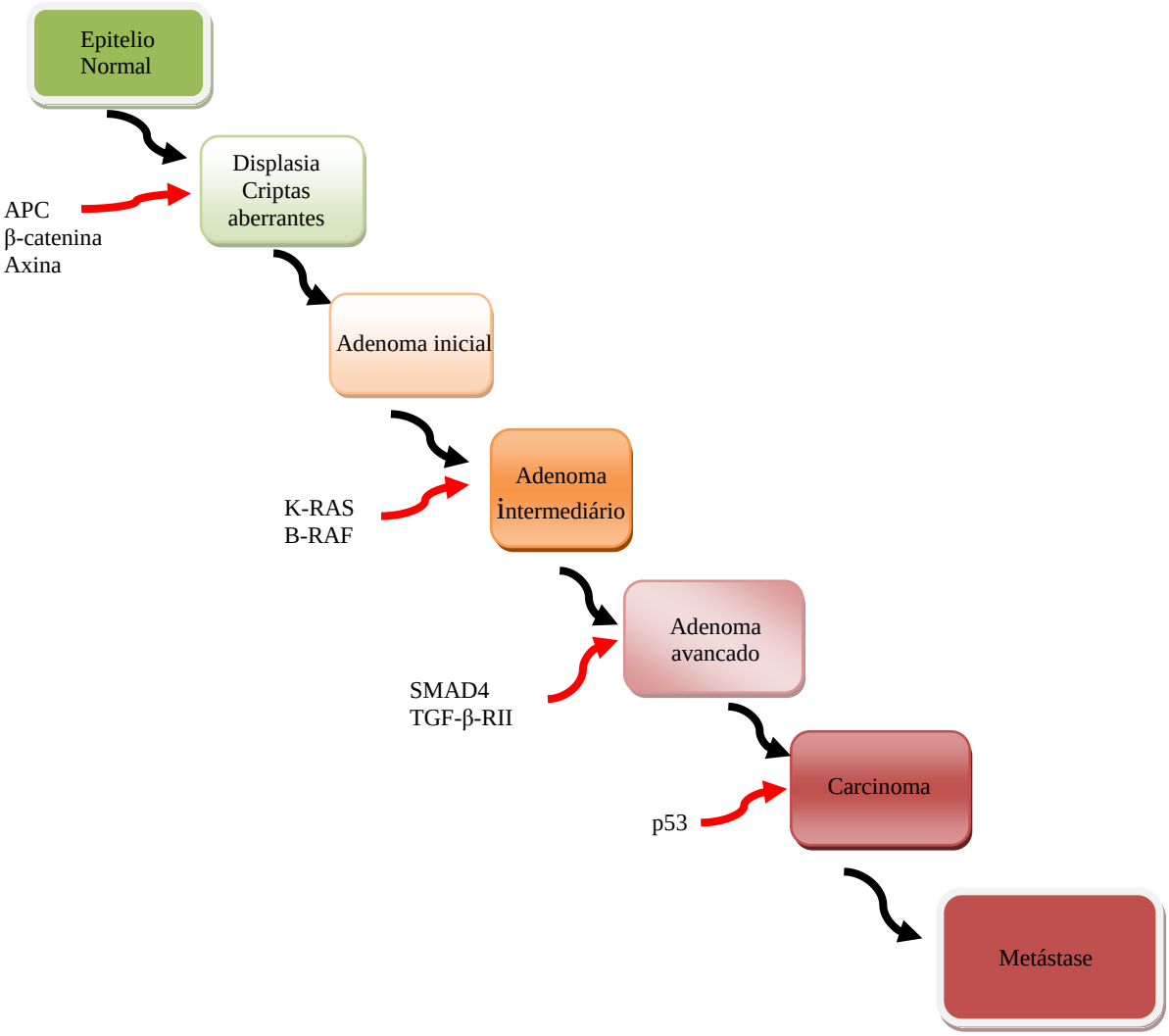


Figura 8: Correlação entre a progressão do CCR e o acúmulo de mutações genéticas. Adaptado de Sancho *et al.*, 2004.

Como visto, observamos que uma das mutações iniciais que levam ao CCR ocorre na proteína juncional β-catenina. Esta proteína juntamente com as proteínas APC e Axina que também sofrem mutações no processo inicial da tumorigênese colo-retal, fazem parte de uma importante via de sinalização, a via Wnt.

A via Wnt encontra-se ativa durante a embriogênese e em células-tronco adultas de tecidos como epitélio intestinal, próstata, retina e pele (Wang & Wynshaw-Boris, 2004; Blum

et al., 2009; Haegebarth & Clevers, 2009; Locker *et al*., 2009). No entanto, diversos estudos vêm mostrando que a ativação inadequada desta via é responsável pelo início e progressão de tumores em diferentes tecidos, incluindo o CCR (Jiang *et al*., 2008, Carethers, 2009).

A via Wnt, homeostase do epitélio intestinal e desenvolvimento do câncer colo-retal

A via Wnt é altamente conservada em todo o reino animal (Clevers, 2006). Sua descoberta foi iniciada por Nüsslein-Volhard e Wieschaus (1980) que descreveram o gene *wg* (*drosophila wingless*) responsável pela polaridade de *Drosophila* durante o desenvolvimento larval. Em 1982, Nusse e Varmus descreveram o gene murino *Int-1* como sítio preferencial para um vírus causador de tumor mamário. Posteriormente, foi visto que *wg* e *Int1* eram homólogos o que resultou na denominação atual Wnt (Rijsewijk *et al.*, 1987).

Diversos estudos demonstram que a via Wnt é essencial para o correto desenvolvimento embrionário (Dominguez *et al*., 1995; Guger & Gumbiner, 1995; He *et al*., 1995; Wang & Wynshaw-Boris, 2004; Byrum *et al*., 2009; Lindvall *et al*., 2009; Verma & Lenka, 2009). Byrum e colaboradores (2009) bloquearam a via Wnt em embriões de ouriço do mar e observaram o impedimento da gastrulação e da esqueletogênese. Verma e Lenka (2009) demonstraram que a ativação da via Wnt induz a formação do mesoderma e do endoderma em embriões de camundongo além de ser importante para a cardiomiogênese. Outros estudos demonstram a importância da via Wnt na formação do coração em *Drosophila* e em mamíferos (Wu *et al*., 1995; Kwon *et al*., 2007).

Além de sua importância na embriogênese, pesquisadores revelaram a participação da via Wnt no controle da auto-renovação de diferentes tecidos (Clevers, 2006).

No controle da homeostase do epitélio intestinal, esta via encontra-se ativa nas células indiferenciadas e proliferativas da cripta, e inativa nas células diferenciadas das vilosidades. Diversos estudos *in vivo* comprovam a importância da via Wnt na renovação do epitélio intestinal (Bienz & Clevers, 2000; Pinto *et al*., 2003; Fevr *et al*., 2007). A superexpressão da proteína Dkk-1, antagonista da via Wnt, reduz fortemente a proliferação das células epiteliais da cripta intestinal e posteriormente, ocasiona a perda das criptas (Korinek *et al*., 1998). Fevr e colaboradores (2007) demonstraram que a via Wnt é indispensável para manter as células-tronco adultas da cripta em estado indiferenciado.

Aspectos moleculares da via Wnt:

As proteínas Wnt representam uma grande família de ligantes compostas por 19 proteínas homólogas que possuem a mesma função apesar de apresentarem seqüência distinta de aminoácidos. Alem disso, possuem diversos sítios de glicosilação e apresentam 22 resíduos de cisteína (Nusse, 2008).

Os receptores dos ligantes Wnt constituem a proteína de sete alças transmembrana *Frizzled* (Fzd) e a proteína de passagem única LRP que faz parte da família de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). As proteínas da família Fzd são constituídas por 10 membros, Fzd1 a Fzd10, e todos contêm um grande domínio extracelular composto por uma região conservada rica em resíduos de cisteína denominada CRD (*cysteine-rich domain*). O domínio CRD dos receptores Fzd reconhecem e se ligam com alta afinidade a múltiplas proteínas Wnt. Na porção citoplasmática, Fzd interage com a proteína *dishevelled* (Dsh) (Nusse, 2008). Os receptores LRP, denominados LRP5 e LRP6 (LRP 5/6), possuem um pequeno domínio intracelular e um grande domínio extracelular com vários sítios de interação (He *et al*., 2006).

A via Wnt pode ser classificada como via canônica que é dependente da proteína juncional β-catenina, e via não canônica que é independente de β-catenina (Vlad *et al*., 2008). Tradicionalmente as glicoproteínas Wnt e os receptores Fzd têm sido classificados como ativadores tanto da via canônica como da não canônica (Vincan & Barker, 2008). Os receptores LRP 5/6 participam apenas da via Wnt canônica.

A figura 9 ilustra o mecanismo de funcionamento da via Wnt canônica: a) na ausência da sinalização de Wnt, a β-catenina citoplasmática, ou seja, que não está interagindo com a E-caderina nas junções aderentes, é fosforilada para posterior degradação. Essa fosforilação é realizada por um complexo protéico, denominado "complexo de destruição", formado pelas proteínas APC e Axina, e pelas tirosinas quinases caseína quinase 1 (CK1α) e glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3-β). A fosforilação ocorre nos resíduos de serina e treonina da porção N-terminal da β-catenina. A β-catenina fosforilada é reconhecida pelo complexo β-TrCP-E3-ligase que medeia sua ubiquitinização e degradação pelo complexo proteassômico. Como resultado, os níveis citoplasmáticos de β-catenina são controlados. Também na ausência da sinalização da via Wnt, as proteínas ligantes de DNA nuclear da família Tcf/Lef agem no núcleo como repressores transcricionais. Com isso não há a transcrição de genes alvo da via Wnt; b) a sinalização da via Wnt é iniciada quando as proteínas Wnt se ligam ao receptor Fzd que se associa com o receptor LRP5/6. Com esta ligação, a proteína citosólica Dsh é fosforilada e conseqüentemente interage com a axina recrutando-a para a porção

citoplasmática de LRP 5/6. Com o deslocamento de axina, o “complexo de destruição” não é formado e, portanto, β-catenina não é fosforilada. A não fosforilação de β-catenina impede sua degradação e, conseqüentemente esta proteína se acumula no citoplasma da célula. A β-catenina acumulada no citoplasma sofre uma translocação para o núcleo e se liga aos membros da família Tcf/Lef convertendo-os a ativadores transcricionais pelo recrutamento, dentre outros, de co-fatores transcricionais como a histona acetilase CBP e a proteína remodeladora de cromatina Brg-1. A formação deste complexo estimula a transcrição de diversos genes relacionados com proliferação, diferenciação, sobrevivência e motilidade. Alguns exemplos de genes alvos da via Wnt são c-myc, ciclina D1, MMPs, NF-kB, VEGF, WISP-1, c-jun, Slug/Snail e CD44 (He *et al*., 1998; Hurlstone & Clevers, 2002; Nelson & Nusse, 2004; Huang & Du, 2008).

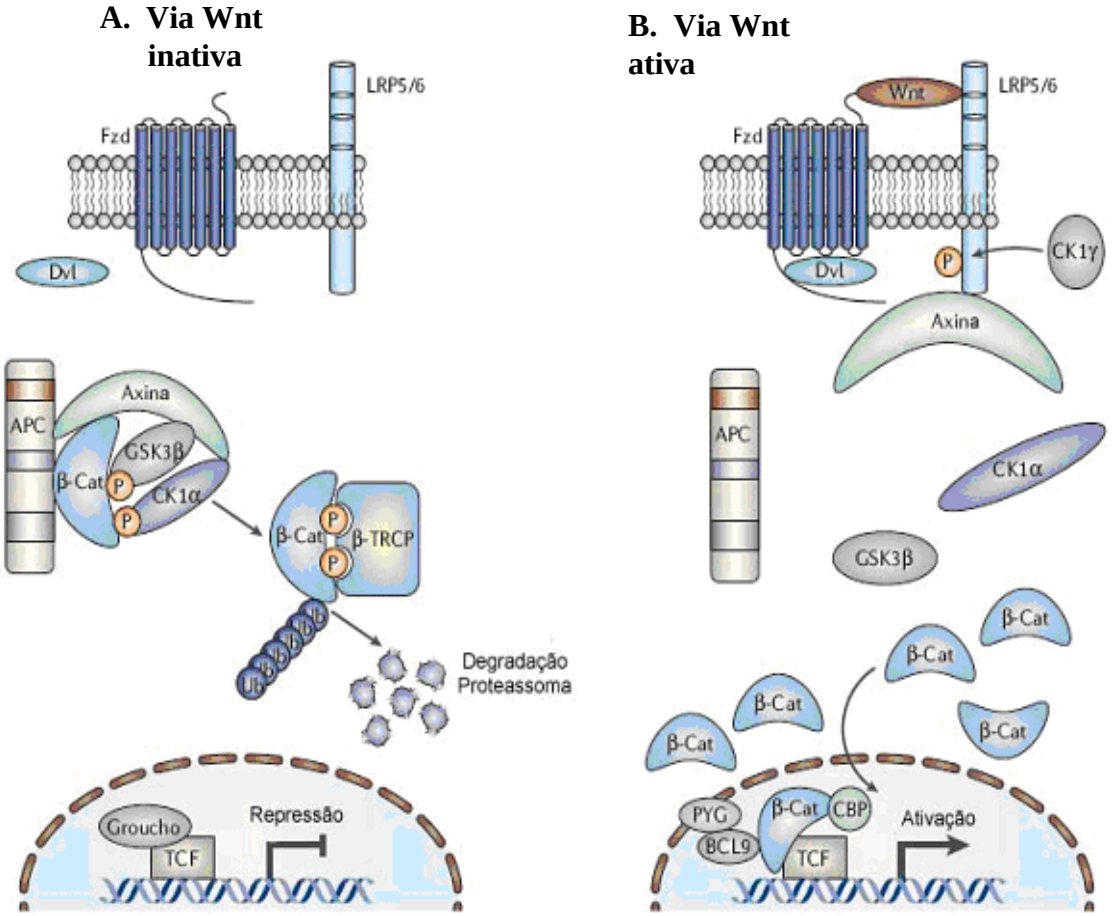


Figura 9. Mecanismos de sinalização da via Wnt canônica. **A.** Representa a via inativa: Na ausência de sinalização da glicoproteína Wnt, a β-catenina se associa ao complexo protéico formado pelas proteínas APC e Axina, e pelas quinases GSK-3β e CK1α. A β-catenina fosforilada é reconhecida e degradada via proteassoma. **B.** Representa a via ativa: Na presença da glicoproteína Wnt, a axina se liga ao domínio citoplasmático do receptor LRP5/6 e com isso o "complexo de destruição não é formado. A β-catenina se acumula no citoplasma sendo posteriormente translocada para o núcleo, onde se liga ao fator transcricional TCF/LEF ativando genes alvos relacionados com a tumorigênese. Adaptado de Barker & Clevers, 2006.

A via Wnt não canônica pode ser subdividida na via Wnt/Ca^{2+} e na via Wnt de polaridade celular denominada Wnt/JNK nos vertebrados e Wnt/PCP em *Drosophila*. Ambas não requerem a participação de β-catenina e do receptor LRP. Na via Wnt/Ca^{2+}, o Ca^{2+} é liberado no meio intracelular e ativa as quinases dependentes de Ca^{2+} PKC e CamKII (proteína quinase II dependente da Ca^{2+}-calmodulina) (Fig. 10) (Veeman *et al.*, 2003;

Slusarski & Pelegri, 2007). A via Wnt/PCP é responsável pela polarização das células no epitélio de *Drosophila.* Uma via similar em vertebrados, a via Wnt/JNK, envolve a ativação das GTPases Rac, Rho e Cdc42 que regulam a atividade de ROCK, MAPK e JNK (Fig.10). De uma forma geral as vias Wnt não canônicas regulam a adesão, polaridade e migração celular (Vincan & Barker, 2008).

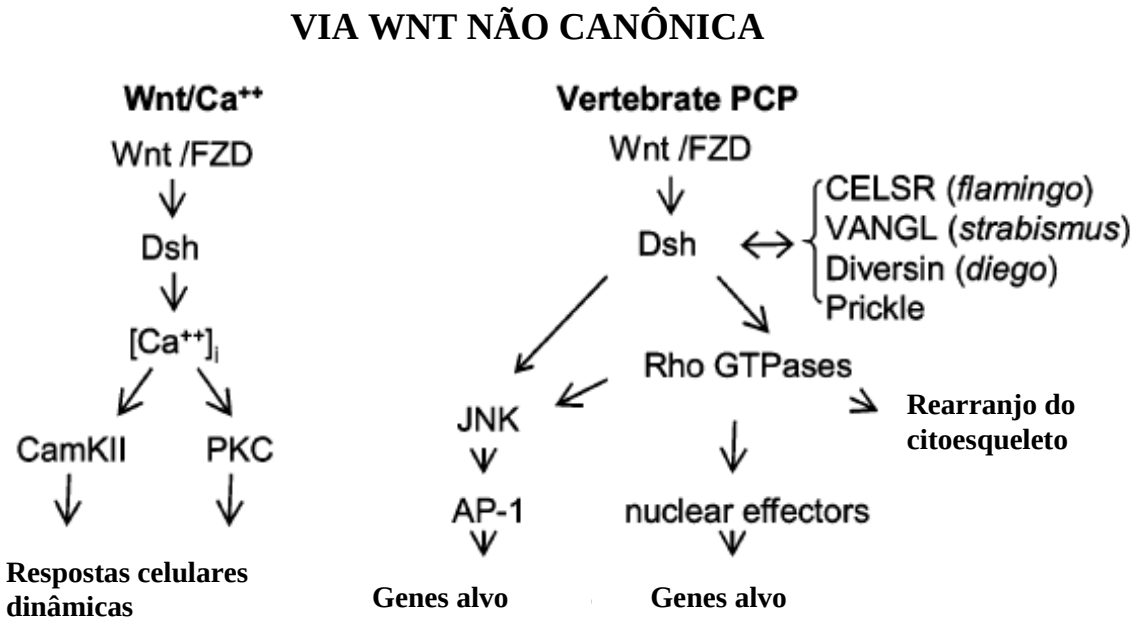


Figura 10: Via Wnt não canônica. A via Wnt não canônica pode ser subdividida na via Wnt/Ca^{2+} e na via Wnt de polaridade celular denominada Wnt/JNK nos vertebrados e Wnt/PCP em *Drosophila*. As vias Wnt não canônicas regulam a adesão, polaridade e migração celular. Adaptado de Vincan & Barker, 2008.

A via Wnt canônica é a mais estudada devido ao seu envolvimento com a tumorigênese da maioria dos tumores epiteliais, inclusive do CCR, e, portanto, será a via abordada neste trabalho.

A figura 11 representa um modelo da atividade do complexo β-catenina/Tcf/Lef nas células do epitélio intestinal e formação inicial de pólipos (van de Wetering *et al*., 2002). Neste modelo, as células mesenquimais produzem as proteínas Wnt que estimulam as células-tronco proliferativas das criptas intestinais. Estas células acumulam β-catenina no núcleo que interage com o complexo Tcf/Lef promovendo a ativação de genes como *c-myc* que promovem a proliferação celular. À medida que as células alcançam a região mediana da cripta, o gradiente de proteínas Wnt diminui e conseqüentemente a atividade do complexo β-catenina/Tcf/Lef é reduzida e isso resulta na interrupção do ciclo celular e diferenciação em enterócitos. Por outro lado, células que apresentarem mutações tais como na β-catenina ou APC, permitem que a via Wnt passe a ser constitutivamente ativa, mantendo o complexo β-catenina/Tcf/Lef ativo. Portanto, estas células vão continuar a se comportar como células-tronco proliferativas dando origem aos pólipos ou adenomas intestinais. Marcadores específicos de células-tronco adultas intestinais como o Lgr5, são observados nos adenomas (Barker & Clevers, 2006).

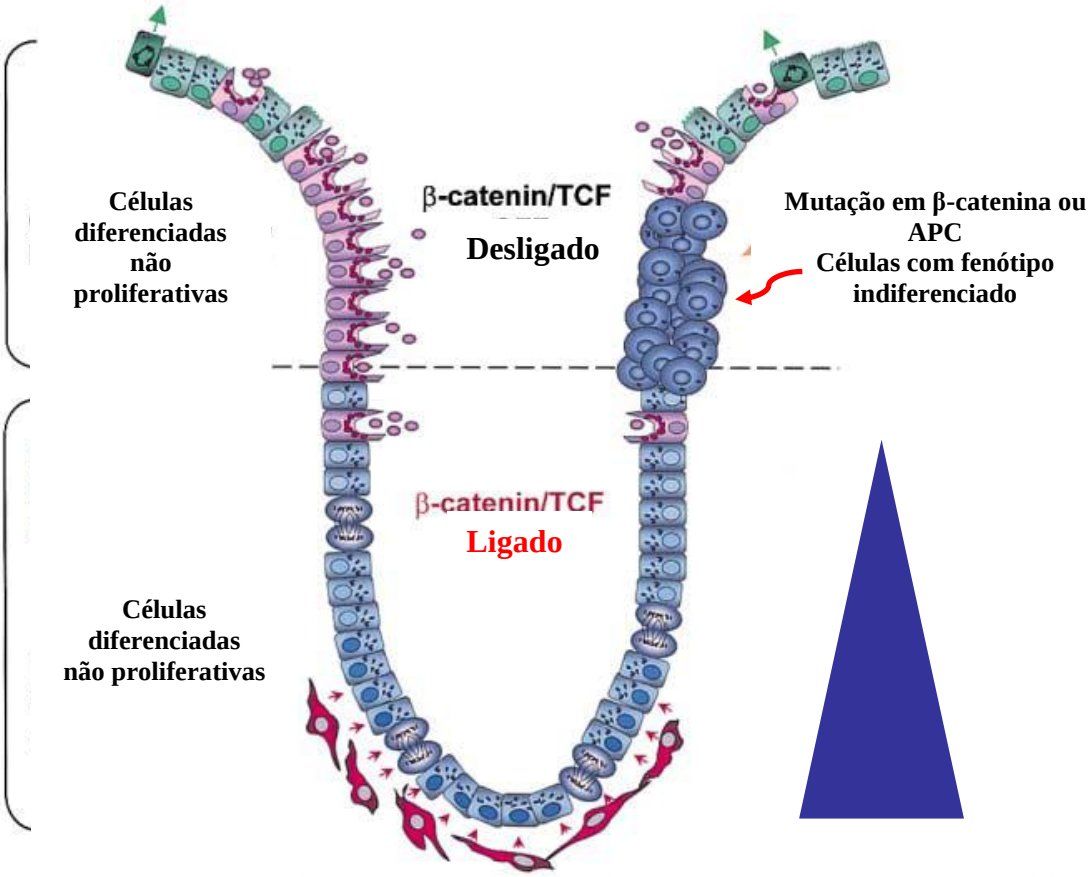


Figura 11: Modelo representativo da atividade do complexo β-catenina/Tcf na cripta intestinal e formação de pólipos. Na base das criptas, as células-tronco proliferativas acumulam β-catenina no núcleo e através da interação desta com o complexo transcricional Tcf/Lef, promove a ativação de genes alvo como o *c-myc*. Á medida que as células migram em direção à superfície, o complexo β-catenina/Tcf é desligado. Dessa forma, as células param de proliferar dando origem a células diferenciadas. Em células com mutações nas proteínas APC ou β-catenina, o complexo β-catenina/Tcf/Lef continua ativo e as células crescem de forma indiferenciada ocorrendo então a formação de pólipos. Adaptado de van de Wetering *et al*., 2002.

