



**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer**  
**Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**  
**Pós-Graduação em Oncologia**

**ANNIE CRISTHINE MORAES SOUSA SQUIAVINATO**

**O PAPEL DA COFILINA-1 NA PROGRESSÃO DO CÂNCER COLORRETAL**

**Orientador: Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz**

**RIO DE JANEIRO**

**2019**



**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer**  
**Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**  
**Pós-Graduação em Oncologia**

**ANNIE CRISTHINE MORAES SOUSA SQUIAVIANTO**

**O PAPEL DA COFILINA-1 NA PROGRESSÃO DO CÂNCER COLORRETAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Câncer, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Oncologia.

**Orientador: Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz**

**RIO DE JANEIRO**

**2019**

S773p Squiavinato, Annie Cristhine Moraes Sousa.

O papel da cofilina-1 na progressão do câncer colorretal / Annie Cristhine Moraes Sousa Squiavinato. – Rio de Janeiro, 2019.  
x, 153 f. : il .color.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019.

Orientador: José Andrés Morgado Díaz.

1. Neoplasias Colorretais. 2. Progressão da Doença. 3. Cofilina 1. 4. Transição Epitelial-Mesenquimal. I. Diaz, José Andrés Morgado (orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.99435



**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer**  
**Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**  
**Pós-Graduação em Oncologia**

**ANNIE CRISTHINE MORAES SOUSA SQUIAVINATO**

**O PAPEL DA COFILINA-1 NA PROGRESSÃO DO CÂNCER COLORRETAL**

**Tese aprovada em: 14 / 02 / 2019**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Patrícia Torres Bozza - FIOCRUZ**

**Prof. Dr. Robson de Queiroz Monteiro - UFRJ**

**Prof. Dr. Marcelo Alex de Carvalho - INCA**

**Prof. Dra. Sheila Coelho Soares Lima - INCA**

**Prof. Dr. André Luiz Mencialha - UERJ - Suplente I**

**Prof. Dra. Renata Binato Gomes - INCA - Suplente II**

**RIO DE JANEIRO**

**2019**

*Dedico aos meus pais, pelo constante*

*apoio em ir atrás dos meus sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Dimas, meu esposo e companheiro, pelo incentivo e compreensão durante os quatro anos de estudo e trabalho. Foram muitos finais de semana, feriados e férias abdicados, em todos eles tive seu apoio. Pelo amor, carinho e por me ouvir quando aquele experimento de três semanas não dava certo. Enfim, com você tudo foi possível.

Ao Dr. Jose Morgado Dias, pela amizade desenvolvida ao longo do trabalho, pela oportunidade a mim concedida de fazer parte do seu grupo de pesquisa, por sua dedicação e paciência prestadas com grande profissionalismo. Seus ensinamentos em muito contribuíram para o meu crescimento profissional.

Aos meus exemplos de pesquisadores e amigos Dr. Julio Cesar, Dr. Waldemir e Dr. Wallace que em muito me ensinaram durante o percurso, seja no delineamento e execução dos experimentos quanto no senso crítico e ético de avaliação dos mesmos. Meu crescimento profissional em muito se espelha no de vocês.

Ao Dr. Pedro Barcellos pelo auxílio durante o trabalho, seja na discussão de ideias, delineamento e/ou execução dos experimentos.

Ao Dr. Murilo Ramos pela ajuda nos experimentos de TEM e captura das imagens de super resolução.

À Renata Ivo Vasconcelos pela colaboração nos trabalhos realizados.

Aos meus queridos amigos Perôny e Jessica  $\beta$  pelo apoio e constante auxílio durante os experimentos. Obrigada pelas risadas e grandes discussões, o dia de trabalho com vocês sempre era leve e descontraído.

Ao restante dos membros dos grupos de Estrutura e Dinâmica Celular e Glicobiologia do Câncer, pelo acolhimento, companheirismo e amizade, pelas altas risadas e por vários conselhos em situações críticas. Todos de forma direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento do trabalho.

