



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

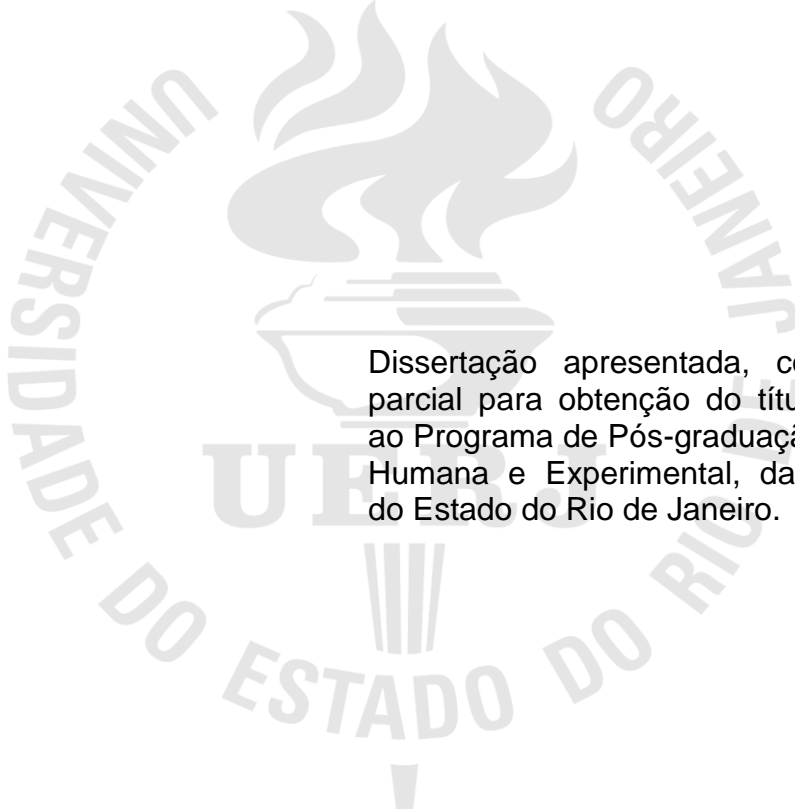
Lílian Gonçalves R. Bastos

**Dose terapêutica de radiação ionizante induz um fenótipo migratório em células de carcinoma de colon humano (CACO-2):
vias de sinalização envolvidas**

Rio de Janeiro
2009

Lílian Gonçalves R. Bastos

**Dose terapêutica de radiação ionizante induz um fenótipo migratório em
células de carcinoma de colon humano (caco-2):
vias de sinalização envolvidas**



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

Orientador: Dr. José Andrés Morgado Díaz

Rio de Janeiro

2009

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

B237 Bastos, Lílian Gonçalves R.

Dose terapêutica de radiação ionizante induz um fenótipo migratório em células de carcinoma de colon humano (CACO-2): vias de sinalização envolvidas / Lílian Gonçalves R. Bastos. - 2009.
107 f.

Orientador: José Andrés Morgado Díaz.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Neoplasias colorretais - Teses. 2. Junções aderentes - Teses. 3. Radioterapia - Teses. 4. Citoesqueleto - Teses. I. Díaz, José Andrés Morgado. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.348/.351-006.6

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

Assinatura

Data

Lílian Gonçalves R. Bastos

**Dose terapêutica de radiação ionizante induz um fenótipo migratório em
células de carcinoma de colon humano (caco-2):
vias de sinalização envolvidas**

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

Aprovada em 17 de julho de 2009.

Banca Examinadora:

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

Prof^a. Dra. Ana Carolina Stumbo Machado
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Prof. Dr. Ricardo Luis Alves Silva
Centro de pesquisas do Instituto Nacional do Câncer - INCA

Rio de Janeiro

2009

DEDICATÓRIA

Aos meus maravilhosos e queridos pais, à Vovó Nair, à Marlú e Dê “cabeção”, ao Marcus e à Tetê, que com certeza, está sempre presente.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus pela oportunidade de estar aqui e por me iluminar e dar forças nos momentos difíceis;

Aos meus pais que sempre me apoiaram incondicionalmente em minha trajetória e sempre priorizaram os estudos em nossa família; e além disso, aos “chazinhos pro estômago”, bolos e guloseimas que minha mãe deixava em minha mesa de estudos ao longo das escrituras infinitas!!!

Aos meus irmãos Livia e Reizer pelo incentivo;

Agradeço ao Marcus, meu namorado, amigo, companheiríssimo, que além de ter muita paciência comigo, sempre me incentivou e foi capaz de ficar em casa, ao meu lado, me fazendo companhia enquanto eu escrevia boa parte da tese! Coitado....!

À Melanina, minha cachorrinha linda que também é muito companheira e ficava sempre por perto;

Agradeço à vovó Nair, minha vovozinha maravilhosa, pelo amor e carinho;

À Marlú e Dê, por tudo que fazem por mim nessa vida;

À Bibi pelo incentivo e risadas durante um lanche e outro;

Ao Professor José, que foi capaz de me aceitar em seu laboratório mesmo com quase um ano de mestrado concluído. Sou imensamente grata pelo fato de você ter me acolhido naquele momento;

Aos membros do Laboratório: Rho-c (segundo a Fernanda!), Walzinho, Fernanda bigorna, Tanakón, Wallace *goat*, Jú tube, Obina, Thaline, Sissi, Deiróóó, Flavinha, Jútube e Sarali. Pessoas maravilhosas que além de companheiros de trabalho, somos AMIGOS e constituímos uma família. Obrigada pela atenção de todos vocês ao longo das minhas dúvidas, pelos momentos engraçadíssimos, por me ajudarem a atravessar o ano passado, o qual vocês sabem o quanto foi pesado psicologicamente pra mim; e por segurar minha “onda” nos meus momentos “*Emy*” bááásicos...!! Vocês são demais!!

E à todos os outros amigos que me acompanharam nessa caminhada que marca uma nova fase da minha vida.

“ Os estudos devem ter por finalidade
a orientação do espírito, para que possamos
formular juízos firmes e verdadeiros, sobre
todas as coisas que lhe apresentam”
René Descartes (1560-1650).

“...Por isso sem temer,
Foi sempre o nosso lema
Buscarmos no saber
A perfeição suprema...”

Música: Francisco Braga; Letra: Hamilton Elia
Trecho do Hino do Colégio Pedro II,
onde estudei com muito orgulho.

RESUMO

BASTOS, Lílian Gonçalves R. *Dose terapêutica de radiação ionizante induz um fenótipo migratório em células de carcinoma de colon humano (caco-2): vias de sinalização envolvidas*. 2009. 114 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

O câncer colo-retal é a terceira neoplasia mais frequente em todo o mundo e a recorrência local e neoplasia refratária são desafios no tratamento do câncer colo-retal após a cirurgia convencional. Com o intuito de controlar a recorrência e aumentar a média de sobrevida dos pacientes, uma estratégia multidisciplinar que combina a radioterapia (RT) e a quimioterapia com o processo cirúrgico tem sido protocolo clínico de escolha. Embora esta combinação seja capaz de otimizar o tratamento, nem todos os pacientes são beneficiados com o protocolo quimio-rádio combinado, uma vez que existem os insucessos terapêuticos relacionados com a incidência de neoplasias secundárias tardias em pacientes que foram submetidos à RT para tratamento de neoplasias anteriores. Além da doença refratária, outro agravante da RT são os efeitos colaterais produzidos pela radiação ionizante (IR), em especial àqueles do trato gastrointestinal. Estes efeitos estão relacionados com alterações da homeostase do epitélio intestinal, através da desorganização dos complexos juncionais. Porém, os mecanismos que medeiam estes efeitos ainda não estão elucidados. Este estudo avaliou as vias de sinalização que medeiam os efeitos da IR em células Caco-2. Foi observado que a IR causa uma desorganização da junção aderente via Src, EGFR e MAPK, sendo estas alterações acompanhadas por desorganização do citoesqueleto de actina em todo o volume celular. Src, EGFR e MAPK participam de maneira diferenciada na modulação destes efeitos. Observamos também que a radiação aumenta a motilidade dessas células via Src e MAPK e não induz alteração na proliferação celular até 48 horas após o tratamento. Este é o primeiro trabalho que correlaciona vias de sobrevivência celular como Src, EGFR e MAPK com alterações nas proteínas de junção aderente, alterações do citoesqueleto e migração celular. Estes eventos são relacionados aos efeitos colaterais primários e tardios induzidos pela IR, e podem favorecer à aquisição de um fenótipo maligno herdável durante o fracionamento de doses na RT, favorecendo a progressão tumoral do câncer colo-retal. Logo, além da correlação das vias de sinalização envolvidas nos eventos induzidos pela IR mostrados neste estudo, os resultados também corroboram para um melhor entendimento da atividade farmacológica dos inibidores químicos utilizados, uma vez que muitos deles encontram-se em fase de ensaios pré-clínicos e clínicos.

Palavras-chave: Câncer colo-retal. Junções aderentes. Radioterapia. Citoesqueleto.

ABSTRACT

The colorectal cancer (CRC) is one of the most common tumours among population and the local recurrence and second malignancies still the main problem in the treatment of CRC. Radiotherapy (RT) is used as first line of treatment in combination with surgical process. To improve better results, multidisciplinary strategies that use RT, surgical process and chemotherapy have been used in clinical protocols. However, not all over the patients get the successfully therapeutic, and disease refractory has become occurred. Furthermore, beside the acute and later effects after RT, in special at gastrointestinal tract, are so important to improve quality of life for patients. These effects are correlated with alterations at intestinal epithelium homeostasis, with apical junctions (AJ) disassembly. The signaling pathways that mediate these alterations are not elucidated. The aim of this study was investigate the cell signaling pathways that guide the IR effect on AJ disassembly, cytoskeleton organization, the migratory potential and the cell proliferation in Caco-2 cells. Ours results showed that the disassembly of AJ by IR was mediate by Src, EGFR and MAPK. These effects were accompanied by cytoskeleton disorganization at all over cellular volume. Src, EGFR and MAPK are involved in this process in a differential manner. We also observed that IR induces a migratory potential in Caco-2 cells by Src and MAPK pathways and didn't alters the cell proliferation at 48 hours. This is the first work that correlated cell signaling survival (Src, EGFR, and MAPK) and cell-cell contacts disassembly, actin cytoskeleton reorganization and cell migration, events that guide acute and later effects of IR. These events, in turn, induce a heritable malignant phenotype during radiotherapy fractionation and improve CRC tumour progression at later stages. In conclusion, the study of signaling pathways that guide these effects are important to understand the recurrence of disease after radiotherapy and a better understanding of pharmacological activity of these chemical inhibitors used here, once that some of them are used in pre-clinical studies.

Keywords: Colorectal cancer. Adherent junctions. Radiotherapy. Cytoskeleton.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação espacial das taxas de incidência de neoplasia maligna do cólon e reto por 100 mil mulheres/homens, estimadas para o ano de 2009.....	17
Figura 2 –	Mudanças histopatológicas resultantes de alterações genéticas, definindo a sequência adenoma-carcinoma do câncer colo-retal...	22
Figura 3 –	Relação entre perfil de expressão gênica e compartimentalização celular diferenciada no epitélio intestinal normal.....	24
Figura 4 –	Representação esquemática da via de sinalização <i>Wnt</i>	26
Figura 5 –	Modelo esquemático do complexo juncional.....	28
Figura 6 –	Vias de transporte formadas pelas células epiteliais.....	29
Figura 7 –	Estrutura e composição molecular das junções <i>tight</i>	30
Figura 8 –	Representação esquemática da estrutura das proteínas integrais da junção <i>tight</i> : Claudina, ocludina, tricelulina e JAMs.....	33
Figura 9 –	Modelo esquemático dos constituintes moleculares da junção aderente.....	35
Figura 10 –	Esquema mostrando a organização estrutural do complexo E-caderina- β catenina na junção entre duas células epiteliais vizinhas.....	37
Figura 11 –	Modelo funcional da α -catenina na regulação dinâmica do citoesqueleto e na organização inicial do contato célula-célula.....	39
Figura 12 –	Esquema mostrando a progressão tumoral em epitélios.....	44
Figura 13 –	Vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento da TEM.....	45
Figura 14 –	Mecanismos envolvidos no <i>stress</i> celular.....	46
Figura 15 –	Paradigma antigo da radiação (centralização dos efeitos no DNA) e o novo paradigma (propagação da instabilidade genômica).....	48
Figura 16 –	Fases do processo de cicatrização e fibrose induzida pela radiação na escala do tempo.....	50
Figura 17 –	Representação esquemática da rede de sinalização envolvendo NF-kB na radiorresistência adaptativa induzida pela radiação.....	51
Figura 18 –	Redistribuição da E-caderina induzida pela radiação ionizante.....	63

Figura 19 –	Localização subcelular de E-caderina após a radiação.....	65
Figura 20 –	Redistribuição da β -catenina induzida pela radiação ionizante.....	67
Figura 21 –	Localização subcelular de β -catenina após a radiação.....	68
Figura 22 –	Expressão total de E-caderina após a irradiação.....	69
Figura 23 –	Expressão total de β -catenina após a irradiação.....	70
Figura 24 –	Efeito da radiação ionizante na distribuição do citoesqueleto de actina 1 hora após o tratamento.....	73
Figura 25 –	Efeito da radiação ionizante na distribuição do citoesqueleto de actina 24 horas após o tratamento.....	74
Figura 26 a–	Efeito da radiação ionizante na motilidade celular.....	76
Figura 26b –	Gráfico de quantificação da motilidade celular.....	76
Figura 26c –	Alterações morfológicas induzidas pela radiação 24 horas após o tratamento.....	76
Figura 27 –	Avaliação da proliferação celular após exposição à radiação ionizante.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aPKC -	Proteína quinase C atípica
α -SMA -	Alfa actina de músculo esquelético
AMP-	Adenosina monofosfato
ANOVA -	Análise de variância
AP-1 -	Proteína ativadora-1
APC -	do inglês, <i>adenomatous polyposis coli</i>
ATP -	adenosina trifosfato
BMP –	do inglês <i>bone morphogenetic protein</i>
BAD -	Promotor de morte associado à Bcl-2
BSA -	Albumina bovina
CBD -	Domínio de ligação à catenina
CCR -	Câncer colo-retal
CDK -	Quinase dependente de ciclina
CK-	citoqueratina
CKI- α -	Caseína quinase I - α
Cox -	Ciclooxigenase
Dsh (Dvl) -	<i>Dishevelled</i>
EGF -	do inglês, <i>epidermal growth factor</i>
EGFR -	do inglês, <i>epidermal growth factor receptor</i>
EC -	Domínio extracelular da E-caderina
EDTA -	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA -	Ácido tetracético etileno-glicol
EPLIN -	Proteína epitelial perdida em neoplasias
ER- α -	Receptor de estrogênio α
ERK -	Quinase regulada <i>por sinal extracelular</i>
<i>Eph-</i>	<i>do inglês ephrin</i>
FAK -	Quinase de adesão focal
FAP -	do inglês, <i>familial adenomatous polyposis</i>
Fz-	do inglês <i>Frizzled</i>
Fuc -	fucose
GDP -	guanosina difosfato
GSK -	Glicogênio sintase quinase

HNPCC -	do inglês, <i>hereditary nonpolyposis colon câncer</i>
IGFR-	do inglês <i>Insulin Growth Factors Receptor</i>
IκB -	Proteína inibitória Kappa b
IκBK -	Quinase da proteína IκB
JA -	Junção aderente
JAM -	Molécula de adesão juncional
JNK -	c-Jun N-terminal quinase
KDa -	Kilodaltons
LEF -	Fator de aumento linfocitário
LRP -	Proteína relacionada à receptor de lipoproteína
MAGUK -	Guanilato quinase associada à membrana
MDR -	Resistência a multidroga
MEK -	Proteína quinase quinase ativada por mitógenos
MMR -	Reparo de mal-pareamento
MAPK -	do inglês, <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDCK –	do inglês, <i>Madin-Darby canine kidney</i>
MSH -	<i>Homóloga à MutS</i>
NFκB -	Fator nuclear Kappa b
OMS –	Organização Mundial de Saúde
PI3K -	Fosfatidil-inositol-3-quinase
PALS -	Proteína associada com Lin Seven
PATJ -	Proteína de junção tight associada à PALS
PAR -	Proteína de partição defeituosa
PDZ-	do inglês <i>postsynaptic density protein-95 (PSD-95), the Drosophila lethal disc large tumor supressor protein Dlg and the TJ scaffold protein zonulaoccludens 1 (ZO-1)p</i>
PKA -	do inglês, <i>protein kinase A</i>
PKB -	do inglês, <i>protein kinase B</i>
PTEN -	do inglês, <i>phosphatase and tensin homolog</i>
RTK -	Receptor tirosina quinase
Ser –	seri
SDS -	Sódio dodecil sulfato
SDS-PAGE -	Gel de poliácridamida contendo sódio dodecil sulfato
SH -	Domínio de homologia Src

SHP-2 -	Fosfatase com domínio SH2
STAT -	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TNF -	Fator de necrose tumoral
TCF -	Fator de célula T
TJs-	do inglês <i>Tight Junctions</i>
TAMs -	macrófagos associados ao tumor
TEM -	transição epitélio-mesenquimal
TGF- β -	Fator de crescimento transformante β
TGF-R β II –	Receptor do Fator de crescimento transformante β -II
TME -	transição mesenquimal-epitelial
Thr -	treonina
VEGF -	do inglês, <i>vascular endothelial growth factor</i>
WNT -	do inglês, <i>wingless</i>
ZO-	<i>Zônula ocludens</i>

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	RELEVÂNCIA DO TRABALHO	53
2	OBJETIVO	54
2.1	Objetivos específicos	55
3	MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.1	Anticorpos e Reagentes	55
3.2	Cultura de células	55
3.3	Inibição farmacológica	56
3.4	Irradiação das células	56
3.5	Microscopia de fluorescência	56
3.6	Obtenção de lisados totais	57
3.7	Obtenção de frações solúveis e insolúveis em Triton X-100	58
3.8	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE), e <i>immunoblotting</i> e análise densitométrica	58
3.9	Ensaio de migração celular (<i>Wound Healing Assay</i>)	59
3.10	Ensaio de Proliferação Celular (Cristal Violeta)	59
3.11	Análise estatística	60
4	RESULTADOS	62
4.1	A radiação ionizante induz redistribuição de proteínas das junções aderentes e esse evento é modulado de forma diferencial por Src, EGFR E MAPK	62
4.2	A radiação ionizante não altera a expressão de proteínas do complexo juncional apical	69
4.3	A irradiação causa desorganização do citoesqueleto de actina e este evento é regulado de forma diferencial por SRC, EGFR e MAPK	70
4.4	As vias SRC e MAPK estão envolvidas no aumento da motilidade celular induzida pela radiação 48 horas após o tratamento	75
4.5	A dose de 5 Gy de radiação não altera a proliferação celular 48 horas após o tratamento	77
5	DISCUSSÃO	78

5.1	Src, EGFR e MAPK modulam a redistribuição de E-caderina e β-catenina induzida pela radiação	79
5.2	Dose de 5 Gy de radiação não altera a expressão total de E-caderina e β-catenina nos tempos de 1 e 24 horas após o tratamento	82
5.3	A radiação induz reorganização do citoesqueleto de actina em momentos iniciais após o tratamento e Src, EGFR e MAPK revertem este efeito de maneira diferenciada	83
5.4	A radiação aumenta a motilidade celular via Src e MAPK	88
5.5	A proliferação celular não é alterada nos tempos de 24 e 48 horas após exposição à dose de 5 Gy de radiação	90
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	92
7	CONCLUSÕES.....	94
	REFERÊNCIAS.....	95

INTRODUÇÃO

Câncer colo-retal

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública no mundo (*Cancer Statistics*, 2008) e de acordo com estudos do Centro Internacional de Pesquisas contra o câncer da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2010 o câncer deverá superar as incidências cardiovasculares, sendo principal causa de mortalidade dentro do contexto mundial (www.portalms.com.br). No Brasil, as estimativas para o ano de 2008, válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer, sendo 231.860 para o sexo masculino e 234.870 para o sexo feminino (INCa, Estimativa 2008-Ministério da Saúde).

Neste contexto, o câncer de cólon e reto está entre os tipos de tumores mais comuns que afetam a população mundial, sendo a terceira causa mais comum de câncer em ambos os sexos no mundo. Quando diagnosticado em estágio precoce, a sobrevida do paciente é considerada alta, em torno dos 50%, e este diagnóstico relativamente favorável faz com que o câncer colo-retal seja um dos mais frequentes na população mundial, com 2,4 milhões de pessoas vivas diagnosticadas com a doença. O número de novos casos estimados para o Brasil em 2009 é de 12.490 casos em homens e de 14.500 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 13 casos novos a cada 100 mil homens e de 15 para cada 100 mil mulheres (INCa, Estimativa 2008-Ministério da Saúde). A Figura 1 ilustra a distribuição geográfica da incidência do câncer colo-retal no Brasil.

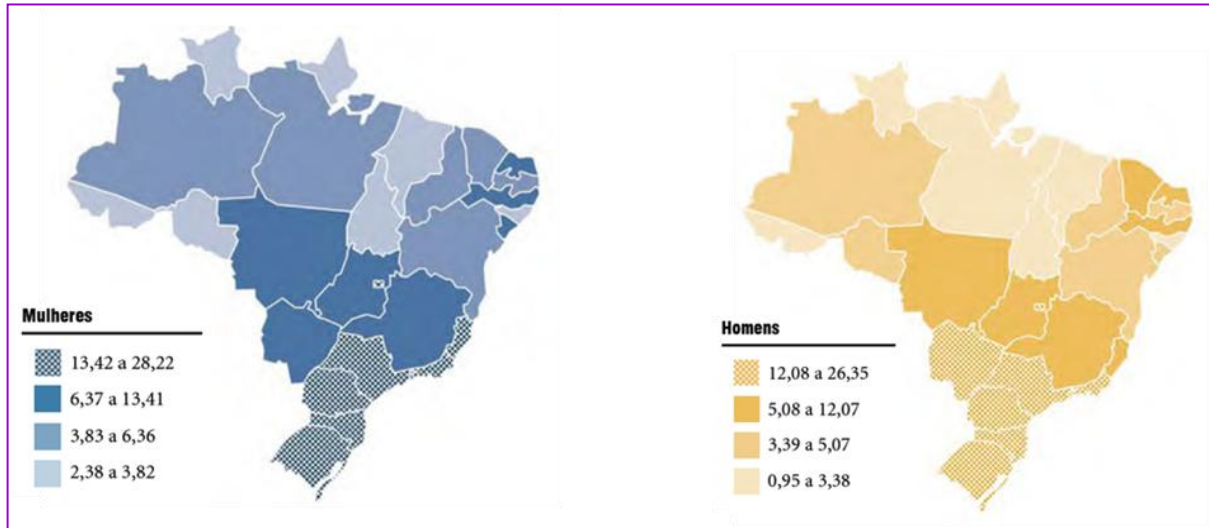


Figura 1: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres/homens, estimadas para o ano de 2009, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna do cólon e reto). Estimativa INCa, 2008.

Patogênese molecular do câncer colo-retal:

Em cânceres humanos, mutações em genes pertencentes às classes de oncogenes, supressores tumorais e genes de reparo do DNA, MMR, (*Mismatch repair*) são eventos comuns que ocorrem na carcinogênese. Proto-oncogenes são genes normais responsáveis pela proliferação celular de maneira controlada. Uma única mutação é suficiente para que haja um ganho de função, tornando-se assim um oncogene. Os genes supressores tumorais atuam de modo recessivo à nível molecular durante o desenvolvimento do câncer. Quando um gene supressor tumoral é herdado com uma mutação em um dos alelos na linhagem germinativa, é necessário que ocorra apenas uma mutação no alelo normal restante para que haja perda de função; quando ambas as cópias do gene são normais, são requeridos dois eventos mutacionais para que haja perda de função do gene. Esta teoria designada como “*two-hit hypothesis*”, (Knudson, 1985) explica porque uma doença hereditária geralmente manifesta-se em indivíduos mais jovens quando comparadas à doenças esporádicas.

Mutações em genes que codificam enzimas da maquinaria de reparo do DNA (MMR) resultam em fenótipos mutantes caracterizados por uma instabilidade genética do tipo microssatélite (Calvert & Frucht 2002). Este tipo de instabilidade

implica na perda de mecanismos críticos não somente para a manutenção da fidelidade genômica durante a divisão celular, como também na capacidade de iniciar processos apoptóticos por danos causados no DNA (tornando-se resistentes) e afetam genes reguladores do crescimento (ex: receptor II do fator de crescimento transformante, TGF-R β II). Estes eventos permitem uma proliferação clonal de células mutantes, propagando assim a instabilidade genômica (Jass, 2007). Os principais oncogenes que apresentam anormalidades genéticas encontrados em câncer de cólon são o *K-RAS* e *β -catenina* (Figura 2), e dentre os genes supressores tumorais encontramos o *APC*, *p53* e alguns pertencentes a família de reparo de mal-pareamento (MMR), como o *MSH2*, *MLH1*, *MSH6* (Houlston & Tomlinson, 2001).

O câncer colo-retal (CCR) está associado a fatores de risco como: idade; dieta, fatores ambientais; histórico familiar; portadores de doenças inflamatórias do intestino como retocolite ulcerativa e doença de Crohn; condições hereditárias como FAP (Polipose Adenomatosa Familiar) e Síndrome de Lynch (HNPCC- câncer colo-retal hereditário não poliposo); e outras pré-disposições genéticas às doenças crônicas do intestino (Van den Brandt & Goldbohm, 2006; INCa, Estimativa 2008- Ministério da Saúde). Estes fatores são relacionados a três formas distintas de manifestação da doença: esporádica, hereditária ou familiar.

- Doença esporádica

Corresponde a 75% dos casos de câncer colo-retal na população (Kitisin & Mishra, 2006). Fearon e Vogelstein (1990) descreveram a base molecular do câncer de cólon esporádico como um modelo que envolve uma sequência de etapas que culminam na carcinogênese, caracterizado por um acúmulo de mutações somáticas e observado com maior frequência em indivíduos com idade mais avançada (Calvert & Fucht, 2002). O gene supressor tumoral *APC* é considerado um gene essencial (“*house keeping*”) na carcinogênese colo-retal e sua inativação via mutações somáticas ou silenciamento gênico (Watson, 2005; Kane *et al.*, 1997) é um evento inicial da síndrome esporádica, seguido de outras mutações que levam à ativação de oncogenes como *ras*, *c-myc* e *c-erbB2*. A inativação de *p53*, outro gene supressor tumoral, é um evento tardio na carcinogênese colo-retal ocorrendo em mais de 70% dos casos de câncer esporádico. Além desses eventos, 15% dos cânceres

esporádicos apresentam mutações ou silenciamentos por metilação em genes de reparo DNA-*mismatch* (MMR), levando a uma instabilidade genética do tipo microsatélite que favorece a proliferação clonal de células com instabilidade genômica. O CCR esporádico ocorre em indivíduos com idade mais avançada, pois o acúmulo de mutações somáticas é propiciado por fatores como idade, dieta rica em lipídeos, exposição à carcinógenos ambientais e portadores de doenças inflamatórias do cólon, como retocolite ulcerativa e Doença de Crohn (Fodde *et al.*, 2001; Calvert & Fucht, 2002). A influência de processos inflamatórios atuando como adjuvante na tumorigênese tem sido alvo de controvérsias. Embora muitos estudos em diferentes tipos de câncer associem o microambiente inflamatório a um pior prognóstico, em câncer de cólon os macrófagos associados ao tumor (TAMs) propiciam um melhor prognóstico e um aumento na taxa de sobrevivência dos pacientes. Tal observação deve-se ao tipo de resposta inflamatória induzida no microambiente, fazendo com que os próprios TAMs secretem fatores que podem efetivamente matar as células tumorais susceptíveis (Dumont *et al.*, 2008).

- **Síndrome hereditária**

Aproximadamente 10% de todos os casos de câncer colo-retal são devidos a uma predisposição genética. O câncer de colon herdado é geralmente resultante de mutações na linhagem germinativa, sendo a manifestação fenotípica dependente do gene específico que é mutado. As síndromes herdadas podem apresentar pólipos colônicos ou não como manifestação de doença (Calvert & Frucht, 2002). Dentre elas, podemos citar:

FAP (Polipose Adenomatosa Familiar): É uma síndrome poliposa hereditária dominante, caracterizada por mutação germinativa no gene supressor tumoral *APC*. Indivíduos afetados apresentam milhares de pólipos colônicos, e embora a média de transição desta lesão benigna para o câncer seja baixa em indivíduos jovens, o câncer colo-retal se desenvolve em pacientes afetados aproximadamente na sexta década de vida, caso medidas profiláticas não tenham sido tomadas. Um dos grandes problemas desta doença é o fato de ser uma síndrome silenciosa, o que torna difícil a seleção dos indivíduos acometidos para que medidas profiláticas adequadas sejam tomadas (Santos, 2008).

HNPCC (câncer colo-retal hereditário não poliposo) ou Síndrome de Lynch: É uma síndrome hereditária não poliposa, cuja base molecular consiste na mutação da linhagem germinativa em genes de reparo do DNA (*MMR*), gerando instabilidade genômica do tipo microssatélite. Embora indivíduos acometidos por HNPCC desenvolvam poucos pólipos, estes são altamente favoráveis à progressão maligna porque os pólipos iniciam-se com mutações em genes *MMR* e se transformam rapidamente quando mutações em *APC* ocorrem concomitantemente, desenvolvendo um fenômeno conhecido como “*tumorigênese acelerada*”. A ocorrência destes dois eventos favorece a progressão maligna porque a mutação no *APC* mantém a via Wnt ativa e confere vantagem proliferativa às células com instabilidade genômica, tornando o HNPCC uma síndrome relacionada a um alto índice (risco maior que 85%) de desenvolvimento de câncer em indivíduos acometidos (Jass ,2007; Calvert, 2002; Fodde *et al*, 2001; Watson, 2005).

- Síndrome familiar

Esta síndrome não é muito esclarecida e ocorre em indivíduos com histórico familiar de câncer colo-retal que não apresentam nenhuma correlação com uma síndrome herdada. Em famílias afetadas com este tipo de síndrome, o câncer de cólon se desenvolve em uma frequência similar a encontrada no câncer esporádico. A base molecular baseia-se no polimorfismo no códon 1307 do gene *APC* e é conhecida como mutação I1307 K *APC*. O risco relativo para desenvolvimento de tumores em indivíduos com este polimorfismo é muito mais baixo do que em indivíduos portadores de mutações mencionadas anteriormente. Ao contrário de muitas mutações na linhagem germinativa, as quais causam anormalidades estruturais de forma direta, este tipo de mutação causa predisposição à mutações esporádicas em sítios distantes do gene em um estágio tardio do desenvolvimento, o que levaria então à uma anormalidade estrutural. Esta síndrome não guarda nenhum tipo de hereditariedade, mas causa de maneira indireta, uma pré-disposição genética. Mais de 25% dos casos de câncer colo-retal encontram-se nesta categoria, como o câncer colo-retal que afeta indivíduos *Ashkenazi Jewish*. Estes indivíduos pertencem a um grupo de judeus que vivem historicamente em comunidades

endogâmicas no leste europeu e Europa central. Existem um número de doenças genéticas que acometem essa população com maior frequência, estimando-se que 1 a cada 5 indivíduos *Ashkenazi*, são portadores de mutações em genes relacionados à doenças severas. Devido ao costume endogâmico na história dos antepassados, o estudo de doenças genéticas nesta população vem sendo importante no aconselhamento genético, e o CCR é uma das doenças que acometem esta população devido ao polimorfismo mencionado anteriormente (Calvert 2002; Watson, 2005; Laken *et al.*, 1997; DNA Tribes 2006-2008).