A via Wnt e a transição epitélio mesenquimal (TEM)

O tecido epitelial tem como característica básica a forte adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, que são determinantes para a polaridade celular. Células mesenquimais, por outro lado, apresentam pouco ou nenhum contato com as células vizinhas e não são polarizadas, além disso, possuem maior capacidade migratória, pois são capazes de remodelar a matriz extracelular através da produção de metaloproteinases. Estas células também são fontes abundantes de proteínas sinalizadoras como, por exemplo, glicoproteínas da família Wnt, fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fibroblástico (FGF) assim como TGFβ (Radisky, 2005).

A transição epitélio mesenquimal (TEM) consiste em uma série de eventos morfogenéticos que leva a conversão de uma célula epitelial em uma célula com fenótipo mesenquimal. Este fenômeno é essencial durante muitos estágios do desenvolvimento embrionário como na gastrulação e na formação das cristas neurais (Radisky, 2005)..

Um evento crítico da TEM é a diminuição da expressão de marcadores epiteliais como as proteínas que compõem as junções aderentes, E-caderina, cateninas e as proteínas de JT, claudinas (Thiery *et al.,* 2006). A perda de função ou diminuição da expressão dessas proteínas leva à degradação da adesão célula-célula e aumento da motilidade celular, sendo ambos os fenômenos necessários à disseminação de uma célula tumoral. Por esta razão, a TEM está sendo apontada como um importante indutor da progressão tumoral (Spaderna *et al*., 2007).

A TEM pode ser induzida pelo microambiente tumoral ou de forma autócrina por glicoproteínas da família Wnt, TGF-β e fatores de crescimento que ativam diversos repressores e ativadores transcricionais como SIP-1, LEF, TWIST, SNAIL (Barr *et al*., 2007; Spaderna *et al.,* 2007). Estes indutores da TEM estão intensamente expressos em vários tipos de carcinoma e têm como principal objetivo a supressão do gene da E-caderina e proteínas marcadoras de polaridade celular como as do complexo Crumbs e Scribble (Bates & Mercúrio 2005). A figura 12 ilustra resumidamente eventos que ocorrem durante a TEM como perda das junções célula-célula, mudança fenotípica da célula epitelial e aquisição de capacidade invasiva e migratória.

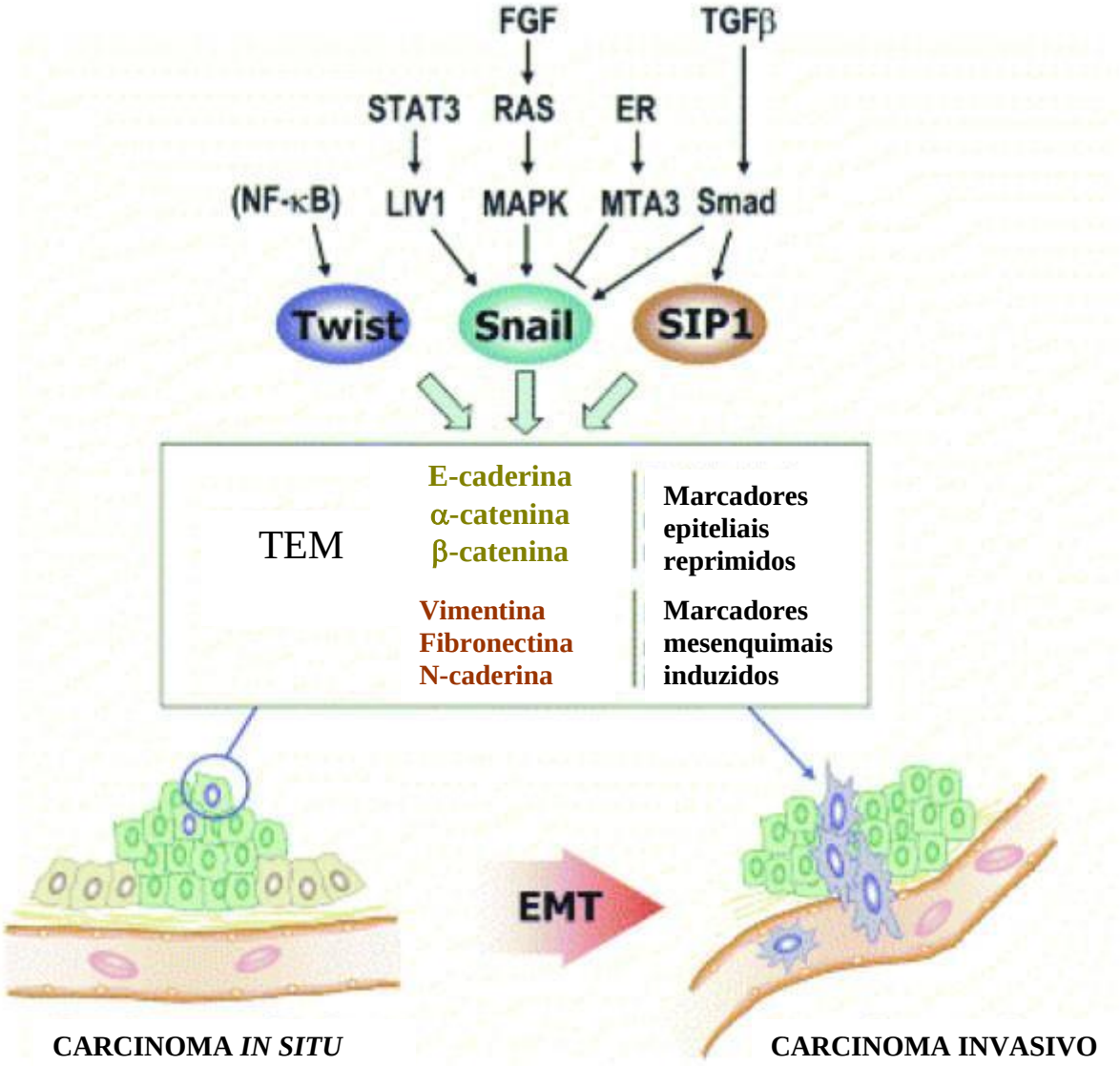


Figura 12: Transição Epitélio Mesenquimal (TEM). A perda das junções célula-célula é o evento primário que leva à TEM. As células epiteliais perdem sua polaridade apico/basal e adquirem mobilidade assim como passam a expressar proteínas mesenquimais como vimentina. Desta forma a célula tumoral pode migrar para os vasos sanguíneos/linfa e colonizar um novo sítio, caracterizando desta forma a metástase. Adaptado de Zvaifler, 2006.

Vários estudos vêm mostrando que um dos eventos morfológicos do desenvolvimento da TEM e subseqüente progressão do câncer colo-retal é a perda da adesão célula-célula. Nesse

sentido, nosso grupo, utilizando linhagens celulares de câncer de cólon, vem mostrando mecanismos de sinalização celular envolvidos com a perda da adesão célula-célula. Inicialmente, mostramos que a fosforilação de tirosina de proteínas causou desorganização das JAs, mas não alteração da morfologia e função das JTs, sugerindo que estas estruturas são reguladas por mecanismos independentes (Morgado-Díaz and de Souza 2001). Além disso, relatamos o envolvimento da via PKC e EGFR (receptor do fator de crescimento epidermal) com ativação de MAPK (*mitogen activated protein kinase*) na regulação da adesão célula-célula mediada pela E-caderina em células de adenocarcinoma de cólon (Barbosa *et al*., 2003). Mostramos também que, em amostras de pacientes com câncer colo-retal as proteínas claudinas 1, -3, e –4 eram superexpressas em relação ao tecido normal, concomitantemente a um aumento da permeabilidade celular (Oliveira *et at*., 2005).

Nosso grupo investigou o efeito da radiação ionizante, um dos tratamentos para o câncer colo-retal, e verificamos que este tratamento causou redistribuição das principais proteínas do CJA, o que levou à desorganização e perda da funcionalidade deste complexo em células Caco-2 (de Carvalho *et al*., 2006). Em trabalhos recentes, demonstramos a existência de uma inter-relação entre a proteína PKA e GTPases da família Rho para mediar eventos relacionados com perda da adesão célula-célula e desorganização do citoesqueleto de actina (Leve *et al*., 2008). Ainda, reportamos que tratamento de células Caco-2 com PGE2, o principal produto das enzimas COX-I e II, induziu a desorganização do CJA em um evento mediado através de receptores PGE2, EP1 e EP2 e sinalização via PKC e claudina-1 como proteína responsável pelos eventos sobre o CJA (Tanaka *et al*., 2008). Araújo e colaboradores (2010) demonstraram uma interação entre as vias Wnt e PI3K na linhagem células de CCR HCT-116. No entanto, se a perda da adesão célula-célula causada por estes agentes, assim como as diferentes vias de sinalização que modulam este evento, poderiam estar envolvidos com o desenvolvimento da TEM, permanece por ser investigado.

Existe uma grande dificuldade entre os pesquisadores de acompanhar a ocorrência da TEM de tumores humanos *in vivo* devido à grande diversidade celular e organização demonstrada nos neoplasmas. Conseqüentemente, a importância deste processo na progressão do carcinoma ainda precisa ser estabelecida, particularmente em tumores sólidos “bem diferenciados” como o carcinoma colo-retal (Thiery *et al*., 2009). Muito do que se conhece atualmente sobre TEM deriva de estudos com linhagens celulares.

O fator de crescimento epidermal (EGF) e CCR

O EGF (fator de crescimento epidermal) é um importante ativador da via das MAPKs e está intimamente relacionado com o CCR. Este ligante pertence à família dos fatores de crescimento epidermal que inclui outros membros como anfiregulina (AR), fator de crescimento transformante-α (TGF-α), betacelulina (BTC), *heparin-binding epidermal growth factor* (HB-EGF), epiregulina (EPR) e neuregulina 1-4 (NRG) (Holbro *et al*., 2003). Estes ligantes ativam os receptores tirosina quinase da família ErbB. Esta família de receptores é formada por quatro membros: (1) EGFR/ErbB1/HER1, (2) ErbB2/Neu/HER2, (3) ErbB3/HER3 e (4) ErbB4/HER4. Todos estes receptores têm em comum um domínio extracelular que interage com ligantes da família do EGF, uma região transmembrana de passagem única e um domínio citoplasmático com atividade tirosina quinase. A interação dos ligantes com os receptores ErbB induz a homo- ou heterodimerização destes receptores e, conseqüentemente, a ativação tirosina quinase do seu domínio citoplasmático (Fig. 13). Estes resíduos fosforilados servem de substrato para várias proteínas iniciarem suas cascatas de sinalização intracelular (Holbro *et al*., 2003; Hynes & Lane, 2005).

Os receptores ErbB são importantes pelo seu envolvimento na tumorigênese de diversos tecidos. Pacientes com câncer que apresentam alterações nos receptores EGFR e ErbB2 tendem a desenvolver tumores mais agressivos e conseqüentemente apresentam pior prognóstico (Salomon *et al*., 1995; Holbro *et al*., 2003).

O EGFR é alvo constante de mutações e deleções tanto na sua porção extracelular quanto no domínio intracelular, que podem fazer com que o receptor se torne constitutivamente ativo na célula tumoral. Alterações deste tipo são observadas em diferentes tumores, dentre eles o glioblastoma, carcinoma de pulmão de células não pequenas e mama (Ekstrand *et al.*, 1992; Garcia de Palazzo *et al.*, 1993; Wikstrand *et al*., 1995). A estimulação autócrina e contínua deste receptor também é bastante comum em diferentes tipos de tumores. A superexpressão de receptores da família ErbB também está relacionada com a tumorigênese em diversos tecidos. É especulado que altos níveis de receptores ErbB na membrana da célula acarreta a sua dimerização espontânea causando conseqüentemente sua ativação (Holbro *et al*., 2003). Esta alteração é observada em tumores mama, ovário, bexiga, gástrico dentre outros (Slamon *et al*., 1989; Lemoine *et al*., 1991; Sauter *et al*., 1993).

No caso do câncer colo-retal, EGFR e seu principal ligante EGF estão freqüentemente superexpressos o que representa um mau prognóstico para o paciente (Spano *et al*., 2005;

Solmi *et al.*, 2008). EGFR e EGF são reconhecidos por ativarem diversas quinases intracelulares como MAPK, PI3-K, JAK-STAT e p90rsk que inibem a enzima GSK-3β aumentando os níveis citoplasmáticos e nucleares de β-catenina (Eldar-Finkelman *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 2003; Tan *et al*., 2005; Sinha *et al*., 2005; Li *et al*., 2008). Portanto, é sugerida uma relação entre as vias EGFR e Wnt. Considerando que a via Wnt também possui um importante papel na tumorigênese colo-retal, estudos que visam entender a interação entre estas duas vias são necessários para o melhor entendimento dos eventos moleculares que ocorrem durante a progressão do CCR. Além disso, novos alvos terapêuticos podem ser identificados no sentido de evitar a disseminação da metástase neste tipo de câncer.

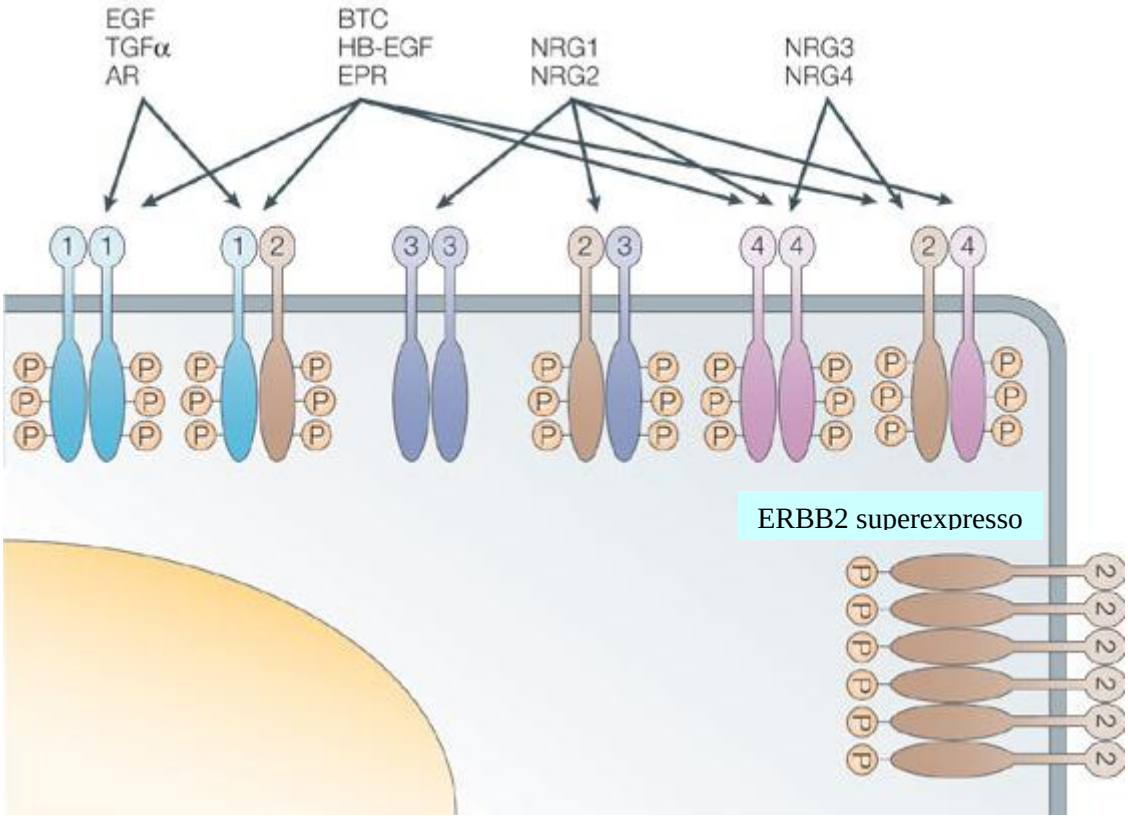


Figura 13: Receptores e ligantes da família de fatores de crescimento epidermal**.** A ligação dos diferentes ligantes dos receptores da família ErbB induz a homo- ou heterodimerização dos receptores e a ativação por fosforilação do domínio citoplasmático tirosina quinase. Estes resíduos fosforilados servem de substratos para diferentes quinases intracelulares. A figura também ilustra a superexpressão do receptor ErbB2 observada em diferentes tipos de tumores. Adaptado de Hynes & Lane (2005).

A quinase GSK3-β e o CCR

No desenvolvimento do CCR a ativação da via Wnt se deve principalmente a mutações nas proteínas que compõem esta via e não pela ligação das glicoproteínas Wnt aos seus receptores (Akiyama, 2000; Logan & Nusse, 2004; Pinto & Clevers, 2005; van der Flier & Clevers, 2009). Alguns estudos vêm mostrando que além das mutações destas proteínas, a ativação inadequada de outras vias de sinalização celular como as vias de receptores tirosina-quinases/Ras (RTK/Ras) e TGFβ podem acarretar no funcionamento anormal da via Wnt. Diferentes estímulos podem ativar receptores tirosina-quinase, que por sua vez ativam várias quinases, por exemplo PI3K, MAPK e mTOR, que tem como alvo em comum a enzima GSK3-β (Fig. 14) (Frame & Cohen, 2001). Diferentemente da maioria das quinases, a GSK3-β encontra-se constitutivamente ativa na célula em repouso e quando fosforilada em decorrência de sinalizações celulares, como estímulos proliferativos e migratórios, a GSK3-β torna-se inativa (Rayasam *et al*., 2009).

A enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) foi originalmente identificada como uma das diversas proteínas quinases capazes de fosforilar a enzima responsável pela síntese de glicogênio, a glicogênio sintase (Patel *et al*., 2004). Atualmente sabe-se que GSK3 possui um papel central em diversas vias de sinalização celular além de funcionar como regulador de diferentes fatores de transcrição (Grimes & Jope, 2001). Existem duas isoformas de GSK3 em mamíferos: GSK3-α e GSK3-β expressas por genes diferentes, mas com grande homologia nos seus domínios quinase (97%) (Rayasam *et al*., 2009). Apesar disso, as duas isoformas não são funcionalmente redundantes. Um estudo mostrou que a deleção de GSK3-β resulta na morte de embriões de camundongo após 16 dias de desenvolvimento sugerindo que a função de GSK3-β não foi compensada por GSK3-α (Hoeflich *et al*., 2000). Os efeitos causados pela deleção de shaggy, um homólogo de GSK3-β em *Drosophila*, é recuperado quando inserida GSK3-β humana, mas não GSK3-α, demonstrando a distinta função fisiológica das duas enzimas (Ruel *et al*., 1993). GSK3-β é a menor das isoformas consistindo em 482 aminoácidos. Apesar de ter sido originalmente isolada do músculo esquelético, a GSK3-β é encontrada em todos os tecidos, sendo particularmente abundante no cérebro (Woodgett, 1990).

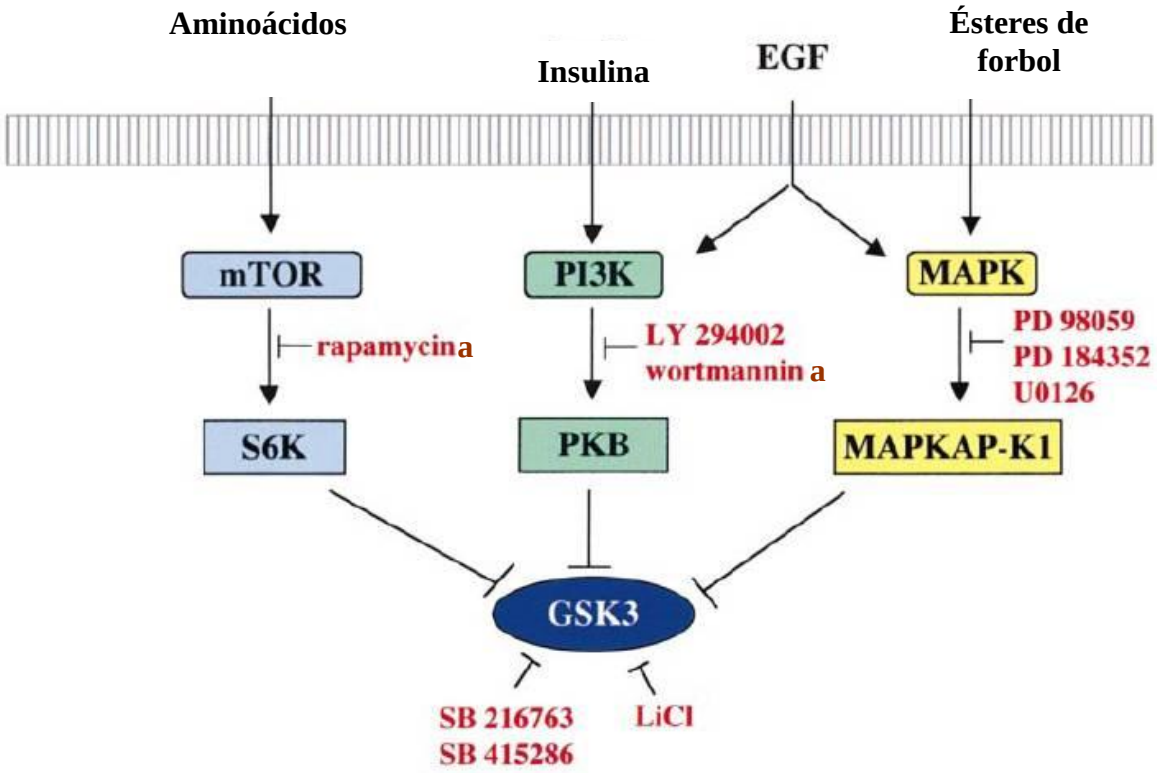


Figura 14: Esquema mostrando modulação da enzima GSK3-β por quinases. O esquema mostra que GSK3-β pode ser inativada por diferentes quinases (S6K, PKB/AKT, MAPKAP-K1). Em vermelho estão indicados variados inibidores farmacológicos de quinases e da própria GSK-3β que podem participar da sua inibição. Adaptado de Frame & Cohen, 2001.

A GSK3-β é uma serina/treonina quinase reguladora de numerosas vias de sinalização como a Wnt, vias de receptores tirosina/quinase (RTKs) e receptores acoplados a proteína G, responsáveis por várias respostas celulares como inibição da proliferação, migração e apoptose. Isso se deve a uma vasta gama de substratos que esta enzima é capaz de fosforilar (Doble & Woodgett, 2003), A tabela 3 mostra exemplos de substratos que podem ser fosforilados pela GSK3-β.

Tabela 3. Substratos que são fosforilados pela enzima GSK3-β.

SUBSTRATOS DA GSK3-β	**REFERÊNCIA**
Bcl3	Viatour *et al*., 2004
β-catenina	Ikeda *et al*., 1998
c-Jun	Nikolakaki *et al*., 1993
CREB	Fiol *et al*., 1994
Ciclina-D1	Diehl *et al*., 1998
Sintase de glicogênio	Rylatt *et al*., 1980
c-Myc	Gregory *et al*., 2003
Notch 1C	Foltz *et al*., 2002
p53	Turenne & Price, 2001
Tau	Hanger *et al*., 1992

A oncoproteína Bcl-3 é um fator de transcrição que ativa genes alvo da via NF-κB. A fosforilação desta proteína por GSK3-β atenua sua oncogenicidade através do controle de diversos genes como SLPI e Cxcl 1 (Viatour *et al*., 2004). GSK3-β também fosforila ciclina-D1, uma proteína mitogênica muito ativa em tumores, "marcando-a" para degradação proteassômica (Diehl *et al*., 1998). O mesmo ocorre para c-myc (Gregory *et al*., 2003). A proteína associada ao microtúbulo (Tau) é fosforilada por GSK3-β diminuindo sua associação com os microtúbulos (Hanger *et al.,* 1992). Alterações na atividade de GSK3-β acarretam no desenvolvimento de diversas doenças em humanos. A inibição de GSK3-β está associada ao surgimento de diferentes tipos de câncer e inversamente, a atividade exarcebada desta enzima está associada a doenças como Alzheimer, transtorno bipolar e diabetes mellitus não dependente de insulina (Doble & Woodgett, 2003; Rayasam *et al*., 2009).