Aos membros do grupo Biomarcadores Neoplásicos, liderado pela Dra Etel Gimba, em especial a Paula, Mari e Lú pela paciência e solicitude em tirar várias dúvidas que surgiram no decorrer do trabalho. Pela amizade desenvolvida durante esse tempo.

Aos membros que já se desligaram, Dra. Lili, Priscila, Natália e Andréa pelas discussões de ideias, colaborações e amizade.

Aos nossos técnicos, Giovani Borges dos Santos e Andreia Deiró de Carvalho por todo auxílio durante a concretização deste projeto.

Ao Dr. Fernando Pereira do CENABIO-UFRJ, pelo auxílio com a captura e processamento das imagens obtidas por microscopia de alta resolução.

Ao Dr. Matheus Rajão, pela ajuda com a obtenção das imagens no microscópio confocal.

A Dra. Mariana Boroni, pela colaboração em relação às análises de bioinformática.

Aos colaboradores do Banco de tumores (BNT), em especial à enfermeira Maria Tereza pelo auxílio com os TCLEs.

À Priscila Valverde e Dra. Ivanir do DIPAT pela colaboração na execução e análise das imagens de imunohistoquímica.

Ao Júlio Show e Thayana, pela ajuda com as análises de associação.

Às agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) e ao Ministério da Saúde (MS), pelo apoio pessoal e ao projeto de pesquisa.

E finalmente, aos nossos pacientes que mesmo encarando momentos difíceis lutando contra o câncer aceitaram participar do estudo.

*"Olhe para as estrelas e não para os seus pés.*

*Tente entender o que você vê e imagine  
o que faz o universo existir. Seja curioso."*

***Stephen Hawking***





**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer**  
**Coordenação de Pós-graduação**

## **O PAPEL DA COFILINA-1 NA PROGRESSÃO DO CÂNCER COLORRETAL**

### **RESUMO**

#### **Tese de Doutorado**

**ANNIE CRISTHINE MORAES SOUSA SQUIAVINATO**

O câncer colorretal (CCR) em estágios avançados é frequentemente uma doença letal devido à formação de metástases. A reorganização do citoesqueleto de actina é um evento crucial da migração celular durante a ativação do programa de transição epitélio-mesenquimal (TEM), e está associado com a aquisição de propriedades metastáticas pelas células tumorais. A proteína cofilina-1 modula a dinâmica do citoesqueleto através do corte e despolimerização da actina, levando a formação de protusões de membrana, migração e invasão celular. No entanto, o papel da cofilina-1 durante a TEM no CCR é ainda desconhecido. Na primeira parte do estudo, avaliamos o papel da cofilina-1 durante a TEM induzida pelo tratamento com TGF- $\beta$  na linhagem de câncer de cólon HT-29. Nossos resultados demonstraram que a cofilina-1 e a sua forma fosforilada, pcofilina-1, apresentam distribuição subcelular distinta em células que sofreram TEM, cofilina-1 distribui-se em regiões de lamelipódio, enquanto pcofilina-1 localiza-se na parte posterior da célula próximo às fibras de stress. Verificamos também que o silenciamento de cofilina-1 foi capaz de reverter parcialmente os efeitos do tratamento com TGF- $\beta$ , pois a redução dos níveis de ativação do eixo pLIMK2-pcofilina-1 nas células silenciadas contribuiu para restauração tanto dos níveis proteicos quanto da localização subcelular de E-caderina e claudina-3, além de promover a reorganização dos filamentos de actina e diminuição do nível da proteína mesenquimal vimentina. Além disso, as células silenciadas exibiram taxas de migração e invasão reduzidas, bem como diminuição da atividade de MMP-2 e -9 e aumento do tamanho das adesões focais. Confirmando esses resultados, a expressão do mimético de pcofilina-1 S3E (forma inativa) reduziu também os níveis proteicos de E-caderina e claudina-3, bem como sua presença nos contatos célula-célula, além de induzir aumento dos níveis de vimentina. Na segunda parte do estudo, o objetivo foi verificar a expressão gênica e os níveis proteicos de cofilina-1 e de suas reguladoras LIMK1 e SSH1 em amostras de CCR humano, a fim de compreender melhor o papel destas proteínas ao longo da progressão tumoral. Foi observado que pacientes no estadió III apresentavam níveis elevados de cofilina-1 e SSH1. Estes altos níveis foram positivamente associados com metástase linfonodal, um importante parâmetro de progressão tumoral. Ademais, utilizando dados do banco TCGA foi demonstrado correlação negativa entre as proteínas cofilina-1 e SSH1 em todos os estádios, em especial no estadió III. Conjuntamente, os resultados sugerem que a proteína cofilina-1 é crucial na TEM induzida por TGF- $\beta$ , regulando a mudança da morfologia epitelial para mesenquimal, atuando nos processos de migração e invasão celular, regulando a organização do citoesqueleto de actina e das adesões celulares em câncer de cólon. Portanto, nossos dados sugerem que as proteínas cofilina-1 e SSH1 podem ser úteis não somente para estratificar pacientes com alto risco de acometimento de linfonodos, como também se mostram promissores alvos para o desenvolvimento de novos tratamentos capazes de controlar a disseminação tumoral.