O modelo “*multistep*” da carcinogênese ilustrado na Figura 2 é caracterizado pelo acúmulo de mutações somáticas, e confere uma vantagem seletiva de crescimento das células do cólon, resultando em uma proliferação descontrolada e favorecendo o desenvolvimento clonal do tumor. Tais eventos ocorrem na sequência adenoma-carcinoma, onde alterações histopatológicas são resultados de alterações genéticas que envolvem genes supressores tumorais e oncogenes. Aproximadamente 90% dos casos de câncer colo-retal são derivados de lesões adenomatosas benignas. Quando ocorre detecção precoce destas lesões, medidas profiláticas podem ser tomadas e o indivíduo é então monitorado a fim de evitar o aparecimento de câncer (Fodde, Smits & Clevers 2001).

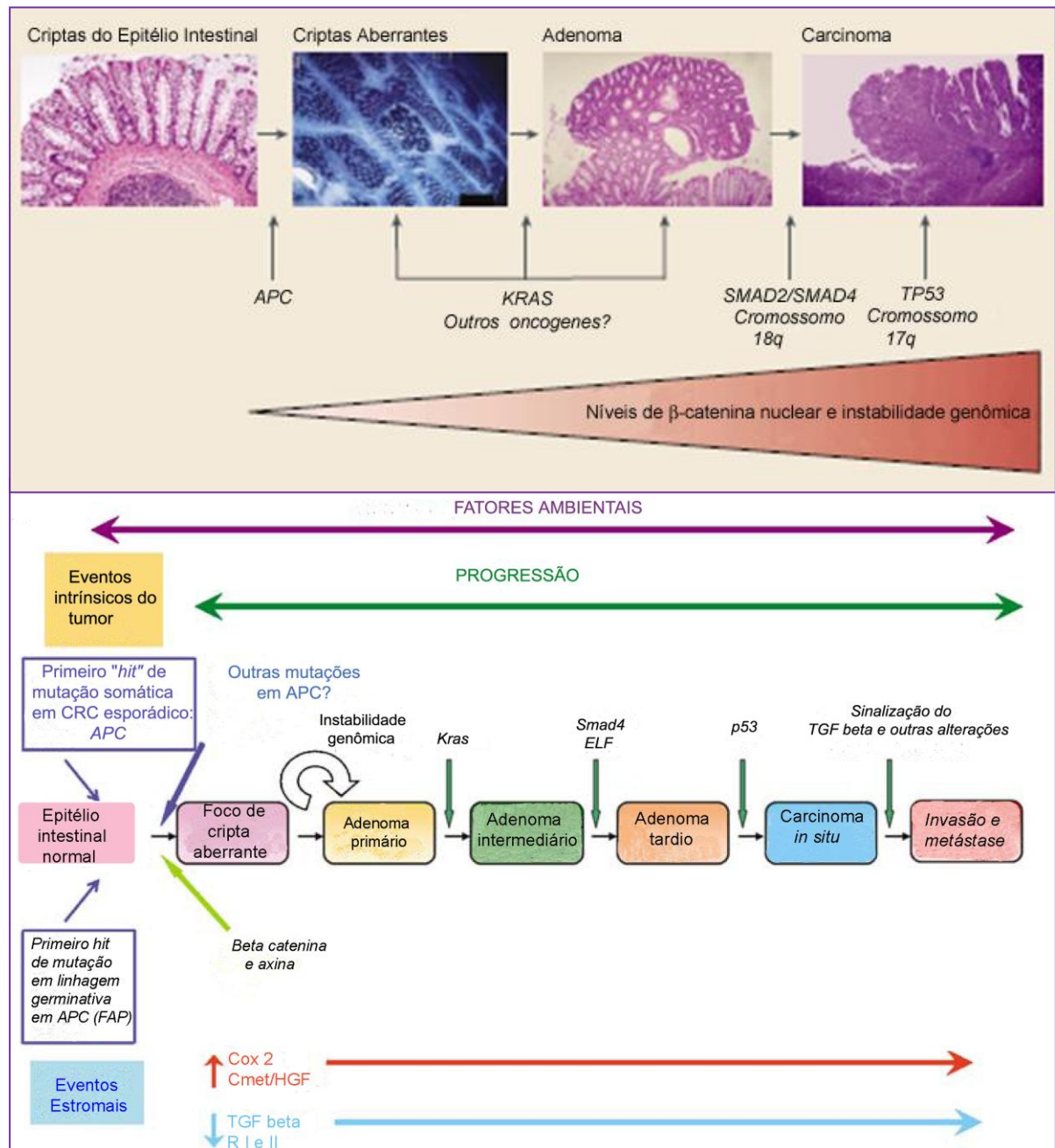


Figura 2: Mudanças histopatológicas resultantes de alterações genéticas, definindo a sequência adenoma-carcinoma do câncer colo-retal. Adaptado de Clevers *et al*, 2001; Mishra *et al*, 2005.

Epitélio intestinal e homeostase

O intestino dos mamíferos é revestido por uma monocamada de células epiteliais que compõem a mucosa intestinal e é dividido em intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso. O epitélio do intestino delgado é

caracterizado por invaginações conhecidas como “criptas de *Lieberkuhn*” e protusões luminais denominadas vilus. Tais compartimentos morfológicos distintos apresentam funções diferenciadas, sendo as criptas um compartimento principalmente comprometido com a proliferação celular; e as vilosidades, compartimentos com características absorptivas. A cripta é composta por células tronco multipotentes que realizam divisão assimétrica, gerando células filhas progenitoras comprometidas com duas principais linhagens celulares epiteliais: A linhagem absorptiva composta pelos enterócitos e a linhagem secretória, composta pelas células de *Globet* ou caliciformes; as células enteroendócrinas; e as células de Paneth, as quais estão presentes apenas no intestino delgado (Fodde *et al.*, 2001, Pinto & Clevers, 2005).

No colon, a formação de um eixo cripta-colônico (Figura 3) é um processo dinâmico e, portanto a homeostase do epitélio intestinal depende do balanço entre apoptose e proliferação. O perfil diferenciado de expressão gênica em relação aos compartimentos da cripta reflete uma arquitetura harmônica que consiste de células em atividade mitótica na base da cripta, portanto indiferenciadas, e um processo de migração e diferenciação ao longo da cripta, seguidos de parada do ciclo celular e apoptose com intuito de renovação total do epitélio. O epitélio intestinal humano é totalmente renovado a cada cinco dias, sendo o órgão mais auto-renovável dos mamíferos adultos (Sena *et al.*, 2005).

Vias de sinalização como WNT (*wingless*), BMP (*bone morphogenetic protein*), e NOTCH regulam a renovação e diferenciação das células tronco da cripta colon intestinal. (Kosinski *et al.*, 2007). A via canônica WNT atua principalmente na manutenção da célula tronco intestinal e na proliferação de células progenitoras (Clevers *et al.*, 2006), enquanto a sinalização BMP atua inibindo a ativação da célula tronco, favorecendo a diferenciação intestinal (Giepmans *et al.*, 2008). Já a via NOTCH, direciona as células para a linhagem secretória do intestino (Van *et al.*, 2005). A figura 3 mostra também o perfil diferenciado de expressão gênica quanto à organização celular ao longo da cripta. Estudos demonstram que a via WNT é a principal reguladora da expressão gênica ao longo do eixo cripta-vilus (Kosinski *et al.*, 2007), sendo que a β -catenina, uma proteína integrante das junções aderentes, cumpre um papel central desta via.

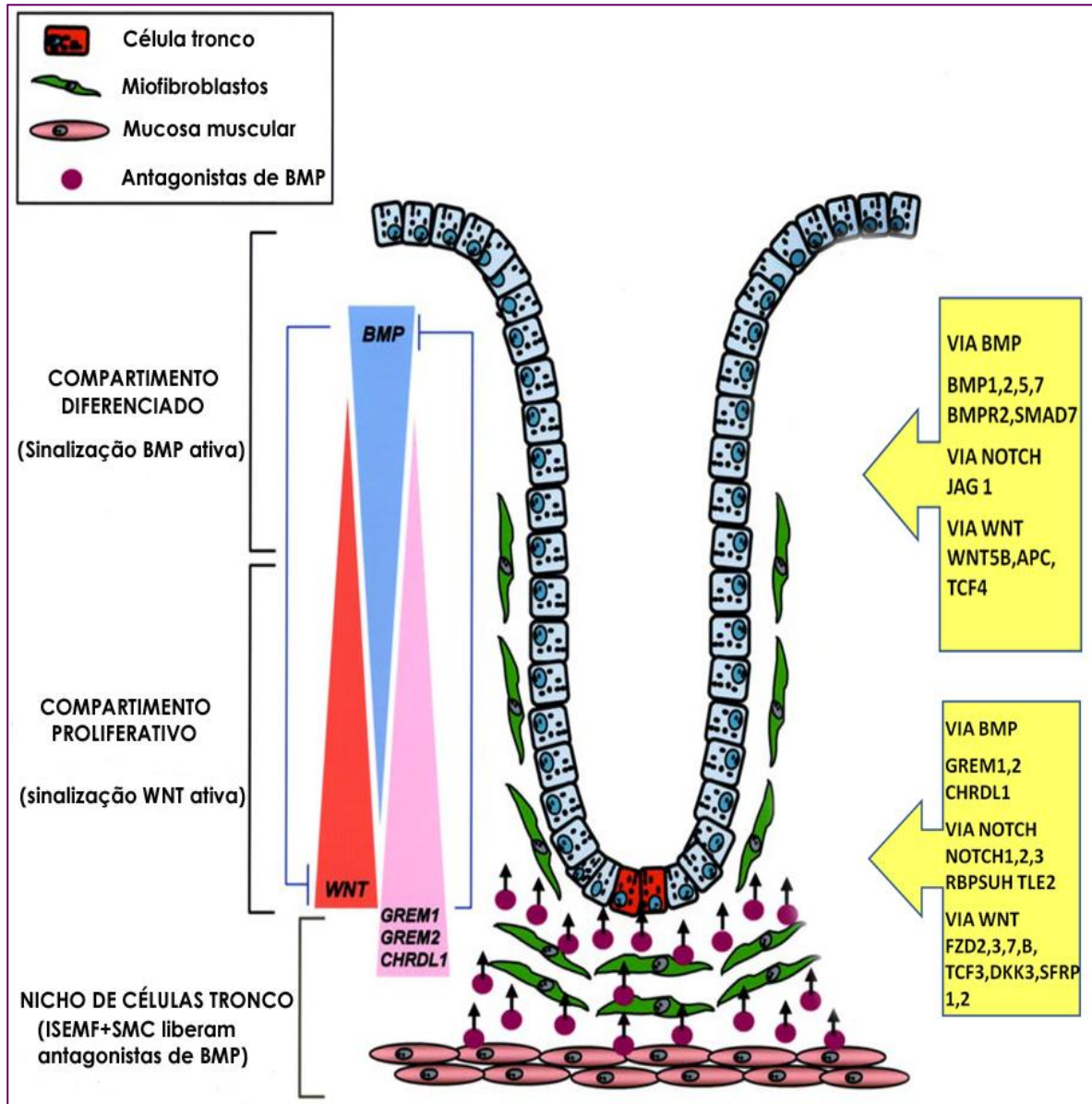


Figura 3: Relação entre perfil de expressão gênica e compartimentalização celular diferenciada no epitélio normal, mostrando o desenvolvimento do cólon intestinal e a manutenção do nicho de células tronco. Note que células normais presentes na parte superior da cripta apresentam expressão de genes relacionados com a parada do ciclo celular. No processo de carcinogênese, tal compartimentalização diferenciada é perdida, e ocorre a formação de pólipos. (ISEMF, miofibroblastos intestinais subepiteliais; SMC, célula de músculo liso). Adaptado de Kosinski *et al.*, 2007.

As células tronco epiteliais intestinais localizam-se num ambiente designado nicho de célula tronco, no qual há um contato direto com os miofibroblastos subepiteliais que secretam glicoproteínas ligantes do receptor *Frizzled* e mantêm a atividade proliferativa na base da cripta (Figura 3). Esta interação ligante-receptor atua a nível citoplasmático ativando a via canônica WNT, levando a estabilização da β -catenina citoplasmática e impedindo seu direcionamento para degradação via proteossoma. Tal evento favorece sua translocação para o núcleo, onde atua

promovendo a transcrição de genes envolvidos com a proliferação celular, induzindo a formação de pólipos e posterior desenvolvimento da tumorigênese colo-retal. (Pinto *et al.*; 2005; Clevers 2006).

Via canônica Wnt e Câncer colo-retal

A via canônica Wnt é a principal reguladora da expressão gênica ao longo do eixo cripta-vilus (Kosinski *et al.*, 2007), e portanto, atua de maneira extremamente importante na manutenção da homeostase do epitélio intestinal. Desta forma, alterações na via Wnt são as mais frequentes em câncer colo-retal. Em 80% dos casos, encontram-se mutações no gene *APC* (Shitashige *et al.*, 2008), o qual codifica a proteína APC que participa do complexo protéico que estabiliza a β -catenina, o complexo APC/GSK-3 β / β -Catenina/Axina. Mutações em *APC* podem resultar na perda de função desta proteína, levando a não degradação da β -catenina e uma ativação constitutiva da via canônica Wnt, mesmo na ausência de ligante. Estudos sugerem que mutação em *APC* seja o evento inicial da tumorigênese colo-retal em casos de FAP, atuando na formação de pólipos benignos em virtude do aumento da proliferação via ativação da Wnt canônica (Michor *et al.*, 2005).

Mutações em β -catenina, GSK 3 e axina também favorecem a tumorigênese por impedir o direcionamento da β -catenina para o proteossoma. Desta forma, uma célula normal enterocítica do topo da cripta apresenta a via canônica Wnt inibida, e durante a tumorigênese esta via é ativada e simula o ambiente do nicho de célula tronco da base da cripta, favorecendo a formação de pólipos por apresentar uma proliferação descontrolada e perda da diferenciação (Pinto *et al.*; 2005; Clevers, 2006).

A figura 4 mostra a via Wnt ativada por ligante e a função extra-juncional da β -catenina. Nesta via, proteínas solúveis Wnt são secretadas pelas células e se associam aos receptores *Frizzled* (Fz) e LRP5/6. Essa associação desencadeia uma cascata de sinalização que impede que o complexo formado pelas proteínas APC/Axina/CK1 α /GSK3 β direcione a proteína β -catenina para degradação dependente de proteossoma. Dessa forma, a β -catenina pode acumular no citoplasma e translocar-se para o núcleo, associando aos fatores transcricionais *downstream* da via Wnt, como TCF/ LEF (*T-cell Factor - lymphoid enhancer factor*) e

induzindo a expressão de diversos genes como ciclina D1, Tcf1, MMP7, Axina-2, entre outros relacionados com proliferação celular, evasão da apoptose e invasividade celular, mesmo na ausência de ligante (Niessen, 2008).

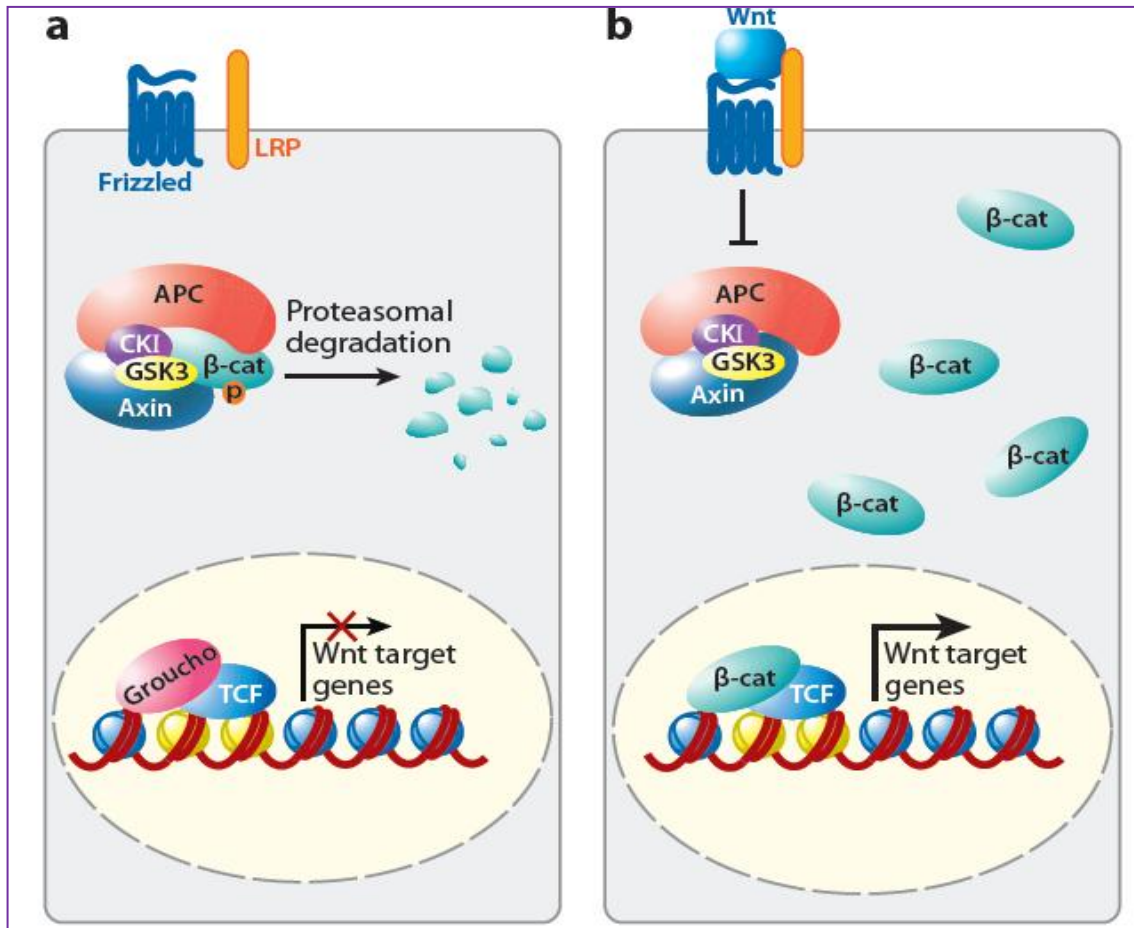


Figura 4: Representação esquemática da via de sinalização *Wnt*. a) Na ausência de estimulação, os níveis de β -catenina são mantidos através da degradação do complexo formado por APC/CKI/GSK3/axina. Esse complexo fosforila e direciona β -catenina para degradação via proteossoma. b) Com a ativação da via *Wnt*, os ligantes dos receptores Frizzled e co-receptores LRP desorganizam o complexo APC/CKI/GSK3/axina, impedindo que β -catenina seja degradada. Assim, essa proteína acumula no citosol e pode ser translocada para o núcleo, onde se associa a fatores transcripcionais e induz a expressão de genes alvos *Wnt*. Adaptado de Niessen & Gottardi, 2008; Flier & Clevers, 2008.

Além de vias de sinalização que modulam a compartimentalização diferenciada ao longo da cripta, o bom funcionamento do epitélio depende da integridade e manutenção do complexo juncional apical, os quais formam barreiras paracelulares e transcelulares ao longo do epitélio. Estudos recentes vêm mostrando que as proteínas do complexo juncional podem desempenhar tanto uma função

estrutural, atuando na manutenção da arquitetura tecidual quanto em eventos de sinalização relacionados à proliferação e migração (Giepmans *et al*, 2008).

Complexo juncional apical:

O complexo juncional apical organiza o epitélio em domínios celulares contínuos, atuando como uma barreira física seletiva que além de compartimentalizar fluidos distintos do organismo, proporciona um isolamento destes compartimentos perante o ambiente externo. Domínios funcionais lípido-protéicos são formados a partir de um processo organizacional da membrana plasmática, gerando uma polaridade celular ápico-baso-lateral que é de extrema importância em programas celulares de organogênese e na fisiologia dos tecidos epiteliais e endoteliais (Ebnet *et al.*, 2004; Niessen, 2007; Giepmans *et al.*, 2008; Hartsock *et al.*, 2008). O domínio apical contém canais iônicos e transportadores; a porção lateral do domínio baso-lateral contém proteínas envolvidas na adesão às células vizinhas (formando as junções *tight*, aderente e desmossomos) e no processo de comunicação celular (formando as junções tipo *gap*). A porção basal deste mesmo domínio contém proteínas envolvidas na adesão célula-matriz (hemidesmossomos) e sítios de ligação para constituintes da lâmina basal como as integrinas. (Miyoshi & Takai, 2005). A polarização confere uma permeabilidade seletiva, visto que as junções celulares atuam como uma barreira paracelular e transcelular (Ebnet *et al.*, 2004). A figura 5 mostra a organização e composição molecular das junções intercelulares. Conceitos atuais na literatura utilizam o termo “complexo juncional apical” para denominar a estrutura composta pelas junções aderentes e *tight* ou oclusivas, sendo responsáveis pela manutenção da adesão célula-célula em epitélios.

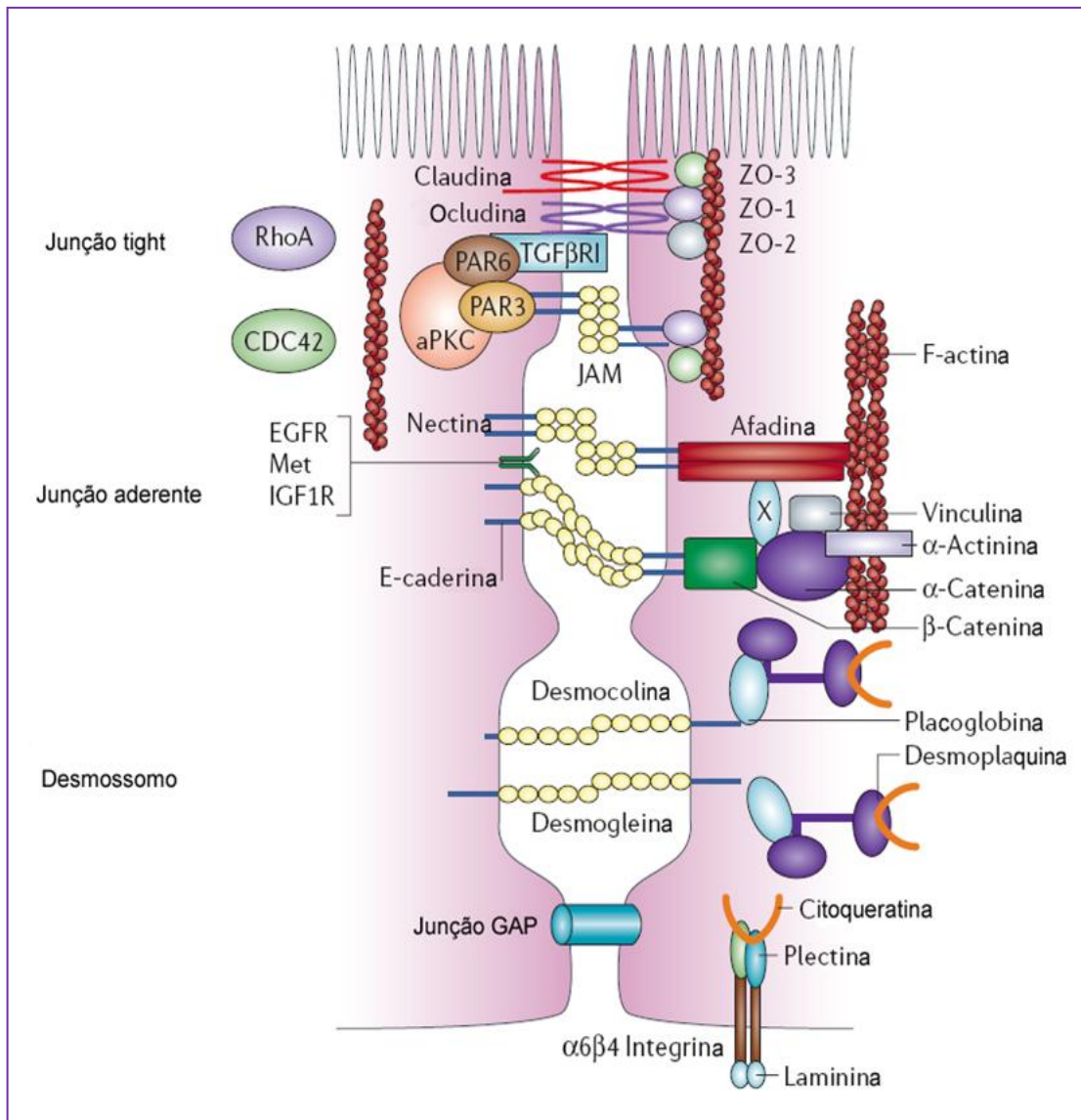


Figura 5: Modelo esquemático do complexo juncional. O esquema mostra a localização das junções *tight*, aderentes, gap e desmossomos, assim como os diferentes componentes moleculares destas estruturas. Junções aderentes e *tight* se conectam a microfilamentos, e desmossomos a filamentos intermediários, estabilizando a adesão célula-célula. Modificado de Thiery & Sleeman, 2006.

O complexo juncional apical é considerado um marcador de células epiteliais polarizadas e além de atuar como uma barreira seletiva contribui para a manutenção da polaridade ápico-basolateral, impedindo a passagem de moléculas ao longo da própria membrana e também participa de eventos de sinalização importantes em diversos processos biológicos como proliferação e migração (Laprise *et al.*, 2004; Nelson, 2008). A figura 6 ilustra os diferentes tipos de transporte epitelial. Além disso, foi visto que as junções célula-célula constituem-se de subdomínios

caracterizados como “barra magnética” pela sua capacidade de sequestrar fatores de transcrição e impedir sua translocação para o núcleo onde atuam na promoção ou silenciamento da atividade transcricional relacionada com a proliferação celular (Balda *et al.*, 2003; Goswami *et al.*, 2005; Afonso *et al.*, 2006).

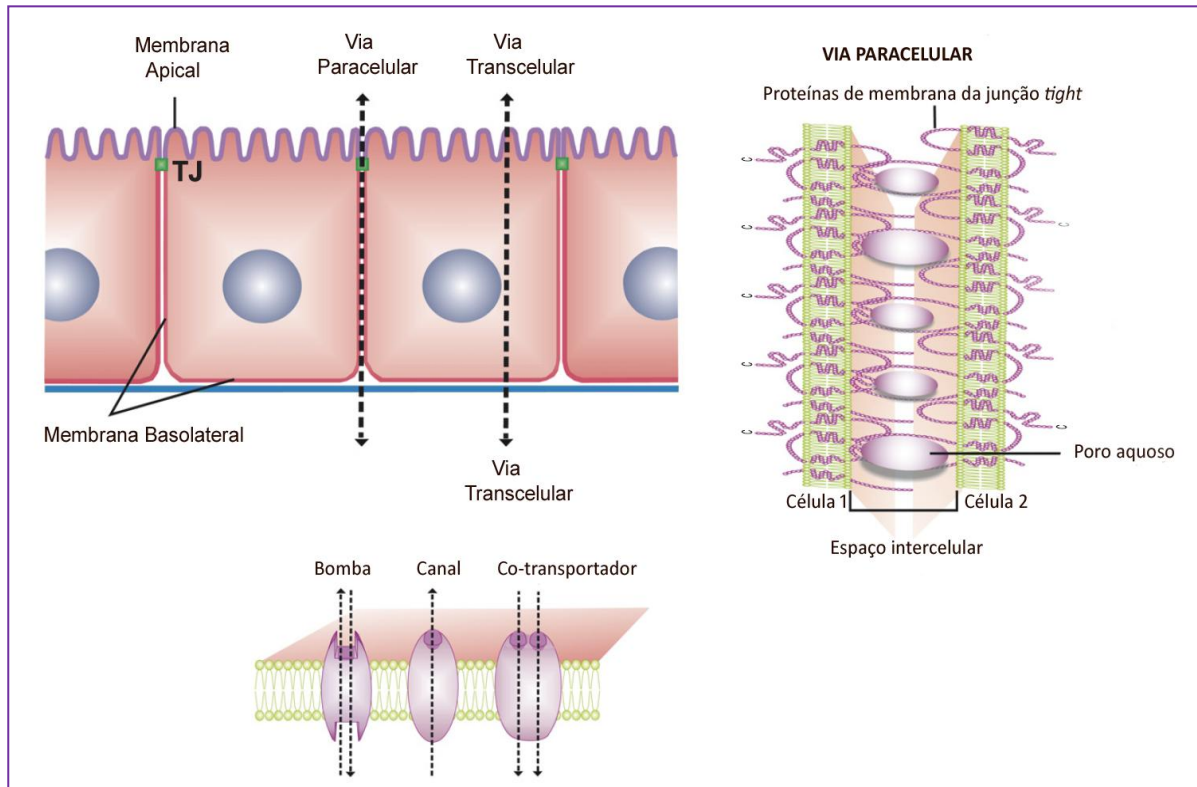


Figura 6: Vias de transporte formadas pelas células epiteliais. A figura mostra duas vias de transporte transcelular: A via transcelular, que permite seletivamente a passagem de substâncias através da membrana apical. No caso de substâncias não lipofílicas, a passagem transcelular se dá através de mecanismos de transporte específicos como moléculas carreadoras, bombas, canais ou co-transportadores. Outra via alternativa para o trânsito transcelular é a via paracelular, que se dá no espaço entre duas células adjacentes. Este último transporte é regulado pelas proteínas de junção tight, situadas no domínio baso-lateral. Adaptado de González-Mariscal *et al.*, 2007.

- Junção Tight

As junções *tight* (TJs), também chamadas de junções ocludentes estão localizadas na região mais apical do complexo juncional e estão presentes em epitélios e células endoteliais vasculares (Chiba *et al.*, 2008). Estas junções atuam como uma barreira paracelular controlando o transporte de íons, solutos e água,

além de formar uma fenda que divide a membrana plasmática em domínios apical e basolateral. Estudos recentes têm relatado dois tipos de junção *tight*: junção *tight* tricelular, que se apresenta como pontos de contato entre três células, sendo formada por três pares de elementos de selagem centrais (Figura 7a) e junção *tight* bicelular, que se apresenta como pontos de anastomose entre membranas plasmáticas de duas células adjacentes, quando observada por microscopia eletrônica (Figura 7b). Estes dois tipos de junções *tight* (JT) desempenham um importante papel na selagem do espaço intercelular (Ikenouchi *et al.*, 2005; Cereijido *et al.*, 2008; Chiba *et al.*, 2008).

TJs são complexos multiprotéicos funcionais compostos por proteínas transmembranas (occludinas, claudinas, moléculas de adesão juncional (JAMs) e tricellulina) e proteínas adaptadoras citoplasmáticas que participam da conexão com o citoesqueleto, como as zônulas ocludens (ZO-1, ZO-2 e ZO-3), e ainda por complexos protéicos citoplasmáticos que atuam na construção e manutenção da polaridade celular, como PAR6/PAR3/aPKC e CRB/PALS/PATJ (Fig. 7b) (Chiba *et al.*, 2008). A Figura 7 é uma representação esquemática da organização e composição molecular desta estrutura.