Sutherland e colaboradores (1993) relataram que a quinase p70S6 (70-kDa ribosomal protein s6 kinase) e p90Rsk poderiam fosforilar e inativar GSK3-β em resposta à insulina. Inversamente, comprovaram que PP2A, uma proteína fosfatase, poderia reativá-la. Saito e colaboradores (1994) observaram que em células epidermóides da linhagem A431, a quinase p90Rsk induzia inativação da enzima GSK3-β em resposta ao tratamento com EGF. O mesmo foi observado por Eldar-Finkelman e colaboradores (1995) em fibroblastos murinos da linhagem NIH/3T3. A via PI3K/Akt é apontada por vários autores como uma das principais vias responsáveis pela inativação de GSK3-β. Esta atividade inibitória pode ser induzida por diferentes estímulos como fatores de crescimento e stress oxidativo (Cui *et al*., 1998;

Quevedo *et al*., 2000; Desbois-Mouthon *et al*., 2001; Sinha *et al*., 2005). A via MAPK também é apontada como inibidora de GSK3-β. Esta via é regulada por uma variedade de estímulos como fatores de crescimento, citosinas e fatores de stress celular. Os componentes que se encontram *upstream* desta via são as MAPKKK (MAP3K) que fosforilam as MAPKK (MAP2K) que por fim fosforilam as MAPKs representadas pelas enzimas p38, JNK1/2 e ERK1/2 (Steeg, 2003). Caraci e colaboradores (2008) observaram que TGF-β1 ativa a via Wnt através da fosforilação de GSK3-β por ERK1/2 durante a transição de fibroblastos em miofibroblastos. Outros trabalhos também comprovaram a inativação de GSK3-β por ERK1/2 em linhagens celulares derivadas de carcinoma hepático e fibroblastos pulmonares (Grimes & Jope, 2001; Ding *et al*., 2005; Caraci *et al*., 2008).

Inversamente, a fosforilação do resíduo Tyr216 da GSK3-β aumenta a atividade da enzima. Porém, poucos estudos têm analisado este tipo de fosforilação. Kim e colaboradores (1999) demonstraram que em *Dictyostelium discoidium* a tirosina quinase ZAK1 aumenta a atividade de GSK3-β através da fosforilação do resíduo Tyr216. Outro estudo, em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano, revelou que a enzima Fyn, da família das Src quinases, fosforilava GSK3-β no resíduo Tyr216 aumentando sua atividade (Lesort *et al*., 1999). Também em células SH-SY5Y, foi demonstrado que a fosforilação do resíduo Tyr216 de GSK3-β ocorre com o aumento transiente do Ca^{2+} intracelular (Hartigan & Johnson, 1999).

A figura 15 ilustra as quinases e os sítios de fosforilação que em resposta a diferentes estímulos são capazes de modular a atividade desta enzima.

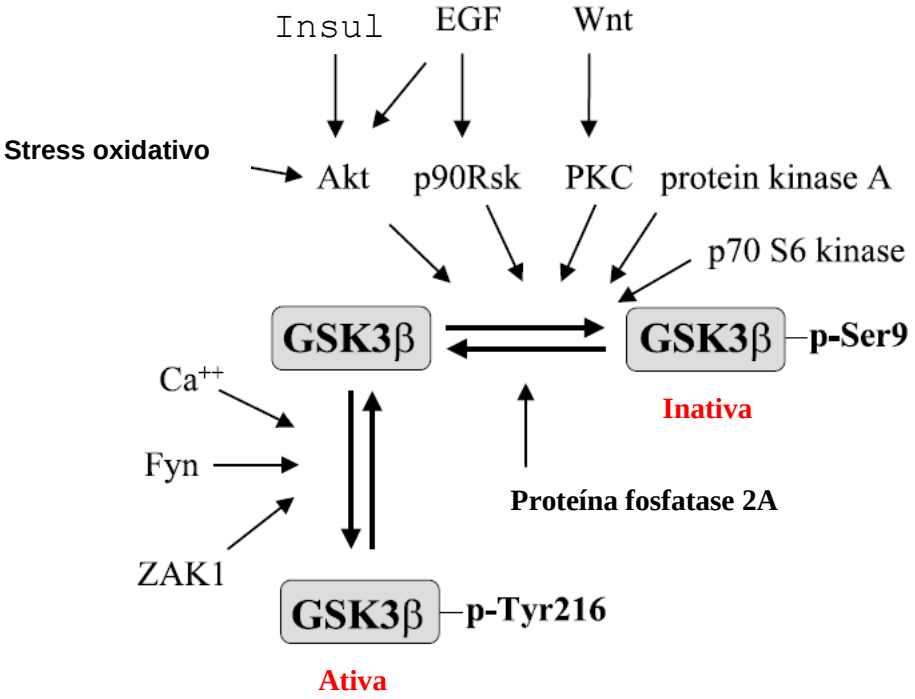


Figura 15: Modulação da atividade da enzima GSK3-β. A fosforilação do resíduo de Ser9 da GSK3-β por diferentes quinases inibe sua atividade. Algumas destas quinases são estimuladas por fatores de crescimento como EGF e insulina. Por outro lado, outras enzimas como Fyn e ZAK1 fosforilam GSK3-β no resíduo Tyr216, aumentando ainda mais sua atividade O aumento intracelular de Ca^{2+} também acarreta no aumento de atividade de GSK3-β. Adaptado de Grimes & Jope, 2001.

Como visto na figura 14, além das quinases que inibem a atividade de GSK3-β, existem moléculas farmacológicas que apresentam a mesma função e com isso ativam a via Wnt (Sinha *et al*., 2005). Por esta razão, diversos estudos que visam caracterizar a ativação da via Wnt em diferentes linhagens celulares utilizam os inibidores farmacológicos da enzima GSK3-β. O inibidor melhor descrito de GSK3-β é o cloreto de lítio (LiCl). O LiCl é um inibidor seletivo de GSK3 e compete com esta enzima pelo Mg^{2+} intracelular (Klein *et al*., 1996; Ryves & Harwood, 2001). Ryves e Harwood (2001) relataram que a atividade de GSK3-β é dependente de Mg^{2+} e que Li^{+} estaria rompendo esta interação. Outros inibidores

têm sido desenvolvidos sendo que a grande maioria inibe GSK3-β pela competição por ATP como as maleimidas (SB216763), indirubinas (BIO) e aloisinas (Cross *et al*., 2001; Damiens *et al.*, 2001; Martinez *et al*., 2002; Mettey *et al*., 2003).

Apesar de ser um reconhecido ativador da via Wnt, uma vez que tem a capacidade de inativar GSK3-β, alguns estudos vêm demonstrando que o LiCl pode induzir outros efeitos, independente de GSK3-β. Estes efeitos incluem alteração da fosforilação das enzimas MEK e ERK e inibição da proliferação celular (Pardo *et al*., 2003; Stump *et al*., 2006; Sun *et al*., 2007; Wang *et al*., 2008). O efeito de inibição da proliferação é bastante contraditório já que LiCl, sendo um ativador da via Wnt, deveria aumentar a proliferação. Pardo e colaboradores (2003) relataram uma diminuição na fosforilação de MEK e ERK em astrócitos tratados com LiCl. Stump e colaboradores (2006) observaram que LiCl inibiu a proliferação, migração e a transição epitélio mesenquimal (TEM) em células epiteliais de retina. Sun e colaboradores (2007) e Wang e colaboradores (2008) observaram inibição da proliferação em linhagens de câncer de próstata e na linhagem Eca-109 de câncer de esôfago, respectivamente. Um último dado recente de Néel e colaboradores (2009) demonstrou que LiCl inibiu a motilidade e a invasividade de células *v-src* transformadas. Portanto, muitos autores vêm propondo que LiCl teria propriedades anti-tumorigênicas.

Ainda não há na literatura estudos mostrando os efeitos do tratamento com LiCl em uma linhagem de câncer colo-retal. Portanto, uma das propostas de nosso estudo é avaliar os efeitos deste inibidor farmacológico sobre a GSK3-β e sua relação com eventos envolvidos com a progressão deste tipo de câncer. Por outro lado, considerando que a sinalização mediada pelo EGF também possui um importante papel na tumorigênese colo-retal, estudos que visam entender a interação entre estas duas vias são necessários para o melhor entendimento dos eventos moleculares que ocorrem durante a progressão deste tipo de CCR.

1. OBJETIVOS

1.1 Geral

Este estudo visa esclarecer a relação entre as vias Wnt e EGFR na progressão do câncer colo-retal usando a linhagem celular de adenocarcinoma colo-retal humano, Caco-2, como modelo. Além disso, avaliamos os mecanismos moleculares de modulação do LiCl sobre a enzima GSK3-β, bem como sua possível propriedade anti-tumorigênica no câncer colo-retal.

1.2 Específicos

- Avaliar mudanças morfológicas das células Caco-2 após tratamento com EGF e LiCl.
- Investigar os efeitos de EGF e LiCl sobre o sistema da adesão célula-célula avaliando a expressão e a localização das proteínas de adesão claudina-1 e β-catenina.
- Analisar se EGF é capaz de ativar a via Wnt avaliando a localização da proteína β-catenina e o estado de fosforilação da quinase GSK3-β.
- Avaliar a proliferação, migração e capacidade de formação de colônia em baixa densidade nas células Caco-2 após tratamento com EGF e LiCl.
- Identificar por citometria de fluxo, o ciclo celular de células Caco-2 após tratamento com LiCl para assim avaliar seu potencial antitumorigênco.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultura de células

Foi utilizada a linhagem celular Caco-2 (ATCC, # HTB-37, Rockville, MD, EUA) derivada de um adenocarcinoma colo-retal humano. As células foram cultivadas em garrafas de 25 cm^2 contendo meio DMEM (Dulbelcco`s Modified Eagle Medium) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 60 mg de estreptomicina e 100 mg de penicilina G, a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2. Para a manutenção da cultura e experimentos, as células em monocamada eram tripsinizadas com uma solução de tripsina 0,25% (w/v) – EDTA 0,03% (w/v) e o meio de cultura trocado 2X por semana para manutenção da cultura.

2.2 Tratamentos com EGF e LiCl

Antes dos tratamentos, as células foram incubadas em DMEM sem soro por 24 horas. Posteriormente, o fator de crescimento epidermal (EGF) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e/ou LiCl (Sigma Chemical Co, MO, EUA) foram adicionados ao meio de cultura em uma concentração final de 100 ng/ml e 50 mM, respectivamente, por 24, 48 e 72 horas (Bowley *et al*., 2005; Li *et al*, 2008).

2.3 Obtenção de lisado total e frações solúveis e insolúveis em Triton-X-100 (TX-100)

2.3.1 Lisado total

Após os tratamentos, as células foram lavadas em PBS e incubadas por 30 min em tampão de lise (1% de Triton X-100, 0,5% de Deoxicolato, 0,2% de SDS, 0,15 M de NaCl, 10 mM de HEPES pH 7,3, 2 de mM EDTA) contendo 1 mM de ortovanadato (Sigma Co, MO, EUA), 20 mM de NaF e coquetel de inibidores de proteases (1:100) (Sigma Co, MO, EUA).

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20º C para análises subseqüentes.

2.3.2 Obtenção de frações solúveis e insolúveis em TX-100

Após os tratamentos, as células foram incubadas por 20 min a 4°C em tampão CSK (NaCl 50 Mm, PIPES 10 Mm pH 6,8, $MgCl_2$ 3 mM, Triton X-100 0,5%, sacarose 300 mM) contendo ortovanadato 1mM, NaF 20 mM e coquetel de inibidores de proteases (1:100). Posteriormente, as células foram homogeneizadas e centrifugadas a 10000 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante, correspondendo à fração solúvel em Triton X-100 (proteínas não associadas ao citoesqueleto de actina), foi coletado e armazenado a -20°C. O pellet foi homogeneizado em tampão SDS (Tris-HCl 20 mM, EDTA 5 mM, EGTA 2,5 mM, SDS 1%) e fervido a 100 °C por 10 minutos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10000 g por 10 min e o sobrenadante, correspondendo à fração insolúvel em TX-100 (proteínas associadas ao citoesqueleto) foi coletado e estocado a -20°C.

2.3.3 Fracionamento subcelular

Após os tratamentos, as células foram lavadas em PBS, ressuspendidas em tampão de lise A (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, sacarose 250 mM, $MgCl_2$ 1 mM) contendo ortovanadato 1 mM, NaF 20 mM e coquetel de inibidores de proteases (1:100), e homogenizadas com um homogeneizador tipo Potter com 30 a 60 *strokes*. O homogeneizado foi centrifugado a 3000 g por 10 min e o pellet, representando a fração nuclear, armazenado a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 30000 g por 1h a 4 °C. O sobrenadante resultante, representando a fração citosólica foi armazenado a –20 para posterior utilização. O pellet, representando a fração de membrana foi ressuspendida em tampão de lise B (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, EDTA 2 mM, SDS 0.1%, deoxicolato de sódio 5%, TX-100 1%, NaCl 137 mM, glicerol 10%) contendo ortovanadato 1 mM, NaF 20 mM e coquetel de inibidores de proteases (1:100), e armazenada a –20°C. A fração nuclear foi homogeneizada em tampão hipertônico (HEPES-KOH 20 mM pH 7.9, glicerol 25%, NaCl 420 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, DTT 0.5 mM) contendo ortovanadato 1 mM, NaF 20 mM e coquetel de inibidores de proteases (1:100), em vórtex constante por 20 min a 4°C. A amostra foi centrifugada a 30000 g por 1 h

e o sobrenadante contendo as proteínas nucleares foi armazenado a –20°C. Todos os passos do fracionamento foram realizados a 4°C. A fração nuclear foi confirmada por *Imunoblotting* através da marcação com anticorpo monoclonal produzido em camundongo anti-Lamina B (1:500) (Calbiochem, Darmstadt, Germany).

O conteúdo protéico dos lisados totais bem como o das frações foi estimado utilizando-se o kit comercial para dosagem de proteína BCA (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA), utilizando a proteína BSA (albumina sérica bovina) (Sigma Chemical Co, MO, EUA) como padrão.

2.4 **Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sódio dodecilsulfato (SDS-PAGE) e *imunoblotting***

Para análise por *Imunoblotting*, 30 – 40 μg de proteínas foram separadas por SDS-PAGE em géis de 10 e 12%, e transferidas do gel para membranas de nitrocelulose utilizando-se um aparelho de transferência semiseco (BIORAD) a 10 V por 60 min. As membranas foram bloqueadas por 1 h em TBS-T (Tris 20 mM p.H 7,6, NaCl 137 mM, Tween-20 0,1%) contendo 5% de leite desnatado ou, no caso das proteínas fosforiladas, bloqueadas em 1% de BSA em TBS-T. Posteriormente, as amostras foram incubadas overnight a 4°C com os anticorpos primários: monoclonal anti-β-catenina (Sigma Chemical Co, MO, EUA, 1:4000), monoclonal anti-GSK3-β total (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA, 1:1000), policlonal anti-fosfo-GSK-3β (Ser^9) (Cell Signaling Technology, 1:1000), monoclonal anti-E-caderina (BD Bioscience, San Diego, CA, EUA, 1:2500), policlonal anti-claudina-1 (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, EUA, 1:250) ou monoclonal anti-α-tubulina (Zymed, 1:1000). Após lavagem em TBS-T durante 20 minutos, as membranas foram incubadas por 1 hora com os anticorpos secundários conjugados à peroxidase anti-coelho IgG (Zymed, 1:60000) ou anti-camundongo IgG (Zymed, 1:50000). A detecção da imunomarcação foi realizada através de reação de quimiluminescência usando o kit ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

A densitometria foi efetuada utilizando-se o *software* Labworks 4.6 (UVP Inc., Upland, CA, EUA). Para as diferentes bandas de um mesmo *immunoblotting,* foram atribuídas áreas iguais para a densitometria. Para a confecção dos gráficos foram adotados os

seguintes procedimentos: (a) Quantificação de níves protéicos em lisados totais - após a conclusão de 3 experimentos independentes, os valores densitométricos referentes às bandas das proteínas em estudo foram divididos pelo valor densitométrico referente a banda da proteína constitutiva α-tubulina. (b) Grau de associação das proteínas com o citoesqueleto de actina pela análise da presença de proteínas nas frações solúveis e insolúveis em Triton X-100 - os valores densitométricos referentes às bandas da fração solúvel em Triton X-100 (proteínas não associadas ao citoesqueleto de actina) foram divididos pelos valores referentes às bandas da fração insolúvel em Triton X-100 (proteínas associadas ao citoesqueleto de actina). (c) Quantificação de níves protéicos de β-catenina em diferentes frações subcelulares de Caco-2. Para β-catenina nuclear, após a conclusão de 3 experimentos independentes, os valores densitométricos referentes à banda de β-catenina foram divididos pelo valor densitométrico referente a banda da proteína constitutiva nuclear Lamina B. Para os gráficos de β-catenina na fração citoplasmática e de membrana, os valores densitométricos de três experimentos independentes foram considerados. (d) Quantificação da fosforilação de GSK3-β - os valores densitométricos referentes à banda de GSK3-β fosforilada foram divididos pelo valor densitométrico referente à banda de GSK3-β total. A proteína tubulina foi utilizada como controle de aplicação da concentração de proteínas no gel de poliacrilamida.

2.5 **Imunofluorescência**

As células foram cultivadas em lamínulas redondas de 12 mm de diâmetro em placas de 24 poços e tratadas com EGF e/ou LiCl conforme já descrito. As lamínulas contendo a monocamada foram posteriormente lavadas com PBS e fixadas em paraformaldeído 4% por 5 minutos. A permeabilização foi feita em TX-100 0,5% por 10 minutos e então as células foram lavadas e incubadas com $NHCl_4$ 50 mM em PBS por 10 min. Posteriormente, o bloqueio foi feito com BSA 3% por 1 h e as células incubadas com os anticorpos primários anti-β-catenina (1:500), ou anti-claudina-1 (1:25) por 1 h. As células foram lavadas em PBS e incubadas com os anticorpos secundários Alexa 488 anti-coelho IgG ou Alexa 546 anti-camundongo IgG (Invitrogen, 1:500), e então lavadas 5 vezes em PBS e montados em meio contendo N-propil galacto. A imunofluorescência foi detectada em um microscópio invertido AXIOVERT S 100 e as imagens adquiridas por uma câmera CCD VarioCam, (PCO

Computer Optics, Germany). A análise das imagens foi feita através do software KS 300 (Carl Zeiss Inc., Alemanha).

As mesmas lâminas foram observadas por contraste de fase para observação geral da morfologia das células após os tratamentos.

2.6 **Ensaio de proliferação**

As células foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer, e, uma alíquota de 2 x 10^4 células/ml foi cultivada em placas de 96 poços na presença ou não dos tratamentos. Após 24, 48 e 72 horas de tratamento, as células foram fixadas em etanol e coradas com uma solução de Cristal Violeta 0,05% e etanol 20% por 10 minutos. Após esse tempo, as células foram lavadas em água deionizada e descoradas por 5 minutos em metanol. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro de placa Spectra Max 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) utilizando-se um comprimento de onda de 595nm. O gráfico representa a média do resultado de três experimentos independentes e o desvio padrão.

2.7 **Ensaio de migração**

As células foram cultivadas em placas de 6 poços até atingirem 90% de confluência. Três diferentes áreas de um mesmo poço foram riscadas com a ponta de uma ponteira de 200 μl. Após lavagem em PBS para retirada de células em suspensão, as células foram tratadas ou não com EGF e/ou LiCl. A migração das células para a área riscada foi fotografada e avaliada com a ajuda de um microscópio invertido Zeiss Axiovert S100 (Carl Zeiss Inc). A distância entre as células foi medida após 24 e 48 horas de tratamento utilizando-se uma ferramenta do software Adobe Photoshop 6.0. O gráfico representa a média do resultado de três experimentos independentes e o desvio padrão.

2.8 **Ensaio de formação de colônia**

Uma alíquota de $5x10^3$ células/ml foi crescida em placas de 12 poços e após 4 horas de incubação, foram adicionados EGF e/ou LiCl ao meio de cultura e as células foram cultivadas por 10 dias. O meio foi trocado a cada dois dias e as drogas recolocadas. Ao final do experimento, as células foram coradas em solução de 0,05% cristal violeta em 20% etanol e a leitura realizada no espectrofotômetro Spectra Max 190 utilizando o comprimento de onda de 595 nm. O gráfico representa a média do resultado de três experimentos independentes e o desvio padrão.

2.9 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo

As células Caco-2 foram cultivadas em uma densidade de $4x10^5$ células/ml em placas de 6 poços e cultivadas em meio sem soro *overnight*. Posteriormente, as células foram tratadas com EGF e/ou LiCl. O cloreto de sódio (NaCl) foi utilizado como controle de LiCl a fim de comprovar que os resultados observados são independentes de diferenças osmóticas no meio de cultura. Após 24 e 48 h de tratamento, as células foram tripsinizadas, lavadas em PBS e ressuspendidas em solução contendo iodeto de propídio (PI) e RNases. A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi mensurada pelo citômetro FACSalibur (BD Biosciences) e o resultado analisado pelo software CELLQUEST (BD Biosciences).