**Ministério da Saúde**

**Instituto Nacional de Câncer**

**Coordenação de Pós-graduação**

## **THE ROLE OF COFILIN-1 IN COLORECTAL CANCER PROGRESSION**

### **ABSTRACT**

#### **PhD. Thesis**

**ANNIE CRISTHINE MORAES SOUSA SQUIAVINATO**

Colorectal cancer (CRC) in advanced stages is frequently lethal due to metastatic disease. Actin cytoskeletal rearrangement is an essential step in cell migration during activation of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) program, which is associated with metastatic properties of cancer cells. Cofilin-1 protein modulates cytoskeleton dynamic by promoting actin treadmilling, thereby driving membrane protrusion, cell migration and invasion. However, the role of cofilin-1 during EMT in CRC is unknown. First, we evaluated the role of cofilin-1 during TGF- $\beta$ -induced EMT in colorectal cancer cells, HT-29 cells. We demonstrated that cofilin-1 and its phosphorylated form, pcofilin-1, have distinct subcellular localization in EMT cells, cofilin-1 was found distributed at the lamellipodium regions while pcofilin-1 was located in the rear of the cell near the stress fibers. Silenced cofilin-1 cells (siCofilin-1) were able to partially abrogate TGF- $\beta$  effects, since the reduction of the p-LIMK2-pcofilin-1 axis lead to the relocalization of E-cadherin and claudin-3 at the cell-cell contact and recovery of their respective protein levels. Moreover, siCofilin-1 cells promoted actin reorganization, and a decrease in mesenchymal protein level, vimentin. Furthermore, siCofilin-1/TGF- $\beta$  cells exhibited decreased migration and invasion rates as well as reduced MMP-2 and -9 activity and augmented focal adhesion size. The expression of an inactive phospho-cofilin-1 mimetic (S3E) reduced E-cadherin and claudin-3 at cell-cell contacts, reduced their protein levels, and increased vimentin protein. Second, we also aimed to address the levels of cofilin-1 and its regulators, LIMK1 and SSH1, in CRC tissue samples in order to better understand the role of these proteins throughout tumor progression. We found that stage III patients have high levels of cofilin-1 and SSH1. These high levels were positively associated with lymph node metastasis, an important parameter of tumor progression. In addition, we also demonstrated negative correlation between gene expression data from the TCGA project database between the cofilin-1 and SSH1 at all stages, especially in stage III. Taken together, our findings provide insights into the crucial role of cofilin-1 in TGF- $\beta$ -induced EMT, driving phenotypic switching from epithelial to mesenchymal-like morphology, cell migration and invasion through rearrangement of actin cytoskeleton and cell adhesion organization in CRC. Thus, our results also suggest that cofilin-1 and SSH1 proteins could be useful to predict patients with high risk of lymph node impairment as well as are promising targets for the development of new treatments capable of controlling tumor dissemination.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo .....	18
Figura 1.2 - Modelo da sequência adenoma-carcinoma para CCR.....	23
Figura 1.3 - Subtipos moleculares do CCR.....	25
Figura 1.4- Representação esquemática da TEM e MET .....	27
Figura 1.5 - Mecanismo molecular de indução a TEM pela via de sinalização TGF- $\beta$ .....	29
Figura 1.6 - Esquema da estrutura molecular do Complexo Juncional Apical (CJA).....	32
Figura 1.7 - Modelo esquemático das Adesões Focais.....	34
Figura 1.8 - Citoesqueleto de actina e suas funções celulares.....	35
Figura 1.9 - Regulação das proteínas Rho-GTPases.....	36
Figura 1.10 - Via de sinalização das proteínas Rho-GTPases.....	38
Figura 1.11 - Representação esquemática da dinâmica actina reguladas pelas proteínas Rho.....	41
Figura 1.12 - Representação esquemática da regulação por fosforilação da proteína cofilina-1 .....	43
Figura 5.1- Análise da expressão e localização de proteínas epiteliais e mesenquimais em células HCT-116 tratadas com TGF- $\beta$ . .....	63
Figura 5.2 - Análise do potencial maligno de células HCT-116 tratadas com TGF- $\beta$ .....	64
Figura 5.3 - Análise da expressão e localização de proteínas epiteliais e mesenquimais em células HT-29 tratadas com TGF- $\beta$ .....	66
Figura 5.4 - Análise dos níveis proteicos e localização subcelular de marcadores da TEM em células HT-29 tratadas com TGF- $\beta$ e SB431542.....	68
Figura 5.5 - Análises morfométricas de células HT-29.....	69
Figura 5.6 - Análise do potencial maligno de células HT-29 tratadas com TGF- $\beta$ .....	70
Figura 5.7 - Análise da ativação da via de sinalização de RhoA após o tratamento com TGF- $\beta$ em células HT-29.....	71
Figura 5.8 - Análise da atividade de cofilina-1 e expressão gênica em células HT-29 após o tratamento com TGF- $\beta$ . .....	73