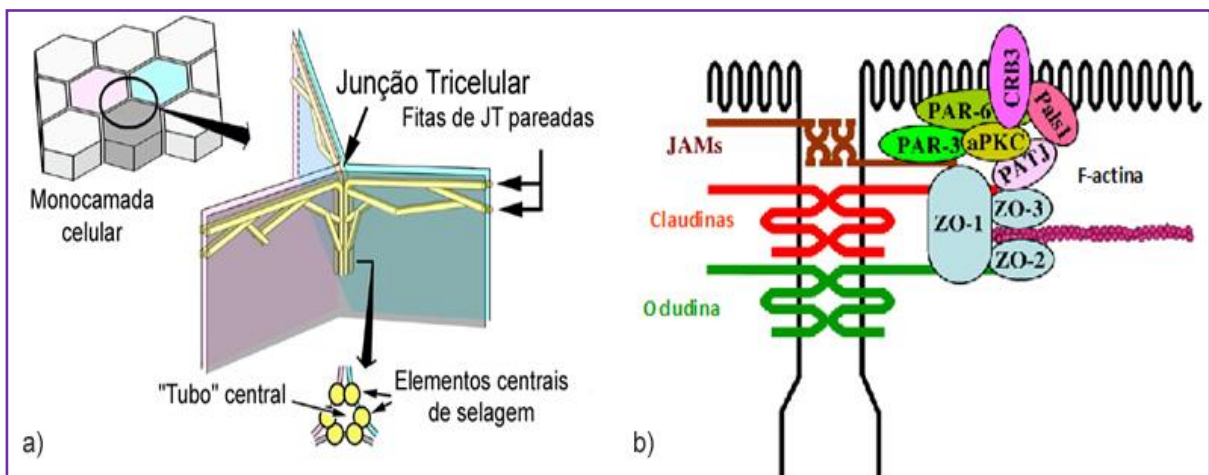


Figura 7: Estrutura e composição molecular das junções *tight*. a) organização da junção *tight* tricelular ; b) arquitetura molecular da junção *tight* bicelular e a distribuição de proteínas transmembranas claudinas, occludinas e JAM; proteínas adaptadoras ZO-1, ZO-2 ZO-3; e o complexo de manutenção de polaridade PAR6/PAR3/aPKC e CRB/PALS/PATJ. Adaptado de Chiba *et al.*, 2008 e Ikenouchi *et al.*, 2005.

A ocludina é uma proteína de aproximadamente 65 kDa (Figura 8) que apresenta duas isoformas resultantes de *splicing* alternativo do RNAm, e é composta por quatro domínios transmembranas e dois *loops* extracelulares, sendo as porções amino e carboxi-terminal voltadas para o citoplasma. A função da ocludina na junção *tight* é regulada por fosforilação tanto em células endoteliais quanto epiteliais (Afonso *et al.*, 2006; Martin-Belmonte *et al.*, 2007). Estudos têm revelado o envolvimento da ocludina em diferentes eventos celulares relacionados à carcinogênese, demonstrando seu papel na sinalização celular, além da sua atuação como molécula de adesão. (Barrios-Rodiles *et al.*, 2005; Murata *et al.*, 2005),.

As claudinas são as principais proteínas determinantes da função de barreira das junções *tight*, incluindo a seletividade paracelular (via formação de poros) tanto iônica quanto em relação ao tamanho molecular. Estruturalmente, as claudinas são proteínas integrais transmembranas com 4 passagens pela membrana, dois *loops* extracelulares, um loop intracelular e domínios amino e carboxi-terminais voltados para a região citoplasmática. As claudinas formam uma família constituída de 24 membros de pesos moleculares que variam de 18 a 27 kDa (Chiba *et al.*, 2008). Embora estejam presentes em células endoteliais e epiteliais, exibem expressão distinta de maneira tecido-celular específica, apresentando localização subcelular em gradientes diferenciados ao longo do eixo cripta-vilosidade no intestino (Chamorro *et al.*, 2008).

Em processos patológicos como doenças inflamatórias e câncer, as claudinas podem estar *up* ou *down* reguladas, de acordo com o tecido específico. Pacientes com doença intestinal inflamatória apresentam um aumento na expressão de claudina-2 ao longo das criptas intestinais, bem como as claudinas-3 e 4 são reduzidas ou redistribuídas ao longo da cripta. Estudos feitos por nosso Grupo (Oliveira *et al.*, 2005), demonstraram que as claudinas-1, -3 e -4 estão super expressas em câncer de cólon, no entanto observou-se uma maior permeabilidade paracelular à macromoléculas. Este evento pode permitir um maior acesso de fatores de crescimento à membrana basolateral, aumentando a sobrevivência celular e reduzindo a média de apoptose, o que seria altamente favorável para células cancerígenas durante a progressão tumoral. (Dhawan *et al.*, 2005). Uma revisão detalhada sobre a participação das claudinas em diferentes tipos de câncer epitelial, assim como a importância dessas proteínas no câncer colo-retal foi recentemente relatado por Oliveira & Morgado-Díaz (2007).

Como as claudinas apresentam uma variabilidade em número e distribuição de resíduos carregados ao longo dos *loops* extracelulares, a seletividade iônica é diferenciada de acordo com o tipo de claudina, algumas formam canais iônicos, e outras formam barreiras iônicas (Amasheh *et al.*, 2002). Devido a este fato, a expressão de claudinas também tem sido relacionada com a resistência à certos quimioterápicos, como a cisplatina (Huber *et al.*, 2006).

As JAMs são glicoproteínas transmembranas de passagem única (Figura 8) que pertencem à superfamília das imunoglobulinas G. Estão presentes em células polarizadas epiteliais e endoteliais e em todas as linhagens hematopoiéticas (Liu Y *et al.*; 2000). As JAMs também participam da formação da polaridade ápico-basolateral, além de estarem envolvidas na função de barreira da junção *tight*. Essas proteínas participam da adesão celular, interagindo com seus domínios extracelulares de maneira homofílica ou heterofílica. Atuam na adesão célula-célula e célula-matriz, através da ligação com as subunidades $\beta 1$ e $\beta 2$ da integrina não somente de células do mesmo tipo, mas também em integrinas de diferentes tipos celulares como leucócitos, plaquetas e células endoteliais (Bazzoni *et al.*, 2003; Ebnat *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2007; Chiba *et al.*, 2008). Desta maneira, além de auxiliar na função de barreira na junção *tight*, as JAMs também estão relacionadas a processos migratórios e no potencial angiogênico tumoral (Santoso *et al.*, 2005; Fuse *et al.*, 2007).

As tricelulinas são proteínas que possuem quatro passagens pela membrana e se orientam de maneira vertical nas fitas de junção *tight* presentes nos contatos tricelulares. Possuem cerca de 30% de similaridade com o domínio C-terminal da ocludina. Ikenouchi e colaboradores (2005) têm relatado a atuação do repressor transcricional Snail na redução da expressão da tricelulina em células epiteliais mamárias Eph4. Ainda, recentemente foi mostrado que em células MDCKII, a perda da expressão da ocludina resultava na localização da tricelulina na junção *tight* bicelular (Ikenouchi *et al.*, 2008).

As proteínas ZOs (ZO-1, -2 e -3) fazem parte da família de proteínas guanilato quinase associadas à membrana (MAGUK), possuem domínios PDZ que permitem a interação com as proteínas integrais de membrana da junção *tight*, como JAM, ocludina e claudina, e atuam na ligação destas proteínas ao citoesqueleto (González-Mariscal *et al.*, 2008). A ZO-1 pode participar também da regulação do ciclo celular, atuando na repressão transcricional da ciclina D1 (Huerta *et al.*, 2007).

A figura 8 ilustra a estrutura básica das proteínas integrais de membrana das junções tight.

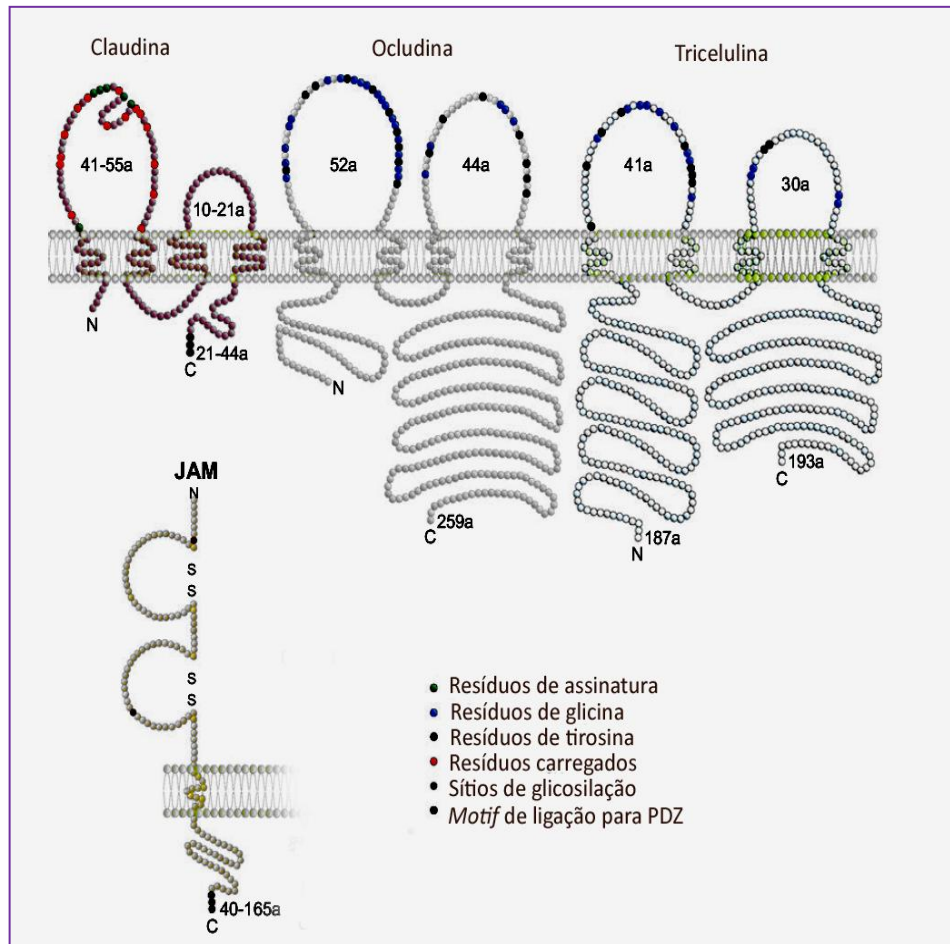


Figura 8: Representação esquemática da estrutura das proteínas integrais da junção tight: Claudina, ocludina, tricelulina e JAMs. O número de resíduos presentes no *loop* extracelular e nas cadeias carboxi-terminais são indicados. Resíduos de assinatura, *motifs* de ligação para PDZ, sítios de glicosilação e aminoácidos carregados são indicados em diferentes cores. Adaptado de González-Mariscal *et al.*, 2007.

Já o complexo protéico citoplasmático PAR6/PAR3/aPKC e CRB/PALS/PATJ são responsáveis pela formação da junção *tight* e a polarização epitelial, atuando no amadurecimento do complexo juncional (Assémat *et al.*, 2008; Gopalakrishnan *et al.*, 2007; Michel *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2005).

- **Junção aderente**

As junções aderentes são microdomínios de estreita interação célula-célula e localizam-se logo abaixo das junções *tight* em epitélio de mamíferos. Atribuía-se no passado a característica de um complexo estável, porém, atualmente sabe-se que ele é altamente dinâmico. Este complexo atua na manutenção de processos celulares como diferenciação; integridade tecidual por atuar na manutenção da polaridade celular; inibição do complexo Arp 2/3 reduzindo a polimerização de actina; estabilização do epitélio por promover a formação da junção *tight* e suportar sua função mecânica de adesão; além de regular a proliferação celular e migração (Dress *et al.*, 2005; Roy & Berx, 2008). Como mostrado na Figura 9, as junções aderentes podem ser subdivididas em dois tipos de complexos de adesão: o complexo nectina/afadina e o complexo E-caderina/catenina (Niessen & Gottardi, 2008).

As nectinas são proteínas transmembranares de passagem única (Figura 9) pertencentes à superfamília das imunoglobulinas, que compreende uma família de quatro membros (nectina-1,-2,-3 e -4). A maioria das isoformas dessas proteínas contém um motivo conservado na região carboxi-terminal que se liga ao domínio PDZ da proteína afadina que, por sua vez, possui um domínio de ligação a filamentos de actina e também pode se ligar em Ras. Nectinas podem se associar lateralmente, formando interações homotípicas, ou podem se associar a receptores similares a nectinas, formando interações heterotípicas. Nectinas e afadinas apresentam uma importante função na formação de JAs e na subsequente formação de JTs (Okamoto *et al.*, 2005; Niessen, 2007). Estudos têm mostrado que a redução da expressão de nectina-1 α está associada ao aumento do potencial maligno em queratinócitos (Matsushima *et al.*, 2003) e que sua superexpressão está associada com a formação da JAs em células de câncer gástrico (Peng *et al.*, 2002). A figura 9 ilustra os subtipos de junção aderente.

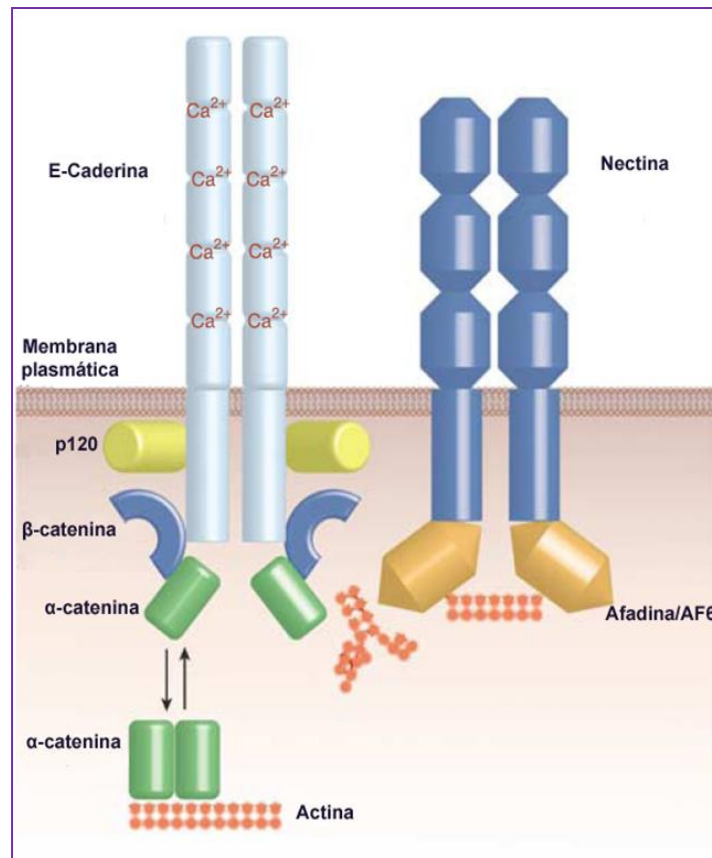


Figura 9: Modelo esquemático dos constituintes moleculares da junção aderente. O esquema mostra também a associação do complexo E-caderina/catenina e nectina/afadina aos filamentos de actina citoplasmáticos. (Modificado de Niessen, 2007).

As caderinas são subdivididas em seis subfamílias: caderinas clássicas do tipo I e do tipo II, caderinas desmossomais, caderinas transmembranares de sete passagens, grandes caderinas e protocaderinas (Stemmler, 2008). A E-caderina, integrante da subfamília de caderinas clássicas do tipo I, é a principal proteína transmembrana de células epiteliais. Essa proteína possui cinco domínios extracelulares de caderina repetitivos (conhecidos como EC), um domínio justamembranar conhecido como JMD, e um domínio de ligação em catenina (CBD, do inglês *catenin binding domains*) (Hartsock & Nelson, 2008).

Nas junções aderentes (Figura 10), a região citoplasmática da E-caderina liga-se à β -catenina (ou à placoglobina, no caso dos desmossomos) e a p120-catenina. A β -catenina liga-se à α -catenina, a qual apresenta domínios de ligação para a actina (Pokutta and Weis, 2007). Citoquimicamente, o complexo E-caderina-

β -catenina co-localiza com filamentos de actina em junções epiteliais apicais, formando um anel circunferencial de actina em torno da membrana lateral da célula (Vaezi *et al.*, 2002). Durante muito tempo, acreditava-se que a α -catenina mediava uma ligação estável entre o complexo E-caderina/ β -catenina e o citoesqueleto de actina. No entanto, recentes estudos têm mostrado que a ligação entre este complexo e o citoesqueleto é extremamente dinâmica, e apontam a α -catenina como uma proteína alostérica que se liga à actina somente na sua forma de homodímero, enquanto se liga ao complexo E-caderina/ β -catenina na sua forma monomérica (Drees *et al.*, 2005). Este fato levou à hipótese da existência de *pools* funcionais de α -catenina importantes na regulação do citoesqueleto. Foi relatado que o homodímero de α -catenina atua na inibição do complexo ARP2/3, levando à inibição da formação de lamelipódio e gerando estabilidade funcional das junções aderentes ao manter o anel de filamentos de actina em torno do complexo juncional (Drees *et al.*, 2005).

Outro estudo demonstrou que a conexão do complexo E-caderina/ β -catenina-F-actina é mediada pela proteína EPLIN, visto que a depleção desta proteína em células de carcinoma de colon humano (DLD-1) promoveu a reorganização da actina cortical e desestabilização do complexo juncional. (Abe and Takeichi, 2008). A figura **10** ilustra a organização e os componentes moleculares das junções aderentes.

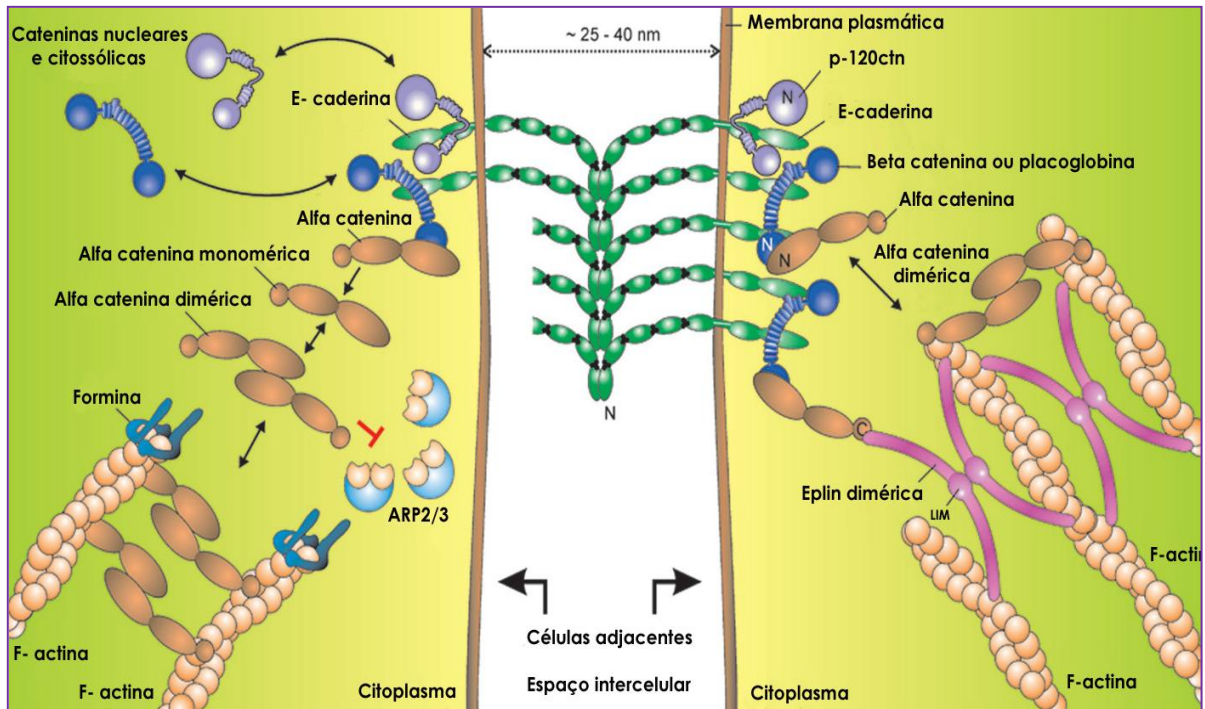


Figura 10: Esquema mostrando a organização estrutural do complexo E-caderina-βcatenina na junção entre duas células epiteliais vizinhas. A α-catenina na sua forma monomérica liga-se à β-catenina, enquanto na forma de homodímero, liga-se ao citoesqueleto de actina via proteína EPLIN. A dimerização da α-catenina é importante na inibição do alongamento do filamento de actina. Adaptado de Royá and Berx, 2008.

A E-caderina é também considerada uma proteína supressora tumoral, visto que a perda de sua expressão é associada à tumorigênese e progressão tumoral (Wong & Gumbiner, 2003). Na progressão de alguns carcinomas pode ser observada a clivagem do domínio extracelular da E-caderina por algumas metaloproteinases (MMPs), resultando na E-caderina solúvel (sE-cad) e na liberação do domínio intracelular para o citoplasma. Subsequentemente, a sE-cad pode atuar de maneira parácrina, se associando ao domínio extracelular da E-caderina de células adjacentes e levando a uma desorganização da JA. Já o domínio intracelular pode ser translocado para o núcleo e ativar genes relacionados com o processo tumorigênico, como ciclina D1, AP-1 e STAT1/STAT2 (Salahsho *et al.*, 2007; Symowicz *et al.*, 2007). Eventos epigenéticos também estão envolvidos na diminuição da expressão da E-caderina durante a progressão tumoral, como a hipermetilação de um sítio próximo a sua região promotora em carcinomas de mama, próstata e colo-retal, e a deacetilação da histona H3 em câncer colo-retal (Liu *et al.*, 2008).

Além disso, estudos têm mostrado que a E-caderina é responsável também pelo processo de inibição por contato do crescimento celular. Este evento pode ocorrer de duas maneiras: a) diretamente ao aumentar os níveis de p27 (St. Croix *et al.*, 1998) e interagir com receptores de fator estimulante de crescimento epidermal (EGFR), bloqueando a cascata de sinalização intracelular (Qian *et al.*, 2004), e b) indiretamente, ao manter as cateninas na superfície celular, visto que a localização citoplasmática e nuclear destas proteínas atua na reorganização do citoesqueleto e em atividades transcricionais (Van Roy & Berx, 2008).

A β -catenina é uma proteína multifuncional altamente conservada que se liga diretamente a E-caderina, atuando de maneira crucial no processo de adesão célula-célula. Foi relatado em estudos *in vitro* que a formação do complexo E-caderina/ β -catenina impede a degradação proteolítica do domínio citoplasmático da E-caderina (Huber *et al.*, 2001), permitindo ligação com a α -catenina, e conectando este complexo ao citoesqueleto de actina via proteína EPLIN (Kentaro and Takeichi, 2008). Além da sua função estrutural na adesão celular, a β -catenina atua como co-ativadora transcricional da via WNT (Van *et al.*, 2003) como mencionada no item 1.4. No entanto, nada tem sido descrito em relação à localização citoplasmática da β -catenina após tratamentos com radiação ionizante e sobre a sua relação com o sucesso terapêutico.

A α -catenina é uma proteína indispensável para a adesão celular mediada por E-caderina visto que na sua ausência, ocorre desorganização da junção aderente e o anel de actina apical sofre reorganização (Watabe-Uchida *et al.*, 1998). A figura 11 mostra o modelo funcional de atuação da α -catenina tanto em processos de maturação dos contatos celulares quanto na estabilização dos contatos maduros. Além disso, estudos demonstram sua atividade alostérica, na qual *pools* funcionais homodiméricos de α -catenina são importantes na regulação do citoesqueleto por inibir o complexo ARP2/3 e impedir a nucleação e alongamento dos filamentos de actina, gerando estabilidade funcional das junções aderentes (Yamada *et al.*, 2005).

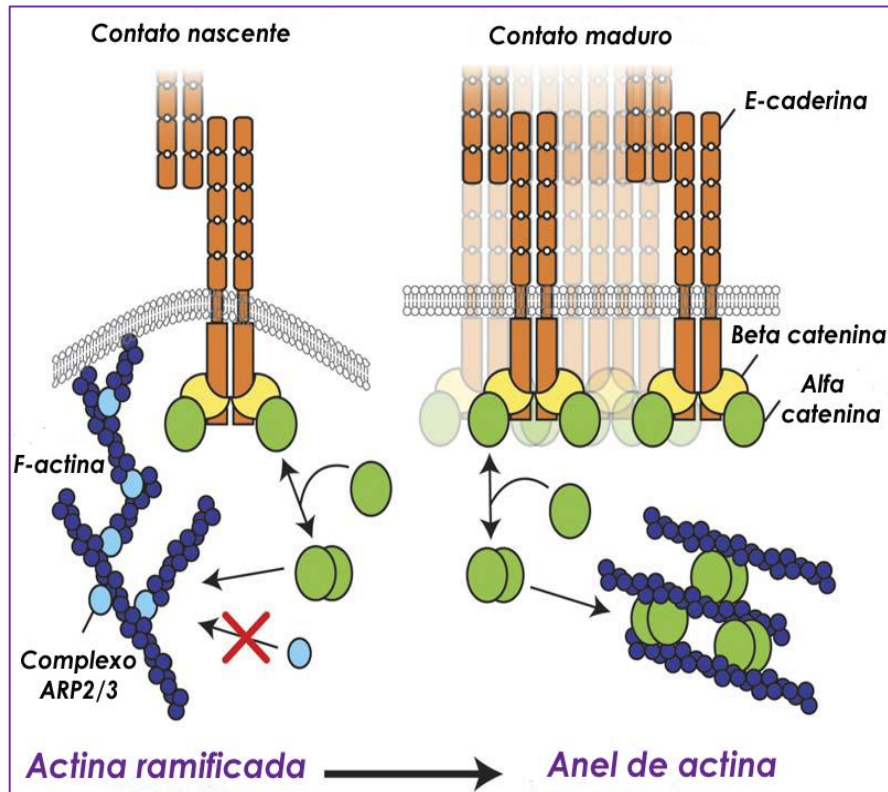


Figura 11: Modelo funcional da α -catenina na regulação dinâmica do citoesqueleto e na organização inicial do contato célula-célula. A interação de E-caderinas nos contatos nascentes levam a um acúmulo de complexos E-caderina- β -catenina e a formação de *pools* homodiméricos e diméricos de α -catenina. Observe os dímeros competindo com o complexo ARP2/3 pelos filamentos de actina, suprimindo a organização destes filamentos actina em protusões de membrana. Já nos contatos maduros os filamentos de actina localizam-se de forma paralela à membrana. Adaptado de Dress *et al.*, 2005.

A p120 é outra proteína da família *Armadillo* que se liga na região justamembranar da E-caderina e atua de maneira crucial na sua estabilização na membrana plasmática durante a formação dos contatos celulares (Thoreson *et al.*, 2000). Embora não se ligue diretamente ao citoesqueleto, ela é capaz de regular localmente a dinâmica da actina via inibição da proteína Rho-GTPase (Perez-Moreno *et al.* 2006; Wildenberg *et al.* 2006).

As junções apicais parecem ser fisicamente ligadas ao citoesqueleto de actina, uma vez que alterações no citoesqueleto de actina cortical interferem diretamente na localização dos complexos E-caderina-cateninas, levando à desorganização das junções aderentes. Uma vez que a desorganização deste complexo tem sido associada a eventos que desencadeiam o processo

tumorigênico, torna-se importante o estudo destes eventos relacionado à efeitos colaterais terapêuticos, visto que a integridade destes complexos é capaz de modular processos fisiológicos variados como apoptose, proliferação, tumorigênese e motilidade celular.

Citoesqueleto de actina e tumorigênese

O citoesqueleto é uma rede de proteínas altamente dinâmicas que se estende por todo o citoplasma. É constituído por três tipos de filamentos protéicos: os microtúbulos, os filamentos intermediários, e os filamentos de actina ou microfilamentos. Os microtúbulos são polímeros compostos por heterodímeros de tubulina, alinhados de forma a gerar uma polaridade, isto é, a exposição de β -tubulina numa terminação específica, determina um crescimento rápido e a α -tubulina um crescimento lento. Os microtúbulos se associam ao centróssomo, apresentando duas famílias de proteínas motoras, as cinesinas e as dineínas, fundamentais no transporte intracelular de vesículas. Agentes inibidores da polimerização de microtúbulos são utilizados em terapias anti-câncer, influenciando diretamente nos processos de divisão celular (Arora *et al.*, 2009). Os filamentos intermediários apresentam uma variedade de formas de acordo com a sua sequência da cadeia polipeptídica, sendo os epiteliais constituídos por filamentos de queratina. Esses filamentos proporcionam resistência tensional às células e tecidos (Fudge *et al.*, 2008). Estudos demonstram que o aumento de expressão da vimentina, um tipo de filamento intermediário de células mesenquimais, está relacionado com o aumento do potencial invasivo de uma linhagem celular derivada de câncer de próstata no qual observou-se também uma diminuição da expressão protéica de E-caderina (Liu *et al.*, 2008).

A actina é a principal determinante da morfologia das células eucarióticas, gerando força motriz e formação de projeções de membranas que estão intimamente relacionadas com o processo de motilidade celular, contratilidade, e transporte intracelular. A F-actina (actina filamentar) é formada por monômeros de G-actina (actina globular) que se ligam entre si através de moléculas de ATP (Disanza *et al.*, 2005). Em monocamadas de células polarizadas, os filamentos de actina são distribuídos na porção basal, como fibras de *stress* que correm paralelas,

mantendo a célula firmemente ancorada ao substrato; na região apical, como feixes de actina nos sítios de adesão célula-célula, conhecidos como anéis de actina perijuncional onde estão ancoradas proteínas pertencentes aos complexos de adesão; e na porção central das microvilosidades. Além disso, os microfilamentos formam o córtex celular logo abaixo da membrana plasmática e controlam os movimentos da superfície celular através da interação com moléculas de miosina (Nelson, 2003).

Estudos vêm mostrando que o rearranjo coordenado do citoesqueleto de actina é essencial para a motilidade celular, invasão e metástase, visto que drogas despolimerizadoras de actina reduzem a migração de células de câncer de mama e de pulmão (Hayot *et al.*, 2006). A regulação da polimerização dos filamentos de actina é responsável pela formação e *turnover* de estruturas protusivas de membrana que são essenciais para o movimento celular, como o filopódio, lamelipódio e invadopódio (Yamaguchi *et al.*; 2006). Tais estruturas consistem em adesões transientes e especializadas em degradação de matriz extracelular, sendo a integração de processos regulatórios do citoesqueleto de actina um fator importante na modulação de forças contráteis no processo de invasão tecidual pelas células tumorais (Mario, 2008). Outros estudos correlacionaram um pior prognóstico com o aumento da expressão de genes relacionados com o remodelamento do citoesqueleto tais como CDC42, cofilina1, RhoD entre outros, durante a invasão e metástase em células de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço (Mario, 2008; Kelley *et al.*, 2008). Protrusões de actina na periferia celular é um evento central na formação de filopódios e lamelipódios durante a migração celular, enquanto a formação do invadopódio ocorre em um sistema 3D, durante a invasão do tumor (Yamaguchi *et al.*; 2006). A estabilização destas estruturas protusivas é acompanhada pela adesão mediada por integrinas na matriz extracelular. A interação actina-integrina-matriz extracelular também atua como via adicional na coordenação de eventos de transdução de sinais, que regulam o movimento celular (Ridley *et al.*; 2003).

Proteínas receptoras e não receptoras do tipo tirosina-quinases, proteínas associadas a integrinas e proteínas da família Rho-GTPases têm sido implicadas na regulação dos processos de migração e adesão celular (Wells, 2000; Avizienyte *et al.*, 2005). Além de atuar na regulação da actina cortical, as Rho-GTPases também regulam o *turnover* de adesão entre substrato e integrinas, e a polimerização e

contração dos filamentos de actina na rede de fibras de *stress* citoplasmática (Friedl *et al.*; 2000). Além disso, proteínas que participam do alongamento dos filamentos de actina como WASp e o complexo ARP2/3, também são extremamente importantes neste processo (Pollard *et al.*;2003).