2.10 **Análise estatística**

Os dados foram obtidos de pelo menos três experimentos independentes e expressos como média e SD (desvio padrão). Para análise estatística dos dados, foi realizado o teste *one-way analysis of variance* (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Dunnet. O método *two-way analysis of variance* (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Bonferroni foi utilizado para as análises estatísticas do ensaio de proliferação. As diferenças foram consideradas significativas quando o $p<0,05$. O programa utilizado para auxiliar a análise estatística foi o GraphPad Prism versão 4.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

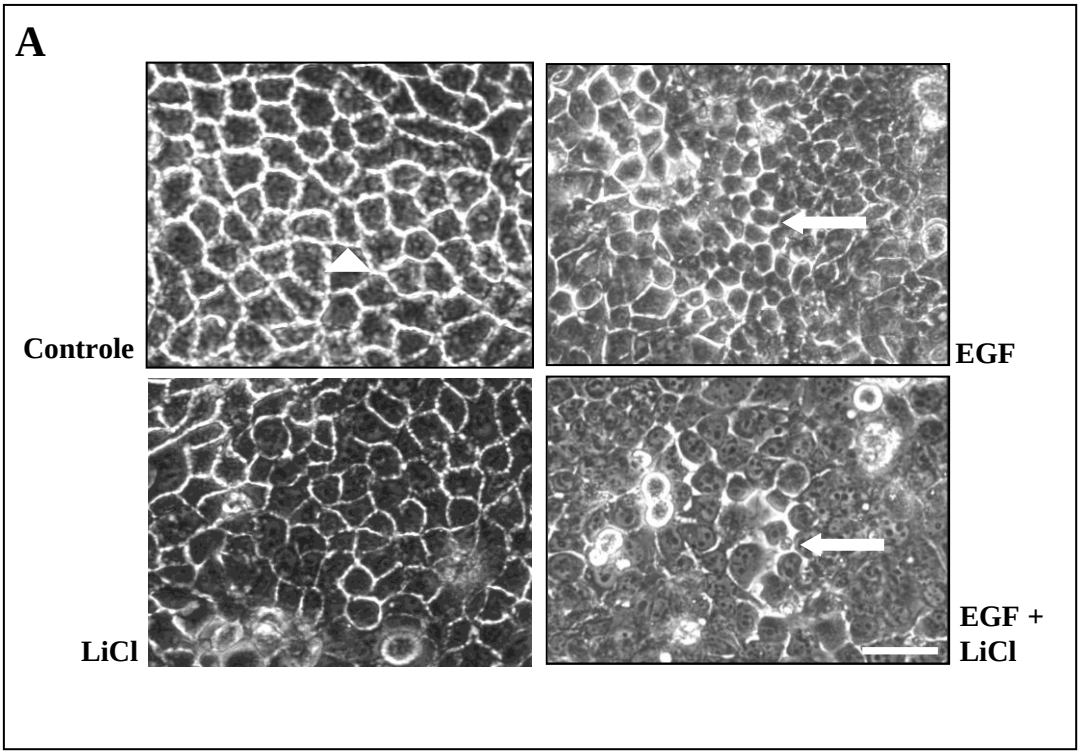
3 RESULTADOS

3.1 Efeitos dos tratamentos com EGF e cloreto de lítio (LiCl) sobre a morfologia de culturas densas e esparsas das células Caco-2

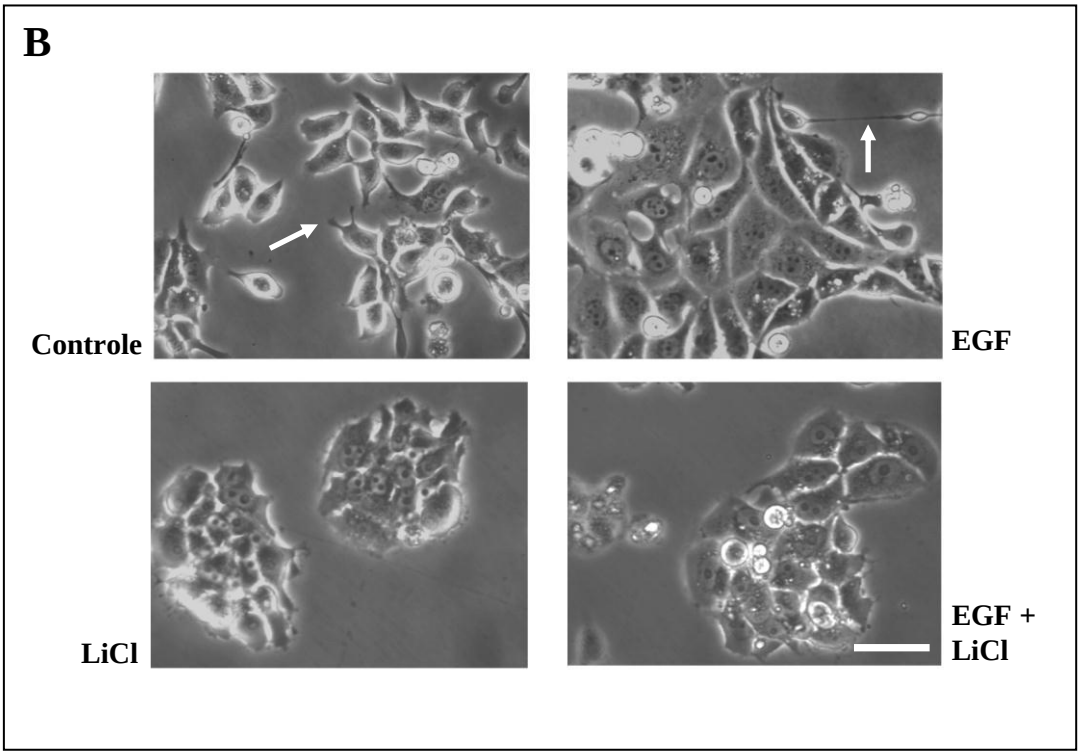
Para avaliar os efeitos do tratamento de EGF e LiCl sobre a morfologia celular, foram utilizadas culturas densas (monocamadas) e culturas esparsas de células Caco-2. Na Figura 16A é possível observar por contraste de fase uma monocamada de células Caco-2 confluente. Células Caco-2 controle apresentavam um formato típico denominado "*honeycomb*" com nítidas regiões de contato célula-célula. O tratamento com EGF por 24 horas ocasionou o arredondamento das células com aparente perda de adesão entre elas. Células cultivadas na presença de LiCl não demonstraram modificações morfológicas evidentes. As células tratadas com EGF+LiCl apresentaram as mesmas alterações das células tratadas somente com EGF, aparente perda de adesão entre as células e arredondamento.

Células Caco-2 em proliferação, representadas aqui pelas culturas esparsas, apresentam um padrão de expressão gênica distinto das células diferenciadas que formam a monocamada segundo descrição de Sääf e colaboradores (2007). Em culturas esparsas (Fig 16B), as células Caco-2 não tratadas apresentavam uma morfologia fibroblástica com abundantes expansões citoplasmáticas denominadas filopódios, que representam o início do contato entre células adjacentes (Faix *et al*., 2009). O tratamento com EGF por 24 horas acarretou na formação precoce das denominadas "ilhas" de células. Nestas ilhas já é possível observar contatos célula-célula maduros, mas ainda estão presentes os filopódios. O tratamento das células Caco-2 com LiCl inibiu a formação dos filopódios apesar de não afetar a formação das "ilhas celulares". O mesmo efeito foi observado nas células tratadas com EGF+LiCl, ausência de filopódios apesar da formação das "ilhas".

CULTURA DENSA

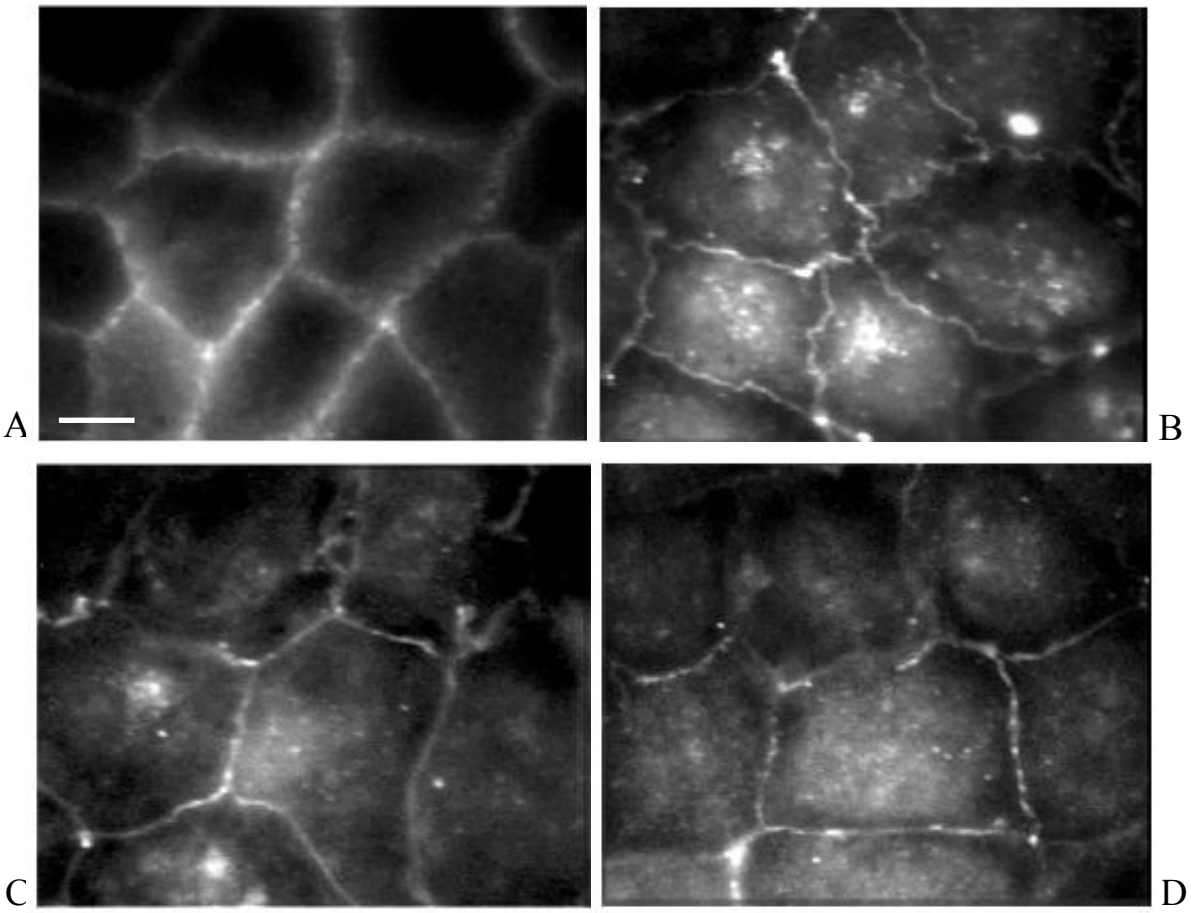


CULTURA ESPARSA



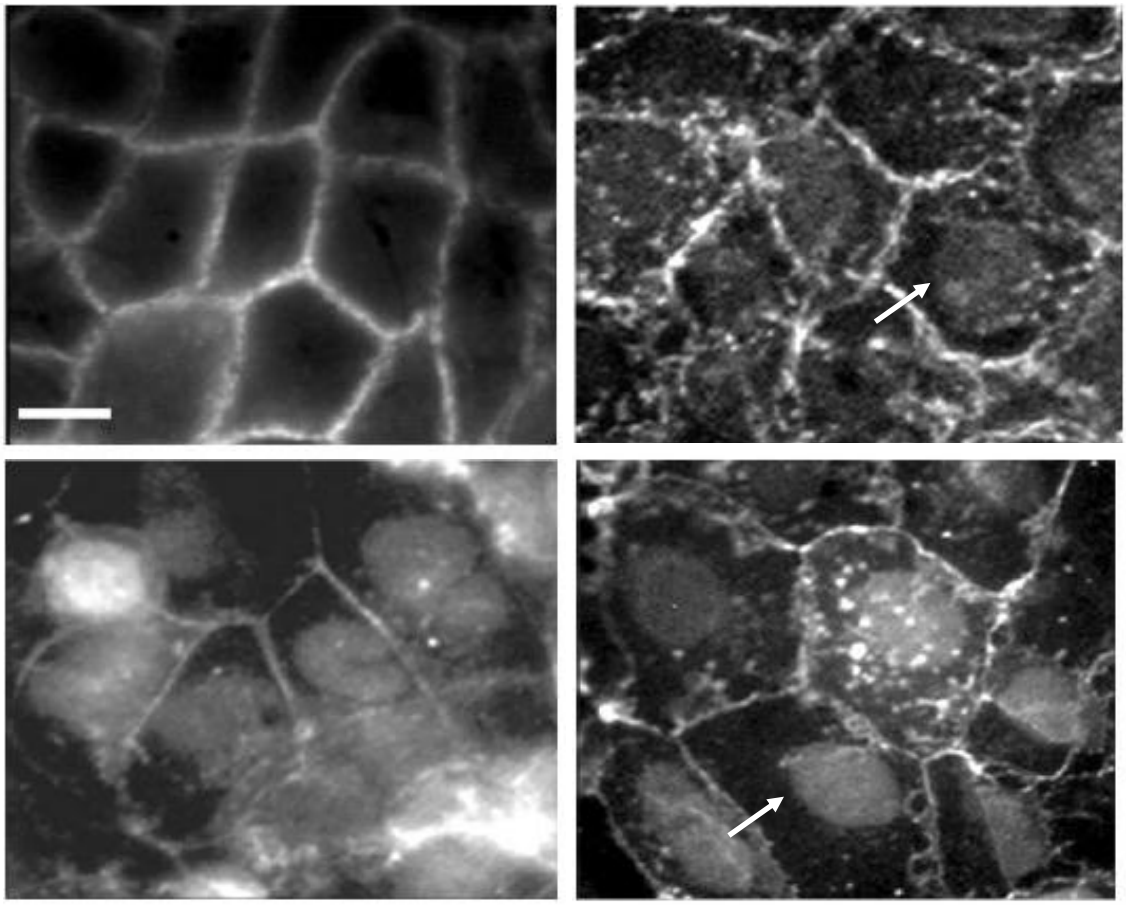
3.2 Efeitos dos tratamentos com EGF e cloreto de lítio (LiCl), na localização das proteínas de junção célula-célula

Inicialmente, por análise de imunofluorescência, verificamos o efeito do tratamento do EGF e do LiCl por 24 horas na distribuição das proteínas do complexo juncional apical. Dentre as proteínas de junções *tight*, foi analisada a localização da proteína claudina-1. Nas células Caco-2 sem tratamento, claudina-1 mostrou um padrão de localização epitelial típica nos contatos célula-célula (Fig. 17A). Após o tratamento com EGF, as células apresentaram marcação citoplasmática, no entanto a marcação nos contatos intercelular ainda foi observada (Fig. 17B). O tratamento com LiCl causou uma diminuição de marcação na membrana com perda em alguns contatos, no entanto marcação citoplasmática foi também observada (Fig. 17C) O tratamento com EGF + LiCl mostrou resultados semelhantes àqueles observados com as células tratadas com EGF, a proteína continuava expressa na membrana, porém também apresentava marcação citoplasmática (Fig. 17D).


A
B
C
D

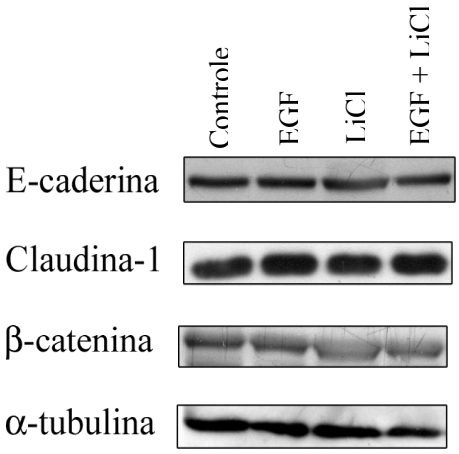
Uma vez que proteínas das JAs também desempenham um importante papel na adesão célula-célula, a localização subcelular da β-catenina também foi investigada.

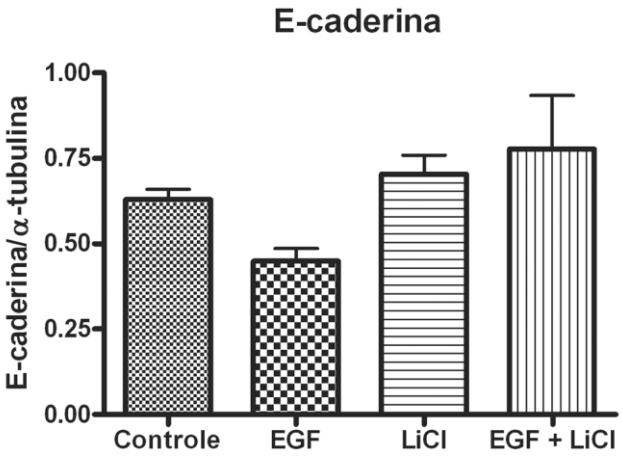
Como esperado, em células não tratadas β-catenina estava localizada nos contatos intercelulares (Fig. 18A). Após tratamento com EGF, β-catenina ainda encontrava-se na membrana, porém de uma forma irregular. Também foi observada uma marcação aparentemente nuclear (Fig. 18B). A localização de β-catenina foi severamente alterada em células Caco-2 tratadas com LiCl. Algumas células apresentavam marcação na membrana, porém grande parte possuía marcação sugestivamente citoplasmática e nuclear (Fig. 18C). O tratamento com EGF e LiCl acarretou em uma localização supostamente nuclear apesar da proteína ainda se localizar na membrana (Fig. 18D).

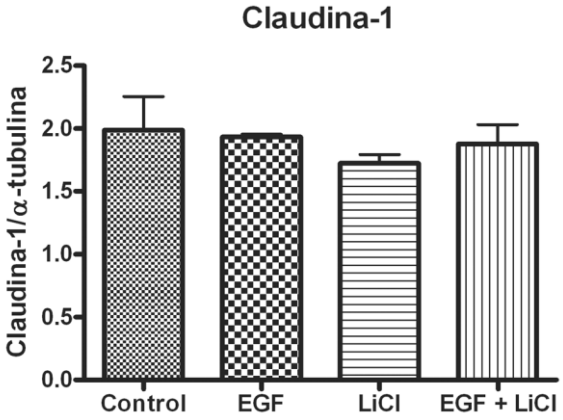


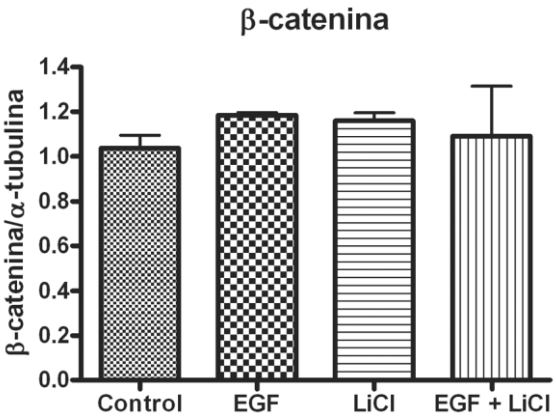
3.3 **Análise da expressão das proteínas do complexo juncional apical**

Para observar se os tratamentos com EGF e LiCl ocasionaram mudanças na expressão das proteínas juncionais, as células foram homogenizadas como descrito na seção de materiais e métodos e os extratos protéicos foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a transferência eletroforética, foi realizado o imunoblotting para análise da expressão das proteínas E-caderina, claudina-1 e β-catenina usando anticorpos específicos. A figura 19 mostra imunoblottings representativos e as respectivas análises densitométricas onde se observa que os tratamentos não causaram qualquer mudança significativa na expressão das proteínas analisadas.


Controle
EGF
LiCl
EGF + LiCl
E-caderina
Claudina-1
β-catenina
α-tubulina


E-caderina
E-caderina/α-tubulina
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
Controle
EGF
LiCl
EGF + LiCl

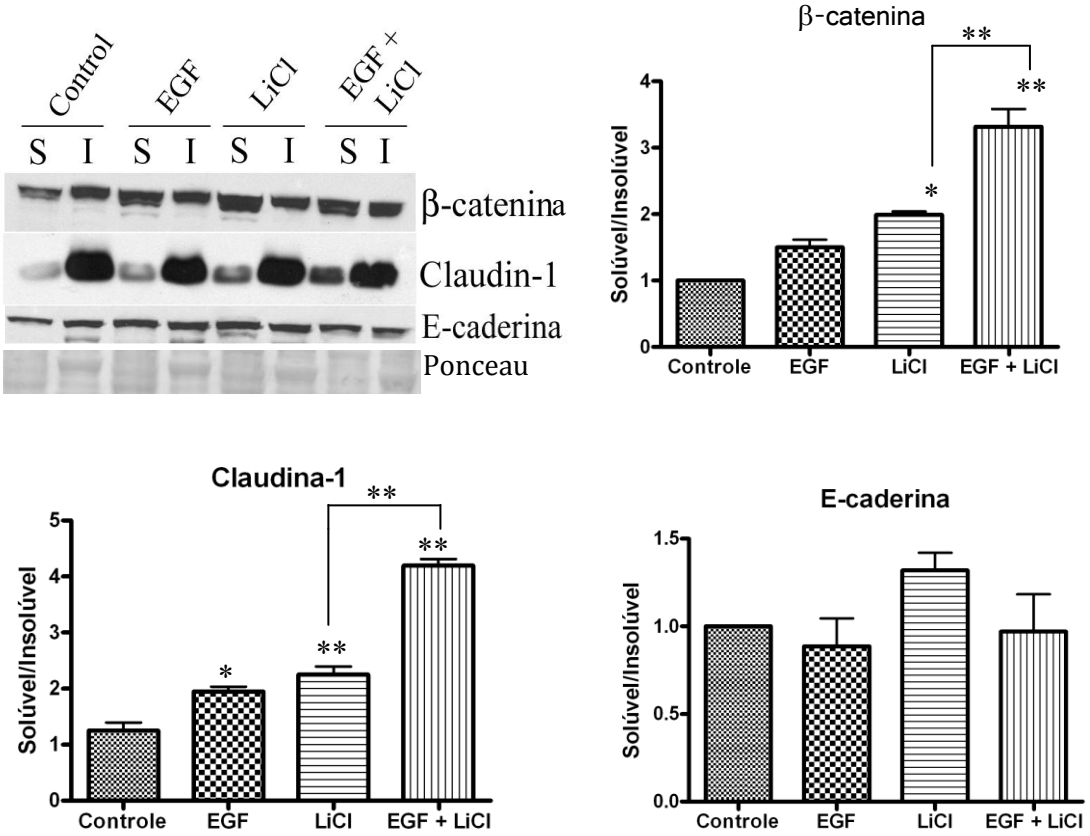

Claudina-1
Claudina-1/α-tubulina
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Control
EGF
LiCl
EGF + LiCl


β-catenina
β-catenina/α-tubulina
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Control
EGF
LiCl
EGF + LiCl

3.4 **Análise da distribuição das proteínas β-catenina, claudina-1 e E-caderina em frações solúveis e insolúveis em Triton-X-100 (TX-100)**

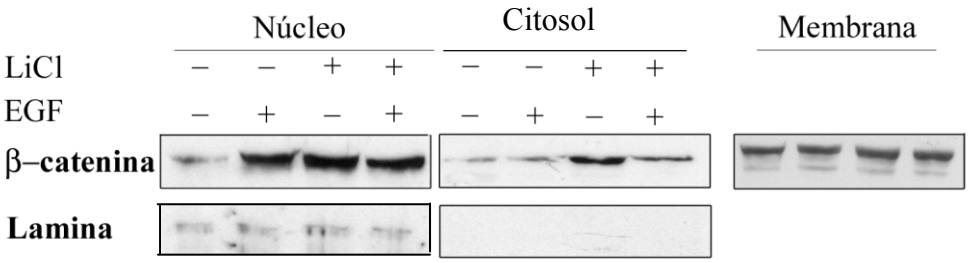
É conhecido que a funcionalidade do complexo juncional apical (CJA) depende da associação dos seus componentes com o citoesqueleto de actina. Desta forma, foi analisada por *imunoblotting* a distribuição das proteínas β-catenina, E-caderina e claudina-1 em frações solúveis e insolúveis em TX-100. As frações TX-100 solúveis representam as proteínas citosólicas, por outro lado, as frações TX-100 insolúveis representam as proteínas conectadas ao citoesqueleto e, portanto funcionais (Tenenbaum *et al*., 2008; Nighot *et al*., 2009). Foi observado que o tratamento com LiCl causou um aumento significativo de β-catenina na fração solúvel em TX-100 ($p<0,05$). O tratamento com EGF causou o aumento β-catenina na fração solúvel em TX-100, porém, este aumento não foi significativo (Fig. 20). Apesar de EGF não ter efeito sobre a distribuição da β-catenina na fração solúvel em TX-100, foi observado um aumento significativo desta proteína na fração solúvel em TX-100 após o tratamento com EGF + LiCl ($p<0,01$). A localização subcelular de E-caderina não foi afetada significativamente após os tratamentos com EGF e LiCl (Fig. 20).