Figura 5.9 - Análise dos níveis totais e fosforilados de LIMK2 e cofilina-1 em células HT-29 tratadas com SB431542.....	74
Figura 5.10 - Análise do <i>pool</i> de G-actina e F-actina mediante tratamento com TGF- $\beta$ em células HT-29..	74
Figura 5.11 - Análise da localização subcelular de cofilina-1 e pcofilina-1 em células HT-29 após tratamento com TGF- $\beta$ .....	76
Figura 5.12 - Análise da localização subcelular de cofilina-total e pcofilina-1 por microscopia de super resolução em células HT-29 após tratamento com TGF- $\beta$ .....	78
Figura 5.13 - Silenciamento da cofilina-1 usando siRNA em células HT-29.....	79
Figura 5.14 - Análise da ativação de LIMK2 e pcofilina-1 em células HT-29 mediante silenciamento de cofilina-1 e tratamento com TGF- $\beta$ .....	80
Figura 5.15 - Efeitos do silenciamento de cofilina-1 na morfologia celular em células tratadas com TGF- $\beta$ .....	81
Figura 5.16 - Efeitos do silenciamento de cofilina-1 na dinâmica do citoesqueleto de actina em células HT-29 tratadas com TGF- $\beta$ .....	82
Figura 5.17 - Análise dos níveis proteicos de marcadores epiteliais e mesenquimal em células HT-29 mediante silenciamento de cofilina-1 e tratamento com TGF- $\beta$ .....	83
Figura 5.18- Análise da localização subcelular de E-caderina, claudina-3 e vimentina em células HT-29 silenciadas para cofilina-1 mediante ao tratamento com TGF- $\beta$ .....	84
Figura 5.19 - Análise da localização de E-caderina e actina mediante tratamento com SB431542 .....	85
Figura 5.20 - Análise do padrão organizacional do citoesqueleto de actina em células expressando mutantes de cofilina-1.....	86
Figura 5.21 - Avaliação do papel dos mutantes de cofilina-1 na desmontagem juncional .....	87
Figura 5.22 - Análise do crescimento celular de células HT-29 silenciadas para cofilina-1 e tratadas com TGF- $\beta$ .....	88
Figura 5.23 - Análise do potencial migratório de células HT-29 silenciadas para cofilina-1 e tratadas com TGF- $\beta$ .....	89
Figura 5.24 - Avaliação do papel de cofilina-1 na invasão celular em células HT-29.....	90
Figura 5.25 - Análise do papel do silenciamento de cofilina-1 sob o padrão organizacional das adesões focais.....	91
Figura 6.1 - Representação esquemática do papel de cofilina-1 em eventos da TEM.....	100