Existem várias evidências que sugerem participação dos filamentos de actina na biogênese e função do complexo juncional: a) a desorganização das junções célula-célula apicais (junções aderentes e oclusivas) é acompanhado por reorganização do anel de actina perijuncional (Ivanov *et al.*, 2004a); b) a desorganização dos microfilamentos por drogas que se ligam à actina, como Citocalasina D ou Latrunculina A, resulta na perda de proteínas de junções aderentes e oclusivas, prevenindo a formação do complexo juncional (Yamada *et al.*, 2004); c) o rompimento dos contatos célula-célula pode ser desencadeado tanto por inativação quanto por hiperativação de GTPases da família Rho, moduladores bastante conhecidos do citoesqueleto de actina (Hopkins *et al.*, 2003); e d) a ausência de proteínas ligadoras de actina, ou a mutação em proteínas juncionais de forma a impedir sua ligação ao citoesqueleto, impede a formação de complexos juncionais de células epiteliais (Bershadsky, 2004). Diversos trabalhos vêm estudando a interação entre proteínas do complexo juncional e o citoesqueleto de actina. Por exemplo, foi mostrado que a permeabilidade das junções oclusivas é regulada pela contração do anel de actina perijuncional através de uma força contrátil que aumenta a tensão entre células adjacentes, resultando na abertura das junções (Miyake *et al.*, 2006). Outro estudo mostra que em modelos *knockout* para proteínas adaptadoras do citoesqueleto, não ocorre a formação de complexo juncional estável. Uma vez que a organização do citoesqueleto é um evento dinâmico crucial no processo de perda de adesão celular, transição epitélio mesenquimal, migração e invasividade, tornam-se relevante o estudo de alterações neste sistema de microfilamentos após terapias aplicadas em protocolos clínicos, como a radioterapia.

Transição epitélio-mesenquimal e tumorigênese colo-retal

A maioria das neoplasias humanas é de origem epitelial e embora o crescimento localizado de um tumor cause uma significativa disfunção de um órgão e

alguns casos de morte, a metástase é o evento responsável por 90% da mortalidade em humanos acometidos por câncer. A habilidade de metastização está associada à capacidade das células tumorais de invadir tecidos adjacentes, intravasamento e sobrevivência na circulação sanguínea ou linfática, seguida de extravasamento vascular e colonização de órgãos secundários (Hanahan and Weinberg, 2000).

Na carcinogênese colo-retal, o desenvolvimento de carcinomas é um processo “*multistep*” no qual a célula adquire vantagens proliferativas devido ao acúmulo de mutações e fatores epigenéticos, o que desencadeia a ativação de vias de sinalização relacionadas à proliferação. Durante esse processo observa-se a perda da polaridade e desorganização dos complexos de adesão celular, devido à alocação de marcadores epiteliais (ex: E-caderina e β -catenina), aquisição de marcadores mesenquimais (α -actina de músculo liso e vimentina). Além disso, ocorre também uma reorganização do citoesqueleto, promovendo a dissociação de células do tecido e disseminação metastática de tumores primários. Estas alterações são remanescentes do processo de Transição Epitélio Mesenquimal (TEM) que ocorre durante o desenvolvimento embrionário. Estudos apontam que o repertório gênico embrionário da TEM é reativado em células epiteliais durante processos fisiológicos como cicatrização e fibrose e durante a carcinogênese, contribuindo para a plasticidade celular e aquisição de um potencial invasivo (Gavert and Ben-Ze'ev, 2008). Evidências sugerem que o processo de transição mesenquimal-epitelial (TME), inverso à TEM, ocorre na formação tecidual ectópica durante a instalação da metástase, permitindo que as células possam se aderir e proliferar no sítios secundários de metastização (Brabletz *et al.*, 2001). A figura **12** ilustra as etapas do processo da TEM e da TME durante o desenvolvimento da metástase.

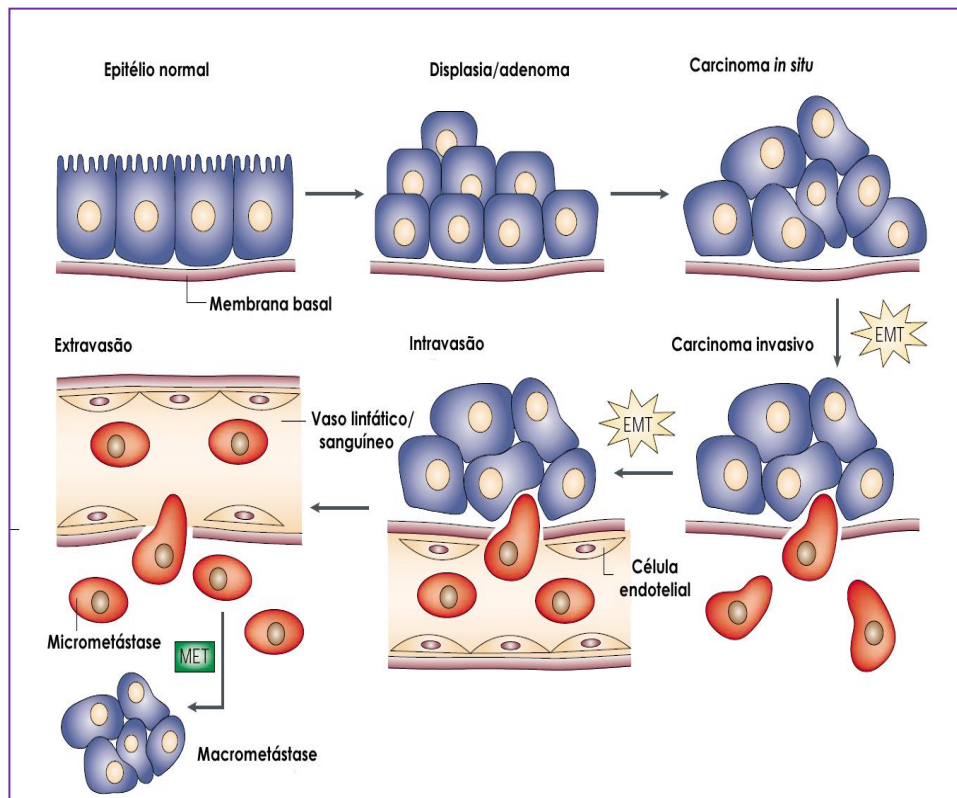


Figura 12: Esquema mostrando a progressão tumoral em epitélios. Evolução do carcinoma *in situ* para um carcinoma invasivo, através do rompimento da membrana basal; intravasamento nos vasos linfáticos e/ou sanguíneos; sobrevivência ao longo da circulação intravascular e extravasamento para órgãos alvos. A colonização metastática pode se dar tanto solitariamente (micrometástase) ou pode formar um novo carcinoma (macrometástase) via processo de transição mesenquimal-epitelial. *Nature Reviews Cancer* 2, 442-454 (June 2002).

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da TEM são integrados com vias oncogênicas reguladoras do crescimento tumoral, angiogênese e metástase, através de receptores de superfície celular tirosina quinases, integrinas, receptores da família TGF- β e quinases intracelulares, como ILK (quinase ligada à integrina) e Src. A ativação transcricional de membros do TCF/LEF pela localização nuclear da β -catenina na via WNT atua sobre genes alvos, tais como membros de metaloproteinases (MMPs) e citocinas, sustentando o processo de TEM durante o desenvolvimento embrionário (Harris & Peifer, 2005). No entanto, a ativação da via canônica Wnt também ocorre na carcinogênese colo-retal, mostrando evidências de que o processo de TEM está relacionado com a progressão tumoral (Chua *et al.*, 2007; Wever *et al.*, 2008; Sabbah *et al.*, 2008). A figura 13 mostra a relação entre as

vias de sinalização envolvidas no programa de TEM e as alterações desencadeadas por tais vias.

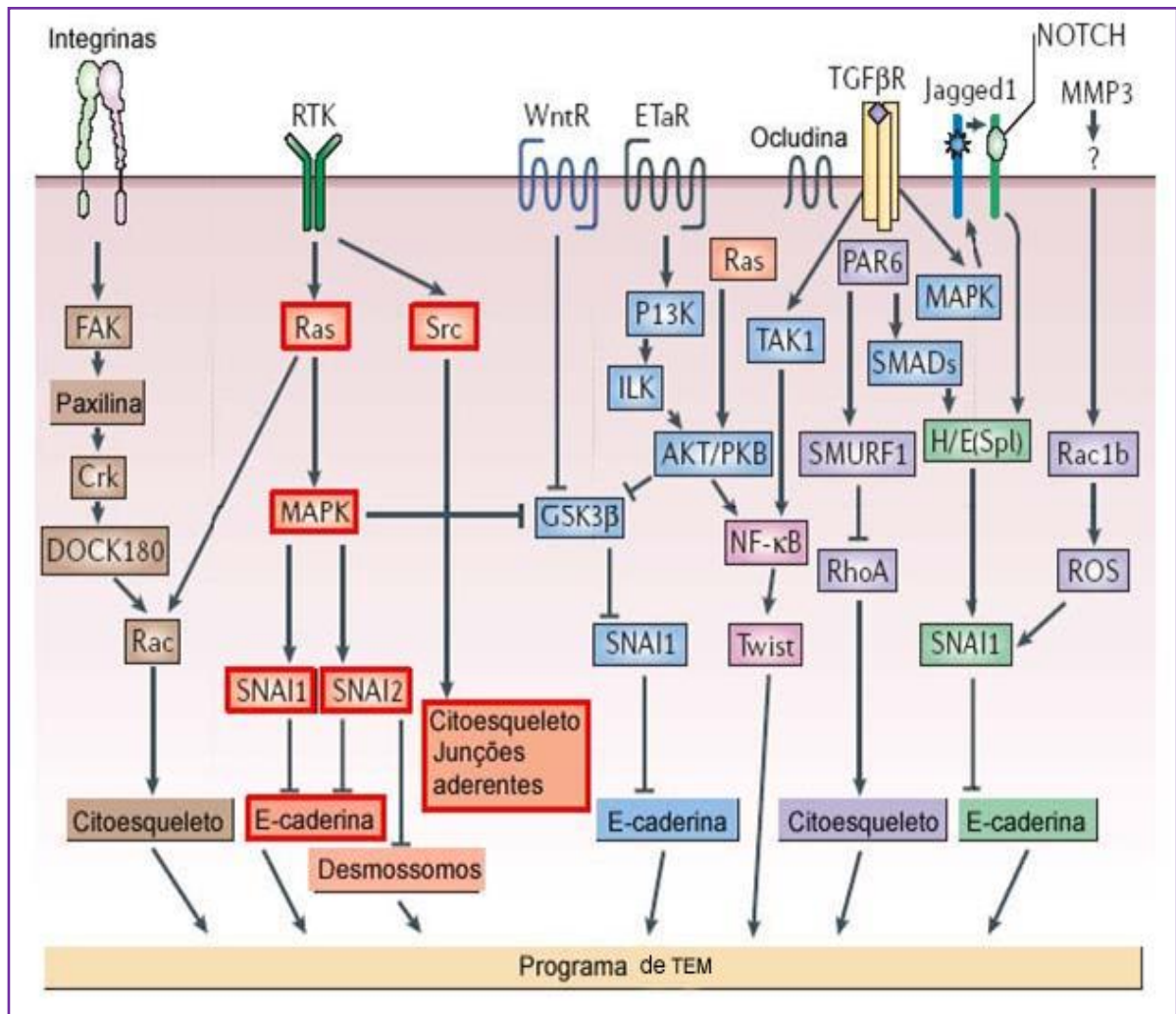


Figura.13: Vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento da TEM. O esquema mostra diferentes vias e sua influência sobre diversas estruturas celulares, como o citoesqueleto, E-caderina e desmossomos. Adaptado de Thiery & Sleeman Nature, 2006.

Alterações moleculares características da TEM foram observadas em modelo animal de câncer colo-retal hereditário e em tumores humanos gastrointestinais (Chen *et al.*, 2008); tumores de mama e próstata (Blanco *et al.*, 2002., Gravdal *et al.*, 2007; Spaderna, *et al.*, 2008), além da evidência clínica de assinatura molecular e patológica da TEM no *front* invasivo de tumores sólidos avançados (Peinado, *et al.*, 2007). Além do mencionado anteriormente, tem sido relatado que o programa de TEM também está associado ao desenvolvimento de resistência tumoral à diversos

agentes terapêuticos, sendo capaz de gerar células tumorais com características de célula tronco. Assim, o estudo de fenômenos relacionados à TEM representam um grande impacto no melhor entendimento da progressão neoplásica e sobrevida dos pacientes, visto que a ocorrência de TEM é um fator importante na recidiva de doença refratária à diversos tratamentos (Kajita *et al.*, 2004; Massard *et al.*, 2006; Mimeault *et al.*, 2006; Sabbah *et al.*, 2008). A figura 14 ilustra a importância do processo de TEM na resistência à diferentes regimes terapêuticos e a ativação de vias concomitantes com a TEM após o *stress* celular causados por tais tratamentos.

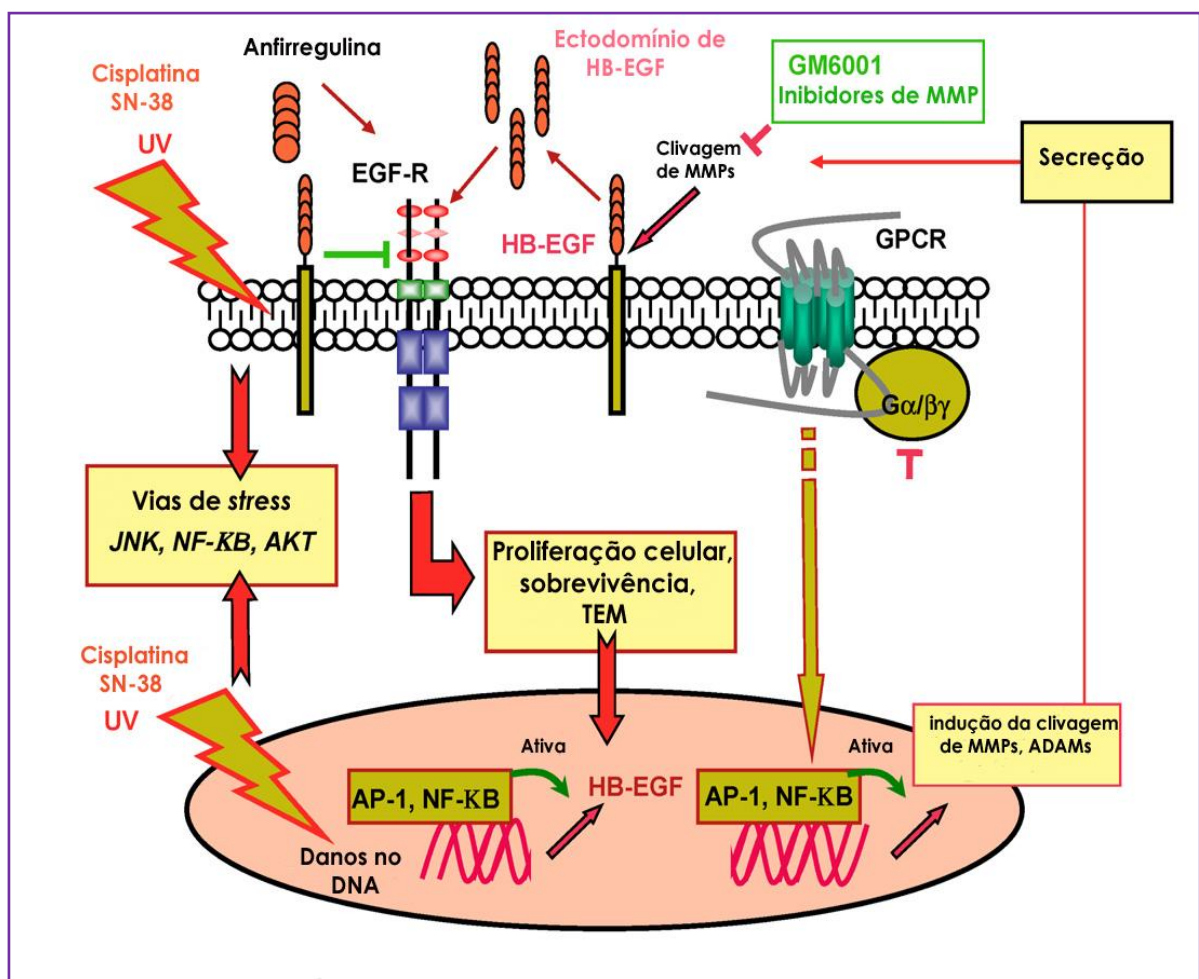


Figura.14: Mecanismos envolvidos no *stress* celular: sinalização HB-EGF e receptores associados à proteína G durante a transição epitélio mesenquimal: Intervenções terapêuticas (cisplatina, inibidores de topoisomerase, luz UV); danos no DNA e receptores acoplados à proteína G (GPCR) iniciam respostas transcricionais dependentes de vias de sobrevivência AP-1/NFκB, promovendo ativação transcricional de promotores de HB-EGF e MMPs. MMP-3 cliva o HB-EGF (*heparin-binding-EGF*) e o ectodomínio do pro HB-EGF torna-se solúvel na região extracelular e transativa EGFR, promovendo proliferação, sobrevivência e TEM. Inibidores de metaloproteinases e de GPCR revertem este efeito. Modificado de Ahmed *et al.*, 2006.

Radioterapia

A radiação ionizante é uma modalidade terapêutica utilizada na clínica para o tratamento de tumores desde 1897 (Prise *et al.*, 2005) e é considerada terapia de primeira linha para diversos tumores sólidos, dentre eles os carcinomas, tanto com intenção curativa para cânceres primários como paliativa em caso de tumores avançados (Yacoub *et al.*, 2006). Estima-se que mais da metade dos novos pacientes diagnosticados com câncer receberão radioterapia em algum momento do curso da doença (Bentzen, 2006). Dentro dos protocolos terapêuticos do câncer colo-retal, a recorrência local após processos cirúrgicos e quimioterápicos é um desafio no tratamento desta neoplasia, sendo a taxa de reincidência em torno de 15 a 45% após cirurgia convencional (Zhang *et al.*, 2007). Com intuito de controlar a recorrência local e aumentar a média de sobrevivência dos pacientes após a cirurgia, a radioterapia é uma das principais terapias adjuvantes para o câncer colo-retal, sendo administrada tanto no pré quanto pós-operatório (Colorectal Cancer Collaborative Group, 2001). Podemos citar a radioterapia intra-cirúrgica (Skandarajah *et al.*, 2009) e o tratamento combinado com Capecitabine®, uma fluorpirimidina carbamato usada frequentemente na clínica para o tratamento de câncer metastático colo-retal e de mama (Kim *et al.*, 2009) como exemplos de radioterapia adjuvante para o tratamento de tumores sólidos.

Efeitos celulares e teciduais da radiação ionizante.

Em contraste com a quimioterapia, poucos estudos são realizados na determinação de doses máximas toleradas, sendo esta tolerância tecido-específica (Stone *et al.*, 2003). Estudos demonstraram que células do sistema hematopoiético, linfóide e da linhagem germinativa são muito mais sensíveis aos efeitos apoptóticos da radiação do que tumores sólidos derivados de células epiteliais, apresentando extensiva radorresistência após o tratamento (Suzuki *et al.*, 2008). Os efeitos terapêuticos da radiação ionizante são baseados no fato de que a exposição a uma quantidade de dose suficiente de radiação seja capaz de reduzir o crescimento tumoral por induzir morte celular por apoptose (Pierzchalski *et al.*, 2008). Até os anos 90, as bases moleculares e celulares que orquestram os efeitos da radiação

utilizada na terapêutica eram atribuídas exclusivamente ao paradigma central do DNA atingido, produzindo uma série de lesões no DNA incompatíveis com a sobrevivência, das quais as duplas quebras eram consideradas as mais importantes na indução de morte celular (Prise *et al.*,2005). O modelo dos efeitos da radiação centrados no DNA tem sido questionado, pois estudos têm demonstrado que o meio condicionado de células irradiadas ou irradiação seletiva do citoplasma de células pela técnica de *microbeam* induz respostas celulares semelhantes em células não atingidas diretamente pela radiação (Gow *et al.*, 2008). A Figura 15 ilustra ao antigo e o novo paradigma dos efeitos celulares da radiação.

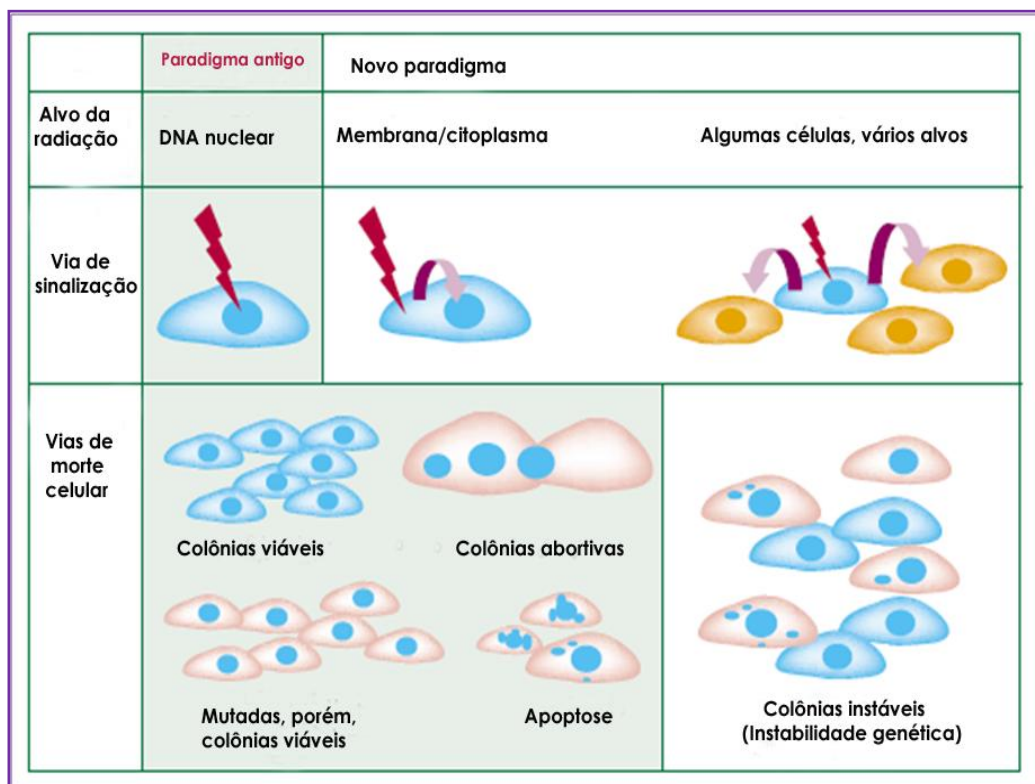


Figura 15: Paradigma antigo da radiação (centralização dos efeitos no DNA) e o novo paradigma (propagação da instabilidade genômica). Esquema mostrando que além dos efeitos diretos da radiação no DNA de células irradiadas, inclui vias extranucleares e sinalização entre células atingidas e não atingidas. Tal evento também é capaz de produzir a formação de colônias abortivas, apoptose e colônias com mutações não letais, favorecendo a hereditariedade da instabilidade genômica proveniente de células sobreviventes. Modificado de Prise *et al.*, 2005.

A ocorrência de efeitos colaterais primários e tardios pós-radioterapia também coloca em questão a centralização de seus efeitos no DNA diretamente atingido, deixando claro que além dos efeitos provocados no DNA, existe uma complexa sinalização multicelular no microambiente em resposta a danos em nível tecidual

(Bentzen, 2006; Barcellos-Hoff *et al.*, 2005). A radiação induz eventos que afetam diversos processos celulares, como danos diretos e indiretos no DNA, alteração na expressão gênica, alterações dos processos mitocondriais, parada do ciclo celular, morte celular apoptótica e catastrófica, autofagia e senescência prematura induzida por *stress*, conhecida como SIPS. (Paglin *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 2004; Kovalchuk & Baulch, 2008; Suzuki *et al.* 2008). Estas alterações promovem respostas celulares parácrinas e autócrinas pós-irradiação, secretando fatores solúveis como citocinas, fatores de crescimento e espécies reativas de oxigênio, produzindo o evento chamado de "*bystander effects*" (Goldber & Lehnert, 2002; Hamada *et al.*, 2007). Este fenômeno associa a interação da radiação com sistemas biológicos, sendo os efeitos importantes tanto no sucesso terapêutico por induzir morte tardia de células constituintes da massa tumoral (Luce *et al.*, 2009) quanto nos efeitos colaterais indesejáveis (Goldber & Lehnert, 2002). A liberação de mediadores pró inflamatórios como TNF α (fator α de necrose tumoral), IL1 (interleucina 1) e IL6 (interleucina 6) são importantes no processo de cicatrização tecidual, atuando como fatores importantes em efeitos colaterais tardios da radioterapia como a fibrose. O TGF β (fator de crescimento transformante) é uma citocina multifuncional que também é secretada pós-irradiação e atua como vilã no processo fibrótico tecidual, apresentando um papel dual na carcinogênese por atuar tanto na progressão quanto na supressão tumoral (Dumont *et al.*, 2003).

Outro fator de crescimento secretado pós irradiação é o EGF, que atua em vias de sinalização de proliferação celular. Tal evento amplifica a sinalização da radiação mediada por ligação dessas citocinas em receptores de membranas de células adjacentes não atingidas diretamente pela radiação, além da sinalização via junções Gap (Hamada *et al.*, 2007). A figura **16** demonstra um esquema dos efeitos primários e tardios da IR.

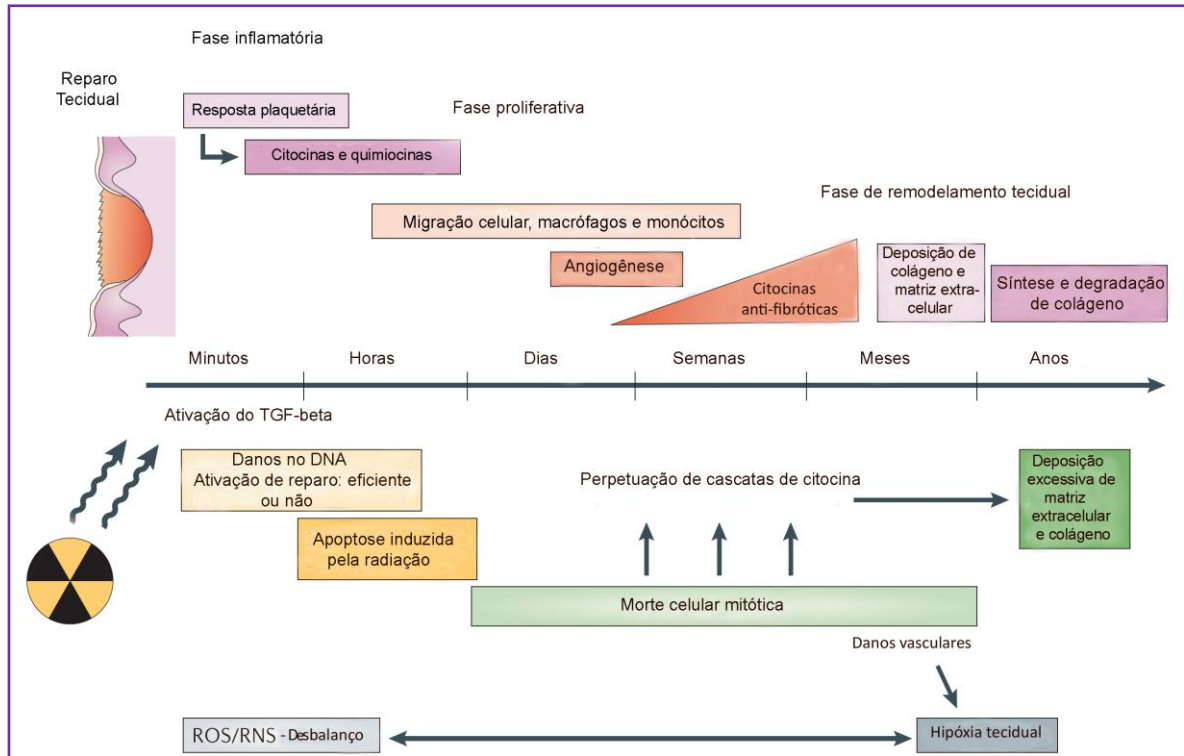


Figura 16: Fases do processo de cicatrização e fibrose induzida pela radiação na escala do tempo. A cicatrização normal é um processo orquestrado de resposta à injúrias, iniciando-se imediatamente após um determinado trauma, com intuito de remodeler o tecido, não só em momentos iniciais, mas sim durante anos. A radiação ativa a maquinaria de cicatrização além de uma série de processos que são distintos daqueles envolvidos no processo de cicatrização normal. A secreção de fatores solúveis faz com que as vias que regulam o remodelamento tecidual permaneçam ativas por longos períodos, levando à uma deposição excessiva de matriz extra-celular e colágeno no tecido irradiado, levando à fibrose. Espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS), Fator de crescimento transformante β (TGF β) Adaptado de. *Bentzen* 2006.

Respostas radioadaptativas são induzidas em células expostas previamente a uma baixa dose de radiação, devido à ativação de mecanismos de reparo do DNA, sinalizações de *stress* celular e ativação de vias de sobrevivência (Mokim *et al.*, 2008). Existe a hipótese de transpor esta observação para o contexto clínico, atribuindo o reaparecimento de tumores refratários ao regime radioterapêutico, que consiste no multifracionamento de doses em determinados intervalos de tempo. Esta janela terapêutica de administração das doses poderia induzir a ativação de NF- κ B e mecanismos de reparo do DNA (Figura 17), podendo este reparo ser fidedigno ou não, gerando radiorresistência; e conseqüentemente promover instabilidade genômica, favorecendo a repopulação do tumor e metástases secundárias (Kevin *et al.*, 2005; Bentzen *et al.*, 2006; Ahmed *et al.*, 2008).

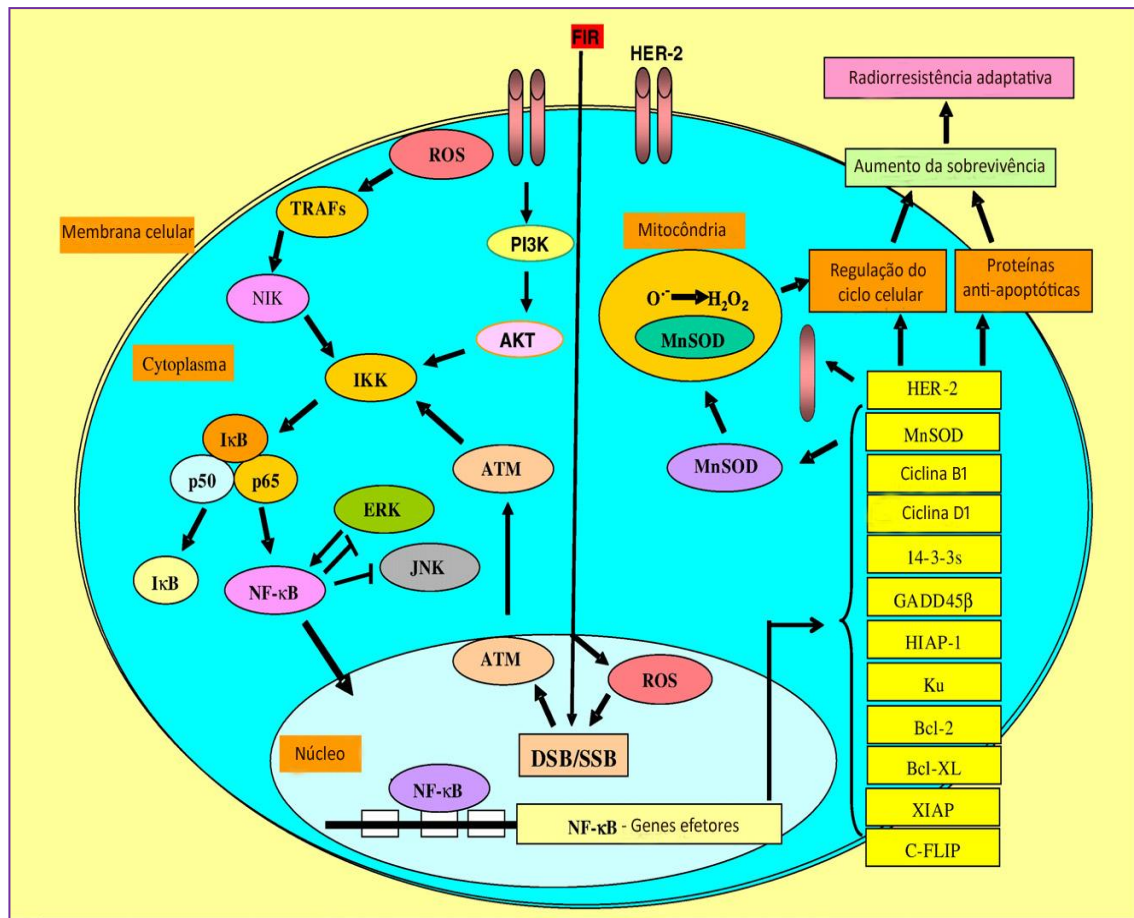


Figura 17: Representação esquemática da rede de sinalização envolvendo NF- κ B na radiorresistência adaptativa induzida pela radiação. O fracionamento de doses de radiação induz danos no DNA. Tal fato ativa a proteína Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM), a qual se transloca para o citoplasma e ativa a via NF- κ B. Espécies reativas de oxigênio geradas na célula não somente induz danos no DNA, mas também via TRAFs (fator associado ao receptor TNF). A ativação tanto nuclear quanto citoplasmática da via NF- κ B tem sido vista como necessária na *up*-regulação de genes efetores da radiação que incluem elementos antiapoptóticos e do ciclo celular. NF- κ B regula também a expressão de superóxido desmutase (MnSOD), enzima mitocondrial importante no processo de detoxificação de radicais superóxidos. Adaptado Ahmed *et al.*, 2007.