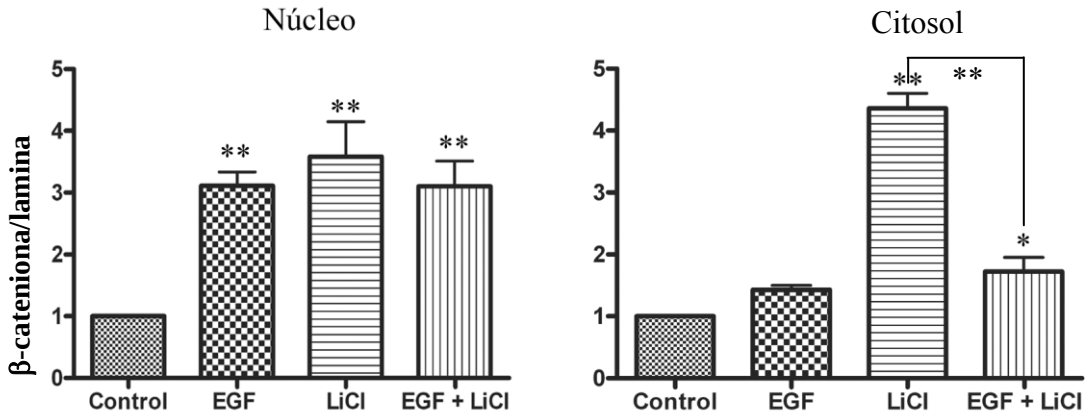
No caso de claudina-1, EGF causou aumento significativo desta proteína na fração solúvel em TX-100 ($p<0,05$), porém este efeito mostrou-se mais acentuado em células tratadas com LiCl ($p<0,01$). O co-tratamento das células com EGF e LiCl causou um efeito sinérgico no aumento da localização de claudina-1 na fração solúvel em Triton-X-100 ($p<0,01$).

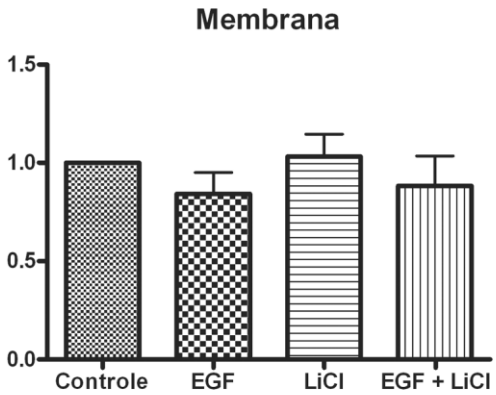

Control
EGF
LiCl
EGF + LiCl
S I S I S I S I
β-catenina
Claudin-1
E-caderina
Ponceau
β-catenina
Solúvel/Insolúvel
Controle
EGF
LiCl
EGF + LiCl
Claudina-1
E-caderina

4.5 **Análise da localização da β-catenina em diferentes frações subcelulares**

A localização subcelular da proteína β-catenina é um fator importante que pode definir a ativação/inativação da via Wnt em câncer colo-retal. Considerando a aparente localização nuclear como visto nas análises de imunofluorescência e localização nas frações solúveis em TX-100 após os diferentes tratamentos, decidimos avaliar a localização desta proteína usando diferentes frações subcelulares por *imunoblotting*. O tratamento das células Caco-2 com EGF e LiCl causou aumento da localização de β-catenina na fração nuclear ($p < 0,01$). Porém, diferentemente do que foi observado no ensaio com Triton-X-100, não houve efeito sinérgico na localização de β-catenina na fração nuclear em células tratadas com EGF+LiCl. β-catenina foi observada na fração citoplasmática somente em células tratadas com LiCl ($p< 0,01$) e em menor intensidade em células tratadas com EGF + LiCl. ($p < 0,05$). O tratamento das células com EGF não acarretou na localização citoplasmática de β-catenina. Quando comparamos estatisticamente a localização na fração citoplasmática de β-catenina em células tratadas com LiCl e aquelas tratadas com EGF + LiCl observamos uma redução significativa da expressão citoplasmática de β-catenina ($p< 0,01$). Além disso, não houve modificações estatisticamente significativas na localização de β-catenina na fração de membrana das células tratadas ou não com EGF e LiCl (Fig.21).


Núcleo
Citosol
Membrana
LiCl
EGF
β–catenina
Lamina

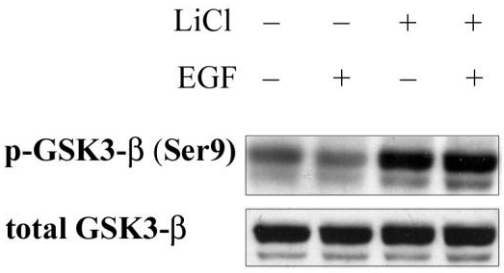

Núcleo
Citosol
β-cateniona/lamina
Control
EGF
LiCl
EGF + LiCl

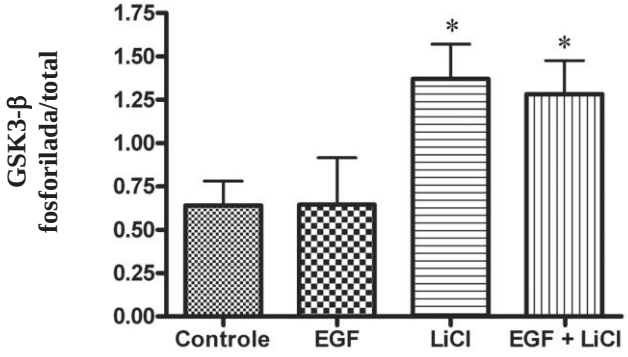

Membrana
Controle
EGF
LiCl
EGF + LiCl

3.6 **Ativação da via Wnt**

Como foi observado que os tratamentos com EGF, LiCl e EGF+LiCl causaram translocação de β-catenina para o núcleo das células, procuramos entender se essa translocação foi devido a inibição de GSK3-β, uma importante enzima da via Wnt. LiCl é reconhecido como um inibidor específico e não competitivo da enzima GSK3-β, e conseqüentemente, um ativador da via Wnt/β-catenina *(*Hedgepeth *et al.,* 1997; Ryves & Harwood, 2001).

A atividade da enzima GSK3-β foi avaliada por imunoblotting usando um anticorpo que reconhece a fosforilação da enzima no resíduo Ser9. A figura 22 mostra que o tratamento com LiCl ocasionou um aumento da fosforilação da GSK3-β, indicando que esta droga causou inativação da enzima ($p< 0,05$). Entretanto, não houve aumento de fosfo-GSK3-β em células tratadas com EGF. No entanto, o tratamento com EGF + LiCl causou um aumento na fosforilação da GSK3-β, provavelmente devido a ação do LiCl e não do EGF ($p< 0,05$).

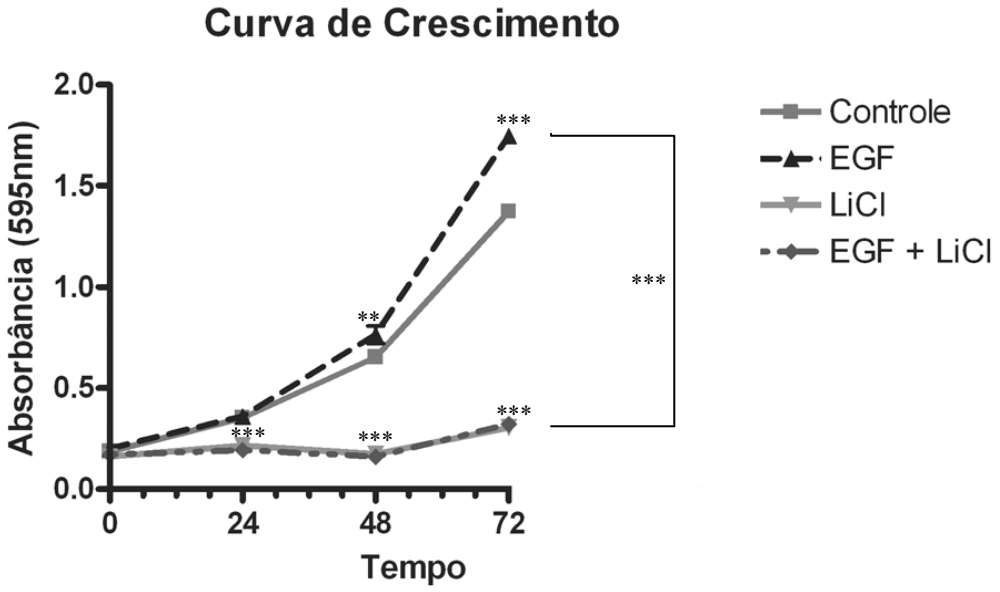

LiCl – – + +
EGF – + – +
p-GSK3-β (Ser9)
total GSK3-β


GSK3-β
fosforilada/total
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
*
*
Controle
EGF
LiCl
EGF + LiCl

3.7 **Efeitos do tratamento com EGF e/ou LiCl na proliferação, migração e na formação de colônia em células Caco-2**

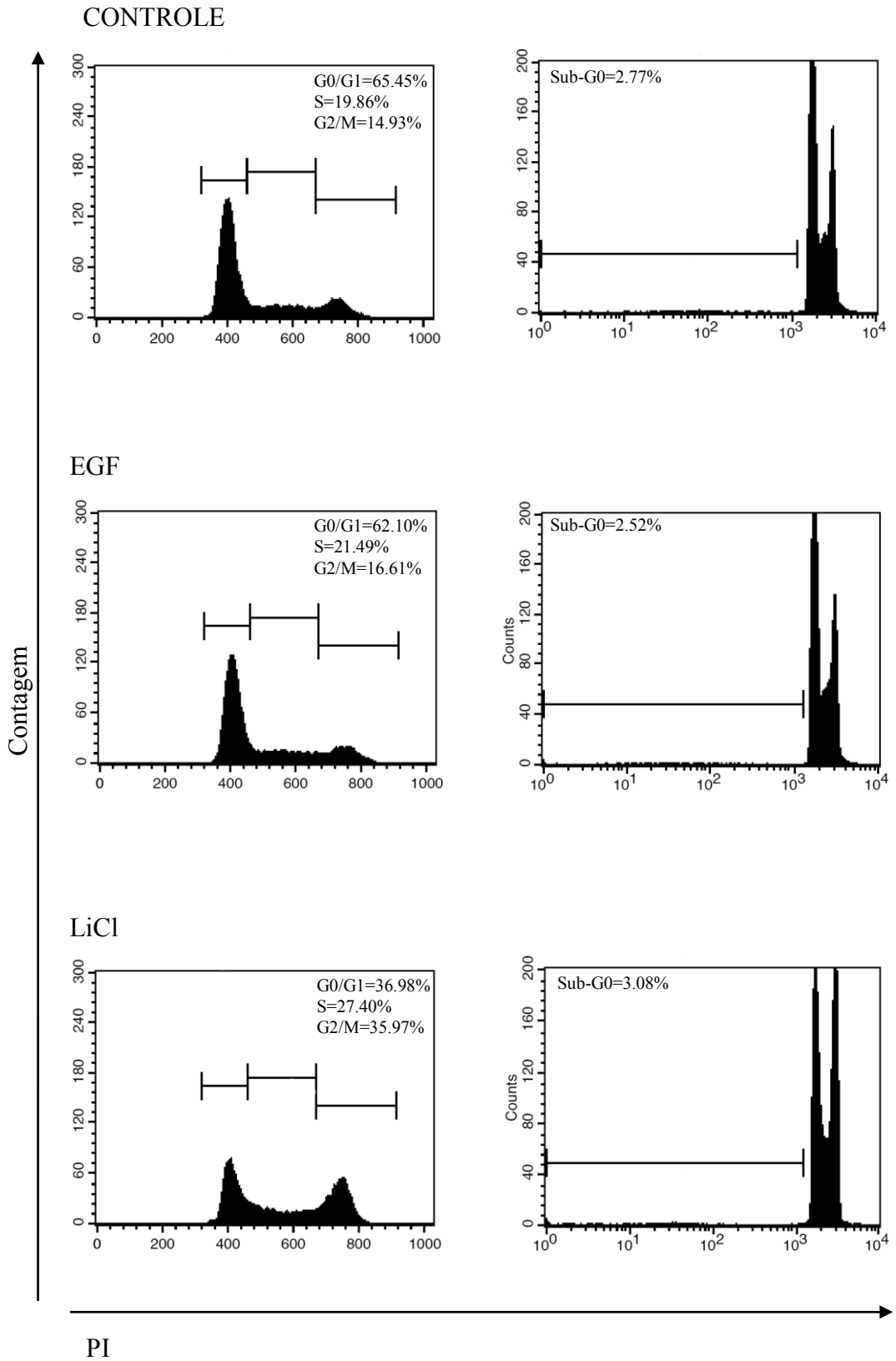
Células epiteliais tumorais necessitam adquirir um potencial metastático para colonizar outros tecidos. Para isto é necessária uma alteração no fenótipo da célula que modifique sua capacidade proliferativa, migratória e seu potencial tumorigênico.

O aumento da proliferação é um dos primeiros eventos que ocorrem no desenvolvimento de tumores epiteliais. Genes como c-myc e ciclina D1 são superexpressos pela via Wnt (Huang & Du, 2008). Portanto, resolvemos avaliar o potencial proliferativo de células Caco-2 após tratamento com EGF e LiCl por 24, 48 e 72 h. O tratamento das células com EGF causou um aumento da proliferação após 48h e mais acentuadamente após 72h quando comparada à proliferação das células controle ($p<0,01$ e $p<0,001$, respectivamente). Como o LiCl é um ativador da via Wnt, é esperado que haja um aumento da proliferação das células Caco-2 após tratamento com este agente. Surpreendentemente, LiCl inibiu a proliferação das células Caco-2 em todos os tempos de tratamento ($p<0,001$). O mesmo foi observado para células tratadas com EGF + LiCl ($p<0,001$). Quando comparamos a proliferação de células tratadas com EGF e aquelas tratadas com EGF+LiCl, observamos uma redução bastante significativa na proliferação celular ($p<0,001$). Este resultado sugere que LiCl poderia estar de alguma forma impedindo o EGF de exercer sua capacidade proliferativa (Fig. 23).

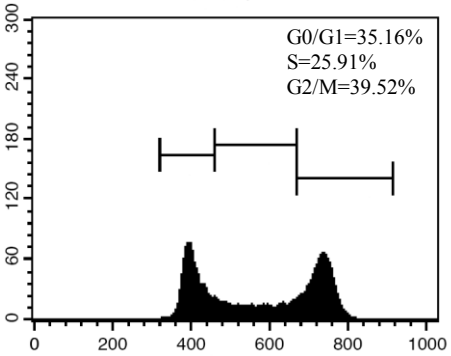

Curva de Crescimento
Absorbância (595nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
24
48
72
Tempo
***
**
***
***
***
***
Controle
EGF
LiCl
EGF + LiCl

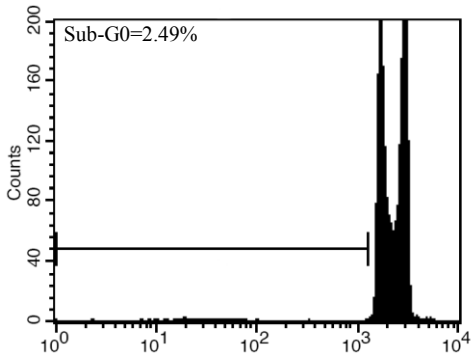
Devido aos dados observados no ensaio de proliferação e a fim de confirmar a inibição da proliferação mediada por LiCl, foi realizado uma análise do ciclo e morte celular. Células Caco-2 foram tratadas com EGF, LiCl e EGF+LiCl por 24 h, logo marcadas com iodeto de propídeo e as diferentes fases do ciclo celular e morte foram monitoradas no citômetro de fluxo.

Como mostrado na figura 24, não foi observada morte celular, representada pela porcentagem de células em sub-G0, em nenhum dos tratamentos analisados. Os valores para as células controle, tratadas com NaCl, EGF, LiCl e EGF+LiCl foram de 2,77%, 2,70%, 2,52%, 3,08% e 2,49%, respectivamente. A porcentagem de células controle, tratadas com EGF e tratadas com NaCl na fase G0/G1 foram similares com valores de 65,45%, 62,10% e 64,19%, respectivamente. Por outro lado, células tratadas com LiCl e EGF+LiCl apresentaram uma porcentagem inferior de células na fase G0/G1phase com os valores de 36,98% e 35,16%, respectivamente. A porcentagem de células controle e tratadas com NaCl na fase S, foi de 19,86% e 17,27% respectivamente. Células tratadas com EGF apresentaram um aumento de sua porcentagem na fase S quando comparada às células controle, com valor de 21,49%. A porcentagem de células tratadas com LiCl e EGF+LiCl na fase S foi 27,40% e 25,91%, respectivamente, ainda maior daquelas observadas nas células controle. A porcentagem de células controle, tratadas com EGF e tratadas com NaCl na fase G2/M foi de 14,93%, 16,61% e 18,69, respectivamente. Por outro lado, a porcentagem de células tratadas com LiCl e EGF+LiCl na fase G2/M foi de 35,97% e 39,32%, respectivamente. Estes resultados indicam que LiCl pode promover a entrada das células Caco-2 na fase S e na fase G2/M.

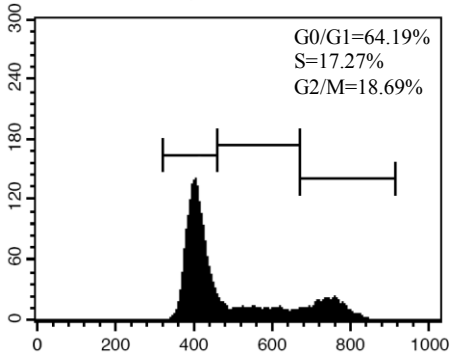

CONTROLE
G0/G1=65.45%
S=19.86%
G2/M=14.93%
Sub-G0=2.77%
EGF
G0/G1=62.10%
S=21.49%
G2/M=16.61%
Sub-G0=2.52%
LiCl
G0/G1=36.98%
S=27.40%
G2/M=35.97%
Sub-G0=3.08%
Contagem
Counts
PI