Figura 7.1 - Análise dos níveis cofilina-1 em amostras de CCR.....	104
Figura 7.2 - Imagem representativa da distribuição citoplasmática de cofilina-1 em amostras de CCR por IHC .....	105
Figura 7.3 - Análise dos níveis LIMK1 em amostras de CCR.....	108
Figura 7.4 - Imagem representativa da distribuição citoplasmática de LIMK1 em amostras de CCR por IHC.....	109
Figura 7.5 - Análise dos níveis SSH1 em amostras de CCR.....	112
Figura 7.6 - Imagem representativa da distribuição citoplasmática de SSH1 em amostras de CCR por IHC.....	113
Figura 7.7 - Análise da expressão gênica de cofilina-1, LIMK1 e SSH1 em diferentes estadios do CCR utilizando o banco de dados TCGA.....	115
Figura 7.8 - Análise de correlação entre cofilina-1 e SSH1 entre os estadios do CCR utilizando o banco de dados TCGA.....	116

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Relação de amostras de pacientes e ensaios utilizados.....	49
Tabela 4.2 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a análise da expressão gênica.....	53
Tabela 7.1 - Dados clinicopatológicos de pacientes com câncer colorretal inseridos no estudo.....	102
Tabela 7.2 - Associação dos níveis de cofilina-1 com parâmetros clinicopatológicos de pacientes com CCR.....	106
Tabela 7.3 - Associação dos níveis de LIMK1 com parâmetros clinicopatológicos de pacientes com CCR.....	110
Tabela 7.4 - Associação dos níveis de SSH1 com parâmetros clinicopatológicos de pacientes com CCR.....	114

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPs - do inglês *actin-binding proteins*  
ADF - do inglês *actin depolymerizing factor*  
ANOVA - do inglês *analysis of variance*  
APC - do inglês *adenomatous polyposis coli*  
Arp2/3 - do inglês *actin-related protein 2/3*  
BMP - do inglês *bone morphogenetic protein*  
BRAF - do inglês *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*  
BVES - do inglês *blood vessel epicardial substance*  
AC - do inglês *amplifier cells*  
CAFs - do inglês *cancer-associated fibroblasts*  
CDC 42 - do inglês *cell division cycle 42*  
CDK - do inglês *cyclin-dependent kinase*  
CDKN2A - do inglês *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*  
CFL-1 - do inglês *cofilin-1 non muscular*  
CFL-2 - do inglês *muscular cofilin-1*  
CJA - complexo juncional apical  
CIMP - do inglês *CpG Island methylator phenotype*  
CIN - do inglês *chromosomal instability*  
CMS - do inglês *consensus molecular subtype*  
CRB3 - do inglês *protein crumbs homologue 3*  
DDRs - do inglês *discoidin domain receptors*  
MEC - Matriz extracelular  
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético  
EGF - do inglês *epidermal growth factor*  
EGTA - Ácido tetracético etileno-glicol  
ERK - do inglês *extracellular signal-regulated kinase*  
FAK - do inglês *focal adhesion kinase*  
FAP - do inglês *familial adenomatous polyposis*  
FGF - do inglês *fibroblast growth factor*  
GAPs - do inglês *GTPase-activating proteins*  
GDIs - do inglês *guanine-nucleotide dissociation inhibitors*  
GDP - Guanosinadifosfato  
GEFs - do inglês *guaninenucleotide exchange factors*  
GTP - Guanosinatrifosfato  
HNPCC - do inglês *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*  
IARC - do inglês *International Agency for Research on Cancer*  
IDH- Índice de Desenvolvimento Humano  
IGF2R - do inglês *insulin-like growth factor 2 receptor*  
KRAS - do inglês *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*  
LIMK - do inglês *LIM domain kinase*  
MAGI - do inglês *membrane-associated guanylate kinase inverted*  
MAPK - do inglês *mitogen-activated protein kinase*  
mDia - do inglês *diaphanous-related formin-1*  
MEK - do inglês *raf-mitogen-activated protein kinase*  
MET - do inglês *mesenchymal-epithelial transition*  
MIN - do inglês *microsatellite instability*  
MINTS - do inglês *methylated in tumors*  
MLC - do inglês *myosin light chain*  
MLH1 - do inglês *mutL protein homolog 1*