Embora a estratégia multidisciplinar baseada no quimiorradiação seja muito utilizada nos protocolos clínicos; resultem no controle local do tumor e aumente a média de sobrevivência em alguns casos (Carlomagno *et al.*, 2009), ainda existem os insucessos terapêuticos, como resistência, doença refratária ao tratamento e ocorrência de efeitos colaterais intensos, como náusea, vômitos e síndromes gastrointestinais por alterações nas junções *tight*, levam ao aumento da permeabilidade celular (Somosy, 2000). Um estudo realizado pelo nosso grupo demonstrou a redistribuição de proteínas do complexo juncional apical e inalteração

da viabilidade celular após dose única de radiação em linhagem de adenocarcinoma de cólon (De Carvalho *et al.*, 2006). Embora exista um crescente aumento nos estudos envolvendo novas respostas celulares à radiação, pouco se sabe sobre as vias de sinalização que medeiam os efeitos observados à nível de proteínas de junção e citoesqueleto de actina. Estes eventos são importantes no processo de aquisição de resistência ao tratamento e aumento do potencial invasivo através da ativação do programa da Transição Epitélio Mesenquimal.

1 RELEVÂNCIA DO TRABALHO

Considerando que:

- O sucesso terapêutico do tratamento combinado entre radioterapia e quimioterápico é ainda é alvo de muitas controvérsias, devido à existência de metástase refratária ao tratamento;
- Mesmo com o advento de tecnologias que otimizam a biodistribuição da dose de radiação somente para o tecido alvo, os efeitos colaterais ainda são intensos;
- A radiação induz a secreção de fatores solúveis, tais como Interleucinas, TNF α TGF β e EGF, os quais atuam em vias congruentes com o processo fibrótico e a Transição Epitélio Mesenquimal (TEM);
- Que a perda da adesão célula-célula e a reorganização do citoesqueleto de actina é um evento importante na TEM, progressão tumoral e no processo de metástase;

Torna-se de suma importância o estudo de eventos celulares e moleculares induzidos pelo tratamento com radiação ionizante em câncer colo-retal. Além disso, a identificação de vias de sinalização celular envolvidas na perda da adesão célula-célula, com redistribuição das proteínas do complexo juncional apical e alterações da organização do citoesqueleto de actina, pode contribuir no entendimento do desenvolvimento da TEM, e conseqüentemente na progressão deste tipo de câncer.

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo é analisar os eventos celulares e moleculares induzidos pela radiação ionizante em células de câncer colo-retal. Principal ênfase dar-se à identificação das vias de sinalização celular que medeiam a perda da adesão célula-célula com redistribuição das proteínas do complexo juncional apical, alterações do citoesqueleto de actina e migração celular.

2.1 Objetivos específicos:

- Avaliar a expressão e localização subcelular das principais proteínas da junção aderente em diferentes tempos após a irradiação em células de adenocarcinoma de cólon humano, Caco-2;
- Analisar a organização do citoesqueleto de actina em diferentes tempos após o tratamento com a radiação;
- Determinar se a radiação ionizante aumenta o potencial migratório das células Caco-2 *in vitro*;
- Elucidar se as vias de sinalização Src, EGF e MAPK estão envolvidas nos processos anteriormente citados, através da utilização de inibidores farmacológicos;
- e
- Analisar se estes eventos podem se inseridos no contexto de processos relacionados com a Transição Epitélio Mesenquimal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Anticorpos e Reagentes

Anticorpos primários: Monoclonal anti-E-caderina produzido em camundongo, clone 36 (BD Biosciences - San Diego, CA, EUA), monoclonal anti- β -catenina produzidos em coelho (Sigma Chemical Co. - St Louis, MO, EUA), monoclonal contra a proteína constitutiva α -tubulina produzido em camundongo.

- Faloidina conjugada a TRITC (tetrametil rodamina- isotiocianato) foi obtida da Sigma Chemical Co.

Anticorpos secundários: anti-coelho e anti-camundongo do tipo IgG, conjugados a peroxidase, foram adquiridos da Sigma Chemical Co. Anti-coelho e anti-camundongo do tipo IgG conjugado à fluoresceína ou Alexa 488 foram obtidos da Invitrogen Co (Carlsbad, EUA).

Inibidores farmacológicos de vias de sinalização: Os inibidores PP2 (Pirazolopirimidina, inibidor de Src quinase); PD153035 (4-[(3-Bromophenyl)amino]-6,7-dimethoxyquinazoline, inibidor da via EGFR); PD98059 (2'-Amino-3'-methoxiflavona, inibidor de MAPK), foram obtidos da Merck Chemicals Ltd., Beeston, Nottingham, EUA. Os inibidores foram diluídos em DMSO e mantidos em concentrações estoques, sendo diluídos para a concentração de uso imediatamente antes do experimento.

3.2 Cultura de células

A linhagem celular derivada de adenocarcinoma de cólon humano, Caco-2, foi obtida da ATCC (HTB- 37 TM American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA) e cultivada em meio DMEM (Invitrogen Co) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Invitrogen Co), penicilina G (60 mg/L) e streptomomicina (100 mg/L) (Invitrogen) em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Estas células são capazes de formar monocamada epitelial quando atingem confluência em cultura *in vitro*, e apresentam complexos juncionais funcionais. As células foram tripsinizadas semanalmente com uma solução de tripsina 0,05% diluída em PBS contendo 0,02% EDTA. Para os ensaios experimentais, as células foram semeadas na densidade de

10,5 x 10⁴ células/mL até atingirem 90% de confluência, sendo o meio de cultura trocado diariamente para evitar a depleção de nutrientes.

3.3 Inibição farmacológica

Foram utilizados inibidores específicos de vias de sinalização a partir de solução estoque diluída em DMSO. Monocamada de células foram depletadas de soro por 1 hora e antes irradiação foram pré-tratadas 1 hora com os seguintes inibidores nas respectivas concentrações: PP2 (100 nM); PD153035 (100 nM) e PD98059 (50 µM).

3.4 Irradiação das células:

Monocamadas de células Caco-2 foram irradiadas em meio DMEM sem soro fetal bovino, adicionado ou não de inibidores farmacológicos, com dose única de 5 Gy e taxa de dose de 25 Gy/min, a 25°C em irradiador de Césio, (IBL, Cs 437). As análises foram realizadas 1 hora e 24 horas após a irradiação.

3.5 Microscopia de fluorescência

Imunofluorescência para proteínas E-caderina, β -catenina e Claudina-1: As células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro e após atingirem a confluência, foram lavadas três vezes com PBS contendo MgCl₂ 1mM e CaCl₂ 0,1 mM (PBS/CM), pH 7,2. Para a proteína de junção *tight* claudina-1, a fixação foi realizada em metanol P.A., a - 20°C, e para proteínas da junção aderente, a fixação da monocamada celular foi realizada em paraformaldeído a 4%, diluído em PBS/CM por 10 minutos. As células foram permeabilizadas com solução de Triton X-100 0,1%, contendo albumina bovina sérica (BSA) 0,2% em PBS/CM. As células foram lavadas e incubadas com NH₄Cl 50 mM em PBS/CM. Após esta etapa foi realizado bloqueio utilizando BSA 3% diluído em PBS por 1 hora. As células foram então incubadas com anticorpo primário anti E-caderina (1:200), anti β -catenina (1:200) e anti

claudina-1(1:30) diluídos na solução de bloqueio, por 2 horas e lavadas com PBS/CM. Posteriormente incubou-se com anticorpo secundário conjugado a Alexa flúor 488 por 1 hora, a 37°C. Finalmente, as células foram novamente lavadas com PBS e as lamínulas foram montadas com n-propilgalacto. As Imagens foram obtidas em microscópio Axiovert S 100 acoplado a uma câmera CCD (VarioCam, PCO Computer Optics, Alemanha) utilizando um programa de captura de imagens KS 300 (Carl Zeiss Inc., Alemanha).

Análise do citoesqueleto de actina: Para visualização da distribuição dos filamentos de actina, a monocamada crescida sobre lamínulas de vidro foi fixada e permeabilizada como descrito anteriormente para E-caderina e incubadas com 500 ng/mL de faloidina conjugada a rodamina, por 30 minutos à temperatura ambiente. As Imagens foram obtidas em microscópio confocal LSM 510 (Carl Zeiss Inc.) equipado com um programa de captura de imagens LSM Image browser (Carl Zeiss Inc., Alemanha). Foram realizadas seções ópticas próximas ao plano apical (8 µm), médio (4 µm) e basal da monocamada celular (plano X-Y), e no plano perpendicular (plano X-Z) de pelo menos três experimentos.

3.6 Obtenção de lisados totais

Após os diferentes tratamentos, as monocamadas celulares foram lavadas em PBS e incubadas em tampão de lise (Triton X-100 1% , deoxicolato de sódio 0.5% SDS 0,2% , cloreto de sódio 150 mM, EDTA 2 mM , Hepes 10 mM , pH 7.4, contendo fluoreto de sódio 20 mM , ortovanadato de sódio 1 mM e um coquetel de inibidores de proteases (PMSF 1 mM, aprotinina 1µg/mL, fenantrolina 2,5 µM, leupeptina 10 µM e pepstatina 5 µg/mL (Sigma Chemical Co.)). A homogeneização foi feita utilizando ponteira plástica de 200 µL, na temperatura de 4° C. Após centrifugação a 10.000 g por 10 minutos a 4° C, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80° C.

3.7 Obtenção de frações solúveis e insolúveis em Triton X-100

De acordo com o protocolo estabelecido por Hinck *et al.* (1994), as monocamadas celulares foram lavadas em PBS e homogeneizadas em tampão CSK (Tris-HCl 10 mM, pH 6,8, NaCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, Triton X-100 0,5%, sacarose 300 mM) contendo ortovanadato de sódio 1 mM, fluoreto de sódio 20 mM e o coquetel de inibidores de proteases, por 30 minutos a 4° C. Após centrifugação a 10.000 g por 10 minutos a 4° C, o sobrenadante obtido, que corresponde a fração solúvel em Triton X-100 (proteínas não associadas do citoesqueleto de actina), foi coletado e armazenado a -80° C. O pellet foi homogeneizado em tampão SDS (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 5 mM, EGTA 2,5 mM, SDS 1%) e fervido por 10 minutos. Após centrifugação a 10.000 g por 10 minutos, o sobrenadante, que corresponde à fração insolúvel em Triton X-100 (proteínas associadas ao citoesqueleto de actina), foi coletado e armazenado a -80° C.

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

Para avaliar os níveis de expressão das proteínas, bem como sua distribuição nas frações solúveis e insolúveis em Triton X-100, a concentração protéica dos lisados totais bem como das frações solúveis e insolúveis foi estimada utilizando-se um kit comercial para dosagem de proteína (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA). Quantidades iguais de proteínas (30 µg) foram separadas por SDS-PAGE usando géis na concentração de 7,5, 10 e 12%; e transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando-se o aparelho de transferência semi-seco (Bio-Rad Laboratories Inc.) a 10 V por 45 minutos. As membranas foram mantidas em tampão de bloqueio TBS-T (Tris-HCl, 20 mM, pH 7,6, NaCl 137 mM e Tween 20 0,1%), contendo leite desnatado 5%, durante 60 min em agitador orbital. Em seguida, foram incubadas com os anticorpos primários (E-caderina, na concentração de 1:5000; β-catenina 1:3500; claudina-1 (1:250); α-tubulina (1:500) diluídos em TBS-T contendo leite desnatado 5%) por 2 horas ou *overnight*. Após sucessivas lavagens com TBS-T, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários (camundongo

IgG e coelho IgG, conjugados a peroxidase (diluição de 1:40.000 em TBS-T contendo leite desnatado 5%) por 60 minutos. Finalmente, as membranas foram lavadas 5 vezes em TBS-T e a reatividade para as proteínas em estudo foi determinada utilizando-se um kit comercial de quimioluminescência (Amersham Biosciences GE healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Análise densitométrica foi efetuada utilizando-se o programa Labworks 4.6 (UVP Inc., Upland, CA, EUA).

3.9 Ensaio de migração celular (*Wound Healing Assay*)

Para avaliar o efeito da irradiação e dos diferentes tratamentos com os inibidores farmacológicos na migração celular, monocamadas de células foram submetidas à um risco com ponteira estéril de 10 µl. A análise do potencial migratório foi monitorada por microscopia diferencial interferencial (DIC) nos tempos zero, 24 e 48 horas após os diferentes tratamentos, utilizando o microscópio Axiovert s 100 (Carl Zeiss Inc.). A aquisição de imagens foi efetuada por uma câmera CCD (VarioCam, PCO Computer Optics, Alemanha) equipada com um programa de captura de imagens KS 300 (Carl Zeiss Inc.). A quantificação da migração foi realizada através de medições da extensão do limite da ruptura remanescente entre os dois lados da monocamada, utilizando o programa ZEN 2008 Light Edition, (Carls Zeiss , Inc., Alemanha). As medições foram realizadas em três campos diferentes, em três experimentos independentes e os valores obtidos foram convertidos em porcentagem.

3.10 Ensaio de Proliferação Celular (Cristal Violeta)

Com a finalidade de analisar o efeito dos tratamentos na proliferação celular, foi realizado o ensaio do cristal violeta, no qual 2×10^4 células foram plaqueadas em placas de 96 poços e após o período de aderência (4 horas) iniciou-se os tratamentos descritos anteriormente. Nos tempos de 1 hora, 24 e 48 horas após os tratamentos, as células foram lavadas com PBS e fixadas em etanol 100% por 10 minutos. Posteriormente, foram incubadas com solução contendo cristal violeta (cristal violeta 0,05% em etanol 20%) por 10 min e, após lavagem com água

destilada, e com metanol por 5 minutos. A quantificação colorimétrica foi realizada em leitor de Elisa, a 595 nm.

3.11 Análise estatística

Para a construção dos gráficos foram adotados os seguintes procedimentos:

- a) Quantificação de níveis protéicos em lisados totais: após a conclusão de 3 experimentos independentes, os valores densitométricos referentes às bandas das proteínas em estudo – que correspondem a intensidade do sinal de reatividade nos *immunoblottings* – foram divididos pelo valor densitométrico referente a banda da proteína constitutiva, alfa ou beta 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: a proporção de proteína em cada fração foi obtida em porcentagem, considerando que o somatório dos valores densitométricos das duas frações representa a quantidade total de proteína analisada. Para se obter um gráfico representativo do grau de associação das proteínas com o citoesqueleto de actina, os valores densitométricos referentes ao controle foram ajustados 100%;
- c) Ensaio de migração celular: Após 3 experimentos independentes, as medidas do espaçamento entre a monocamada foram expressas em porcentagem de migração e o tempo zero foi normalizado para momento inicial da migração, sendo igual a zero. A porcentagem de migração dos tratamentos foi comparada à porcentagem de migração do controle, em mm.
- d) Ensaio de proliferação celular: Após 3 triplicatas, as médias das leituras obtidas dos grupos tratados e controle em diferentes tempos foram analisadas, sendo comparadas com o perfil de proliferação do controle.

A análise estatística foi realizada com auxílio do *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Para os ensaios de migração e proliferação celular foi realizado one-way ANOVA com o pós-teste Bonferroni e Dunnet. A análise densitométrica referente aos *immunoblottings* foi normalizada para 1 (células não tratadas) e realizado one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet para os *immunoblottings* de extração total e frações solúveis e insolúveis em TritonX-100.

As amostras foram consideradas estatisticamente significativas quando $*P < 0.05$ pelo teste *One-way ANOVA*, após a análise de três experimentos independentes.

4 RESULTADOS

4.1 A radiação ionizante induz redistribuição de proteínas das junções aderentes e esse evento é modulado de forma diferencial por Src, EGFR e MAPK

Foi relatado que a desorganização do complexo juncional após exposição à radiação ionizante é um evento relacionado à processos patológicos agudos e tardios e à perturbação da homeostase intestinal em pacientes que foram submetidos à radioterapia (Somosy *et al.*, 2002). Em um estudo feito pelo nosso Grupo (de Carvalho *et al.*, 2006) foi mostrado que a radiação ionizante promove desorganização do complexo juncional apical e induz um aumento da permeabilidade paracelular. Porém, os mecanismos moleculares responsáveis por este evento ainda não são conhecidos. Uma vez que a localização justamembranar das proteínas das junções aderentes é fundamental para manter a integridade epitelial e a polaridade celular, avaliou-se o perfil de distribuição destas proteínas após o tratamento com radiação de 5 Gy e as vias de sinalização envolvidas neste processo. Monocamadas de células Caco-2 foram pré-tratadas por 1 hora com inibidores farmacológicos específicos de vias de sinalização como indicado: 100 nM de PP2 (Src), 100 nM de PD153035 (EGFR) e 50 μ M de PD98059 (MAPK) antes da exposição uma dose de 5 Gy de radiação, utilizando-se um irradiador de Césio¹³⁷ com taxa de dose de 2,5 Gy/min. A localização subcelular das proteínas E-caderina e β -catenina foram monitoradas por imunofluorescência e por *immunoblotting* 1 e 24 horas após a irradiação.

A figura 18 mostra o perfil de distribuição da E-caderina 1 e 24 horas após irradiação e o efeito dos respectivos pré-tratamentos com os inibidores. Nas células não irradiadas, podemos observar o perfil de marcação normal da E-caderina mostrando uma distribuição justamembranar. No entanto, após 1 e 24 horas de irradiação com dose única de 5 Gy observa-se uma redistribuição da E-caderina dos contatos célula-célula para o citoplasma, bem como são observadas alterações na morfologia celular. Tais eventos foram revertidos quando as células foram pré-tratadas com os inibidores utilizados, sugerindo que as vias Src, EGFR e MAPK estão envolvidas na desorganização das junções aderentes promovido pela radiação

ionizante, tanto em estágios iniciais (1 hora) quanto tardios (24 horas) após irradiação.

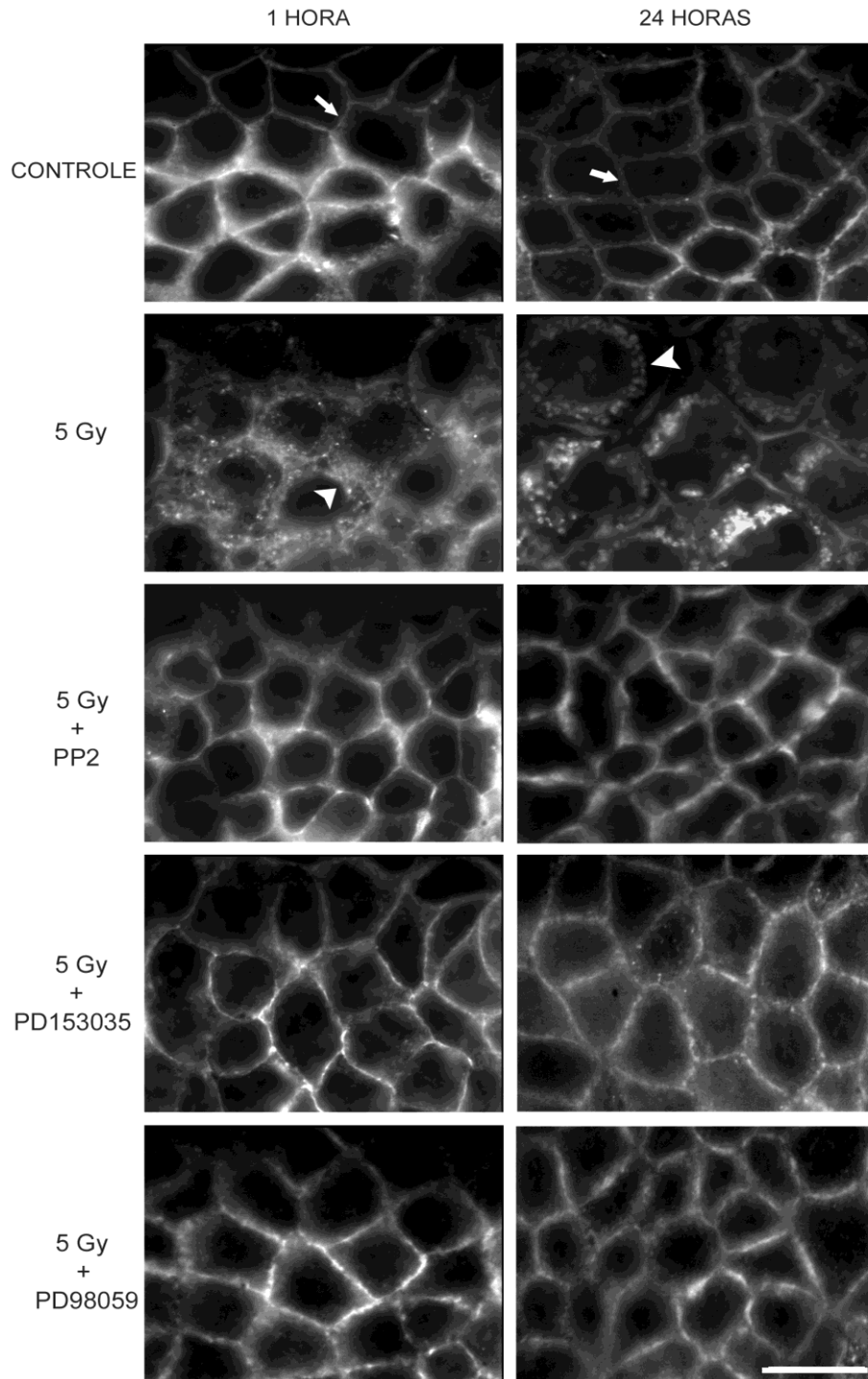


Figura 18. Src, EGFR e MAPK medeiam a redistribuição da E-caderina induzida pela radiação ionizante. Monocamadas de células Caco-2 foram pré-tratadas com inibidores de vias de sinalização: 100 nM de PP2 (Src), 100 nM de PD153035 (EGFR) e 50 μ M de PD98059 (MAPK). Subsequentemente, as células foram irradiadas na dose de 5Gy e analisadas por imunofluorescência usando um anticorpo contra E-caderina 1 e 24 horas após a irradiação. A seta indica uma distribuição justamembranar de E-caderina nas células não irradiadas, no entanto após a irradiação observa-se uma redistribuição da E-caderina para o citoplasma (cabeça de seta). Observe que a inibição farmacológica das vias de sinalização Src, EGFR e MAPK foi capaz de reverter o efeito de redistribuição da proteína E-caderina causado pela radiação nos tempos analisados. Barra=12 μ m

A visualização da distribuição subcelular por *immunoblotting* foi realizada usando frações solúveis e insolúveis através da extração diferencial com detergente não iônico Triton X-100, na qual a fração solúvel corresponde às proteínas solúveis citoplasmáticas, enquanto que a fração insolúvel corresponde às proteínas ligadas ao citoesqueleto e, portanto funcionais. As figuras 19a e 19b mostram o perfil de distribuição subcelular da proteína de junção aderente E-caderina e a respectiva análise densitométrica 1 e 24 horas após irradiação, além dos efeitos dos pré-tratamentos com os inibidores farmacológicos. Foi possível observar que a radiação promove um aumento significativo da marcação de E-caderina na fração solúvel em Triton-X 100 1 hora após o tratamento e este efeito foi revertido pelo pré-tratamento com os inibidores de Src, EGFR e MAPK. Desta forma, estas observações corroboram com os resultados obtidos na imunofluorescência. Embora o aumento da E-caderina na fração solúvel 24 horas após a irradiação não tenha sido significativo, podemos observar no gráfico da densitometria que ocorre um aumento acentuado da translocação da E-caderina da fração insolúvel para a solúvel, enquanto que na imunofluorescência observamos também uma intensa marcação citoplasmática para E-caderina neste mesmo tempo.

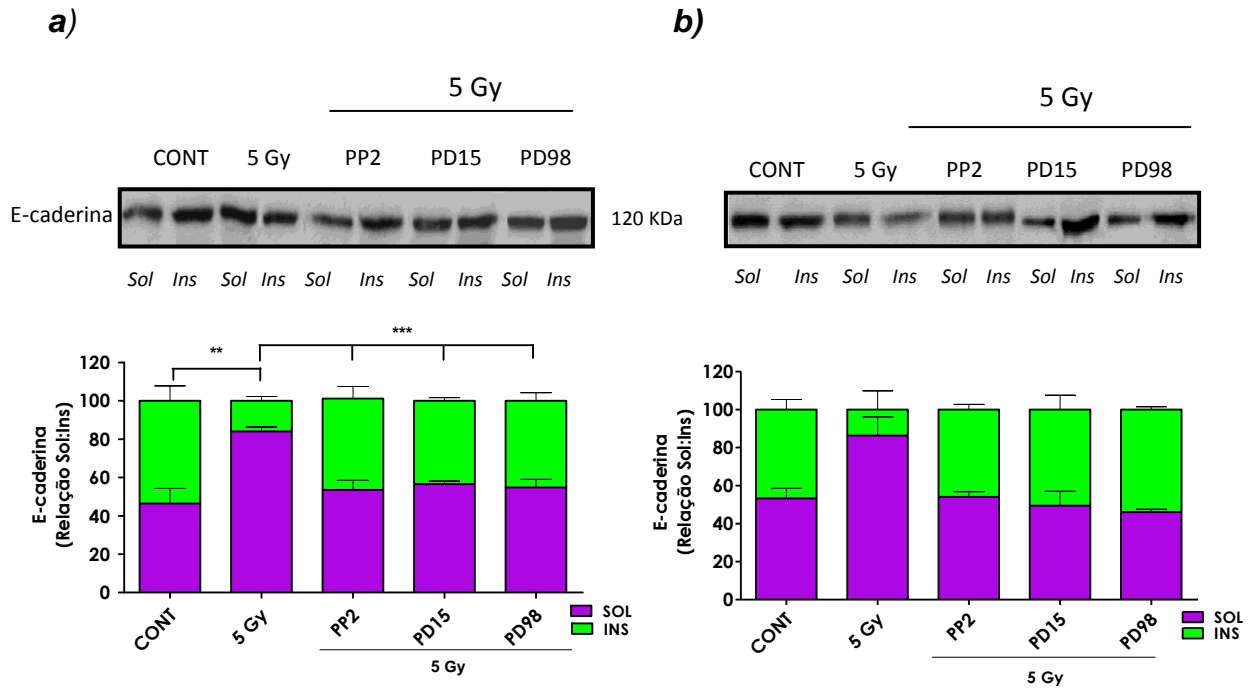


Figura 19: A translocação da E-caderina da fração insolúvel para a solúvel após irradiação é mediada pelas vias Src, EGFR e MAPK. Células Caco-2 em confluência foram pré-tratadas com inibidores farmacológicos de vias de sinalização: PP2 (Src), PD153035 (EGFR) e PD98059 (MAPK). Após 1 hora, as células foram irradiadas na dose de 5 Gy e frações solúveis (Sol) e insolúveis (Ins) em Triton X-100 foram obtidas para análise da localização subcelular da E-caderina por *immunoblotting* 1 hora (a) e 24 horas (b) após irradiação. A dose de radiação de 5 Gy causa uma translocação estatisticamente significativa da E-caderina para a fração solúvel 1 hora após o tratamento, já este evento não foi significativo após 24 horas de irradiação. Os inibidores utilizados em ambos os tempos analisados revertem este efeito. As colunas dos gráficos representam a média da análise densitométrica de três experimentos independentes, com os respectivos desvios padrões. Os valores densitométricos da relação Sol:Ins foram calculados usando a seguinte equação: relação Sol:Ins = quantidade de proteína na fração analisada x 100 / soma da quantidade de proteína nas duas frações. A barra representa o erro padrão. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Bonferroni. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. CONT: Controle, Sol: fração solúvel em Triton X-100, Ins: fração insolúvel em Triton X-100.

A β -catenina é outra proteína constituinte das junções aderentes e atua em diversos processos relacionados à manutenção da funcionalidade da junção, além de possuir uma função extrajuncional relacionada com a proliferação celular e tumorigênese (Abe *et al.*, 2008; Van *et al.*, 2003). Considerando que esta proteína forma um complexo com a E-caderina nas junções aderentes funcionais, avaliamos também sua distribuição subcelular após a irradiação e pré-tratamentos com os inibidores farmacológicos. A figura 20, mostra por imunofluorescência o perfil normal de distribuição justamembranar da β -catenina nos contatos célula-célula, no controle (não irradiado), e nos tempos de 1 e 24 horas. Após a irradiação, observou-se uma internalização da proteína para o citosol em ambos os tempos analisados, sendo este efeito mais evidente 1 hora após a irradiação. Este evento foi prevenido quando as células foram pré-tratadas com os inibidores de Src, EGFR e MAPK, sugerindo o envolvimento destas vias na redistribuição da E-caderina após o tratamento com a radiação.