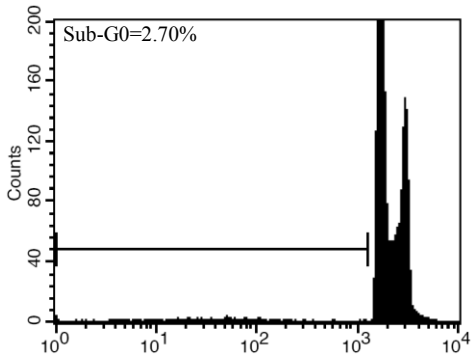
EGF+LiCl



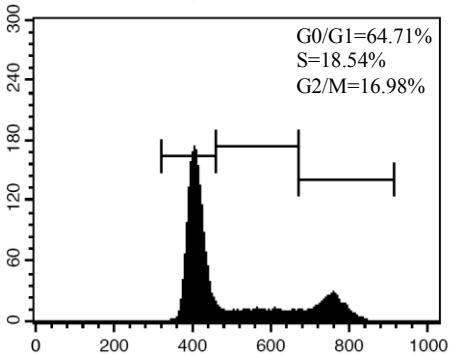


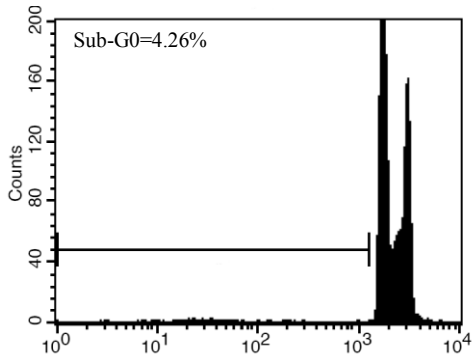
NaCl





EGF+NaCl

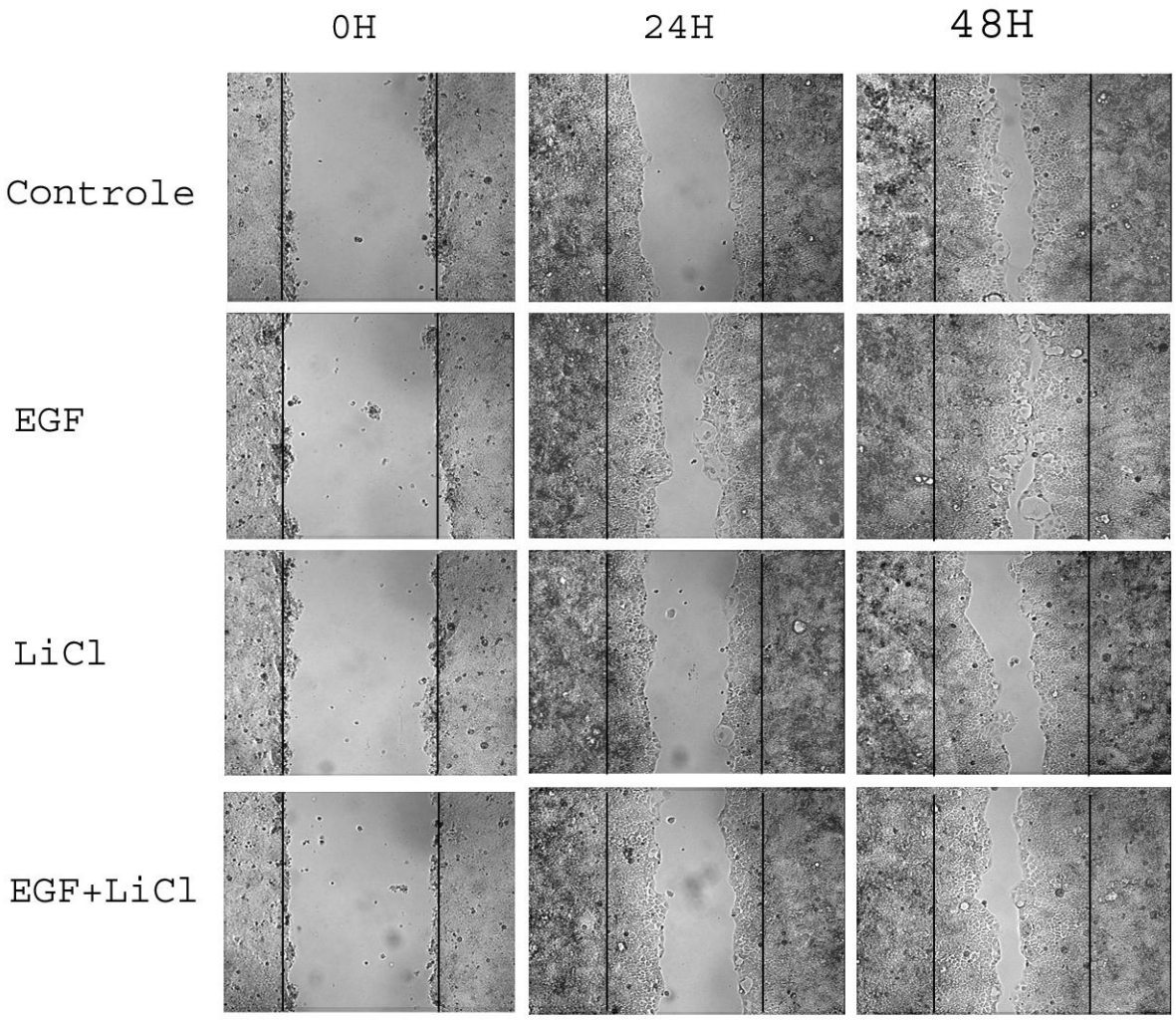


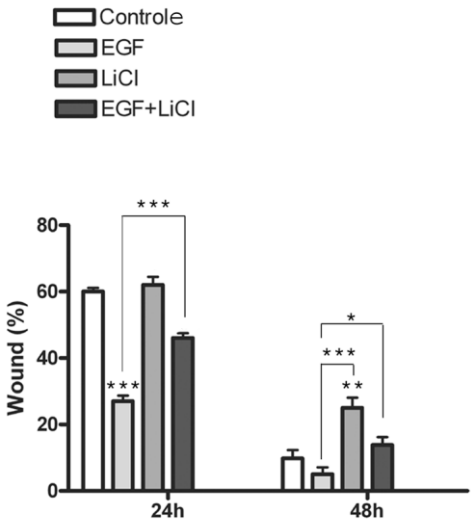


Contagem

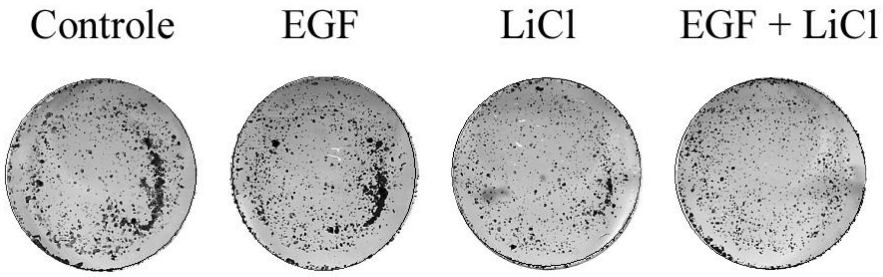
PI

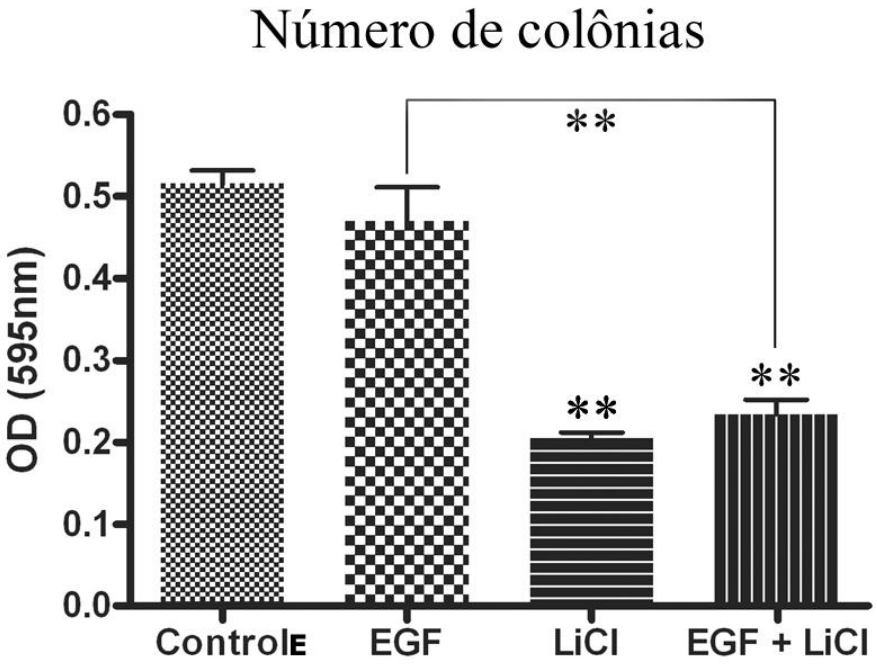
Outro importante parâmetro no progresso do câncer epitelial é o ganho de motilidade das células tumorais (Tsuji *et al.*, 2009). No presente trabalho, a migração celular foi analisada pelo método de *wound-healing.* O tratamento com EGF por 24 horas ocasionou um aumento significativo na capacidade migratória das células ($p<0,001$). LiCl não alterou significativamente a migração das células após 24 h assim como o tratamento com EGF+LiCl. Porém, quando comparamos a migração das células tratadas com EGF+LiCl com àquelas tratadas com EGF, observamos uma redução bastante significativa na migração celular ($p<0,001$). Após 48 horas, apesar de a imagem demonstrar que a ferida na monocamada tratada com EGF estava quase fechada, não houve diferença significativa quando comparada ao fechamento da monocamada das células controle. Por outro lado, células tratadas com LiCl continuaram migrando mais lentamente do que as células controle e aquelas tratadas com EGF ($p<0,01$ e $p<0,001$, respectivamente). Além disso, LiCl continuou a inibir os efeitos sobre a migração causados pelo EGF, como visto em células tratadas com EGF+LiCl, porém com menor intensidade daquela observada em 24 horas ($p<0,05$) (Fig. 25).


0H
24H
48H
Controle
EGF
LiCl
EGF+LiCl


Controle
EGF
LiCl
EGF+LiCl
Wound (%)
80
60
40
20
0
24h
48h
***
***
*
***
**

A capacidade de formação de colônia em baixa densidade é outro importante parâmetro para avaliar o potencial tumorigênico em células epiteliais que necessitam de contatos célula-célula para proliferarem. Nós observamos que EGF não aumentou o número de colônias quando comparadas as células controle. LiCl, por sua vez, reduziu o número de colônias ($p<0,01$) (Fig. 25).


Controle
EGF
LiCl
EGF + LiCl


Número de colônias
OD (595nm)
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
**
**
**
Controle
EGF
LiCl
EGF + LiCl

4 DISCUSSÃO

O CCR tem maior prevalência em países ocidentais onde o modo de vida dos indivíduos como a má alimentação e o stress, propiciam o aparecimento deste e de outros tipos de tumores (Tanaka, 2009). No Brasil, segundo publicação recente do INCa, o número de casos novos de câncer de cólon e reto no ano de 2010 será de 13.310 casos em homens e de 14.800 em mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 14 casos novos a cada 100 mil homens e 15 para cada 100 mil mulheres (Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil). Apesar disso, a sobrevida para esse tipo de neoplasia é considerada boa, se a doença for diagnosticada em estágio inicial.

A cirurgia é o tratamento primário para o CCR. É retirada a parte do intestino afetada e os linfonodos próximos a esta região. Após o tratamento cirúrgico, a radioterapia associada ou não à quimioterapia é utilizada para diminuir a possibilidade da volta do tumor (recidiva). Quando a doença está disseminada, com metástases para o fígado, pulmão ou outros órgãos, as chances de cura diminuem. A quimioterapia atual mais utilizada para o tratamento do CCR, especialmente as formas mais agressivas, tem como alvo principal o VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), utilizando o bevacizumab, e o EGFR, utilizando o cetuximab e panitumumab (Punt & Tol, 2009). Todas estas drogas são anticorpos monoclonais que agem diretamente nas vias de sinalização de VEGF e EGFR.

Atualmente, uma série de estudos vem ressaltando a importância da via de sinalização Wnt/β-catenina no desenvolvimento do CCR. Esta via possui um papel muito importante na homeostase normal do epitélio intestinal, no entanto, mutações em componentes desta via podem acarretar alterações da sua atividade e conduzir à superexpressão de uma gama de genes relacionados com a progressão do CCR (Cheah, 2009).

O estudo aprofundado de vias que participem da tumorigênese colo-retal é importante já que viabiliza o desenvolvimento de drogas cada vez mais específicas, mais eficientes e com menos efeitos colaterais. Os tratamentos combinados, ou seja, com mais de uma droga com diferentes alvos, muitas vezes melhoram a eficácia do tratamento e conseqüentemente a sobrevida do paciente. Por esta razão, a pesquisa básica exerce um papel muito importante na elucidação da interação entre duas vias de sinalização que

posteriormente pode ser aproveitada pelos estudos clínicos para o desenvolvimento de novas drogas.

Neste contexto, e devido à importância das vias EGFR e Wnt/β-catenina na tumorigênese do CCR e ao desconhecimento da existência de uma interrelação entre estas vias durante a progressão do CCR, no presente estudo avaliamos os efeitos do tratamento com EGF, o principal ligante do EGFR e do cloreto de lítio, um conhecido inibidor da enzima GSK-3β e importante componente da via Wnt, usando células Caco-2, uma linhagem tumoral derivada de adenocarcinoma de colon, como modelo de CCR.

Primeiramente, analisamos a morfologia das células Caco-2 em culturas esparsas ou densas tratadas com EGF e LiCl. É sabido que células Caco-2 mudam a expressão gênica após atingirem confluência e tornam-se diferenciadas (Sääf *et al*., 2007). Isso se deve ao fato de que a interação célula-célula é capaz de regular a transdução de sinais intracelulares assim como mecanismos regulatórios da transcrição e tradução de genes envolvidos no controle da proliferação celular e na diferenciação (Balda & Matter, 2009). Observamos que células controle e células tratadas com EGF de culturas esparsas apresentavam morfologia fibroblástica com longos prolongamentos citoplasmáticos denominados filopódios. Os filopódios são projeções celulares compostas por feixes de actina que funcionam como estruturas sensoriais, por exemplo, no crescimento dos cones neuronais e durante a fusão de bordas epiteliais. Além disso, também agem como sítios precursores de adesão célula-célula (Faix *et al*., 2009). Não observamos, portanto, diferenças morfológicas significativas entre células controle e tratadas com EGF. O tratamento com LiCl causou o desaparecimento dos filopódios. Nowicki e colaboradores (2008) observaram o mesmo efeito na morfologia de células de glioma. Owen & Gordon-Weeks (2003) relataram que LiCl e SB216763, outro inibidor da quinase GSK3-β, inibiram o alongamento de axônios em cultura de neurônio de galinha. Além disso, estes autores demonstraram que GSK3-β pode influenciar a dinâmica do citoesqueleto de actina na formação e no crescimento dos filopódios. Portanto, a inibição da formação dos filopódios em células Caco-2 após tratamento com LiCl pode ser devido à inibição de GSK3-β. O mesmo efeito inibitório de LiCl foi observado nas células tratadas com EGF+LiCl.

Em culturas densas, o tratamento com EGF ocasionou aparente perda de adesão entre as células. Este efeito provavelmente se deve ao fato da ação proliferativa de EGF já

que células em proliferação necessitam desestruturar suas junções celulares acarretando no seu arredondamento (Boonstra, 1999). O tratamento das células com LiCl não modificou a morfologia das células Caco-2 quando comparado às células controle. Porém, quando tratadas com EGF+LiCl, as células sofriam os mesmos efeitos daquelas tratadas somente com EGF, ou seja, arredondamento celular com aparente perda de adesão.

Com este ensaio, concluímos que as células Caco-2 respondem diferentemente aos tratamentos com EGF e LiCl dependendo da densidade da cultura. Este fato se deve provavelmente as modificações na expressão gênica que células Caco-2 sofrem após atingirem confluência e tornarem-se diferenciadas (Sääf *et al*., 2007). A próxima etapa foi a análise da localização e expressão das proteínas do CJA claudina-1, E-caderina e β-catenina. Não foram encontradas modificações na expressão das proteínas claudina-1, β-catenina e E-caderina em células Caco-2 tratadas com EGF ou LiCl. Porém, pelos ensaios de imunofluorescência, foi observada uma internalização parcial das proteínas da membrana plasmática para o citoplasma das células. Este resultado foi confirmado por Western blot usando frações solúveis/insolúveis em TX-100, onde observamos que o tratamento com EGF ou LiCl causou um aumento das proteínas claudina-1 e β-catenina na fração solúvel em Triton-X-100. Além disso, o co-tratamento com estes agentes aumentou ainda mais a localização destas proteínas na fração solúvel em Triton-X-100 indicando um efeito sinérgico destes compostos. Estes resultados sugerem que o tratamento das células com EGF e LiCl causa uma perda estrutural do CJA.

Os efeitos de EGF na localização de β-catenina foram descritos por outros autores (Lu *et al*., 2003; Li *et al*., 2008; Colomiere *et al*., 2009). Lu e colaboradores (2003) demonstraram que o tratamento de células epidermóides humanas da linhagem A431 com EGF resultou na perda dos contatos célula-célula e translocação de β-catenina com aumento subseqüente da sua atividade transcricional. Li e colaboradores (2008) trataram duas linhagens de câncer cólon-retal, HCT-116 e SW480 com EGF e não encontraram modificação na expressão de β-catenina, no entanto, translocação desta proteína para o núcleo da célula, foi observado. Recentemente, Colomiere e colaboradores (2009) observaram que em linhagens celulares de câncer de ovário tratadas com EGF houve uma translocação desta proteína para o núcleo da célula e um aumento da migração celular.

Estes resultados corroboram com nossos achados em relação ao efeito do EGF sobre a expressão e localização de β-catenina.

Alguns trabalhos têm descrito regulação da expressão e localização de diferentes tipos de claudina por fatores de crescimento, porém o mecanismo desta regulação ainda é desconhecido (Singh *et al*., 2004; Chen *et al*., 2005; Dhawan *et al*., 2005). Singh e colaboradores (2004) não observaram modificações nos níveis de β-catenina em células MDCK II tratadas com EGF. Porém, houve uma diminuição nos níveis de claudina-2 e um aumento na expressão total de claudina-1, -3 e –4 assim como uma translocação de claudina-1 da fração solúvel em TX-100 para a fração insolúvel em TX-100, indicando um retorno da claudina-1 para as junções *tight*. Estes resultados conflitantes quando comparados aos nossos, podem ser devido à diferença de linhagem. MDCK II é uma linhagem celular normal derivada de epitélio renal de cão, já a Caco-2 é uma linhagem humana tumoral de epitélio intestinal e, portanto podem se comportar de forma diferente no que se refere à localização e expressão de claudina-1 após tratamento com EGF. Dhawan e colaboradores (2005) demonstraram aumento de claudina-1 em diferentes tipos de tumores humanos assim como uma alteração na localização desta proteína da membrana plasmática para o citoplasma e núcleo da célula. Além disso, foi visto que tumores e linhagens celulares mais agressivos apresentavam maior expressão ectópica de claudina-1 assim como maior capacidade migratória. Seguindo a hipótese de Dhawan e colaboradores (2005), o comportamento mais agressivo de Caco-2 demonstrado pelo aumento na proliferação e migração após tratamento com EGF pode ser explicado por esta alteração na localização de claudina-1 nas células. No entanto, mais estudos seriam necessários para confirmar esta hipótese.

Os efeitos de LiCl na expressão e localização de claudina-1 nunca antes havia sido descrito. Nós demonstramos que o inibidor de GSK3-β, LiCl, não só altera a localização subcelular de β-catenina mas também afeta a proteína de JT claudina-1. O mecanismo desta ação é ainda desconhecido.

A diminuição de expressão de E-caderina é uma característica molecular crucial para que ocorra a TEM, porém, EGF e LiCl mostraram-se incapazes de reduzir a expressão desta proteína em células Caco-2. Estes resultados juntamente com as observações do ensaio de contraste de fase mostrando ausência de alterações da morfologia indicam que

ambos tratamentos não foram capazes de induzir TEM. Este fato pode ser explicado pela natureza menos agressiva e mais diferenciada de Caco-2 em relação a outras células tumorais já induzidas a sofrer TEM (Cai *et al.*, 2009; Hugo *et al*., 2010). A TEM talvez não dependa apenas da ativação de vias oncogênicas, mas também da expressão gênica da célula. Além disso, muitos pesquisadores utilizam não só o EGF para induzir TEM em linhagens celulares, mas sim o co-tratamento com TGF-β, outro importante indutor de TEM (Docherty *et al*., 2006; Tian *et al*., 2007; Uttamsingh *et al.*, 2008).

O LiCl é um reconhecido ativador da via Wnt através da inativação da enzima GSK3-β com conseqüente translocação da β-catenina para o núcleo das células. A fim de avaliarmos a ativação da via Wnt em células Caco-2 após os tratamentos, realizamos diferentes ensaios para verificar a localização de β-catenina no núcleo das células Caco-2. Através dos ensaios de imunofluorescência, observamos aparente marcação nuclear da proteína β-catenina, e os ensaios usando o detergente TX-100 corrobora com este resultando como visto no aumento da localização de β-catenina na fração solúvel em TX-100. Assim, para definir se o tratamento com LiCl estaria induzindo localização nuclear da β-catenina em células Caco-2, realizamos um ensaio de fracionamento celular para obter frações subcelulares de membrana, citoplasma e núcleo. Através do ensaio de fracionamento, demonstramos que EGF e LiCl promoveram a localização nuclear de β-catenina mas diferentemente do que foi observado no ensaio com TX-100, o co-tratamento não agiu sinergicamente na translocação de β-catenina para o núcleo. A localização no citoplasma foi vista apenas em células tratadas com LiCl e com menor intensidade em células tratadas com EGF+LiCl. EGF não causou acúmulo citoplasmático de β-catenina. Diferentes autores, utilizando esta técnica e uma variedade de células, tais como em linhagens celulares epidermóides de câncer esofágico humanas e células tubulares renais de camundongo, observaram que LiCl causou a translocação de β-catenina da membrana plasmática para o núcleo destas células (Jones *et al*., 2003; Sinha *et al*., 2005). Além disso, nossos resultados mostrando que o EGF e LiCl promoveram translocação da β-catenina podem ser explicados pelos diferentes efeitos destes agentes na enzima GSK3-β. Nós observamos que diferentemente de LiCl, EGF não inativou GSK3-β como visto nos ensaios de imunoblotting. Este resultado discorda daqueles que demonstraram que a estimulação de

EGFR por EGF em algumas linhagens celulares pode promover a inibição de GSK-3β por uma variedade de quinases (Saito *et al*., 1994; Eldar-Finkelman *et al.,* 1995). Sobre a base de nossos resultados, é possível sugerir que em células tratadas com LiCl, a GSK3-β está inativa e portanto não fosforila β-catenina. Na forma não fosforilada esta proteína está acumulando no citoplasma e conseqüentemente translocando para o núcleo. Em células tratadas com EGF, GSK3-β não esta sendo inativada e, portanto está fosforilando β-catenina que conseqüentemente deveria estar sendo degradada pela via proteassômica. Porém, β-catenina está sendo translocada para o núcleo de forma independente de GSK3-β por algum mecanismo ainda não esclarecido. Similar a estes nossos resultados, Lu e colaboradores (2003) observaram β-catenina nuclear e aumento da atividade transcricional do complexo β-catenina-TCF/LEF-1 em células humanas de carcinoma epidermóide A431 tratadas com EGF. Porém, os autores também relatam que não foi observada alteração nos níveis de fosforilação de GSK3-β (Ser 9). Nossos resultados sugerem que EGF ativa a via Wnt/β-catenina, porém isto ocorre por uma regulação independente de GSK3-β. O mecanismo pelo qual EGF transloca β-catenina para o núcleo da célula sem inativar GSK3-β, permanece por ser elucidado.

O aumento na proliferação e migração são importantes processos para a progressão tumoral. Nossos resultados mostraram que EGF aumentou a proliferação de Caco-2 a partir de 48 h de tratamento. Este resultado era esperado já que EGF age no receptor EGFR, ativando diversas vias de sinalização como PI3K, MAPK e o transdutor de sinal e ativador transcricional 3 (STAT3) que regulam diversos processos celulares incluindo a proliferação celular (Colomiere *et al*., 2009; Park & Han, 2009). Por outro lado, LiCl inibiu a proliferação de Caco-2 e ainda impediu o efeito proliferativo de EGF como demonstrado no tratamento de EGF+LiCl. Este resultado foi surpreendente já que este composto ativa a via Wnt/β-catenina que por sua vez ativa diversos genes como c-myc e ciclina D1 responsáveis pelo aumento da proliferação (Huang & Du., 2008).

A fim de tentar explicar o efeito inibitório de LiCl sobre a proliferação quando células Caco-2 foram tratadas com EGF, decidimos analisar o ciclo celular por citometria de fluxo após os diferentes tratamentos. Análise do ciclo celular revelou que LiCl ocasionava uma parada do ciclo celular na fase G2/M e além disso, não apresentava citotoxicidade à célula. Este mesmo efeito foi observado por outros autores, no entanto em

outras linhagens celulares (Stump *et al*., 2006; Sun *et al*., 2007; Wang *et al*., 2008). Stump e colaboradores (2006) concluíram também que LiCl inibiu a TEM induzida por TGF-β em célula epiteliais de retina humana através da diminuição da proliferação, da migração e da expressão do marcador mesenquimal alfa - SMA (alfa actina de músculo liso). Sun e colaboradores (2007) observaram que LiCl inibiu a proliferação de células de câncer de próstata através da redução da expressão de diversos fatores relacionados a replicação do DNA como cdc6 (*cell division cycle 6*), ciclina A, ciclina E e cdc25C. Wang e colaboradores (2008) observaram que LiCl reduzia a proliferação da linhagem de câncer esofágico humano Eca-109 através da indução de parada do ciclo celular na fase G2/M e redução na expressão de ciclina B1. Além de inibir a proliferação de Caco-2, o LiCl também bloqueou a proliferação induzida por EGF. Pardo e colaboradores (2003) descreveram que LiCl diminui de uma forma tempo- e dose-dependente a fosforilação de MEK e ERK. Portanto, é possível sugerir que LiCl esteja inibindo a proliferação mediada por EGF através da via MEK. São necessárias mais investigações quanto ao envolvimento de LiCl com a via MAPK e com outras vias de sinalização em células Caco-2. Um fator importante observado por nosso grupo, e também descrito em outros trabalhos, é que o LiCl não reduziu a viabilidade celular (Wu *et al*., 2007; Wang *et al*., 2008).

Outro fator importante na progressão tumoral é a aquisição de motilidade celular. Na tentativa de determinar se os diferentes tratamentos estariam causando alteração no potencial migratório das células, nós analisamos a taxa migratória celular usando o ensaio de *wound-healing*. Nossos resultados mostraram que o EGF aumentou a migração celular a partir de 24 h de tratamento. Este resultado está de acordo com outros trabalhos (Harms *et al*., 2005; Jiang *et al*., 2006). Harms e colaboradores (2005) observaram que o tratamento com EGF aumentou a motilidade da linhagem celular CHO. Jiang e colaboradores (2006) demonstraram que EGF induziu a migração celular em culturas de células epiteliais de retina humanas num evento mediado pelas vias ERK e PI3K/AKT. Nossos resultados também demonstraram que o LiCl inibiu a migração celular após 48 h e reduziu a migração induzida por EGF em 24 e 48 h de tratamento. Uma possível explicação seria que LiCl estaria diminuindo a fosforilação de MEK e ERK mediada pelo EGF, como sugerido por Pardo e colaboradores (2003), e dessa forma, inibindo a migração.

A capacidade que células epiteliais têm de formar colônias quando cultivadas em baixa densidade é uma característica para se avaliar o potencial tumorigênico da mesma. Isso se deve à necessidade que as células tem de formar contatos com células adjacentes e assim estabelecer uma comunicação e conseqüentemente iniciar dentre outros processos, a proliferação. Nossos resultados mostraram que o tratamento com EGF não alterou a capacidade de formar colônias de células Caco-2 quando comparado às células controle. Porém, o tratamento com LiCl reduziu a formação de colônias e impediu a formação de colônia mediada por EGF, como visto no tratamento de EGF+LiCl.

Juntos, nossos resultados demonstram um papel antagônico do LiCl. Apesar de o LiCl alterar a localização das proteínas β-catenina e claudina-1, ele inibiu a proliferação, migração e formação de colônia sugerindo a este composto, portanto, uma potencial ação antitumorigênica. Além disso, a utilização do LiCl como um inibidor de GSK3-β deve ser mais discutida já que importantes efeitos colaterais são observados.

5 **CONCLUSÃO**

- O presente estudo demonstrou que EGF altera a localização de β-catenina e claudina-1 em células de adenocarcinoma colo-retal humano Caco-2, ativa a via Wnt/β-catenina como demonstrado pela localização nuclear de β-catenina, porém esta ativação ocorre através de um mecanismo independente de GSK3-β.

- LiCl também altera a localização de β-catenina e claudina-1, e ativa a via Wnt/β-catenina como demonstrado pela localização nuclear de β-catenina e inativação da quinase GSK3-β.

- LiCl inibe a proliferação, migração e a formação de colônia em células Caco-2. Análises do ciclo celular por citometria de fluxo demonstraram que a inibição da proliferação mediada por LiCl é devida a uma parada no ciclo celular na fase G2/M.

- LiCl impediu a ação proliferativa e migratória de EGF como demonstrado pelos resultados de células tratadas com EGF+LiCl.

- O efeito dual de LiCl demonstra que esta substância age não só como um inibidor da enzima GSK3-β, mas também possui outros alvos moleculares que fazem do LiCl uma potencial droga antitumorigênica.