MLK - do inglês *mixed lineage kinases*  
MMR - do inglês *DNA mismatch repair*  
MRTF-A/B - do inglês *myocardin-related transcription factors*  
MSH2 - do inglês *mutS protein homolog 2*  
MSH6 - do inglês *mutS protein homolog 6*  
MSI - do inglês *microsatellite instability*  
PAK - do inglês *p21-activated kinases*  
PALS1- do inglês *protein associated with Lin-1*  
PAR3 - do inglês *partitioning defective 3*  
PATJ - do inglês *PALS1-associated tight junction*  
PDZ - do inglês *postsynaptic density protein*  
PIK3CA - do inglês *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*  
PIP2 - do inglês *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*  
PKC - do inglês *protein kinase C*  
RAC1 - do inglês *Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1 -Rho Family, Small GTP Binding Protein Rac*  
RHOA - do inglês *Ras homolog gene family*  
ROCK - do inglês *Rho-associated protein kinase*  
SFB - Soro fetal bovino  
SMAD4 - do inglês *SMAD family member 4*  
SMURF1 - do inglês *E3 ubiquitin ligase SMAD ubiquitylation regulatory factor 1*  
SPS - do inglês *serrated hyperplastic polyposis syndrome*  
SSH - do inglês *slingshot*  
TAZ - do inglês *transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*  
TEM - transição epitélio-mesenquimal  
TCT/LEF - do inglês *T-cell factor/lymphoid enhancer factor family*  
TESK1/2 - do inglês *testicular protein kinase 1/2*  
TGFBRI e II - do inglês *transforming growth factor- $\beta$  receptor I and II*  
TGF- $\beta$  - do inglês *transforming growth factor- $\beta$*   
TP53 - do inglês *tumor protein p53*  
VEGF - do inglês *vascular endothelial growth factor*  
WASP - do inglês *Wiskott-Aldrich syndrome protein*  
WAVE/WASF1 - do inglês *WAS protein family member 1*  
WNT - do inglês *wingless*  
YAP - do inglês *Yes-associated protein*  
ZEB - do inglês *zinc finger E-box-binding homeobox*  
ZO1- do inglês *associated nucleic acid binding protein*  
ZONAB - do inglês *transcriptional regulator*  
 $\alpha$ -SMA - do inglês *smooth muscle actin*