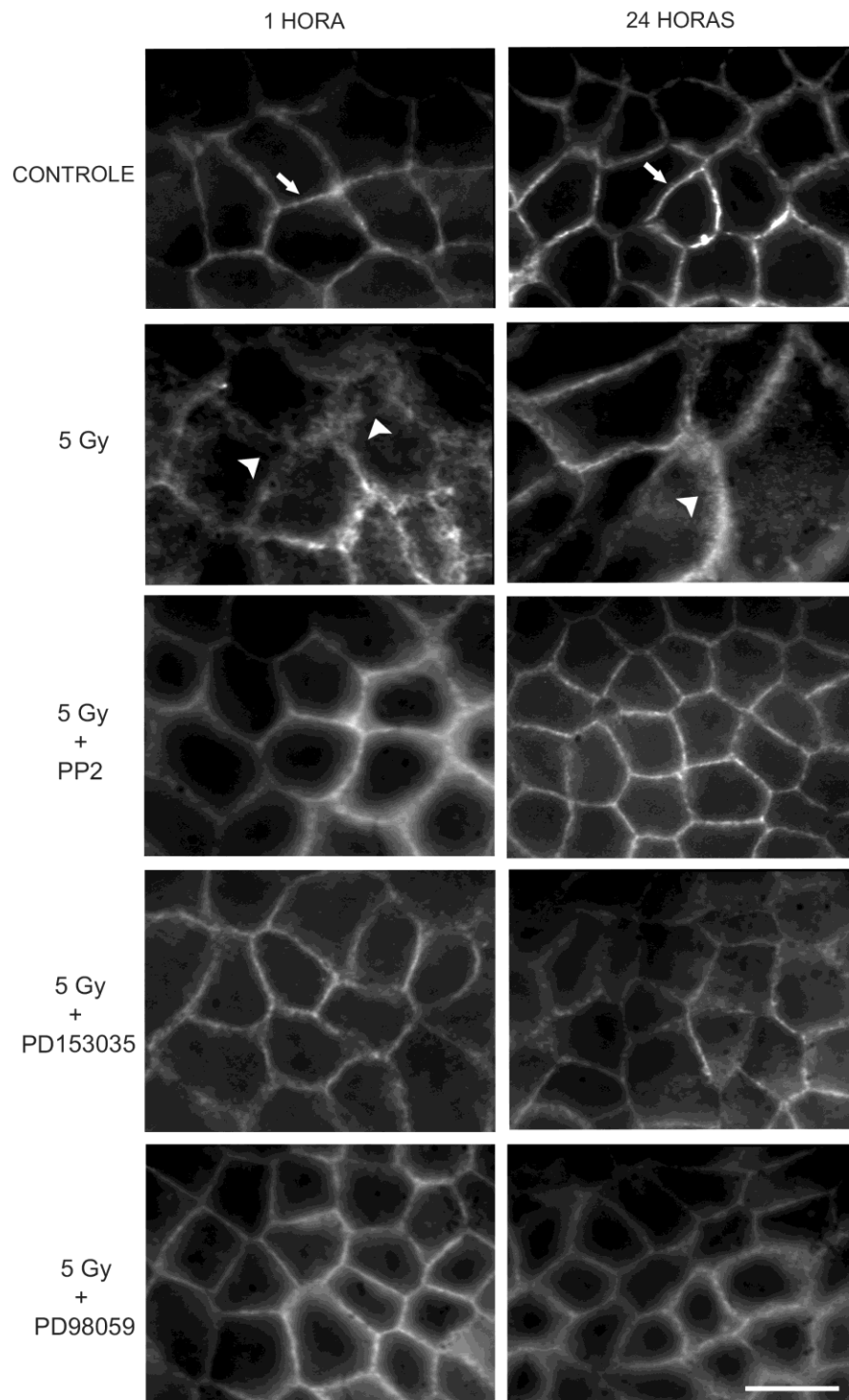


Figura 20: A inibição farmacológica das vias de sinalização Src, EGFR e MAPK reverte o efeito de redistribuição da proteína β -catenina causado pela radiação. Monocamadas de células Caco-2 foram pré-tratadas por 1 hora com inibidores de vias de sinalização como indicado: 100 nM de PP2 (Src); 100 nM de PD153035 (EGFR), e 50 μ M de PD98059 (MAPK). Logo, as células foram irradiadas na dose de 5 Gy e submetidas a imunofluorescência para β -catenina como indicado. As setas indicam a distribuição nos contatos célula-célula normal de β -catenina nos controles, enquanto que as cabeças de seta indicam a redistribuição da β -catenina à nível citoplasmático induzida pela radiação. Observe que o pré-tratamento com os inibidores utilizados revertem este efeito tanto no tempo de 1 hora quanto 24 horas após a radiação. Barra=12 μ m.

O perfil de distribuição subcelular da β -catenina 1 e 24 horas após a irradiação e tratamentos farmacológicos também foi analisado por imunoblotting (Figuras 21a-b). Foi possível observar que o tratamento com dose única de 5 Gy promove uma discreta translocação da β -catenina da fração insolúvel para a solúvel em ambos os tempos analisados, porém não foi significativo estatisticamente.

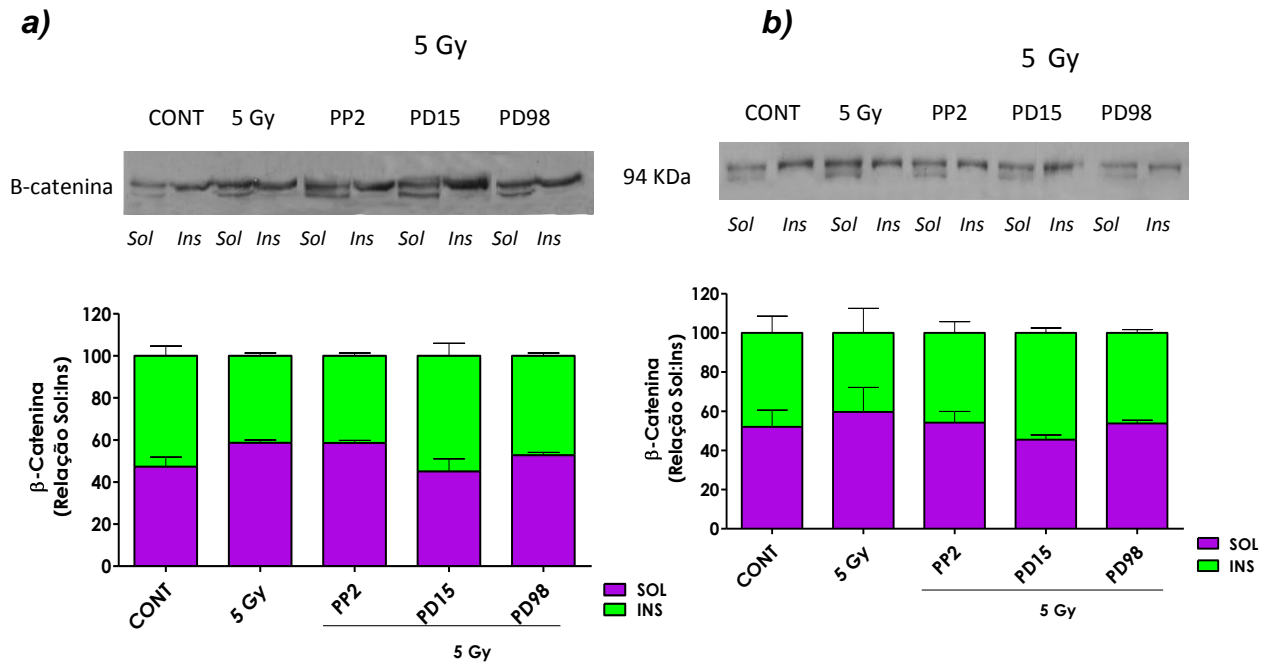


Figura 21: Distribuição subcelular da β -catenina 1 e 24 horas após a irradiação. Monocamadas de Caco-2 em confluência foram pré-tratadas com inibidores farmacológicos de vias de sinalização: 100 nM de PP2 (Src); 100 nM de PD153035 (EGFR); 50 μ M de PD98059 (MAPK). Após 1 hora, as células foram irradiadas na dose de 5 Gy. Frações solúveis (Sol) e insolúveis (Ins) em Triton X-100 foram obtidas para análise da localização subcelular da β -catenina por *immunoblotting* 1 hora (a) e 24 horas (b) após o tratamento com radiação. A radiação causa uma discreta translocação da β -catenina da fração insolúvel para a fração em ambos os tempos analisados, sendo que este efeito não foi significativo estatisticamente. As colunas dos gráficos representam a média da análise densitométrica de três experimentos independentes, com os respectivos desvios padrões. Os valores densitométricos da relação Sol:Ins são calculados usando a seguinte equação: relação Sol:Ins = quantidade de proteína na fração analisada x 100 / soma da quantidade de proteína nas duas frações. Sol: solúvel, Ins: insolúvel.

4.2 A radiação ionizante não altera a expressão de proteínas do complexo juncional apical.

Tendo em vista a alteração na distribuição das proteínas de junção aderente ilustradas na imunofluorescência, sob o tratamento com dose única de 5 Gy de radiação, a expressão dos níveis protéicos totais da E-caderina e β -catenina foram analisadas por imunoblotting. Como pode ser observado nas figuras 22 e 23, a radiação não alterou significativamente os níveis protéicos da E-caderina e β -catenina 1 hora (22a e 23a) e 24 horas (22b e 23b) após o tratamento com radiação.

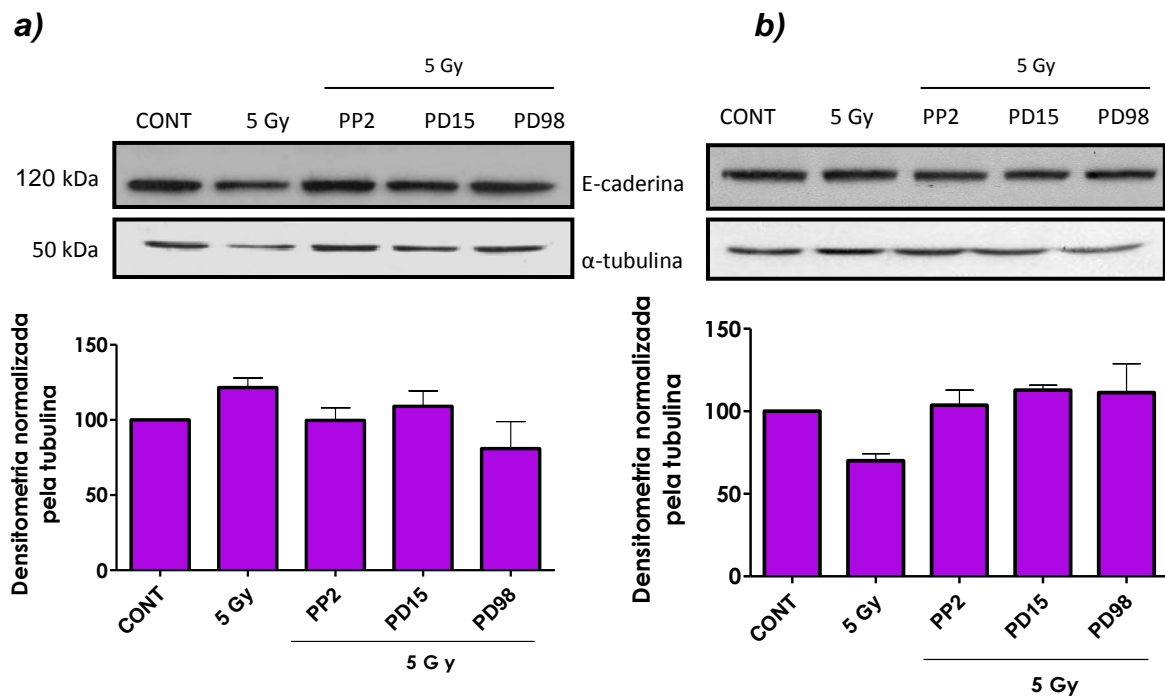


Figura 22: A radiação ionizante não altera os níveis de expressão de E-caderina 1 e 24 horas após o tratamento. Monocamadas de células Caco-2 foram irradiadas ou não com 5 Gy, e quando indicado, as células foram pré-tratadas com os inibidores: PP2 (100 nM); PD153035 (100 nM), PD98059 (50 μ M). Lisados totais foram obtidos 1 e 24 horas após a irradiação e analisados por *immunoblotting* para determinar a expressão da E-caderina. A análise densitométrica mostra que tanto a radiação quanto os inibidores não alteram os níveis de expressão da E-caderina. As colunas dos gráficos representam a média de três experimentos independentes com os respectivos desvios padrão, sendo a expressão total normalizada pela tubulina. A relação do controle foi ajustada para 100%. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Dunnett.

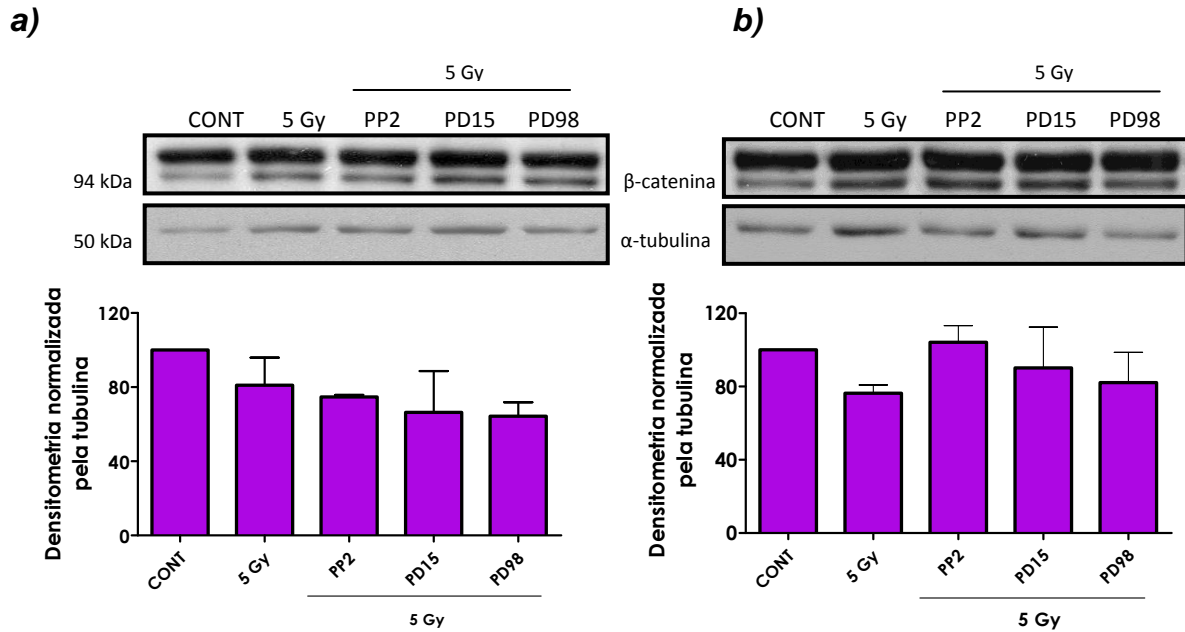


Figura 23: A radiação ionizante não altera os níveis de expressão de β -catenina 1 e 24 horas após o tratamento. Monocamadas de células Caco-2 foram irradiadas ou não com 5 Gy, e quando indicado, as células foram pré-tratadas com os inibidores: PP2 (100 nM); PD153035 (100 nM), PD98059 (50 μ M). Lisados totais foram obtidos 1 e 24 horas após a irradiação e analisados por *immunoblotting* para determinar a expressão de β -catenina. A análise densitométrica mostra que tanto a radiação quanto os inibidores não alteram significativamente os níveis de expressão da β -catenina. As colunas dos gráficos representam a média de três experimentos independentes com os respectivos desvios padrão, sendo a expressão total normalizada pela tubulina. A relação do controle foi ajustada para 100%. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Dunnett.

4.3 A irradiação causa desorganização do citoesqueleto de actina e este evento é regulado de forma diferencial por Src, EGFR e MAPK.

Vários estudos têm mostrado que a distribuição perijuncional dos filamentos de actina é um fator importante para manutenção da integridade do complexo juncional apical; e que a organização das fibras de *stress* à nível basal das células são importantes na ancoragem à matriz e atuam em diversas vias de sinalização envolvidas na migração celular (Pellegrin & Mellor, 2007; Miyoshi & Takai, 2008). Desta forma, analisamos se a radiação induziria alteração na distribuição do citoesqueleto de actina em todo o volume celular, em paralelo ao efeito do pré-tratamento com os respectivos inibidores de vias de sinalização. A distribuição do citoesqueleto de actina nas regiões basal, média e apical das células no plano X-Y e

no plano X-Z foi analisada por microscopia confocal em células marcadas com F-actina conjugada a rodamina.

As figuras 24 e 25 mostram a distribuição do citoesqueleto de actina induzida pela irradiação 1 e 24 horas após o tratamento, respectivamente, assim como o efeito dos pré-tratamentos com os inibidores. Em ambas as figuras, foi possível observar um perfil normal da distribuição da actina em células não irradiadas, tanto em 1 quanto em 24 horas, mostrando uma marcação pontual na região apical (microvilosidades) e contínua nos contatos célula-célula. Na região medial, a actina é predominante nas junções intercelulares, formando um anel perijuncional; e na região basal, formam as fibras de *stress* (seta).

Nas células tratadas com 5 Gy de radiação, observa-se que a radiação ionizante promoveu desorganização do citoesqueleto de actina a nível apical e medial, bem como induziu o rompimento das fibras de *stress* após 1 hora de tratamento e marcação periférica celular intensa de actina à nível basal (Figura. 24). Após 24 horas, observou-se que o efeito provocado pela radiação foi mantido à nível apical e medial, enquanto que à nível basal houve um restabelecimento das fibras de *stress*, porém, reorganizado de maneira diferente quando comparado ao irradiado de 1 hora. É possível observar regiões de marcação intensa de actina no tempo de 24 horas (cabeça de seta), estruturas radiais as quais são correlacionadas com áreas de achatamento celular visualizadas no eixo X-Z (Figura. 25).

Quando células foram pré-tratadas com os inibidores de vias de sinalização, foi observado que tanto os inibidores de Src quanto de EGFR foram capazes de inibir os efeitos da irradiação após 1 hora de tratamento, sugerindo que estas vias estão envolvidas nos efeitos iniciais sobre o citoesqueleto de actina. O efeito de reversão induzido por estas quinases foi através de todo o volume celular (Figura. 24). A inibição farmacológica da via MAPK foi capaz de restaurar somente os efeitos à nível apical e medial, não prevenindo os efeitos causados na região basal. Estes resultados indicam que MAPK estaria envolvida na modulação dos efeitos relacionados à região apical e medial da célula nos eventos iniciais da irradiação. A alteração provocada pela radiação pode ser evidenciada também pela visualização do eixo X-Z, no qual as células não irradiadas apresentam os filamentos de actina formando um anel pericelular, enquanto que as células irradiadas apresentam uma desorganização deste anel e marcação citoplasmática para actina. Os inibidores de

Src, EGFR e MAPK restauraram a organização anelar dos filamentos de actina 1 hora após a radiação (Figura. 24).

Após 24 horas, (Figura. 25) observou-se que os inibidores utilizados reverteram os efeitos induzidos pela radiação em todos os níveis da monocamada celular, restaurando as microvilosidades à nível apical, a localização perijuncional de actina à nível medial e reorganizando as fibras de *stress* à nível basal, semelhante ao visualizado nas células controle não irradiadas. Estes resultados sugerem a atuação das vias Src, EGFR e MAPK na modulação dos efeitos induzidos pela radiação sobre o citoesqueleto de actina, em eventos tardios ao tratamento. Esta observação também foi confirmada pela análise do eixo X-Z da monocamada, no qual foi evidente o restabelecimento dos anéis perijuncionais de actina nas células pré-tratadas com PP2, PD153035 e PD98059 e pela restauração das fibras de *stress* nas células Caco-2 (Figura 25).

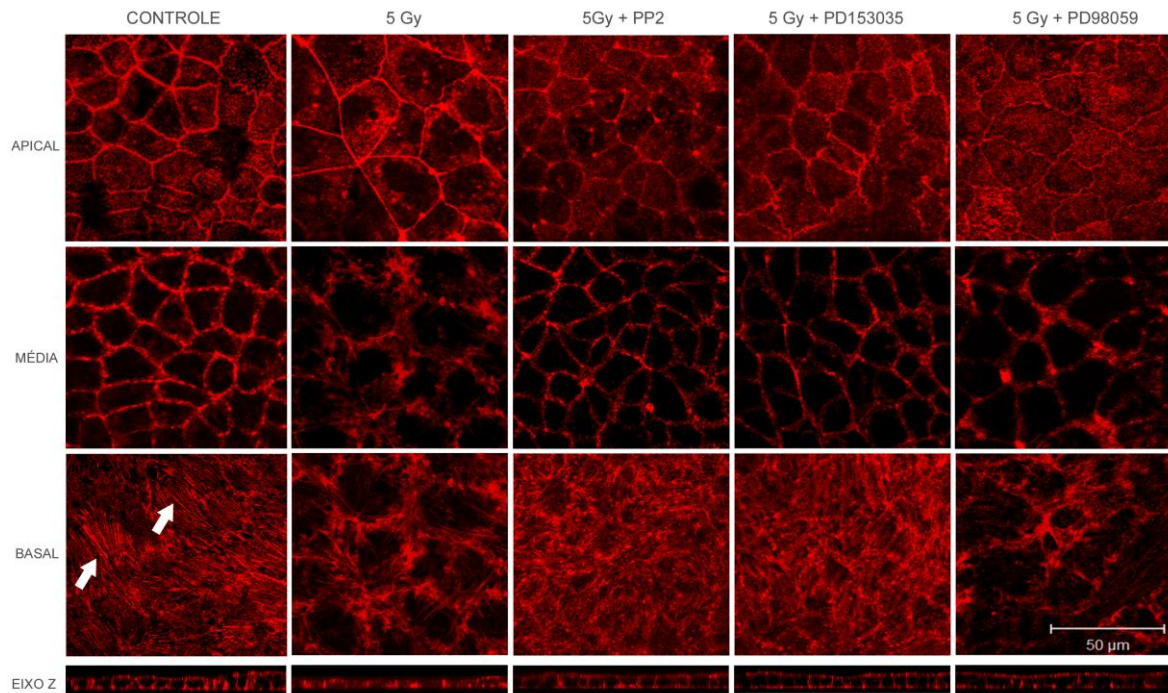


Figura 24: Src, EGFR e MAPK modulam de forma diferencial a distribuição do citoesqueleto de actina induzida pela radiação ionizante. Monocamadas de células Caco-2 foram pré-tratadas ou não com inibidores farmacológicos de Src (100 nM de PP2), EGFR (100 nM de PD153035) e MAPK (50 μ M de PD98059). Após 1 hora, as células foram irradiadas na dose de 5 Gy e marcadas com faloidina conjugada à rodamina. As imagens foram obtidas por microscopia confocal no plano X-Y em seções próximas à região apical (8 μ m), média (4 μ m) e basal e plano X-Z. Note que a radiação promove desorganização do citoesqueleto de actina nos três níveis observados: apical, medial e basal, quando comparados ao controle. À nível apical e medial, a radiação causa uma desorganização da actina quando comparada ao controle, efeito este que é revertido quando as células são tratadas com os inibidores de Src, EGFR e MAPK. Observe que o plano X-Z mostra uma marcação anelar de actina semelhante ao controle quando as células foram pré-tratadas com PP2, PD153035 e PD98059. Já à nível basal observa-se o rompimento das fibras de *stress* após a irradiação quando comparadas ao controle (seta), e os inibidores de Src (PP2) e EGFR (PD153035), mas não o de MAPK (PD98059) revertem este efeito.

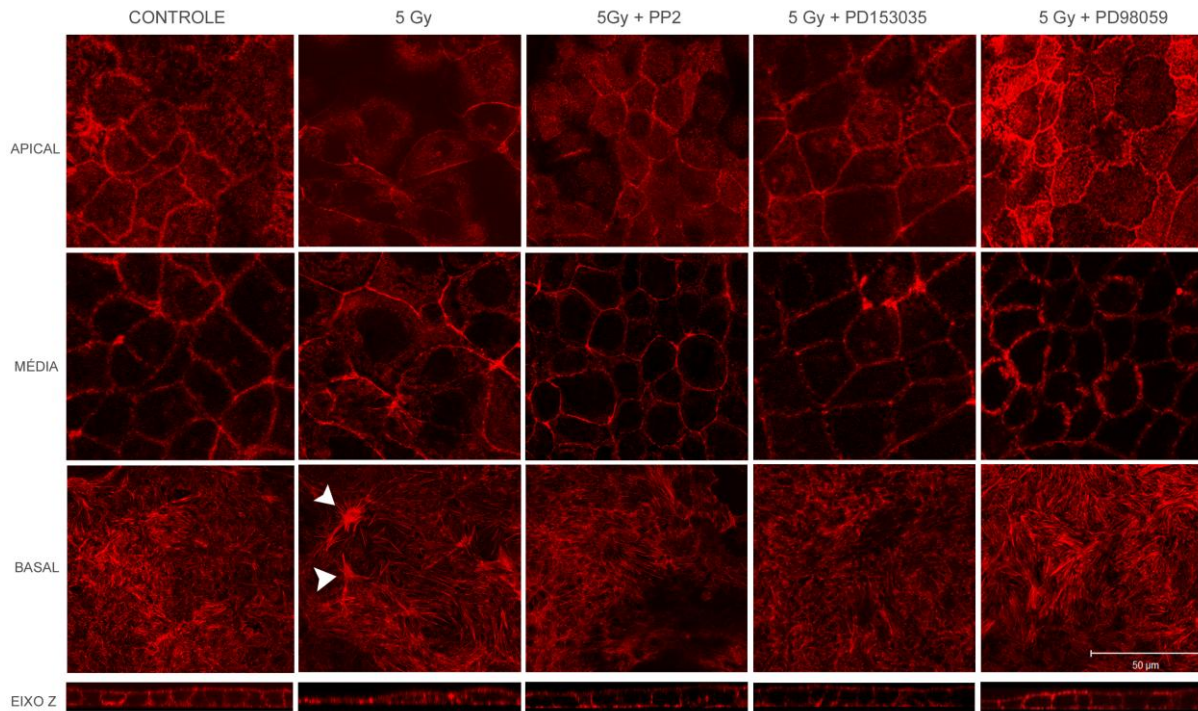


Figura 25: As vias Src, EGFR e MAPK modulam o efeito sustentado (24 horas) de redistribuição do citoesqueleto de actina induzido pela radiação. . Monocamadas de células Caco-2 foram pré-tratadas ou não com inibidores farmacológicos de Src (100 nM de PP2), EGFR (100 nM de PD153035) e MAPK (50 µM de PD98059). Após 1 hora, as células foram irradiadas na dose de 5 Gy e 24 horas após a irradiação foram marcadas com faloidina conjugada a rodamina. As imagens foram obtidas por microscopia confocal no plano X-Y em secções próximas à região apical (8 µm), média (4 µm) e basal e plano X-Z. Note que a desorganização do citoesqueleto de actina induzida pela radiação é sustentada 24 horas após o tratamento em todas as regiões analisadas. À nível apical e medial o efeito de desorganização da actina induzida pela radiação é mantido quando comparado ao controle, e a reversão deste efeito é mantida pelo pré-tratamento com os inibidores de Src, EGFR e MAPK. À nível basal, a radiação promove uma reorganização das fibras de stress 24 horas após o tratamento e formação de pontos de marcação intensa para actina (cabeça de seta). O plano X-Z mostra uma marcação anelar de actina no controle, indicando sua localização perijuncional. Já no irradiado, tal estrutura anelar é desestruturada e observa-se uma marcação citoplasmática para actina e regiões de achatamento celular, que são correlacionadas com os pontos de marcação intensa para actina observadas na região basal. Os inibidores de Src (PP2), EGFR (PD153035) e MAPK (PD98059) mantêm o efeito de restauração das fibras de *stress*, bem como a estrutura anelar perijuncional dos filamentos de actina quando observado pelo eixo X-Z.

4.4 As vias Src e MAPK estão envolvidas no aumento da motilidade celular induzida pela radiação 48 horas após o tratamento.

Uma vez que, a redistribuição de proteínas das junções aderentes e a reorganização do citoesqueleto de actina são eventos importantes na aquisição de um fenótipo potencialmente invasivo, foi analisado se o tratamento com a dose de radiação de 5 Gy seria capaz de induzir um aumento no potencial migratório das células Caco-2, através da técnica de “*wound healing*”.

As Figuras 26 a-b mostram que a radiação ionizante foi capaz de aumentar o potencial migratório das células Caco-2, através da quantificação do fechamento do espaço induzido na monocamada 48 horas após o tratamento. Quando as células foram pré-tratadas com os inibidores das vias Src e MAPK houve uma prevenção dos efeitos causados pela radiação após 48 horas. Embora seja observada uma inibição da migração no tempo de 24 horas após o pré-tratamento com PD153035 (inibidor de EGFR), este não foi estatisticamente significativo. Estes resultados são complementados pela visualização da morfologia das colônias 24 horas após a irradiação (26 c), na qual observa-se uma morfologia alterada com formação de estruturas protrusivas de membrana, sugerindo aumento do potencial migratório. Estes dados corroboram com os resultados observados na alteração do citoesqueleto de actina após a radiação, sugerindo o envolvimento de tais vias de forma concomitante no processo de reorganização do citoesqueleto e aumento da motilidade celular.

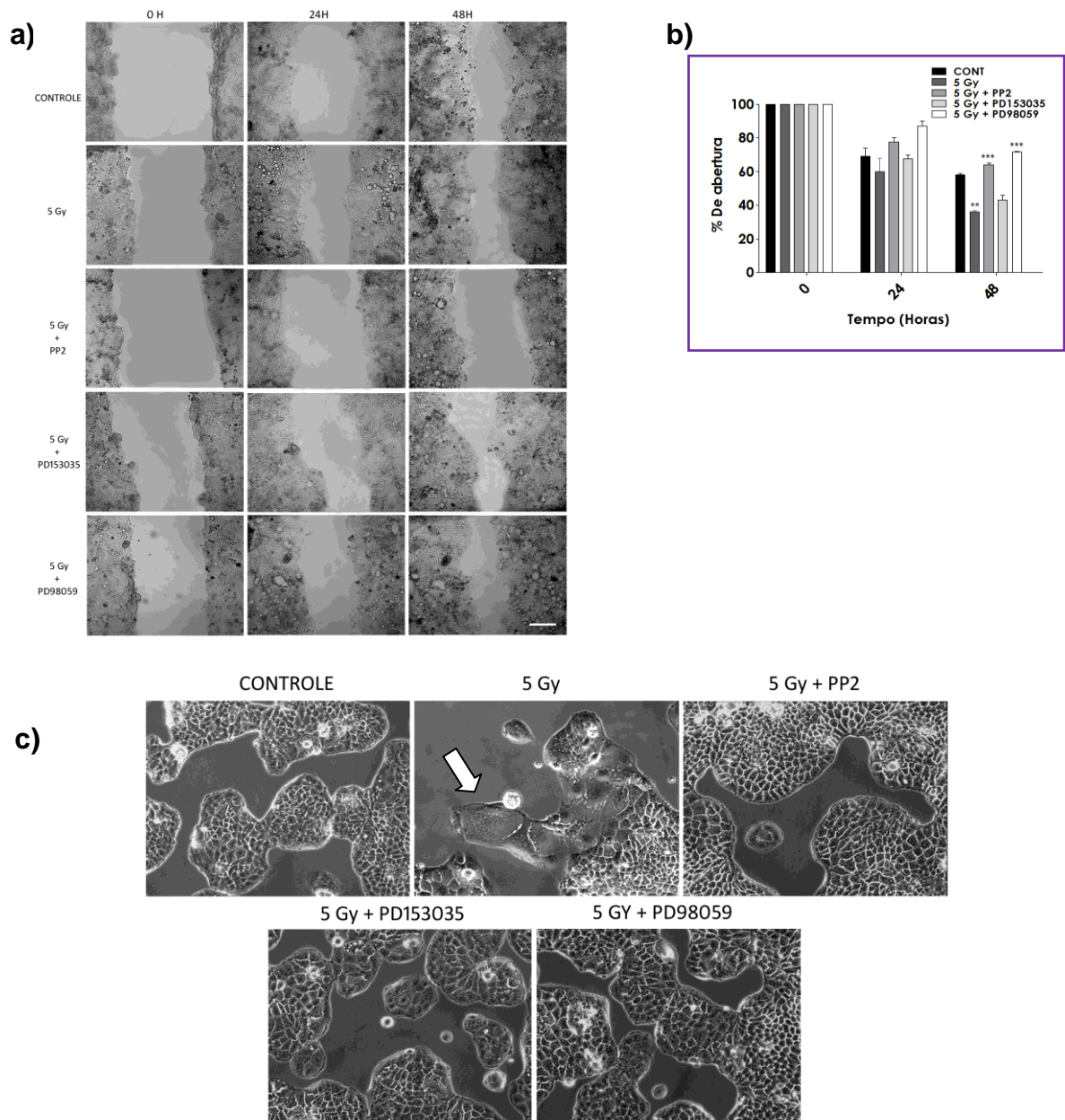


Figura 26: A radiação aumenta a motilidade celular e este evento é modulado por Src e MAPK. a) Monocamadas de células Caco-2 foram submetidas à técnica de *wound healing* e quando indicado, as células foram pré-tratadas com os inibidores: PP2 (100 nM); PD153035 (100 nM), PD98059 (50 μ M) por 1 hora e irradiadas com dose de 5 Gy. A migração celular foi acompanhada por microscopia óptica através da medição da distância de fechamento entre as duas bordas de células em cada tratamento, após 0, 24 e 48 horas. A quantificação da extensão do espaço entre os dois lados da monocamada celular representando a migração celular foi realizada usando o programa ZEN Light Edition, Zeiss. Observe que a radiação promove um aumento significativo na motilidade celular (48 h), quando comparado com as células não tratadas (Controle). O pré-tratamento com os inibidores descritos acima inibe este efeito de maneira diferencial, sendo significativo para Src e MAPK, mas não para EGFR no tempo de 48 horas após o tratamento. Barra = 20nm b) Quantificação da motilidade celular. As colunas do gráfico representam a média da distância de fechamento de três experimentos independentes. c) Morfologia das colônias de Caco-2 24 horas após a irradiação. Note a formação de estruturas protusivas de membrana (seta) 24 horas após 5Gy de radiação. Todos os inibidores revertem este efeito 24 horas após a irradiação. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$. Barra de erro: erro padrão. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

4.5 A dose de 5 Gy de radiação não altera a proliferação celular 48 horas após o tratamento.

Para confirmar se os efeitos observados no ensaio de migração celular foram realmente devidos a um aumento da migração e não a um aumento da proliferação celular, foi realizado um ensaio de proliferação usando a técnica do cristal violeta. Como mostrado na figura 27, não houve diferença significativa na proliferação celular no tempo de 24 e 48 horas quando comparadas células irradiadas com células controle, confirmando que o efeito observado anteriormente era decorrente de um aumento na motilidade das células induzido pela radiação. Observa-se um discreto aumento da proliferação somente nas células irradiadas no tempo de 72 horas após o tratamento.