REFERÊNCIA

Akiri, G., Cherian, M.M., Vijayakumar, S., Liu, G., Bafico, A., Aaronson, S.A. **(2009).** *Wnt pathway aberrations including autocrine Wnt activation occur at high frequency in human non-small-cell lung carcinoma*. Oncogene. 28;28(21):2163-72.

Akiyama, T. **(2000).** Wnt/beta-catenin signaling. Cytokine Growth Factor Rev. 11(4):273-82.

Aranda, V., Haire, T., Nolan, M.E., Calarco, J.P., Rosenberg, A.Z., Fawcett, J.P., Pawson, T., Muthuswamy, S.K. **(2006).** *Par6-aPKC uncouples ErbB2 induced disruption of polarized epithelial organization from proliferation control*. Nat Cell Biol. 8(11):1235-45. Epub 2006 Oct 22.

Araújo, W.M., Vidal, F., Souza, W.F., Freitas, J.C., Souza, W., Morgado-Díaz, J.A. *PI3K/Akt and GSK-3β prevents in a differencial fashion the malignant phenotype of colorectal cancer cells.* J Cancer Res Clin Oncol. *In press*.

Asada, M., Irie, K., Morimoto, K., Yamada, A., Ikeda, W., Takeuchi, M., Takai, Y. **(2003).** *ADIP, a novel Afadin- and alpha-actinin-binding protein localized at cell-cell adherens junctions.* J Biol Chem. 7;278(6):4103-11.

Balda, M.S., Matter, K. **(2000).** *Transmembrane proteins of tight junctions*. Semin Cell Dev Biol. 11(4):281-9.

Balda, M.S., Matter, K. **(2003).** *Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression.* Trends Cell Biol. 13(6):310-8.

Balda, M.S., Matter, K. **(2009).** *Tight junctions and the regulation of gene expression.* Biochim Biophys Acta. 2009 Apr;1788(4):761-7.

Barbosa, L.A., Goto-Silva, L., Redondo, P.A., Oliveira, S., Montesano G, De Souza W, Morgado-Díaz JA. **(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(3):319-31.

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

Barr, S., Thomson, S., Buck, E., Russo, S., Petti, F., Sujka-Kwok, I., Eyzaguirre, A., Rosenfeld-Franklin, M., Gibson, N.W., Miglarese, M., Epstein, D., Iwata, K.K., Haley, J.D. **(2008).**

Bypassing cellular EGF receptor dependence through epithelial-to-mesenchymal-like transitions. Clin Exp Metastasis. 25(6):685-93.

Bates, R.C., Mercurio, A.M. (**2005).** *The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression.* Cancer Biol Ther. 4(4):365-70.

Bazzoni, G. **(2003).** *The JAM family of junctional adhesion molecules*. Curr Opin Cell Biol. 2003 Oct;15(5):525-30.

Bellovin, D.I., Bates, R.C., Muzikansky, A., Rimm, D.L., Mercurio, A.M. **(2005).** *Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease.* Cancer Res. 1;65(23):10938-45.

Benson, A.B. **(2007).** *Epidemiology, disease progression, and economic burden of colorectal cancer*. J Manag Care Pharm. 13(6 Suppl C):S5-18.

Betanzos, A., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., Azuara, E., Amerena, J., González-Mariscal, L. **(2004).** *The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells.* Exp Cell Res. 1;292(1):51-66.

Bienz M, Clevers H. **(2000).** *Linking colorectal cancer to Wnt signaling*. Cell. 13;103(2):311-20.

Bienz M. **(2005)** *beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling*. Curr Biol. 26;15(2):R64-7. Review.

Blum, R., Gupta, R., Burger, P.E., Ontiveros, C.S., Salm, S.N., Xiong, X., Kamb, A., Wesche, H., Marshall, L., Cutler, G., Wang, X., Zavadil, J., Moscatelli, D., Wilson, E.L. **(2009).** *Molecular signatures of prostate stem cells reveal novel signaling pathways and provide insights into prostate cancer.* PLoS One. 29;4(5):e5722.

Boonstra, J. **(1999).** *Growth factor-induced signal transduction in adherent mammalian cells is sensitive to gravity.* FASEB J. 13 Suppl:S35-42.

Bowley, E., Mulvihill, E., Howard, J.C., Pak, B.J., Gan, B.S., O'Gorman, D.B. **(2005).** *A novel mass spectrometry-based assay for GSK-3beta activity.* BMC Biochem. 2005 Dec 16;6:29.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. *Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro, **2009**. 100 f

Byrum, C.A., Xu, R., Bince, J.M., McClay, D.R., Wikramanayake, A.H. **(2009).** *Blocking Dishevelled signaling in the noncanonical Wnt pathway in sea urchins disrupts endoderm formation and spiculogenesis, but not secondary mesoderm formation.* Dev Dyn. 238(7):1649-65.

Cai, S.Y., Gautam, S., Nguyen, T., Soroka, C.J., Rahner, C., Boyer, J.L. **(2009).** *ATP8B1 deficiency disrupts the bile canalicular membrane bilayer structure in hepatocytes, but FXR expression and activity are maintained.* Gastroenterology. 136(3):1060-9.

Cai, Y.C., Jiang, Z., Vittimberga, F., Xu, X., Savas, L., Woda, B., Callery, M., Banner, B. **(1999*).*** *Expression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in gastrointestinal stromal tumours*. Virchows Arch. 435(2):112-5.

Caraci, F., Gili, E., Calafiore, M., Failla, M., La Rosa, C., Crimi, N., Sortino, M.A., Nicoletti, F., Copani, A., Vancheri, C. **(2008).** *TGF-beta1 targets the GSK-3beta/beta-catenin pathway via ERK activation in the transition of human lung fibroblasts into myofibroblasts*. Pharmacol Res.57(4):274-82.

Carethers, J.M. **(2009).** *Intersection of transforming growth factor-beta and Wnt signaling pathways in colorectal cancer and metastasis.* Gastroenterology.137(1):33-6.

Cheah, P.Y. **(2009).** *Recent advances in colorectal cancer genetics and diagnostics*. Crit Rev Oncol Hematol. 69(1):45-55.

Chen, S.P., Zhou, B., Willis, B.C., Sandoval, A.J., Liebler, J.M., Kim, K.J., Ann, D.K., Crandall, E.D., Borok, Z. **(2005).** *Effects of transdifferentiation and EGF on claudin isoform expression in alveolar epithelial cells.* J Appl Physiol. 2005 Jan;98(1):322-8.

Chen, X.Y., Wang, Z.C., Li, H., Cheng, X.X., Sun, Y., Wang, X.W., Wu, M.L., Liu, J. **(2005).** *Nuclear translocations of beta-catenin and TCF4 in gastric cancers correlate with lymph node metastasis but probably not with CD44 expression*. Hum Pathol. 36(12):1294-301.

Cheng, X.X., Wang, Z.C., Chen, X.Y., Sun, Y., Kong, Q.Y., Liu, J., Gao, X., Guan, H.W., Li, H. **(2005).** *Frequent loss of membranous E-cadherin in gastric cancers: A cross-talk with Wnt in determining the fate of beta-catenin.* Clin Exp Metastasis. 22(1):85-93.

Clevers, H. **(2006).** Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. Cell. 3;127(3):469-80.

Colomiere, M., Ward, A.C., Riley, C., Trenerry, M.K., Cameron-Smith, D., Findlay, J., Ackland, L., Ahmed, N. **(2009).** *Cross talk of signals between EGFR and IL-6R through JAK2/STAT3 mediate epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinomas.* Br J Cancer. 13;100(1):134-44.

Cross, D.A., Culbert, A.A., Chalmers, K.A., Facci, L., Skaper, S.D., Reith, A.D. (2001). *Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death*. J Neurochem. 77(1):94-102.

Cui, H., Meng, Y., Bulleit, R.F. **(1998).** *Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta activity regulates proliferation of cultured cerebellar granule cells*. Brain Res Dev Brain Res. 7;111(2):177-88.

Davis, M.A., Ireton, R.C., Reynolds, A.B. **(2003).** *A core function for p120-catenin in cadherin turnover.* J Cell Biol. 10;163(3):525-34.

Damiens, E., Baratte, B., Marie, D., Eisenbrand, G., Meijer, L. **(2001).** *Anti-mitotic properties of indirubin-3'-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest.* Oncogene. 28;20(29):3786-97.

de Carvalho, A.D., de Souza W, Morgado-Díaz JA. **(2006).** *Morphological and molecular alterations at the junctional complex in irradiated human colon adenocarcinoma cells, Caco-2.* Int J Radiat Biol. 82(9):658-68.

Desbois-Mouthon, C., Cadoret, A., Blivet-Van, Eggelpoël, M.J., Bertrand, F., Cherqui, G., Perret, C., Capeau, J. **(2001).** *Insulin and IGF-1 stimulate the beta-catenin pathway through two signalling cascades involving GSK-3beta inhibition and Ras activation.* Oncogene. 11;20(2):252-9.

Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F., Sherr, C.J. **(1998).** *Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization.* Genes Dev. 15;12(22):3499-511.

Ding, Q., Xia, W., Liu, J.C., Yang, J.Y., Lee, D.F., Xia, J., Bartholomeusz, G., Li, Y., Pan, Y., Li, Z., Bargou, R.C., Qin, J., Lai, C.C., Tsai, F.J., Tsai, C.H., Hung, M.C. **(2005).** *Erk associates with and primes GSK-3beta for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin.* Mol Cell. 22;19(2):159-70.

Dhawan, P., Singh, A.B., Deane, N.G., No, Y., Shiou, S.R., Schmidt, C., Neff, J., Washington, M.K., Beauchamp, R.D. **(2005).** *Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer*. J Clin Invest. 115(7):1765-76.

Doble, B.W., Woodgett, J.R. (2003). *GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase*. J Cell Sci. 1;116(Pt 7):1175-86.

Docherty, N.G., O'Sullivan, O.E., Healy, D.A., Murphy, M., O'neill, A.J., Fitzpatrick, J.M., Watson, R.W. **(2006).** *TGF-beta1-induced EMT can occur independently of its proapoptotic*

effects and is aided by EGF receptor activation. Am J Physiol Renal Physiol. 290(5):F1202-12.

Dominguez, I., Itoh, K., Sokol, S.Y. **(1995).** *Role of glycogen synthase kinase 3 beta as a negative regulator of dorsoventral axis formation in Xenopus embryos.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Aug 29;92(18):8498-502.

D'Souza-Schorey, C. **(2005).** *Disassembling adherens junctions: breaking up is hard to do*. Trends in Cell Biology 15, 19-26.

Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W.J., Weis, W.I. **(2005).** *Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly.* Cell. 2;123(5):903-15.

Ebnet, K., Aurrand-Lions, M., Kuhn, A., Kiefer, F., Butz, S., Zander, K., Meyer zu Brickwedde, M.K., Suzuki, A., Imhof, B.A., Vestweber, D. **(2003).** *The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity*. J Cell Sci. 1;116(Pt 19):3879-91.

Ebnet, K. **(2008).** *Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions.* Histochem Cell Biol. 130(1):1-20.

Ekstrand, A.J., Sugawa, N., James, C.D., Collins, V.P. **(1992).** *Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails.* Proc Natl Acad Sci U S A. 15;89(10):4309-13.

Eldar-Finkelman, H., Seger, R., Vandenheede, J.R., Krebs, E.G. **(1995).** *Inactivation of glycogen synthase kinase-3 by epidermal growth factor is mediated by mitogen-activated protein kinase/p90 ribosomal protein S6 kinase signaling pathway in NIH/3T3 cells.* J Biol Chem. 1995 Jan 20;270(3):987-90.

Faix, J., Breitsprecher, D., Stradal, T.E., Rottner, K. **(2009).** Filopodia: *Complex models for simple rods*. Int J Biochem Cell Biol. 41(8-9):1656-64.

Fearon, E.R., Vogelstein, B. **(1990).** *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell. 1;61(5):759-67.

Fevr, T., Robine, S., Louvard, D., Huelsken, J. **(2007).** *Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells.* Mol Cell Biol. 27(21):7551-9.

Fiol, C.J., Williams, J.S., Chou, C.H., Wang, Q.M., Roach, P.J., Andrisani, O.M. **(1994).** *A secondary phosphorylation of CREB341 at Ser129 is required for the cAMP-mediated control of gene expression. A role for glycogen synthase kinase-3 in the control of gene expression.* J Biol Chem. 23;269(51):32187-93.

Foltz, D.R., Santiago, M.C., Berechid, B.E., Nye, J.S. **(2002).** *Glycogen synthase kinase-3beta modulates notch signaling and stability*. Curr Biol. 25;12(12):1006-11.

Frame, S., Cohen, P. **(2001).** *GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery*. Biochem J. 1;359(Pt 1):1-16

Fukumoto, Y., Shintani, Y., Reynolds, A.B., Johnson, K.R., Wheelock, M.J. **(2008).** *The regulatory or phosphorylation domain of p120 catenin controls E-cadherin dynamics at the plasma membrane*. Exp Cell Res. 1;314(1):52-67.

Gao, L., Macara, I.G., Joberty, G. **(2002).** *Multiple splice variants of Par3 and of a novel related gene, Par3L, produce proteins with different binding properties.* Gene. 10;294(1-2):99-107.

Garcia de Palazzo, I.E., Adams, G.P., Sundareshan, P., Wong, A.J., Testa, J.R., Bigner, D.D., Weiner, L.M. **(1993).** *Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas.* Cancer Res. 15;53(14):3217-20.

Gregory, M.A., Qi, Y., Hann, S.R. **(2003).** *Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization.* J Biol Chem. 19;278(51):51606-12.

Grimes, C.A., Jope, R.S. **(2001).** *The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling.* Prog Neurobiol. 65(4):391-426.

Guger, K.A., Gumbiner, B.M. **(1995).** *beta-Catenin has Wnt-like activity and mimics the Nieuwkoop signaling center in Xenopus dorsal-ventral patterning.* Dev Biol. 172(1):115-25.

Haegebarth, A., Clevers, H. **(2009).** Wnt signaling, lgr5, and stem cells in the intestine and skin. Am J Pathol 174(3):715-21.

Hamazaki, Y., Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., Tsukita, S. **(2002).** *Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule*. J Biol Chem. 4;277(1):455-61.

Hanger, D.P., Hughes, K., Woodgett, J.R., Brion, J.P., Anderton, B.H. **(1992).** *Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase.* Neurosci Lett. 23;147(1):58-62.

Harms, B.D., Bassi, G.M., Horwitz, A.R., Lauffenburger, D.A. **(2005).** *Directional persistence of EGF-induced cell migration is associated with stabilization of lamellipodial protrusions.* Biophys J. 88(2):1479-88.

Hartigan, J.A., Johnson, G.V. **(1999).** *Transient increases in intracellular calcium result in prolonged site-selective increases in Tau phosphorylation through a glycogen synthase kinase 3beta-dependent pathway*. J Biol Chem. 23;274(30):21395-401.

He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. **(1998).** *Identification of c-MYC as a target of the APC pathway.* Science. 4;281(5382):1509-12.

He, J., Sheng, T., Stelter, A.A., Li, C., Zhang, X., Sinha, M., Luxon, B.A., Xie, J. **(2006).** *Suppressing Wnt signaling by the hedgehog pathway through sFRP-1*. J Biol Chem. 24;281(47):35598-602.

He, X., Saint-Jeannet, J.P., Woodgett, J.R., Varmus, H.E., Dawid, I.B. **(1995).** *Glycogen synthase kinase-3 and dorsoventral patterning in Xenopus embryos.* Nature. 13;374(6523):617-22.

Hedgepeth, C.M., Conrad, L.J., Zhang, J., Huang, H.C., Lee, V.M., Klein, P.S. (1997). *Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action*. Dev Biol. 1;185(1):82-91.

Hewitt, K.J., Agarwal, R., Morin, P.J. **(2006).** *The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues.* BMC Cancer. 12;6:186.

Hoeflich, K.P., Luo, J., Rubie, E.A., Tsao, M.S., Jin, O., Woodgett, J.R. **(2000).** *Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation.* Nature. 6;406(6791):86-90.

Holbro, T., Civenni, G., Hynes, N.E. **(2003).** *The ErbB receptors and their role in cancer progression*. Exp Cell Res. 10;284(1):99-110.

Hossain, Z., Hirata, T. **(2008).** *Molecular mechanism of intestinal permeability: interaction at tight junctions.* Mol Biosyst. 4(12):1181-5.

Hsieh, E.T., Shepherd, F.A., Tsao, M.S. **(2000).** *Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-alpha is independent of ras mutations in lung adenocarcinoma.* Lung Cancer. 29(2):151-7.

Huang, D., Du, X. **(2008).** *Crosstalk between tumor cells and microenvironment via Wnt pathway in colorectal cancer dissemination.* World J Gastroenterol. 28;14(12):1823-7.

Hugo, A.A., De Antoni, G.L., Pérez, P.F. **(2010).** Lactobacillus delbrueckii subsp lactis (strain CIDCA 133) resists the antimicrobial activity triggered by molecules derived from enterocyte-like Caco-2 cells. Lett Appl Microbiol. 2010 Jan 15.

Hurlstone, A., Clevers, H. **(2002).** *T-cell factors: turn-ons and turn-offs*. EMBO J. 15;21(10):2303-11.

Hynes, N.E., Lane, H.A. **(2005).** *ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors*. Nat Rev Cancer. 5(5):341-54.

Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S., Kikuchi, A. **(1998).** *Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin.* EMBO J. 2;17(5):1371-84.

Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., Tsukita, S. **(2005).** *Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells*. J Cell Biol. 19;171(6):939-45.

Jiang, Q., Zhou, C., Bi, Z., Wan, Y. **(2006).** *EGF-induced cell migration is mediated by ERK and PI3K/AKT pathways in cultured human lens epithelial cells.* J Ocul Pharmacol Ther. 22(2):93-102.

Jiang, X., Tan, J., Li, J., Kivimäe, S., Yang, X., Zhuang, L., Lee, P.L., Chan, M.T., Stanton, L.W., Liu, E.T., Cheyette, B.N., Yu, Q. **(2008).** *DACT3 is an epigenetic regulator of Wnt/beta-catenin signaling in colorectal cancer and is a therapeutic target of histone modifications.* Cancer Cell. 13(6):529-41.

Jiang, Y., Zou, L., Zhang, C., He, S., Cheng, C., Xu, J., Lu, W., Zhang, Y., Zhang, H., Wang, D., Shen, A. **(2009).** *PPARgamma and Wnt/beta-Catenin pathway in human breast cancer: expression pattern, molecular interaction and clinical/prognostic correlations.* J Cancer Res Clin Oncol.135(11):1551-9.

Jones, L.J., Veale, R.B. **(2003).** *Redistribution of beta-catenin in response to EGF and lithium signalling in human oesophageal squamous carcinoma cell lines.* Cancer Cell Int. 15;3(1):13.

Kaihara, T., Kusaka, T., Nishi, M., Kawamata, H., Imura, J., Kitajima, K., Itoh-Minami, R., Aoyama, N., Kasuga, M., Oda, Y., Hattori, M., Fujimori, T. **(2003).** *Dedifferentiation and decreased expression of adhesion molecules, E-cadherin and ZO-1, in colorectal cancer are closely related to liver metastasis*. J Exp Clin Cancer Res. 22(1):117-23.

Kausalya, P.J., Phua, D.C., Hunziker, W. **(2004).** *Association of ARVCF with zonula occludens (ZO)-1 and ZO-2: binding to PDZ-domain proteins and cell-cell adhesion regulate plasma membrane and nuclear localization of ARVCF.* Mol Biol Cell. 15(12):5503-15.

Kim, L., Liu, J., Kimmel, A.R. **(1999).** *The novel tyrosine kinase ZAK1 activates GSK3 to direct cell fate specification.* Cell. 12;99(4):399-408.

Kim, S.W., Park, J.I., Spring, C.M., Sater, A.K., Ji, H., Otchere, A.A., Daniel, J.M., McCrea, P.D. **(2004).** *Non-canonical Wnt signals are modulated by the Kaiso transcriptional repressor and p120-catenin.* Nat Cell Biol. 6(12):1212-20.

Klein, P.S., Melton, D.A. **(1996).** *A molecular mechanism for the effect of lithium on development.* Proc Natl Acad Sci U S A. 6;93(16):8455-9.

Kobielak, A., Fuchs, E. **(2006).** *Links between alpha-catenin, NF-kappaB, and squamous cell carcinoma in skin.* Proc Natl Acad Sci U S A. 14;103(7):2322-7.

Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P.J., Clevers, H. **(1998).** *Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4.* Nat Genet. 19(4):379-83.

Kwon, C., Arnold, J., Hsiao, E.C., Taketo, M.M., Conklin, B.R., Srivastava, D. **(2007).** *Canonical Wnt signaling is a positive regulator of mammalian cardiac progenitors.* Proc Natl Acad Sci U S A. 26;104(26):10894-9.

Lemmers, C., Michel, D., Lane-Guermonprez, L., Delgrossi, M.H., Médina, E., Arsanto, J.P., Le Bivic, A. **(2004).** *CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells.* Mol Biol Cell. 15(3):1324-33.

Lemoine, N.R., Jain, S., Silvestre, F., Lopes, C., Hughes, C.M., McLelland, E., Gullick, W.J., Filipe, M.I. **(1991).** *Amplification and overexpression of the EGF receptor and c-erbB-2 proto-oncogenes in human stomach cancer.* Br J Cancer. 64(1):79-83.

Lesort, M., Jope, R.S., Johnson, G.V. **(1999).** *Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3beta and Fyn tyrosine kinase.* J Neurochem. 72(2):576-84.

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

Li, Y., Zhang, X., Polakiewicz, R.D., Yao, T.P., Comb, M.J. **(2008).** *HDAC6 is required for epidermal growth factor-induced beta-catenin nuclear localization.* J Biol Chem. 9;283(19):12686-90.

Lindvall, C., Zylstra, C.R., Evans, N., West, R.A., Dykema, K., Furge, K.A., Williams, B.O. **(2009).** *The Wnt co-receptor Lrp6 is required for normal mouse mammary gland development.* PLoS One. 5;4(6):e5813.

Liu, Y., Wang, Y., Zhang, Y., Miao, Y., Zhao, Y., Zhang, P.X., Jiang, G.Y., Zhang, J.Y., Han, Y., Lin, X.Y., Yang, L.H., Li, Q.C., Zhao, C., Wang, E.H. **(2009).** *Abnormal expression of p120-catenin, E-cadherin, and small GTPases is significantly associated with malignant phenotype of human lung cancer*. Lung Cancer. 63(3):375-82.

Locker, M., Borday, C., Perron, M. **(2009).** *Stemness or not stemness? Current status and perspectives of adult retinal stem cells.* Curr Stem Cell Res Ther. 4(2):118-30.

Logan, C.Y., Nusse, R. **(2004).** *The Wnt signaling pathway in development and disease*. Annu Rev Cell Dev Biol. 20:781-810.

Lu, Z., Ghosh, S., Wang, Z., Hunter, T. **(2003).** *Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion.* Cancer Cell. 4(6):499-515.

Mandai, K., Nakanishi, H., Satoh, A., Obaishi, H., Wada, M., Nishioka, H., Itoh, M., Mizoguchi, A., Aoki, T., Fujimoto, T., Matsuda, Y., Tsukita, S., Takai, Y. **(1997).** *Afadin: A novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adherens junction.* J Cell Biol. 20;139(2):517-28.

Martinez, A., Castro, A., Dorronsoro, I., Alonso, M. **(2002).** *Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitors as new promising drugs for diabetes, neurodegeneration, cancer, and inflammation.* Med Res Rev. 22(4):373-84.

Matsuda, Y., Schlange, T., Oakeley, E.J., Boulay, A., Hynes, N.E. **(2009).** *WNT signaling enhances breast cancer cell motility and blockade of the WNT pathway by sFRP1 suppresses MDA-MB-231 xenograft growth.* Breast Cancer Res. 11(3):R32.