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Câncer: cenário mundial.....	17
1.2	Câncer colorretal: estimativas de incidência, mortalidade e sobrevida.....	18
1.3	Fatores de risco e tipos de manifestação do câncer colorretal .....	19
1.4	Bases moleculares do câncer colorretal.....	20
1.4.1	Novos subtipos moleculares do câncer colorretal .....	23
1.5	Transição epitélio-mesenquimal –TEM .....	25
1.6	Adesões celulares e citoesqueleto de actina .....	30
1.6.1	Adesões celulares .....	30
1.6.2	O Citoesqueleto de actina.....	34
1.7	Cofilina-1.....	41
2	JUSTIFICATIVA.....	46
3	OBJETIVO GERAL.....	47
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	47
4	MATERIAS E MÉTODOS.....	48
4.1	Anticorpos e reagentes .....	48
4.2	Amostras de tecido obtidas de pacientes .....	48
4.3	Cultura de células .....	49
4.4	Tratamento com TGF- $\beta$ e inibição com SB431542 .....	50
4.5	Silenciamento de cofilina-1 .....	50
4.6	Geração de células com cofilina-1 mutante .....	50
4.7	Obtenção de lisados celulares e <i>Western Blotting</i> .....	51
4.8	Extração de RNA e síntese de cDNA.....	52
4.9	RT-qPCR.....	52
4.10	Imunohistoquímica (IHC) .....	54
4.11	Fracionamento de G/F actina .....	55
4.12	Crescimento celular .....	55
4.13	Análise da migração celular .....	56
4.14	Ensaio para avaliar atividade de RhoA.....	57
4.15	Análise da invasão celular .....	57
4.16	Análise da atividade de metaloproteases por zimografia .....	58
4.17	Imunofluorescência e fluorescência direta .....	58
4.18	Análises morfométricas .....	60

4.19	Análises utilizando banco de dados TCGA.....	60
4.20	Análise estatística.....	61
5	RESULTADOS PARTE I.....	62
5.1	Caracterização de modelo de indução da TEM <i>in vitro</i> em células HCT-116 e HT-29 pelo tratamento com TGF- $\beta$ .....	62
5.2	Avaliação da via de sinalização não canônica RhoA-pLIMK2-pcofilina-1 quanto à indução do fenótipo TEM mediante tratamento com TGF- $\beta$ em células HT-29 .....	70
5.3	Efeitos do silenciamento de cofilina-1 quanto à ativação da via LIMK2/cofilina-1 em células HT-29 tratadas com TGF- $\beta$ .....	78
5.4	Avaliação do papel de cofilina-1 na mudança morfológica de epitelial para mesenquimal nas células HT-29 tratadas com TGF- $\beta$ .....	80
5.5	Análise da contribuição de cofilina-1 na desmontagem juncional em células HT-29 tratadas com TGF- $\beta$ .....	82
5.6	Análise do papel de cofilina-1 na migração e invasão celular em células HT-29 tratadas com TGF- $\beta$ .....	87
6	DISCUSSÃO PARTE I.....	92
7	RESULTADOS PARTE II.....	101
8	DISCUSSÃO PARTE II .....	117
9	CONCLUSÕES.....	122
10	REFERÊNCIAS .....	123
11	ANEXOS.....	137

## REVISÃO DE LITERATURA


### 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 Câncer: cenário mundial

O câncer é um dos principais problemas globais de saúde pública, sendo responsável por altos índices de mortalidade e morbidade tanto em países subdesenvolvidos como em desenvolvidos. Segundo estimativas mundiais do GLOBOCAN, 18,1 bilhões de casos novos e 9,6 bilhões de mortes foram esperados para o ano de 2018 (BRAY et al., 2018). Já dados da Organização Mundial de Saúde estimaram em 2015 o câncer sendo a primeira ou segunda causa de morte antes dos 70 anos em 91 dos 172 países analisados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Outra estimativa prevê para 2030 cerca de 22,2 milhões de novos casos, aumento esse intimamente relacionado à transição social e econômica de muitos países. À medida que os países aumentam o IDH, níveis mais altos na carga de câncer e alteração no perfil dos tipos de câncer são observados (BRAY et al., 2012). Países com IDH alto exibem com mais frequência diagnósticos de cânceres ligados à ocidentalização, incluindo o colorretal, de pulmão, de mama em mulheres e o de próstata em homens. Por outro lado, países com IDH baixo, exibem frequentemente cânceres associados á infecções como o de colo de útero e o de estômago (BRAY et al., 2012).