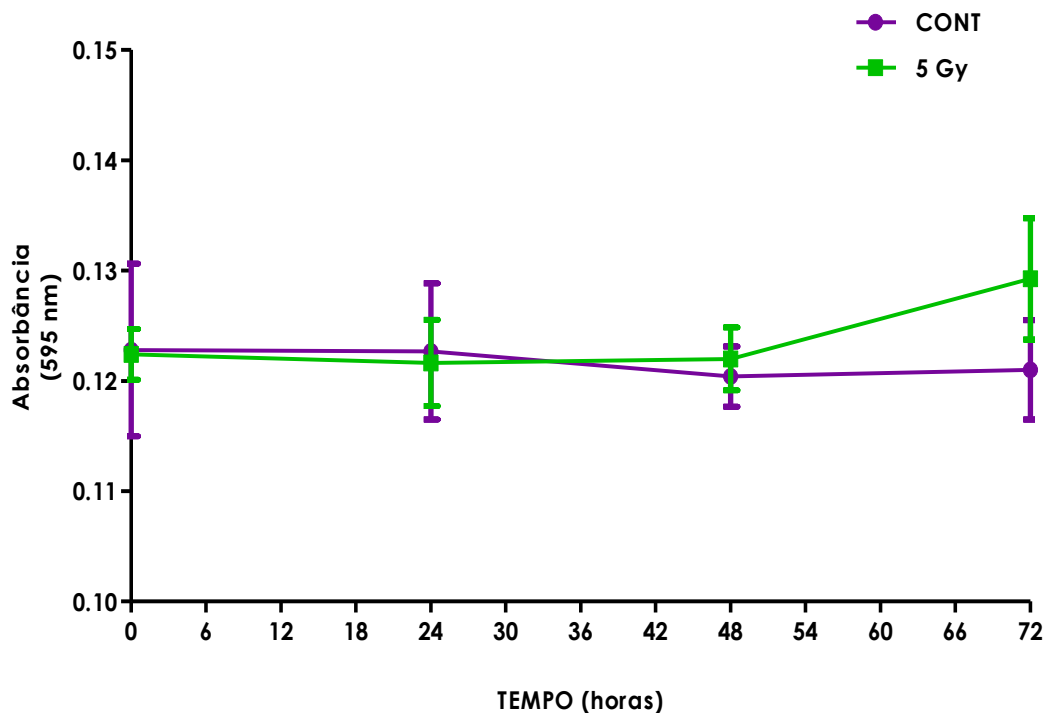


Figura 27: A proliferação celular não é alterada 48 horas após o tratamento com radiação de 5 Gy. Células Caco-2 foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas ou não com radiação na dose de 5 Gy. Posteriormente, a proliferação celular foi quantificada pela técnica do cristal violeta, como descrito em material e métodos. Note que o tratamento não produziu diferença significativa sobre a proliferação quando comparado com as células não tratadas (Cont) até 48 h. O gráfico representa a média da quantificação colorimétrica de três experimentos independentes. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Dunnett.

5 DISCUSSÃO

O câncer colo-retal é a terceira neoplasia mais frequente em todo o mundo e é responsável por 1/3 das causas de morte entre homens e mulheres (Carlomagno *et al*, 2008). A recorrência local é um grande desafio no tratamento do câncer colo-retal, ocorrendo na média de 15 a 45% após a cirurgia convencional, na qual a ressecção da fascia colo-retal frequentemente falha na remoção de todo o tecido tumoral (Zhang *et al*, 2007). Com o intuito de controlar a recorrência local e aumentar a média de sobrevida dos pacientes, uma estratégia multidisciplinar que combina a radioterapia e a quimioterapia tem sido protocolo de escolha utilizado na clínica. Embora esta combinação seja capaz de otimizar o tratamento, nem todos os pacientes são beneficiados com o protocolo quimio-rádio combinado, uma vez que um estudo mostrou aumento da incidência de neoplasias secundárias tardias em pacientes que foram submetidos à radioterapia para tratamento de neoplasias anteriores (Kumar *et al*, 2009).

Além do reaparecimento de doença refratária ao tratamento, outros agravantes da radioterapia são os efeitos colaterais produzidos pela radiação ionizante, em especial aqueles do trato gastrointestinal. A exposição à altas doses de radiação pode ocasionar morte por consequência direta de danos no epitélio gastrointestinal, porém, os eventos celulares e moleculares envolvidos neste processo não estão elucidados (Somosy *et al.*, 2003). Este é um fator limitante da dose de radiação a ser administrada e um dos motivos pelo qual o regime utilizado nos esquemas terapêuticos seja o multifracionamento de doses.

Devido ao fato da radiação induzir a secreção de citocinas e fatores de crescimento que atuam de maneira autócrina e parácrina à nível celular e tecidual, além dos efeitos colaterais, a radiosensibilidade do tumor é uma questão muito importante do ponto de vista do sucesso terapêutico, considerando que células sobreviventes em contato com este microambiente induzido pela radiação pode levar à re-população do tumor ou até mesmo à alterações fenotípicas e/ ou genotípicas que permitam que uma única célula possa metastizar sítios secundários de maneira tardia. Estudos anteriores demonstraram que um dos efeitos colaterais da radiação consiste em respostas inflamatórias e fibróticas que culminam em alterações estruturais e funcionais do

epitélio, relacionando-se diretamente com a desorganização das junções intercelulares (Somosy *et al*, 2003; De Carvalho *et al*, 2006). Atualmente, todos esses eventos são considerados característicos de um processo patológico conhecido como transição epitélio-mesenquimal (TEM), um programa morfogenético que pode contribuir para a progressão tumoral em carcinomas colo-retais (Wells *et al*, 2008; Perrais *et al*, 2007).

Uma série de estudos vem mostrando que essas características estão relacionadas com o aumento do potencial metastático, no entanto, os mecanismos celulares e moleculares pelos quais este evento ocorre, permanecem por ser identificados. Um trabalho prévio do nosso grupo mostrou que a dose de irradiação de 5 Gy não altera a viabilidade celular tanto 1h quanto 24 horas após o tratamento, porém causou perturbação à nível de complexo juncional em células de câncer de cólon humano, Caco-2 (De Carvalho *et al*, 2006).

Assim, o presente trabalho analisou as vias de sinalização que estariam modulando tais efeitos, bem como a relação deste evento com características de malignidade celular tais como: mudanças do citoesqueleto de actina, proliferação e migração.

5.1 Src, EGFR e MAPK modulam a redistribuição de E-caderina e β -catenina induzida pela radiação.

Inicialmente verificamos por imunofluorescência que Src, EGFR e MAPK estão envolvidas na desorganização de proteínas da junção aderente, E-caderina e β -catenina, induzidas pela radiação, uma vez que o pré-tratamento com inibidores farmacológicos específicos destas quinases foi capaz de inibir a redistribuição destas proteínas para o compartimento citoplasmático (Figuras 18 e 20, respectivamente). A reversão deste efeito foi observada em ambos tempos analisados, tanto 1 hora quanto 24 horas após o tratamento com a radiação.

A análise por *immunoblotting* de frações obtidas através da extração diferencial em Triton X-100 destas proteínas mostram uma diminuição significativa da quantidade de proteína E-caderina da fração insolúvel 1 hora após o tratamento com a radiação

(Figura. 19a-b). Este efeito é observado no tempo de 24 horas também, porém não foi significativo. Observa-se também (Figura. 21 a-b) uma discreta translocação da β -catenina da fração insolúvel para a solúvel, sendo este efeito visualizado de maneira mais intensa na imunofluorescência. Estas observações corroboram com os resultados obtidos por imunofluorescência. Considerando que proteínas da fração insolúvel são aquelas ligadas ao citoesqueleto de actina e portanto funcionais, e que proteínas da fração solúvel não estão ligadas ao citoesqueleto, não sendo portanto funcionais, estes resultados mostram que a radiação induz perda da funcionalidade das junções aderentes. Andarawewa *et al*, (2007), relataram que a radiação também causa uma diminuição dos níveis de E-caderina e β -catenina da associadas ao citoesqueleto em células de epitélio mamário HMEC (células epiteliais mamárias humanas). No entanto estes autores não mostraram as vias de sinalização envolvidas neste evento. No presente trabalho, os resultados obtidos pelo pré-tratamento com os inibidores farmacológicos indicam que as vias Src, EGFR e MAPK estão envolvidas neste evento. Estas vias são importantes no processo de proliferação e tumorigênese, no entanto, particularmente EGFR e MAPK foram também relatadas por participar na desorganização das junções aderentes após tratamento de células Caco-2 com TPA (Barbosa *et al*, 2003).

Proteínas da família Src atuam numa via crítica de proliferação e diferenciação de células do epitélio intestinal normal. Na mucosa intestinal normal, as células proliferativas e, portanto indiferenciadas da base da cripta, expressam alta atividade de Src. Ao contrário, células diferenciadas do topo da cripta mostram uma redução da atividade desta quinase. A desregulação da atividade de Src leva à uma atividade quinase constitutiva e portanto auxilia na transformação celular. Mais de 80% dos cânceres de colon humano apresentam atividade de Src, a qual também é evidente em câncer de colon que metastiza o fígado (Mathew *et al*, 2008).

Diversos estudos relacionaram a atividade de Src com a desorganização das junções aderentes e desenvolvimento do câncer colo-retal. Coluccia e colaboradores (2006), por exemplo, relataram que Src pode atuar na fosforilação da proteína β -catenina, levando a desorganização do complexo E-caderina/catenina e, conseqüentemente ativação da via β -catenina/Tcf4 em células de câncer colo-retal.

Mais estudos são necessários para definir a função desta quinase no desenvolvimento do câncer colo-retal. Li e colaboradores (2006) mostraram que o inibidor farmacológico de Src, PP2, suprime a ativação de ERK e a transativação de EGFR induzidas por raios X. No nosso trabalho, uma vez que EGFR e MAPK atuam na redistribuição de proteínas E-caderina e β -catenina, e que a radiação ativa a proteína Src, a reversão do efeito de redistribuição de proteínas da junção aderente após utilização do inibidor de Src (PP2) pode ser relacionada à inibição da transativação tardia de EGFR e MAPK após a radiação em nosso modelo de estudo.

O EGFR é um receptor de membrana com atividade tirosina quinase ao qual se ligam o fator de crescimento epidermal (EGF) e o fator- α de crescimento transformante (TGF- α). O EGFR dentro do contexto da radiação atua na sustentação dos efeitos colaterais da radioterapia, bem como na progressão tumoral e radiorresistência, uma vez que a radiação induz a secreção e clivagem proteolítica de EGF e, portanto, fatores solúveis ficam disponíveis no microambiente para se ligarem aos receptores e desencadear uma sinalização *downstream* (Yacoub *et al.*, 2006; Chen & Nirodi., 2007). Devido a este fato, a integração de anticorpos monoclonais anti-EGFR (ex:Cetuximab®, Matuzumab®, Panitumab®) e inibidores farmacológicos tirosina quinases (ex:Erlotinib®, Gefitinib®, Canertinib®, Lapatinib®) com a radioterapia vem sendo utilizada em estudos de fase II, III e protocolos clínicos (Nyati *et al.*, 2006; Ch`ng *et al.*, 2008). Além disso, um outro estudo mostra que o tratamento em curtos tempos com EGF promove a internalização de E-caderina mediada por caveolina, atuando numa via de redistribuição e não downregulação da E-caderina (Lu *et al.*,2003). Isto sugere que, a endocitose de E-caderina durante estágios iniciais de exposição ao EGF leva a uma desorganização das junções aderentes devido a dissociação do complexo E-caderina-catenina. Este evento pode ser positivo para as células tumorais, já que isso pode induzir um aumento do *pool* citoplasmático de β -catenina e favorecer sua translocação para o núcleo.

A translocação das proteínas E-caderina e β -catenina para o citoplasma, bem como a reversão da translocação da fração insolúvel para a solúvel através da inibição de EGFR observado no tempo de 1 hora, pode ser relacionada com os eventos

mencionados acima. No entanto mais estudos seriam necessários para confirmar a participação do EGFR nesses eventos.

As MAPKs (ERK, JNK e p38) consistem em proteínas-quinases ativadas por mitógenos, via receptores tirosina-quinases diretamente ou via membros da família Ras GTPase (Reardon *et al.*, 1999; Steven *et al.*, 2005). As MAPKs são sensíveis ao *stress* induzido pela radiação e desenvolvem um importante papel tanto na radiorresistência terapêutica quanto na morte celular induzida pela radiação. ERK tem sido relatada por ser fortemente ativada por altas doses de radiação, via receptores tirosina-quinases associados à membrana, atuando em uma via de sobrevivência por coativação da via NFkB e contribuindo para reduzir os efeitos de citotoxicidade celular induzidos pela radiação (Reardon *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005; Ahmed & Li, 2008). Estes relatos corroboram com nosso resultado de reversão do efeito de desorganização das junções aderentes induzidas pela radiação ionizante através do tratamento com inibidor de MAPK, no sentido de que a radiação ionizante induz a secreção de fatores solúveis que podem atuar diretamente em receptores de membrana do tipo tirosina quinase, além de ativar ERK.

É importante ressaltar também que, ERK, por atuar modulando a desorganização das junções aderentes, torna-se extremamente vantajoso para uma célula em *stress*, induzir eventos que facilitem a passagem de fatores de crescimento solúveis presentes no microambiente, para a região basolateral da célula, aumentando sensibilização de receptores de sobrevivência e contribuindo para o escape de morte celular induzido pela radiação.

5.2 Dose de 5 Gy de radiação não altera a expressão total de E-caderina e β -catenina nos tempos de 1 e 24 horas após o tratamento.

Como a expressão reduzida de marcadores epiteliais está relacionada com eventos de transição epitélio mesenquimal e aumento do potencial tumorigênico, investigamos se a dose de 5 Gy estaria alterando os níveis totais de E-caderina e β -catenina. Como mostrado nas Figuras 22 e 23, o tratamento com dose única de 5 Gy

não alterou significativamente a expressão total de E-caderina e β -catenina nos tempos de 1 e 24 horas após a radiação, bem como o pré-tratamento com os inibidores. Embora a diminuição de expressão de E-caderina seja um evento clássico de TEM, uma reorganização das junções e o comprometimento de sua funcionalidade ocorrem em estágios iniciais deste processo, sendo a redução ou supressão completa da expressão de E-caderina um evento tardio no processo de TEM (Gotzmann *et al.*, 2004).

A expressão inalterada de β -catenina após irradiação está de acordo com um estudo prévio em células HMEC (Andarawewa *et al.*, 2007). Talvez uma superexpressão de β -catenina possa ser observada em tempos tardios após o tratamento com a radiação, já que esta superexpressão promove translocação da E-caderina para o citoplasma e, este, evento aumentaria o *pool* citoplasmático de β -catenina. Consequentemente, este fato contribuiria para sua translocação nuclear e ativação de alvos relacionados com a proliferação celular e migração (Nawrocki *et al.*, 2003).

5.3 A radiação induz reorganização do citoesqueleto de actina em momentos iniciais após o tratamento e Src, EGFR e MAPK revertem este efeito de maneira diferenciada.

Uma vez que os complexos de adesão são atualmente considerados como estruturas dinâmicas, a organização e desorganização das junções intercelulares durante a morfogênese e funções celulares são acompanhadas por intensos e rápidos rearranjos do citoesqueleto em resposta a alterações do microambiente e sinais (Jamora & Fuchs, 2002; Miyoshi & Takai, 2007).

A actina é o principal determinante da morfologia das células eucarióticas, gerando força motriz e formação de projeções de membranas que estão intimamente relacionadas com alterações na morfologia celular e motilidade durante a progressão tumoral (Disanza *et al.*, 2005). O remodelamento de actina é acompanhado pelo recrutamento de complexos moleculares multiprotéicos estruturais e regulatórios em sítios celulares de contato específicos. Tal fato permite eventos como alongamento,

polimerização e despolimerização de actina de maneira altamente dinâmica, levando à formação de superestruturas organizadas que refletem diretamente na morfologia celular (Miyoshi & Takai, 2007).

Em células epiteliais polarizadas os filamentos de actina formam um anel contínuo de fibras justapostas de paralelas à membrana celular, formando um anel ao redor de toda a interface da membrana lateral próximo ao complexo juncional apical. Quando as junções são rompidas, os filamentos de actina se organizam de maneira perpendicular à membrana, através de eventos regulados de polimerização e despolimerização de actina, formando estruturas protusivas como filopódio e lamelipódio, característicos de células migratórias. Já na região basal da célula, os filamentos de actina formam as fibras de *stress*, compostas por cabos de aproximadamente 30 a 40 filamentos de actina conectados por proteínas ligadoras como α -actinina e outras. As fibras de *stress* observadas em fibroblastos são divididas em três classes de acordo com a sua localização: ventral, dorsal e arcos transversos, sendo cada uma dessas sitio-celular-específicas e reguladas por diferentes mecanismos (Hotulainen & Lappalainen, 2006). As fibras de *stress* observadas à nível basal das células neste estudo correspondem às fibras ventrais, as quais encontram-se ao longo de toda a base da células e são conectadas à regiões ricas em integrinas (adesão focal) nas suas duas terminações. Este fato é importante no suporte de adesão com a matriz (Nelson, 2003; Pellegrin & Mellor, 2007).

Após a observação de que o tratamento com a radiação induz a desorganização das junções aderentes, evento este relacionado com a progressão tumoral, partimos para a análise da organização do citoesqueleto de actina após os tratamentos através de microscopia confocal. Nas células controle (Figura.24 e 25), uma marcação pontual para os filamentos de actina é observada na região apical, correspondente às microvilosidades. Na região medial, observou-se uma distribuição perijuncional dos filamentos de actina, fato este que está intimamente relacionado à funcionalidade do complexo juncional devido ao fato das proteínas de junção apical estarem conectadas direta ou indiretamente com o citoesqueleto. No nível basal, as células controle apresentaram uma distribuição das fibras de *stress* ao longo de toda a superfície, o que é extremamente importante para a manutenção do contato célula-matriz.

Após o tratamento com a radiação, podemos observar que houve uma redistribuição do citoesqueleto de actina em todos os níveis da monocamada celular 1 hora após a irradiação (Figura.24) e este efeito foi sustentado no tempo de 24 horas (Figura.25). Na região apical observa-se uma alteração morfológica das microvilosidades após a radiação. Tal observação encontra-se em acordo com um estudo feito por Somosy, 2000, no qual é mostrado por microscopia de varredura um grande espectro de alterações na micromorfologia celular em diversos tipos celulares após tratamento com radiação ionizante. Uma dessas alterações está relacionada com diminuição do número e tamanho dos microvilos após poucos minutos de exposição à radiação.

Podemos observar também uma alteração no perfil de distribuição do citoesqueleto induzida pela radiação à nível medial, o que corrobora com a redistribuição de proteínas da junção aderente para o citoplasma observada por imunofluorescência e *imunoblotting*. Já na região basal da célula, observa-se que a radiação induz um rompimento das fibras de *stress* ventrais e uma alteração da distribuição das fibras para um compartimento mais cortical em 1 hora (Figura. 24). Este evento poderia potencialmente aumentar a capacidade migratória, uma vez que a localização de actina polimerizada na periferia das células é uma organização típica de células migratórias e dispersão celular (Peterson *et al.*, 2004). A relação entre a organização das fibras de *stress* à nível basal e potencial migratório de células epiteliais vem sendo extremamente controverso na literatura. Estudos especulam que a formação dessas estruturas poderia prover uma força contrátil vantajosa para a migração celular, enquanto outro sugere que a presença das fibras de *stress* é observada mais proeminentemente em células estáticas, sugerindo que elas são importantes na inibição da migração por ancorar a célula à matriz (Pellegrin & Mellor, 2007). Porém, a maioria dos estudos foi feito em fibroblastos e células endoteliais, sendo que poucos trabalhos avaliam a relação entre organização do citoesqueleto e tratamentos terapêuticos em células epiteliais. Haydont e colaboradores (2007) sugerem que a fibrose induzida pela radioterapia seja um evento mediado por Rho-GTPases, as quais regulam diretamente a dinâmica de formação dos filamentos de actina das fibras de *stress*.

Nosso estudo mostra pela primeira vez uma correlação entre alterações na junção aderente e desorganização do citoesqueleto de actina em todo o volume celular, após tratamento com radiação de células de adenocarcinoma de cólon humano, bem como as vias de sinalização em comum que poderiam modular este processo. Tal observação pode contribuir para o entendimento de eventos induzidos pela radiação em células sobreviventes ao esquema terapêutico, o que é de extrema importância uma vez que pacientes submetidos à radioterapia apresentam efeitos colaterais exacerbados e doença metastática refratária.

Como as vias de sinalização Src, EGFR e MAPK estão envolvidas na desorganização das junções aderentes neste trabalho, analisamos se estas vias estariam envolvidas também nas alterações do citoesqueleto induzidas pela radiação. Na figura 24, observa-se que a inibição das vias de sinalização Src e EGFR revertem a distribuição dos filamentos de actina 1 hora após o tratamento em todas as regiões analisadas (apical, média e basal), enquanto que a via MAPK está envolvida apenas na restauração dos efeitos à nível apical e medial. Tal evento pode ser relacionado com a ativação de Src induzida pela radiação tanto através de EGFR quanto por outras vias, como a do TGF- β . Tem sido mostrado que Src atua na desmontagem do complexo juncional, bem como atua em FAK promovendo a formação de protrusões de membrana (Jones *et al.*, 2000; Artym *et al.*, 2006; Baumgartner *et al.*, 2008).

Portanto, a ativação de Src induzida pela irradiação explicaria a desorganização dos anéis perijuncionais à nível medial, bem como reorganização das fibras de stress à nível basal em nosso modelo de estudo. Por outro lado, sabe-se que a radiação ativa EGFR logo nos primeiros minutos após a exposição, e isto desencadearia sinalizações *downstream* relacionadas com a desorganização do complexo juncional à nível medial da célula. Já a nível basal, a ativação de EGFR poderia estar ativando transientemente a cofilina, uma proteína importante na regulação da dinâmica de actina (Mouneimne *et al.*, 2004). Além disso, uma vez que a radiação promove um pico inicial de ativação de ERK, talvez essa ativação seja suficiente apenas para desorganizar as junções aderentes, e uma ativação mais eficaz seria necessária para induzir efeitos na distribuição da actina em todo o volume celular. A via MAPK pode não estar envolvida com eventos primários (1 hora) relacionados ao remodelamento das fibras de *stress*

induzidos pela radiação em nosso modelo de estudo. Estudos mostraram que a radiação induz um pico de atividade (5 minutos) em células de colon humano após a radiação e retorna ao nível basal de atividade, enquanto que uma nova ativação volta a ocorrer após 120 minutos e mantêm-se ativada por um longo período (Yacoub *et al.*, 2006). De acordo com estes dados, podemos especular que o inibidor de MAPK não induziu restauração dos efeitos causados pela radiação no nível basal devido ao fato desta via possivelmente não estar ativada o suficiente para causar alterações nas fibras de stress no tempo analisado (1 hora).

Em relação ao tempo de 24 horas, observa-se que os efeitos induzidos pela dose de 5 Gy são mantidos à nível apical e medial. Embora as fibras de *stress* reapareçam 24 horas após a irradiação, sua redistribuição diferenciada em relação ao controle reflete um achatamento do volume celular, observadas ao longo do eixo X-Z. Além disso, observou-se a formação de marcação intensa para actina em alguns pontos, os quais podem ser correlacionados com o achatamento celular. Estes pontos de marcação intensa possivelmente são fibras de stress radiais, as quais são estruturas importantes no processo de migração celular, localizadas nas terminações das fibras e caracterizadas por grande concentração de actina polimerizada.

As vias Src, EGFR e MAPK estão envolvidas neste efeito sustentado 24 horas após o tratamento, uma vez que a utilização dos inibidores destas vias promoveu a reversão deste efeito em todo o volume celular. O envolvimento destas vias na desorganização do citoesqueleto pode ser correlacionado com a desorganização das junções aderentes, uma vez que estes eventos só foram analisados separadamente em estudos anteriores. A latência dos efeitos no citoesqueleto de actina 24 horas após o tratamento com dose de 5 Gy pode ser explicado pelo fato de que a radiação induziria a secreção de fatores solúveis que atuam sustentando os efeitos biológicos da radiação, uma vez que neste modelo experimental, não há troca do meio de cultura irradiado nos tempos analisados.

5.4 A radiação aumenta a motilidade celular via Src e MAPK

Após a visualização de alterações nas junções aderentes e no citoesqueleto de actina induzidas pelo tratamento com 5 Gy de radiação, analisamos se estes eventos estariam correlacionados com um aumento da motilidade celular. As figuras **26a e 26b** mostram que a radiação aumenta o potencial migratório de células Caco-2 através da técnica de *wound healing*. Tem sido descrito que a radiação ionizante induz migração e invasividade em células de gliomas, bem como acelera a metástase em ratos (Wild-Bode *et al.*, 2001; Camphausen *et al.*, 2001). Um trabalho publicado por Andarawewa *et al.*, 2007 mostrou que a radiação aumenta o potencial migratório induzido pelo TGF- β em células mamárias normais. Porém, nosso trabalho mostra pela primeira vez que a radiação ionizante induziu um aumento na capacidade migratória em células de adenocarcinoma de colon humano. A observação do aparecimento de estruturas protrusivas de membrana, semelhante a lamelipódios em colônias 24 horas após a irradiação, poderia explicar esse aumento do potencial migratório (Figuras 26c). É possível especular também que estas células estariam realizando uma migração do tipo coletiva, uma vez que grupos de células são visualizados de maneira espalhada (Figura. 26c) 24 horas após a irradiação. Mais estudos seriam necessários para confirmar esta hipótese.

Uma vez que a inibição farmacológica de Src e MAPK foi capaz de reduzir o perfil migratório 48 horas após a irradiação em nosso modelo de estudo, podemos sugerir a participação dessas vias na modulação do aumento do potencial migratório induzido pela radiação. Uma importante função da Src é modular o citoesqueleto de actina através da fosforilação de resíduos de tirosina na vilina, uma proteína reguladora da polimerização e despolimerização de actina que é altamente expressa em células epiteliais renais e intestinais (Mathew *et al.*, 2008). Sua atividade também é requerida para a migração induzida por fatores de crescimento, bem como a alteração morfológica de células epiteliais e polarização do lamelipódio (Timpson *et al.*, 2001). Foi mostrado também que a atividade da Src é requerida para a migração mediada por Rho GTPases (Timpson *et al.*, 2001). Estes estudos corroboram com nossos achados e

mostram um papel importante da atividade de Src no controle da migração celular induzida pela radiação.

Tem sido relatado que a proteína EPLIN (*epithelial protein lost in neoplasm*; também conhecida como Lima-1) participa da conexão dos filamentos de actina, tanto à nível de junção celular apical quanto na conexão e estabilização das fibras de *stress* ao inibir o complexo Arp2/3, impedindo a nucleação dos filamentos de actina (Maul *et al.*, 2003; (Abe & Takeichi, 2007). Recentemente, foi demonstrado que ERK ativada pode fosforilar EPLIN e reduzir sua afinidade pelos filamentos de actina (Han *et al.*, 2007). Este evento ocorre tanto na estimulação com fatores de crescimento quanto durante o *wound healing*. No entanto, se o bloqueio destes eventos podem explicar a redução da migração observada pela inibição farmacológica da ERK em nosso estudo, ainda não está claro. Por outro lado, o fato de que a inibição da migração foi significativa somente em 48 horas, indica uma fosforilação sustentada de ERK somente em momentos tardios após a radiação. Além disso, foi relatado que a formação de peróxidos induzida pela radiação causa ativação tardia de ERK, via transativação de EGFR, mediada por Src em células tumorais de mama (Li *et al.*, 2006). Logo, nossos resultados mostrando que os inibidores de Src e MAPK reduzem o potencial migratório de células Caco-2 sugerem que Src atua de maneira *upstream* à EGFR e MAPK em momentos tardios.

Em relação ao EGFR, foi observado que o tratamento com PD153035 resultou em uma redução, porém não significativa, da migração induzida pela radiação no tempo de 24 horas. É possível que a atividade inibitória em momentos iniciais após irradiação não seja suficiente para exercer um efeito de redução da migração no tempo de 48 horas. Esta questão é importante ser analisada, uma vez que a radiação induz a secreção de ligantes de EGFR, e este por sua vez, caso não esteja inibido de fato, leva à resposta de sinalização *downstream* que culminam em eventos relacionados à migração e proliferação. Talvez uma exposição prolongada ao inibidor, culminaria em uma inibição da migração no tempo de 48 horas.

5.5 A proliferação celular não é alterada nos tempos de 24 e 48 horas após exposição à dose de 5 Gy de radiação.

Os resultados de proliferação celular mostram que a dose de 5 Gy de radiação não foi capaz de induzir um aumento da proliferação até o tempo de 48 Horas (Figura.27). Além disso, mostram também um aumento da proliferação de maneira tardia, somente após o período de 48 horas depois da irradiação. A exposição de células eucarióticas à radiação pode desencadear diversos processos tais como: reparo do DNA, transcrição gênica, parada do ciclo celular, apoptose e radiorresistência. A proteína ATM (Ataxia Telangiectasia Mutada) é considerada reguladora principal da resposta celular à danos no DNA, uma vez que ela atua em vias críticas de pontos de checagem do ciclo celular, e induz células danificadas à parada do ciclo para induzir mecanismos de reparo (Kurz and Miller, 2004). A proteína ATM fosforila p53, e este por sua vez é ativado e atua como supressor tumoral via indução de p21, uma proteína inibidora de CDK (quinase dependente de ciclina) da fase G1. p21 é responsável pela indução de genes alvos de proteínas antiapoptóticas (Gurley and Kemp, 2008). Logo, o fato da radiação não alterar a proliferação celular nos tempos indicados pode ser correlacionado com a indução de parada do ciclo celular, como mencionado anteriormente. Mais estudos através da análise do ciclo celular após a irradiação podem esclarecer os mecanismos moduladores desta checagem induzida pela radiação.

Um outro estudo relatou que células de glioma, após o tratamento com radiação, encontram-se em G1 no ciclo celular e a parada neste ponto é correlacionado com o aumento da motilidade (Hwang *et al.*, 2005). Este fato é interessante no sentido de que, se houve aumento da migração mostrado nesse estudo, as células não poderiam estar com vias de sinalização concomitantes para proliferação e migração, uma vez que ambos os processos necessitam de complexos multiprotéicos que atuam em eventos proliferativos e migratórios, além da reorganização do citoesqueleto de actina. Interessantemente, tem sido relatado que células mutadas para p53 são mais radiosensíveis do que células p53 selvagem, uma vez que o reparo do DNA não é induzido e estas células têm a proliferação reduzida (Yacoub *et al.*, 2006).