Mayerle, J., Friess, H., Büchler, M.W., Schnekenburger, J., Weiss, F.U., Zimmer, K.P., Domschke, W., Lerch, M.M. **(2003).** *Up-regulation, nuclear import, and tumor growth stimulation of the adhesion protein p120 in pancreatic cancer.* Gastroenterology. 124(4):949-60.

McNeil, E., Capaldo, C.T., Macara, I.G. **(2006).** *Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells.* Mol Biol Cell. 17(4):1922-32.

Mees, S.T., Mennigen, R., Spieker, T., Rijcken, E., Senninger, N., Haier, J., Bruewer, M. **(2009).** *Expression of tight and adherens junction proteins in ulcerative colitis associated colorectal carcinoma: upregulation of claudin-1, claudin-3, claudin-4, and beta-catenin*. Int J Colorectal Dis. 24(4):361-8.

Mettey, Y., Gompel, M., Thomas, V., Garnier, M., Leost, M., Ceballos-Picot, I., Noble, M., Endicott, J., Vierfond, J.M., Meijer, L. **(2003).** *Aloisines, a new family of CDK/GSK-3 inhibitors. SAR study, crystal structure in complex with CDK2, enzyme selectivity, and cellular effects.* J Med Chem. 16;46(2):222-36.

Michel, D., Arsanto, J.P., Massey-Harroche, D., Béclin, C., Wijnholds, J., Le Bivic, A. **(2005).** *PATJ connects and stabilizes apical and lateral components of tight junctions in human intestinal cells.* J Cell Sci. 1;118(Pt 17):4049-57.

Morgado-Díaz, J.A., de Souza, W. **(2001).** *Evidence that increased tyrosine phosphorylation causes disassembly of adherens junctions but does not perturb paracellular permeability in Caco-2 cells.* Tissue Cell. 33(5):500-13.

Mori, H., Hirabayashi, S., Shirasawa, M., Sugimura, H., Hata, Y. **(2004).** *JAM4 enhances hepatocyte growth factor-mediated branching and scattering of Madin-Darby canine kidney cells.* Genes Cells. 9(9):811-9.

Moroi, S., Saitou, M., Fujimoto, K., Sakakibara, A., Furuse, M., Yoshida, O., Tsukita, S. **(1998).** *Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/rat but not human/guinea pig Sertoli cells in testes.* Am J Physiol. 274(6 Pt 1):C1708-17.

Nagai-Tamai, Y., Mizuno, K., Hirose, T., Suzuki, A., Ohno, S. **(2002).** *Regulated protein-protein interaction between aPKC and PAR-3 plays an essential role in the polarization of epithelial cells.* Genes Cells. 7(11):1161-71.

Naik, U.P., Naik, M.U. **(2008).** *Putting the brakes on cancer cell migration: JAM-A restrains integrin activation.* Cell Adh Migr. 2(4):249-51.

Néel, B.D., Lopez, J., Chabadel, A., Gillet, G. **(2009).** *Lithium suppresses motility and invasivity of v-src-transformed cells by glutathione-dependent activation of phosphotyrosine phosphatases.* Oncogene. 2009 Sep 10;28(36):3246-60.

Nelson, W.J., Nusse, R. **(2004).** *Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways.* Science 303, 1483-7.

Nighot, P.K., Moeser, A.J., Ryan, K.A., Ghashghaei, T., Blikslager, A.T. **(2009).** *ClC-2 is required for rapid restoration of epithelial tight junctions in ischemic-injured murine jejunum*. Exp Cell Res. 1;315(1):110-8.

Nikolakaki, E., Coffer, P.J., Hemelsoet, R., Woodgett, J.R., Defize, L.H. **(1993).** *Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates Jun family members in vitro and negatively regulates their transactivating potential in intact cells.* Oncogene. 8(4):833-40.

Nowicki, M.O., Dmitrieva, N., Stein, A.M., Cutter, J.L., Godlewski, J., Saeki, Y., Nita, M., Berens, M.E., Sander, L.M., Newton, H.B., Chiocca, E.A., Lawler, S. **(2008).** *Lithium inhibits invasion of glioma cells; possible involvement of glycogen synthase kinase-3.* Neuro Oncol. 10(5):690-9.

Nusse, R., Varmus, H.E. **(1982).** *Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome.* Cell. 31(1):99-109.

Nusse, R. **(2008).** *Wnt signaling and stem cell control*. Cell Res.18(5):523-7.

Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E. (1980). *Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila*. Nature. 30;287(5785):795-801.

Ogden, S.R., Wroblewski, L.E., Weydig, C., Romero-Gallo, J., O'Brien, D.P., Israel, D.A., Krishna, U.S., Fingleton, B., Reynolds, A.B., Wessler, S., Peek, R.M. Jr. **(2008).** *p120 and Kaiso regulate Helicobacter pylori-induced expression of matrix metalloproteinase-7.* Mol Biol Cell. 19(10):4110-21.

Ohno, S. **(2001).** *Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity*. Curr Opin Cell Biol. 13(5):641-8.

Oliveira, S.S., de Oliveira, I.M., De Souza, W., Morgado-Díaz, J.A. **(2005).** *Claudins upregulation in human colorectal cancer.* FEBS Lett. 7;579(27):6179-85. Epub 2005 Oct 13.

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

Ooshio, T., Irie, K., Morimoto, K., Fukuhara, A., Imai, T., Takai, Y. **(2004).** *Involvement of LMO7 in the association of two cell-cell adhesion molecules, nectin and E-cadherin, through afadin and alpha-actinin in epithelial cells.* J Biol Chem. 23;279(30):31365-73.

Ooshio, T., Fujita, N., Yamada, A., Sato, T., Kitagawa, Y., Okamoto, R., Nakata, S., Miki, A., Irie, K., Takai, Y. **(2007).** *Cooperative roles of Par-3 and afadin in the formation of adherens and tight junctions.* J Cell Sci. 15;120(Pt 14):2352-65.

Owen, R., Gordon-Weeks, P.R. **(2003).** *Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta in sensory neurons in culture alters filopodia dynamics and microtubule distribution in growth cones.* Mol Cell Neurosci. 2003 Aug;23(4):626-37.

Pardo, R., Andreolotti, A.G., Ramos, B., Picatoste, F., Claro, E. **(2003).** *Opposed effects of lithium on the MEK-ERK pathway in neural cells: inhibition in astrocytes and stimulation in neurons by GSK3 independent mechanisms*. J Neurochem. 87(2):417-26.

Park, J.H., Han, H.J.. **(2009).** *Caveolin-1 plays important role in EGF-induced migration and proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of PI3K/Akt and ERK.* Am J Physiol Cell Physiol. 297(4):C935-44.

Patel, S., Doble, B., Woodgett, J.R. **(2004).** *Glycogen synthase kinase-3 in insulin and Wnt signalling: a double-edged sword?* Biochem Soc Trans. 32(Pt 5):803-8.

Perez-Moreno, M., Fuchs, E. **(2006).** *Catenins: keeping cells from getting their signals crossed.* Dev Cell. 2006 Nov;11(5):601-12.

Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., Clevers, H. **(2003).** *Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium.* Genes Dev. 15;17(14):1709-13.

Pinto, D., Clevers, H. **(2005).** *Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium.* Exp Cell Res. 10;306(2):357-63.

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

Punt, C.J., Tol, J. **(2009).** *More is less -- combining targeted therapies in metastatic colorectal cancer.* Nat Rev Clin Oncol. 6(12):731-3.

Quevedo, C., Alcázar, A., Salinas, M. **(2000).** *Two different signal transduction pathways are implicated in the regulation of initiation factor 2B activity in insulin-like growth factor-1-stimulated neuronal cells.* J Biol Chem. 23;275(25):19192-7.

Radisky, D.C. **(2005).** *Epithelial-mesenchymal transition.* Journal of Cell Science. 118, 4325-4326.

Radtke, F, Clevers H. **(2005).** *Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin*. Science. 2005 Mar 25;307(5717):1904-9.

Rayasam, G.V., Tulasi, V.K., Sodhi, R., Davis, J.A., Ray, A. **(2009).** *Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake.* Br J Pharmacol. 156(6):885-98.

Riazuddin, S., Ahmed, Z.M., Fanning, A.S., Lagziel, A., Kitajiri, S., Ramzan, K., Khan, S.N., Chattaraj, P., Friedman, P.L., Anderson, J.M., Belyantseva, I.A., Forge, A., Riazuddin, S., Friedman, T.B. **(2006).** *Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing.* Am J Hum Genet. 79(6):1040-51.

Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., Nusse, R. **(1987).** *The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless.* Cell. 14;50(4):649-57.

Ronaldson, P.T., Demarco, K.M., Sanchez-Covarrubias, L., Solinsky, C.M., Davis, T.P. **(2009).** *Transforming growth factor-beta signaling alters substrate permeability and tight junction protein expression at the blood-brain barrier during inflammatory pain.* J Cereb Blood Flow Metab. 29(6):1084-98.

Ruel, L., Bourouis, M., Heitzler, P., Pantesco, V., Simpson, P. **(1993).** *Drosophila shaggy kinase and rat glycogen synthase kinase-3 have conserved activities and act downstream of Notch*. Nature. 8;362(6420):557-60.

Rylatt, D.B., Aitken, A., Bilham, T., Condon, G.D., Embi, N., Cohen, P. **(1980).** *Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Amino acid sequence at the sites phosphorylated by glycogen synthase kinase-3, and extension of the N-terminal sequence containing the site phosphorylated by phosphorylase kinase.* Eur J Biochem. 107(2):529-37.

Ryves, W.J., Harwood, A.J. **(2001).** *Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium.* Biochem Biophys Res Commun. 26;280(3):720-5.

Sääf, A.M., Halbleib, J.M., Chen, X., Yuen, S.T., Leung, S.Y., Nelson, W.J., Brown, P.O. **(2007).** *Parallels between global transcriptional programs of polarizing Caco-2 intestinal epithelial cells in vitro and gene expression programs in normal colon and colon cancer.* Mol Biol Cell. 18(11):4245-60.

Saito, Y., Vandenheede, J.R., Cohen, P. **(1994).** *The mechanism by which epidermal growth factor inhibits glycogen synthase kinase 3 in A431 cells*. Biochem J. 1;303

Saitou, M., Fujimoto, K., Doi, Y., Itoh, M., Fujimoto, T., Furuse, M., Takano, H., Noda, T., Tsukita, S. **(1998).** Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol. 1998 Apr 20;141(2):397-408.*

Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., Tsukita, S. **(2000).** *Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands.* Mol Biol Cell. 2000 Dec;11(12):4131-42.

Sallee, J.L., Burridge, K. **(2009).** *Density-enhanced phosphatase 1 regulates phosphorylation of tight junction proteins and enhances barrier function of epithelial cells*. J Biol Chem. 29;284(22):14997-5006.

Salomon, D.S., Normanno, N., Ciardiello, F., Brandt, R., Shoyab, M., Todaro, G.J. **(1995).** *The role of amphiregulin in breast cancer.* Breast Cancer Res Treat. 33(2):103-14.

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

Sauter, G., Haley, J., Chew, K., Kerschmann, R., Moore, D., Carroll, P., Moch, H., Gudat, F., Mihatsch, M.J., Waldman, F. **(1994).** *Epidermal-growth-factor-receptor expression is associated with rapid tumor proliferation in bladder cancer*. Int J Cancer. 15;57(4):508-14.

Seth, D., Shaw, K., Jazayeri, J., Leedman, P.J. **(1999).** *Complex post-transcriptional regulation of EGF-receptor expression by EGF and TGF-alpha in human prostate cancer cells*. Br J Cancer. 80(5-6):657-69.

Severson, E.A., Lee, W.Y., Capaldo, C.T., Nusrat, A., Parkos, C.A. **(2009).** *Junctional adhesion molecule A interacts with Afadin and PDZ-GEF2 to activate Rap1A, regulate beta1 integrin levels, and enhance cell migration.* Mol Biol Cell. 20(7):1916-25.

Shin, K., Straight, S., Margolis, B. **(2005).** *PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells*. J Cell Biol. 28;168(5):705-11.

Shin, K., Fogg, V.C., Margolis, B. **(2006).** *Tight junctions and cell polarity*. Annu Rev Cell Dev Biol. 22:207-35.

Singh, A.B., Harris, R.C. **(2004).** *Epidermal growth factor receptor activation differentially regulates claudin expression and enhances transepithelial resistance in Madin-Darby canine kidney cells.* J Biol Chem. 2004 Jan 30;279(5):3543-52.

Sinha, D., Wang, Z., Ruchalski, K.L., Levine, J.S., Krishnan, S., Lieberthal, W., Schwartz, J.H., Borkan, S.C. **(2005).** *Lithium activates the Wnt and phosphatidylinositol 3-kinase Akt signaling pathways to promote cell survival in the absence of soluble survival factors.* Am J Physiol Renal Physiol. 288(4):F703-13.

Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A. **(1989).** *Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer*. Science. 12;244(4905):707-12.

Slusarski, D.C., Pelegri, F. **(2007).** *Calcium signaling in vertebrate embryonic patterning and morphogenesis*. Dev Biol. 1;307(1):1-13.

Solmi, R., Lauriola, M., Francesconi, M., Martini, D., Voltattorni, M., Ceccarelli, C., Ugolini, G., Rosati, G., Zanotti, S., Montroni, I., Mattei, G., Taffurelli, M., Santini, D., Pezzetti, F., Ruggeri, A., Castellani, G., Guidotti, L., Coppola, D., Strippoli, P. **(2008).** *Displayed correlation between gene expression profiles and submicroscopic alterations in response to cetuximab, gefitinib and EGF in human colon cancer cell lines*. BMC Cancer. 8;8:227.

Sourisseau, T., Georgiadis, A., Tsapara, A., Ali, R.R., Pestell, R., Matter, K., Balda, M.S. **(2006).** *Regulation of PCNA and cyclin D1 expression and epithelial morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA.* Mol Cell Biol. 26(6):2387-98.

Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hlubek, F., Jung, A., Kirchner, T., Brabletz, T. **(2007).** *Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions during cancer progression*. Verh Dtsch Ges Pathol. 91:21-8.

Spano, J.P., Fagard, R., Soria, J.C., Rixe, O., Khayat, D., Milano, G. **(2005).** *Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives*. Ann Oncol.16(2):189-94.

Steeg, P.S. **(2003).** Steeg PS. *Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells*. Nat Rev Cancer. 3(1):55-63.

Straight, S.W., Shin, K., Fogg, V.C., Fan, S., Liu, C.J., Roh, M., Margolis, B. **(2004).** *Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects.* Mol Biol Cell. 15(4):1981-90.

Stump, R.J., Lovicu, F.J., Ang, S.L., Pandey, S.K., McAvoy, J.W. **(2006).** *Lithium stabilizes the polarized lens epithelial phenotype and inhibits proliferation, migration, and epithelial mesenchymal transition*. J Pathol. 210(2):249-57.

Sun, A., Shanmugam, I., Song, J., Terranova, P.F., Thrasher, J.B., Li, B. **(2007).** *Lithium suppresses cell proliferation by interrupting E2F-DNA interaction and subsequently reducing S-phase gene expression in prostate cancer*. Prostate. 15;67(9):976-88.

Sutherland, C., Leighton, I.A., Cohen, P. (1993). *Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling.* Biochem J. 15;296 (Pt 1):15-9.

Suzuki, T., Elias, B.C., Seth, A., Shen, L., Turner, J.R., Giorgianni, F., Desiderio, D., Guntaka, R., Rao, R. **(2009).** *PKC eta regulates occludin phosphorylation and epithelial tight junction integrity.* Proc Natl Acad Sci U S A. 6;106(1):61-6.

Takai, Y., Nakanishi, H. **(2003)** *Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions*. J Cell Sci. 1;116(Pt 1):17-27.

Takehara, M., Nishimura, T., Mima, S., Hoshino, T., Mizushima, T. **(2009).** *Effect of claudin expression on paracellular permeability, migration and invasion of colonic cancer cells.* Biol Pharm Bull. 32(5):825-31.

Tan, X., Apte, U., Micsenyi, A., Kotsagrelos, E., Luo, J.H., Ranganathan, S., Monga, D.K., Bell, A., Michalopoulos, G.K., Monga, S.P. **(2005).** *Epidermal growth factor receptor: a novel target of the Wnt/beta-catenin pathway in liver.* Gastroenterology. 129(1):285-302.

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

Tanaka, T. **(2009).** *Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies.* J Carcinog. 8:5.

Tenenbaum, T., Matalon, D., Adam, R., Seibt, A., Wewer, C., Schwerk, C., Galla, H.J., Schroten, H. **(2008).** *Dexamethasone prevents alteration of tight junction-associated proteins and barrier function in porcine choroid plexus epithelial cells after infection with Streptococcus suis in vitro.* Brain Res. 10;1229:1-17.

Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R., Fehon, R. **(2001).** *Epithelial cell polarity and cell junctions in Drosophila.* Annu Rev Genet. 35:747-84.

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

Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., Nieto, M.A. **(2009).** *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease.* Cell. 25;139(5):871-90.

Tian, Y.C., Chen, Y.C., Chang, C.T., Hung, C.C., Wu, M.S., Phillips, A., Yang, C.W. **(2007).** *Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 enhance HK-2 cell migration*

through a synergistic increase of matrix metalloproteinase and sustained activation of ERK signaling pathway. Exp Cell Res. 1;313(11):2367-77.

Traweger, A., Fuchs, R., Krizbai, I.A., Weiger, T.M., Bauer, H.C., Bauer, H. **(2003).** *The tight junction protein ZO-2 localizes to the nucleus and interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein scaffold attachment factor-B.* J Biol Chem. 2003 Jan 24;278(4):2692-700.

Tsuji, T., Ibaragi, S., Hu, G.F. **(2009).** *Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis.* Cancer Res. 15;69(18):7135-9.

Tsukita, S., Furuse, M., Itoh, M. **(2001).** *Multifunctional strands in tight junctions.* Nat Rev Mol Cell Biol. 2(4):285-93.

Turenne, G.A., Price, B.D., Turenne, G.A., Price, B.D. **(2001).** *Glycogen synthase kinase3 beta phosphorylates serine 33 of p53 and activates p53's transcriptional activity*. BMC Cell Biol. 2:12.

Umeda, K., Matsui, T., Nakayama, M., Furuse, K., Sasaki, H., Furuse, M., Tsukita, S. **(2004).** *Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1.* J Biol Chem. 2004 Oct 22;279(43):44785-94.

Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M., Tsukita, S. **(2006).** *ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation.* Cell. 25;126(4):741-54.

Umekita, Y., Ohi, Y., Sagara, Y., Yoshida, H. **(2000).** *Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-alpha predicts worse prognosis in breast-cancer patients*. Int J Cancer. 20;89(6):484-7.

Uttamsingh, S., Bao, X., Nguyen, K.T., Bhanot, M., Gong, J., Chan, J.L., Liu, F., Chu, T.T., Wang, L.H. **(2008).** *Synergistic effect between EGF and TGF-beta1 in inducing oncogenic properties of intestinal epithelial cells.* Oncogene. 17;27(18):2626-34.

van Es, J.H., Clevers, H**. (2005).** *Notch and Wnt inhibitors as potential new drugs for intestinal neoplastic disease.* Trends Mol Med. 11(11):496-502.

van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A.P., Tjon-Pon-Fong, M., Moerer, P., van den Born, M., Soete, G., Pals, S., Eilers, M., Medema, R., Clevers, H. **(2002).** *The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells.* Cell. 18;111(2):241-50.

van der Flier, L.G., Clevers, H. **(2009).** *Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium.* Annu Rev Physiol. 71:241-60.

van Roy, F.M., McCrea, P.D. **(2005).** *A role for Kaiso-p120ctn complexes in cancer?* Nat Rev Cancer. 5(12):956-64

Veeman, M.T., Axelrod, J.D., Moon, R.T. **(2003).** *A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling.* Dev Cell. 5(3):367-77.

Verma, M.K., Lenka, N. **(2009).** *Temporal and Contextual Orchestration of Cardiac Fate by WNT-BMP Synergy and Threshold.* J Cell Mol Med. 2009 May 11.

Vestweber, D. **(2001).** *The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM).* EMBO J. 16;20(14):3738-48.

Viatour, P., Dejardin, E., Warnier, M., Lair, F., Claudio, E., Bureau, F., Marine, J.C., Merville, M.P., Maurer, U., Green, D., Piette, J., Siebenlist, U., Bours, V., Chariot, A. **(2004).** GSK3-mediated BCL-3 phosphorylation modulates its degradation and its oncogenicity. Mol Cell. 8;16(1):35-45.

Vincan, E., Barker, N. **(2008).** *The upstream components of the Wnt signalling pathway in the dynamic EMT and MET associated with colorectal cancer progression.* Clin Exp Metastasis. 2008;25(6):657-63.

Vlad, A., Röhrs, S., Klein-Hitpass, L., Müller, O. *The first five years of the Wnt targetome*. Cell Signal. 20(5):795-802.

Vogelmann, R., Nelson W.J**. (2005).** *Fractionation of the epithelial apical junctional complex: reassessment of protein distributions in different substructures.* Mol Biol Cell. 16(2):701-16.

Wang, J., Wynshaw-Boris, A. **(2004).** *The canonical Wnt pathway in early mammalian embryogenesis and stem cell maintenance/differentiation.* Curr Opin Genet Dev. 14(5):533-9.

Wang, J.S., Wang, C.L., Wen, J.F., Wang, Y.J., Hu, Y.B., Ren, H.Z. **(2008).** *Lithium inhibits proliferation of human esophageal cancer cell line Eca-109 by inducing a G2/M cell cycle arrest.* World J Gastroenterol. 2008 Jul 7;14(25):3982-9.

Wang, Q., Zheng, J.Y., Kreth, J., Yan, X., Kamata, M., Campbell, R.A., Xie, Y., Chiu, R., Berenson, J.R., Shi, W., Chen, I.S., Pang, S. **(2009).** *Regulation of prostate-specific antigen expression by the junctional adhesion molecule A.* Urology. 73(5):1119-25.

Wikstrand, C.J., Hale, L.P., Batra, S.K., Hill, M.L., Humphrey, P.A., Kurpad, S.N., McLendon, R.E., Moscatello, D., Pegram, C.N., Reist, C.J. **(1995).** *Monoclonal antibodies against*

EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. Cancer Res. 15;55(14):3140-8.

Woodgett, J.R. **(1991).** cDNA *cloning and properties of glycogen synthase kinase-3.* Methods Enzymol. 200:564-77.

Wu, X., Golden, K., Bodmer, R. **(1995).** *Heart development in Drosophila requires the segment polarity gene wingless.* Dev Biol. 169(2):619-28.

Wu, Y., Shang, Y., Sun, S., Liang, H., Liu, R. **(2007).** *Erythropoietin prevents PC12 cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis via the Akt/GSK-3beta/caspase-3 mediated signaling pathway.* Apoptosis. 12(8):1365-75.

Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W.I., Nelson, W.J. **(2005).** *Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex.* Cell. 2;123(5):889-901.

Zhong, Y., Smart, E.J., Weksler, B., Couraud, P.O., Hennig, B., Toborek, M. **(2008).** *Caveolin-1 regulates human immunodeficiency virus-1 Tat-induced alterations of tight junction protein expression via modulation of the Ras signaling.* J Neurosci. 30;28(31):7788-96.

Zhurinsky, J., Shtutman, M., Ben-Ze'ev, A. **(2000).** *Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles*. J Cell Sci. 113:3127-39.

Zvaifler, N.J. **(2006).** *Relevance of the stroma and epithelial-mesenchymal transition (EMT) for the rheumatic diseases.* Arthritis Res Ther.8(3):210.