Podemos observar também na figura **26c** que a radiação induziu a formação de estruturas protrusivas de membrana (do tipo lamelipódio) 24 horas após a irradiação, e estas estruturas são importantes na aquisição de motilidade celular.

Finalmente, os resultados obtidos no presente estudo em relação à proliferação, corroboram com o ensaio de *wound healing*, mostrando que o efeito do fechamento do espaço produzido na monocamada foi devido à migração *per se*, sem influência de eventos proliferativos. Além do fato interessante de que a radiação não altera a proliferação destas células nos tempos analisados, tal evento pode ser extremamente favorável durante o fracionamento de doses de radiação administradas ao paciente. Uma vez que a janela terapêutica da radioterapia permite que células sobreviventes à radiação subletal ativem seus mecanismos de reparo do DNA e ativem vias de sobrevivência, como a via $\text{NF}\kappa\beta$, tal evento favorece a propagação de instabilidade genômica para as células filhas. Este fato é de extrema importância no que diz respeito a repopulação do tumor e doença metastática refratária ao tratamento, pois os eventos analisados neste estudo podem ser correlacionados diretamente com os efeitos colaterais induzidos pela radiação no trato gastrointestinal. Consequentemente, este microambiente induzido pela radiação favoreceria a progressão tumoral e potencialmente a metástase.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do amplo entendimento da base molecular da tumorigênese colo-retal, o sucesso terapêutico tem sido limitado. Poucos são os pacientes que se beneficiam de fato do tratamento radioterápico. Com intuito de melhorar a média de sobrevivência dos pacientes, a radioterapia vem sendo administrada em protocolos químicos em combinação à agentes citotóxicos, anticorpos monoclonais e inibidores químicos de vias de sinalização. Os estudos feitos com essas combinações terapêuticas têm como foco principal a avaliação do aumento da apoptose. Este é o primeiro trabalho que correlaciona vias de sinalização celular como Src, EGFR e MAPK com alterações na localização de proteínas de junção aderente, organização do citoesqueleto de actina e migração celular. Estes eventos são importantes na análise dos efeitos colaterais primários e tardios induzidos pela radiação, e durante a progressão tumoral do câncer colo-retal.

Estudos envolvendo epigenética colocam o microambiente como um fator muito importante na manutenção dos processos celulares. Sabe-se que a radiação induz alterações biológicas importantes no microambiente tecidual que afetam tanto as células normais quanto as células tumorais remanescentes do fracionamento de doses. Assim, este estudo contribui para um melhor entendimento dos efeitos induzidos pela radiação, podendo transpor estes resultados para uma correlação com eventos importantes na aquisição da Transição Epitélio Mesenquimal e na tumorigênese colo-retal.

É importante lembrar que os eventos observados neste estudo ocorrem em células sobreviventes ao tratamento e, portanto, apresentam instabilidade genômica que podem se agravar com o microambiente inflamatório induzido pela radiação. Tal evento pode induzir um fenótipo alterado que favoreça uma disseminação tardia de células radorresistentes e com características potencialmente mais invasivas, uma vez que a análise microscópica 24 horas após a irradiação mostraram claramente que as células sobreviventes apresentam uma morfologia aberrante e presença de estruturas protrusivas de membrana que estão relacionadas com um fenótipo migratório (Figura 26c). Um estudo mostra que a radiação induziu desorganização das interações

epiteliais e este evento foi observado nas células filhas (Park *et al.*, 2003). Juntos, estes resultados sugerem que além de alterações mutacionais, a radiação ionizante pode promover outras alterações fenotípicas consideradas herdáveis, como por exemplo, alterações epigenéticas. Desta forma, o estudo das vias de sinalização e compostos farmacologicamente ativos que regulam estas alterações contribui para a modulação dos efeitos da radiação, podendo atuar tanto na radioproteção aos efeitos colaterais quanto aumentar a efetividade da radioterapia.

Outro fato importante é que com o advento das “drogas inteligentes”, que são drogas que apresentam uma conformação molecular que propicia sua atuação de maneira mais específica em alvos moleculares intracelulares, o SUS (Sistema Único de Saúde) vem aumentando seu orçamento de maneira exacerbada, visto que estas drogas apresentam um custo muito elevado. Além deste fato, a falta de estudos comprobatórios da eficácia destes medicamentos a nível celular tem sido a principal fonte do problema. Logo, além da correlação das vias de sinalização envolvidas nos eventos induzidos pela radiação mostrados neste estudo, os resultados também corroboram para um melhor entendimento da atividade farmacológica destes inibidores químicos, uma vez que muitos deles encontram-se em fase de ensaios pré-clínicos e clínicos.

7 CONCLUSÕES

- ✓ A radiação ionizante induz alterações na distribuição das proteínas das junções aderentes e este evento é modulado por Src, EGFR e MAPK;
- ✓ Os níveis de expressão das proteínas de junção aderente, E-caderina e β -catenina, não são alterados pela radiação;
- ✓ Src, EGFR e MAPK modulam de maneira diferencial a desorganização do citoesqueleto de actina induzida pela radiação; O inibidor de Src e EGFR revertem o efeito da radiação em todo o volume celular tanto em eventos iniciais quanto em eventos tardios da radiação. Já a inibição da via MAPK restaura os efeitos da radiação somente à nível apical e medial em eventos iniciais, sendo que em 24 horas, MAPK está envolvida na indução de efeitos em todo o volume celular.
- ✓ A dose de 5 Gy de radiação aumenta o potencial migratório das células Caco-2, evento este que é mediado por Src e MAPK 48 horas após a irradiação;
- ✓ A irradiação induz a formação de estruturas semelhantes a lamelipódios na borda das colônias 24 horas após a irradiação, e este evento também é revertido por Src e MAPK.
- ✓ A proliferação celular não é alterada nos tempos de 24 e 48 horas após radiação ionizante.

REFERÊNCIAS

Abe K, Takeichi M. EPLIN mediates linkage of the cadherin- catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *PNAS*, 2008; 105:(1) 13–19.

Afonso C, Henrique D. PAR3 acts as a molecular organizer to define the apical domain of chick neuroepithelial cells, *J. Cell. Sci.* 2006; 119: 4293-4304.

Ahmed KM, Li JJ. NF- κ B-mediated adaptive resistance to ionizing radiation. *Free Radical Biology Medicine*. 2008; 44: 1–13.

Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schöneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J. Cell Sci.* 2002; 115: 4969-4976.

Andarawewa KL, Erickson AC, Chou WS, Costes SV, Gascard P, Mott JD, Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH. Ionizing Radiation Predisposes Nonmalignant Human Mammary Epithelial Cells to Undergo Transforming Growth Factor B–Induced Epithelial to Mesenchymal Transition. 2007; *Cancer Res* 2007; 67: (18) 8662-8670.

Arora S, Wang XI, Keenan SM, Andaya C, Zhang Q, Peng Y, Welsh WJ. Novel microtubule polymerization inhibitor with potent antiproliferative and antitumor activity. *Cancer Res*. 2009; 69(5), 1910-1915.

Artym VV, Zhang Y, Seillier-Moiseiwitsch F, Yamada KM, Mueller SC. Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res*. 2006; 66:3034–3043.

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

Avizienyte E, Frame MC. Src and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol*. 2005; 17(5):542–547.

Balda MS, Matter K. Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression, *Trends. Cell. Biol.* 2003; 13: 310-318.

Barbosa LA, Goto-Silva L, Redondo PA, Oliveira S, Montesano G, De Souza W, Morgado-Díaz JM. TPA-induced signal transduction: A link between PKC and EGFR signaling modulates the assembly of intercellular junctions in Caco-2 cells. 2003; *Cell and Tissue Research*. 312:319-331.

Barcellos-Hoff MH, Park C, Wright EG. Radiation and the microenvironment-tumorigenesis and therapy. *Nature reviews*. 2005; 5:867-875.

Barrios-Rodiles M, Brown KR, *et al.* High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science*. 2005; 307(5715): 1621-1625.

Baumgartner M, Radziwill G, Lorger M, Weiss A, Moelling K. c-Src-Mediated Epithelial Cell Migration and Invasion Regulated by PDZ Binding Site Molecular and Cellular Biology. 2008; 28:(2) 642–655.

Bazzoni G. The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003; 15: 525–530.

Bentzen SM. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6:702–13.

Bershadsky A. Magic touch: how does cell-cell adhesion trigger actin assembly? *Trends Cell Biology.* 2004; 14: 589-593.

Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Locascio A, Cano A, Palacios J, Nieto MA. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* 2002; 21: 3241–3246.

Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001; 98:10356–10361.

Calvert PM, Frucht H. The Genetics of Colorectal Cancer. *Ann Intern Med.* 2002; 137: 603-612.

Camphausen K, Moses MA, Beecken WD, Khan MK, Folkman MS, O'Reilly MS. Radiation therapy to a primary tumor accelerates metastatic growth in mice. *Cancer Res.* 2001; 61:2207-11.

Carlomagno C, Farella A, Bucci L, D'Armiento FP, Pesce G, Pepe S, Cannella L, Pacelli R, De Stefano A, Solla R, D'Armiento MR, De Placido S. Neo-adjuvant treatment of rectal cancer with capecitabine and oxaliplatin in combination with radiotherapy: a phase II study. *Annals of Oncology.* 2009.

Carón R, Yacoub A, Mitchell C, Zhu X, Hong Y, Sasazuki T, *et al.* Radiation-stimulated ERK1/2 and JNK $\frac{1}{2}$ Signaling can promote cell cycle progression in human colon cancer cells. *Cell cycle.* 2005; 456-464.

Catherine CP, Henshall-Powell RL, Erickson AC, Talhouk RR, Parvin B, Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH. Ionizing radiation induces heritable disruption of epithelial cell interactions. *PNAS* 2003; 100:(19) 10728–10733.

Cereijido M, Contreras RG, Shoshani L, Florez-Benitez D, Larre I. Tight junction and polarity interaction in the transporting epithelial phenotype. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1778: 770-93.

Chen DJ, Nirodi SC. The Epidermal Growth Factor Receptor: A Role in Repair of Radiation-Induced DNA Damage. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:(22) 655-6560.

Chen X, Halberg RB, Burch RP, Dove WF. Intestinal adenomagenesis involves core molecular signatures of the epithelial mesenchymal transition. *J. Mol. Histol.* 2008; 39: 283–294.

Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2008; 1778: 588–600.

Ch'ng S, Low I, Daniel Ng, Brasch H, Sullivan M, Davis P, Tan ST. Epidermal growth factor receptor: a novel biomarker for aggressive head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *Human Pathology.* 2008; 39: 344–349.

Chu K, Teele N, Dewey MW, Albright N, Dewey WC. Computerized video time lapse study of cell cycle delay and arrest, mitotic catastrophe, apoptosis and clonogenic survival in irradiated 14-3-3sigma and CDKN1A (p21) knockout cell lines. *Radiat Res.* 2004; 162:270-86.

Chua KN, Ma J, Their JP. Targeted therapies in control of EMT in carcinoma and fibrosis. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms,* 2007; 4:4.

Clevers, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* 2006; 127:469-480.

Colorectal Cancer Collaborative Group. Adjuvant radiotherapy for rectal cancer: a systematic overview of 8507 patients from 22 randomised trials. *The Lancet.* 2001; 358:1291-1304.

Coluccia AML, Benati D, Dekhil H, *et al.* SKI-606 decreases growth and motility of colorectal cancer cells by preventing pp60(c-Src)-dependent tyrosine phosphorylation of β -catenin and its nuclear signaling. *Cancer Res.* 2006; 66 (4): 2279-2286.

De Carvalho AD, De Souza W, Morgado-Díaz JA. Morphological and molecular alterations at the junctional complex in irradiated human colon adenocarcinoma cells, Caco-2. *Int. J. Radiat. Biol.* 2006; 82: (9) 658-668.

De Wever O. *et al.* Molecular and pathological signatures of epithelial–mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochem Cell Biol* 2008; 130:481–494.

Dhawan P, Singh AB, Deane NG, No Y, Shiou SR, Schmidt C, *et al.* Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest.* 2005; 115:1765-76.

Disanza A, Steffen A, Hertzog M, Frittoli E, Rottner K, Scita G. Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cellular and Molecular Life Science.* 2005; 62: 955-970.

Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI. α -Catenin is a molecular switch that binds E-cadherin– β -catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell.* 2005; 123: 903–915.

D'Souza T, Agarwal R, Morin PJ. Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 26233–26240.

Dumont N, Arteaga CL. Targeting the TGF beta signaling network in human neoplasia. *Cancer Cell.*2003; 3:531–536.

Dumont P, Berton A, Nagy N, Sandras F, Tinton S, Demetter P, *et al.* Expression of galectin-3 in the tumour immune response in colon cancer. *Laboratory Investigation.* 2008; 88: 896-906.

Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, Vestweber D. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J. Cell Sci.* 2004; 117: 19-29.

Estimativa 2008: Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Rio de Janeiro: Divulgação Científica, 2008.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990; 61:759-67.

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

Friedl P, Brocker EB. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci.* 2000; 57(1):41–64.

Fudge D, David Russell D, Moore, W.B, Lane, E.B. , Vogl, A.W. The Intermediate Filament Network in Cultured Human Keratinocytes Is Remarkably Extensible and Resilient. *PLOS.* 2008; 3(6), 2327.

Fuse C, Ishida Y, Hikita T, Asai T, Oku N. Junctional adhesion molecule-C promotes metastatic potential of HT1080 human fibrosarcoma, *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 8276–8283.

Gavert N, Ben-Ze'ev A. Epithelial–mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends in Molecular Medicine.* 2008; 14: 5.

Giepmans BNG, van IJzendoorn SCD. Epithelial cell–cell junctions and plasma membrane domains, *Biochim. Biophys. Acta.* 2008; 12; 4C: 2, 3.

Gimona M. The microfilament system in the formation of invasive adhesions. *Seminars in Cancer Biology.* 2008; 18:23-34.

Goldberg Z, Lehnert B. Radiation-induced effects in unirradiated cells: A review and implications in câncer. *International Journal of Oncology.* 2002; 21: 337-349.

Gonzaález-Mariscal L, Lechuga S, Garay E. Progress in Histochemistry and Cytochemistry. 2007; 42:1–57.

González-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1778: 729-756.

Gopalakrishnan S, Hallett MA, Atkinson SJ, Marrs JA. α PKC-PAR complex dysfunction and tight junction disassembly in renal epithelial cells during ATP depletion. *Am J Physiol*. 2007; 292: C1094-102.

Goswami R, Singh D, Phillips G, Kilkus J, Dawson G. Ceramide regulation of the tumor suppressor phosphatase PTEN in rafts isolated from neurotumor cell lines, *J. Neurosci. Res*. 2005; 81: 541-550.

Gotzmann J. *et al*. Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. 2004; *Mutat. Res*. 566: 9-20.

Gow MD, Seymour CB, Byun SH, Mothersill CE. Effect of dose rate on the radiation-induced bystander response. *Phys. Med. Biol*. 2008; 53:119-132.

Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA. A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. *Clin. Cancer Res*. 2007; 13: 7003-7011.

Gurley KE, Kemp CJ. Ataxia-Telangiectasia Mutated Is Not Required for p53 Induction and Apoptosis in Irradiated Epithelial Tissues. *Mol Cancer Res* 2007; 5:(12) 1312-1318.

Hamada N, Matsumoto H, Hara T, Kobayashi Y. Intercellular And Intracellular Signaling Pathways Mediating Ionizing-Induced Bystander Effects. *J.Radiat.res*. 2007; 48:87-95.

Han MY, Kosako H, Watanabe T, Hattori S. Extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase regulates actin organization and cell motility by phosphorylating the actin cross-linking protein EPLIN. *Mol Cell Biol*. 2007 27(23):8190-8204.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100: 57-70.

Harris TJ, Peifer M. The positioning and segregation of apical cues during epithelial polarity establishment in *Drosophila*. 2005. *J. Cell Biol*. 170(5): 813-823.

Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta*. 2008; 1778, 660-669.

Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1778: 660- 69.

Haydont V, Bourgier C, Vozenin-Brotans C. Rho/ROCK pathway as a molecular target for modulation of intestinal radiation-induced toxicity. *The british Journal of Rdiology*. 2007; 80:S32-S40.

Hayot C, Debeir O, Vam Ham P, Vam Damme M, Kiss R, Decaestecker C. Characterization of the activities of actin-affecting drugs on tumor cell migration. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2006; 211: 30-40.

Hopkins AM, Walsh SV, Verkade P, Boquet P, Nusrat A. Constitutive activation of Rho proteins by CNF-1 influences tight junction structure and epithelial barrier function. *Journal of Cell Science*. 2003; 116: 725-742.

Hotulainen P, Lappalainen P. Stress-fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J. Cell Biol.* 2006; 173: 383-394.

Houlston RS, Tomlinson IP. Polymorphisms and colorectal tumor risk. *Gastroenterology*. 2001;121(2): 282-301.

<http://www.portalms.com.br/noticias/Cancer-sera-a-doenca-mais-fatal-do-planeta-em-2010-diz-OMS/Brasil/Saude/27777.html>, acesso em 20/11/2008.

Huber AH, Stewart DB, Laurents DV, Nelson WJ, Weis WI. The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of betacatenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 12301–12309.

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

Hwang SY, Jung JW, Jeong JS, Kim YJ, Oh ES, Kim TH, Kim JY, Cho KH, Han IO. Dominant-negative Rac increases both inherent and ionizing radiation-induced cell migration in C6 rat glioma cells. *International Journal of Cancer*. 2005; 118:2056-2063.

Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells, *J. Cell Biol.* 2005; 171: 939–945.

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

Ivanov AI, McCall IC, Parkos CA, Nusrat A. Role for actin filament turnover and a myosin II motor in cytoskeleton-driven disassembly of the epithelial apical junctional complex. *Molecular Biology of the Cell*. 2004a; 15:2639-51.

Jamora C, Fuchs E. Intercellular adhesion, signaling and the cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* 2002; 4: 101–108.

Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007; 50:113–130.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ: Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008, 58:71-96.

Jones RJ, Brunton VG, Frame MC. Adhesion-linked kinases in cancer; emphasis on Src, focal adhesion kinase and PI 3-kinase. *European Journal of Cancer*.2000; 36:1595-1606.

Kajita M, McClinic KN, Wade PA. Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Mol Cell Biol*. 2004; 24: 7559–7566.

Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H *et al*. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res*. 1997.57:808–811.

Kelley LC, Shahab S, Weed SA. Actin cytoskeletal mediators of motility and invasion amplified and overexpressed in head and neck cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2008; 25:289-304.

Kim TD, Li G, Song YKS, Kim JM, Kim Z JS, *et al*. Radiation-Induced Thymidine Phosphorylase Upregulation In Rectal Cancer Is Mediated By Tumor-Associated Macrophages By Monocyte Chemoattractant Protein–1 From Cancer Cells. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys*. 2009; 73: (3) 853–860.

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

Knudson AG, Jr. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res*. 1985; 45:1437-1443.

Kosinski C, Li VSW, Chan ASY, Zhang J, Ho C, Tsui WY, *et al*. Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *PNAS*. 2007; 104: (39)15418–15423.

Kovalchuk O, Baulch J. Epigenetic changes and non target radiation effects- is there a link? *Enviromental And Molecular Mutagenesis*. 2008; 49:16-25.

Kumar S; Shah JP, Bryant CS, Awonuga AO, Imudia AN, Ruterbusch JJ. *et al*. Second neoplasms in survivors of endometrial cancer: Impact of radiation therapy. 2009; *Gynecol.Oncol*.113:233-239.

Kurz E, Miller S. Dna damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *Dna Repair*. 2004; 3:889-900.

Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB, Oddoux C, Ostrer H, Giardiello FM, *et al*. Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in *APC*. *Nat Genet*. 1997. 17:79-83.

Laprise P, Viel A, Rivard N. Human homolog of disc-large is required for adherens junction assembly and differentiation of human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*. 2004; 279: 10157–10166.

Li Z, Hosoi Y, Cai K, Tanno Y, Matsumoto Y, Enomoto A, Morita A, Nakagawa K, Miyagawa K. Src tyrosine kinase inhibitor PP2 suppresses ERK1/2 activation and epidermal growth factor receptor transactivation by X-irradiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006; 363-368.

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

Liu Y, Nursat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M *et al.* Human junctional adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci*. 2000; 113: 2363-2374.

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

Luce A, Courtin A, Levalois C, Altmeyer-Morel Sandrine, Romeo PH, Chevillard S, Lebeau J. Death receptor pathways mediate targeted and non-targeted effects of ionizing radiations in breast cancer cells. *Carcinogenesis Advance Access*. 9: 2009.

Martin-Belmonte F, Gassama A, Datta A, Yu W, Rescher U, Gerke V, Mostov K. PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42. *Cell*. 2007;128:383–397.

Massard C, Deutsch E, Soria JC. Tumour stem cell-targeted treatment: elimination or differentiation. *Ann Oncol*. 2006; 17: 1620–1624.

Mathew S, George SP, Wang Y, Siddiqui MR, Srinivasan K, Tan L, Khurana S. Potential molecular mechanism for c-Src kinase mediated regulation of intestinal cell migration. 2008; *JBC*.283:22709-22722.

Mathew S, Sudeep P. George, Wang Y, Siddiqui M.R, Srinivasan K, Tan L. and Khurana S. Potential molecular mechanism for c-Src kinase mediated regulation of intestinal cell migration. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M801319200>

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

Maul RS, Song Y, Amann KJ, Gerbin SC, Pollard TD, Chang DD. EPLIN regulates actin dynamics by cross-linking and stabilizing filaments. *J. Cell Biol*. 2003; 160:399–407.

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

Michor F, Iwasa Y, Lengauer C, Nowak MA. Dynamics of colorectal cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2005; 15: 484–493.

Mimeault M, Batra SK. Interplay of distinct growth factors during epithelial-Mesenchymal transition of cancer progenitor cells and molecular targeting as a novel therapies. *Annals of Oncology*. 2007; 18: 1605-1619.

Miyake Y, Inoue N, Nishimura K, Kinoshita N, Hosoya H, Yonemura S. Actomyosin tension is required for correct recruitment of adherens junction components and zonula occludens formation. *Experimental Cell Research*. 2006; 312: 1637-1650.

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

Mokim K, Ahmed, Li JJ. NF- κ B-mediated adaptive resistance to ionizing radiation, *Free Radic. Biol. Med.* 2007.

Mouneimne G. *et al.* Phospholipase C and cofilin are required for carcinoma cell directionality in response to EGF stimulation. *J. Cell Biol.* 2004; 166:697–708.

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

Nawrocki-Raby B, *et al.* Upregulation of MMPs by soluble Ecadherin in human lung tumor cells. *Int. J. Cancer.* 2003; 105:790 - 795.

Nelson WJ. Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature.* 2003; 422, 766-774.

Niessen CM, Gottardi CJ, Molecular components of the adherens junction. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2008; 1778:562–571.

Niessen CM. Tight Junctions/Adherens Junctions: Basic Structure and Function. *Journal of Investigative Dermatology.* 2007; 127: 2525–2532.

Nyati M, Morgan M, Feng F, Lawrence S. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nature.* 2006; 6:876-885.

Okamoto R, Irie K, Yamada A, *et al.* Recruitment of E-cadherin associated with α - and β -catenins and p120^{ctn} to the nectin-based cell-cell adhesion sites by the action of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in MDCK cells. *Genes Cell.* 2005; 10: 435-450.

Oliveira SS, Morgado-Díaz JA. Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007; 64: 17–28.

Paglin S, Hollister T, Delohery T, *et al.* A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res* 2001;61:439-444.

Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer* 2007; 7: 415–428.

Pellegrin S, and Mellor H. Actin Stress Fibers. *Journal of Cell Science*. 2007; 120:3491-3499.

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

Perez-Moreno M, Davis MA, Wong E, Pasolli HA, Reynolds AB, Fuchs E. p120-catenin mediates inflammatory responses in the skin. *Cell*. 2006; 124: 631-644.

Perrais MD, Chen X, Perez-Moreno M, Gumbiner BM. E-Cadherin Homophilic Ligation Inhibits Cell Growth and Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Independently of Other Cell Interactions. *Molecular Biology of the Cell*. 2007; 18:2013–2025.

Peterson LJ, Rajfu Z, Maddox AS, Freel CD, Chen Y, Edlund M, Otey C, Burridge K. Simultaneous Stretching and Contraction of Stress Fibers *In Vivo*. *Mol Biol Cel*. 2004; 15 (7) 3497-3508.

Pierzchalski, Krawiec A, Gawełko J, Pawlik Ww, Konturek S, Gonciarz M. Molecular mechanism of protection against chemically and γ -radiation induced apoptosis in human colon cancer cells. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2008; 59:191-202.

Pinto D, Clevers H. Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Experimental Cell Research*. 2005; 306: 357-363.

Pokutta S, Weis William I. Structure and Mechanism of Cadherins and Catenins in Cell-Cell Contacts *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2007; 23:237–61.

Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 2003; 112(4):453-465.

Prise KM, Schetino G, Folkard M, Held KD. New insights on cell death from radiation exposure. *Lancet oncol*. 2005; 6:520-28.

Qian X, Karpova T, Sheppard AM, McNally J, Lowy DR. E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *Embo J*. 2004; 23:1739–1784.

Reardon DB; Contessa JN, Mikkelsen RB, Valerie K, Amir C, Dent P, Schmidt-Ullrich RK. Dominant negative EGFR-CD533 and inhibition of MAPK modify JNK1 activation and enhance radiation toxicity of human mammary carcinoma cells. *Oncogene*. 1999;18:4756–4766.

Richard J. Gilbertson, Jaqueline A. Langdon, Andrew Hollander, Roberto Hernan, Twala L. Hogg, Amar Gajjar, Christine Fuller and Steven C. Clifford. Mutational analysis of PDGFR–RAS/MAPK pathway activation in childhood medulloblastoma . *European Journal of Cancer* 2006; 4:(5) 646-649.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K *et al.* Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 2003; 302(5651):1704–1709.

Roy FV, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell. Mol. Life Sci*. 2008; 9:11–24.

Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, Zimmer A, Bracke M, De Wever O, Gespach C. Molecular signatures and clinical significance of the epithelial-mesenchymal transitions in human epithelial cancers. *Drug Resist Updat*. 2008; 11:123–151.

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

Santos JR JCM. Câncer Ano-Reto-Cólico: Aspectos Atuais IV - Câncer de Cólon - Fatores Clínicos, Epidemiológicos e Preventivos. *Rev. bras Coloproct*. 2008; 28 (3): 378-385.

Santoso S, Orlova VV, Song K, Sachs UJ, Andrei-Selmer CL, Chavakis T. The homophilic binding of junctional adhesion molecule-C mediates tumor cell-endothelial cell interactions. *J. Biol. Chem*. 2005; 280: 36326–36333.

Sena P, Saviano M, Monni S, Losi L, Roncucci L, Marzona L, De Pol A. Subcellular localization of beta-catenin and APC proteins in colorectal preneoplastic and neoplastic lesions. 2006; *Cancer Lett*. 28;241(2):203-12.

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

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

Skandarajah AR, Lynch AC, Mackay JR, Ngan S, Heriot AG. The Role of Intraoperative Radiotherapy in Solid Tumors. *Ann Surg Oncol*. 2009; 16:735–744.

Somosy Z. Radiation response of cell organelles. *Micron*. 2000; 31: 165-181.

Somosy Z; Horvath G; Bogнар G; Koteles G. Structural and functional changes of cell junctions on effect of ionizing radiation. *Acta Biol Szeged*. 2003; 47:(1-4) 19-25.

Sourisseau T, Georgiadis A, Tsapara A, Ali RR, Pestell R, Matter K, *et al.* Regulation of PCNA and cyclin D1 expression and epithelial morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA. *Mol Cell Biol* 2006; 26:2387–98.

Spaderna S, Schmalhofer O, Wahlbuhl M, Dimmler A, Bauer K, Sultan. The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res*. 2008; 68: 537–544.

St croix B, Sheehan C, Rak JW, Florenes VA, Slingerland JM, Kerbel RS. E-cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(KIP1). *J. Cell Biol.* 1998;142, 557-571.

Stemmler MP. Cadherins in development and cancer. *Mol BioSyst.* 2008; 4: 835-50.
Stone HB, Coleman CN, Anscher MS, McBride WH. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms *Lancet Oncol* 2003; 4: 529–36.

Suzuki M, Boothman DA. Stress-induced premature senescence (SIPS) - influence of SIPS on radiotherapy. *J. Radiat Res.* 2008; 49:105–12.

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

Tapia R, Chamorro D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways Lorenza González-Mariscal. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2008; 1778:729-756.

Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7(2): 131-142.

Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Daniel JM, Ireton RC, Wheelock MJ, Johnson KR, Hummingbird DK, Reynolds AB. Selective uncoupling of p120ctn from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J. Cell Biol.* 2000; 148:89–202.

Timpson, P, Jones, G. E, Frame, M. C, and Brunton, V. G. Coordination of cell polarization and migration by the Rho family GTPases requires Src tyrosine activity. *Curr Biol* 2001; 11,23: 1836-1846.

Vaezi A, Bauer C, Vasioukhin V, Fuchs E *Dev Cell* 2002; 3:367–381.

Van den Brandt PA, Goldbohm RA. Nutrition in the prevention of gastrointestinal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2006; 20(3):589-603.

Van Es J.H. *et al.* You Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2003;13: 28–33.

Van Es JH, Clevers H. *Trends Mol Med.* 2005; 11:496–502.

Wang T, Hu YC, Dong S, Fan M, Tamae D, Ozeki M, Gao Q, Gius D, Li JJ. Co-activation of ERK, NF-kappaB, and GADD45 beta in response to ionizing radiation. *J. Biol. Chem.* 2005; 280:12593 - 12601.

Watabe-Uchida M, Uchida N, Imamura Y, Nagafuchi A, Fujimoto K, Uemura T, Vermeulen S, van Roy F, Adamson ED, Takeichi M. *J Cell Biol.* 1998; 142:847–857.

Weber C, Fraemohs L, Dejana E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7: 467–477.

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

Wells A. Tumor invasion: role of growth factor-induced cell motility. *Adv Cancer Res* 2000; 78:31–101.

Wild-Bode C, Weller M, Rimner A, Dichgans J, Wick W. Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. *Cancer Res*. 2001; 61:2744-50.

Wildenberg GA, Dohn MR, Carnahan RH, Davis MA, Lobdell NA, Settleman J, Reynolds AB. p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell–cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. *Cell*. 2006; 127:1027-1039.

Wong AS, Gumbiner BM. Adhesion-independent mechanism for suppression of tumor cell invasion by E-cadherin. *J. Cell Biol*. 2003; 161: 1191– 1203.

Yacoub A, Miller A, Caron RW, Qiao L, Curiel DA, Fisher PB, *et al*. Radiotherapy-induced signal transduction. *Endocrine-Related Cancer*. 2006; 13: 99-114.

Yamada A, Irie K, Fukuhara A, Ooshio T, Takai Y. Requirement of the actin cytoskeleton for the association of nectins with other cell adhesion molecules at adherens and tight junctions in MDCK cells. *Genes Cells*. 2004; 9:843-855.

Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI, Nelson WJ. Deconstructing the cadherin–catenin–actin complex. *Cell*. 2005; 123: 889–901.

Yamaguchi H, Condeelis J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1773 (5):642–652.

Z. Somosy. Radiation response of cell organelles. *Micron*. 2000; 31: 165–181.

Zhang L, Gong A, Ji J, Wu Y, Zhu X, Suqing Lv, Hongzhu Lv, Sun X. The radiosensitizing effect of doranidazole on human colorectal cancer cells exposed to high doses of irradiation. *BMC Cancer*. 2007, 7:188.