Atualmente países em desenvolvimento estão passando por processo de transição epidemiológica, ou seja, dados indicam diminuição de doenças infecciosas e aumento de doenças crônico degenerativas, refletindo o aumento da expectativa de vida e o impacto positivo de políticas de saúde pública (BRAY et al., 2012). Porém, países desenvolvidos e subdesenvolvidos ainda apresentam taxas de incidência, mortalidade e sobrevida extremamente diferentes na área de oncologia. Perfis de incidência e mortalidade em um determinado país estão relacionados com fatores de risco locais, programas de prevenção primária e secundária e acesso a tratamentos apropriados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Em relação aos dados disponíveis no Brasil, estimativas do biênio 2018-2019 apontam a ocorrência de cerca de 400 mil casos novos de câncer, exceto pele não melanoma. Os cânceres de próstata em homens e mama em mulheres serão os mais frequentes, dados que se assemelham com os da América Latina e do Caribe (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A Fig.1.1 ilustra a distribuição dos dez tipos mais comuns na população brasileira.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
			<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>			
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.880	2,4%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

**Figura 1.1- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018** por sexo, considerando todas as regiões do Brasil, exceto pele não melanoma. MINISTÉRIO DA SAÚDE 2017.

Tanto em dados mundiais como em dados nacionais, o câncer colorretal apresenta altos índices de incidência e prevalência.

## 1.2 Câncer colorretal: estimativas de incidência, mortalidade e sobrevida

Segundo dados do GLOBOCAN de 2018, o câncer colorretal (CCR) é o terceiro mais comum entre homens (10,9 %), e o segundo entre as mulheres (9,5%). As estimativas do CCR estão associadas com o desenvolvimento socioeconômico, países com alto IDH como a Austrália, países do sul e do norte Europa e América do Norte possuem taxas de incidência três vezes mais altas que países em transição (BRAY et al., 2018). Contudo, em países desenvolvidos a mortalidade é baixa, sendo as taxas mais altas encontradas em regiões menos desenvolvidas e com IDH baixo (DOUAIHER et al., 2017; BRAY et al., 2018). Nos Estados Unidos é possível observar um declínio nas taxas de incidência e mortalidade, reflexo de políticas que favorecem a detecção precoce de lesões iniciais, melhores práticas na conduta e tratamento, além da redução na exposição de fatores de risco (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). Por outro lado, diversos países subdesenvolvidos têm apresentado crescimento nas taxas de incidência e mortalidade, reflexo da falta de detecção precoce e tratamentos adequados (BRAY et al., 2018). No Brasil, dados do Ministério da Saúde estimaram para o ano de 2018 cerca de 17.380 novos casos de CCR em homens e de 18.980 em mulheres. O Brasil segue a tendência mundial, onde em mulheres é o segundo mais frequente e em homens o terceiro (Fig.1.1) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

O estágio da doença no diagnóstico é um fator prognóstico importante. Quanto mais cedo diagnosticada a doença, maior a sobrevida. Em países desenvolvidos como os Estados Unidos, a taxa de sobrevida em cinco anos é de 65%. Quando detectado em estágio localizado (39% dos casos), essa taxa aumenta para 90% (MILLER et al., 2016). Países em desenvolvimento a sobrevida em cinco anos é menos de 50%.

### 1.3 Fatores de risco e tipos de manifestação do câncer colorretal

O CCR possui etiologia multifatorial, em que tanto fatores genéticos quanto ambientais estão envolvidos em seu desenvolvimento. Dentre os fatores de risco estão o tabagismo, consumo de álcool, dieta rica em gordura, dieta hipercalórica, alto consumo de carne e alimentos processados, baixo consumo de frutas e vegetais. Em adição a esses, recentemente a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) incluiu recentemente outros dois fatores: a obesidade e o sedentarismo (WORLD CANCER RESEARCH FUND, 2018).

Há ainda a contribuição de fatores de risco que não podem ser prevenidos. Quanto mais senil o indivíduo é (acima dos 50 anos), maior o risco de CCR. Algumas doenças inflamatórias do intestino, como a retocolite ulcerativa e doença de Crohn também são fatores de risco (NORAT et al., 2015).

Em relação aos fatores genéticos envolvidos no CCR, sabe-se que o CCR familiar é responsável por aproximadamente 20% dos casos de CCR (LYNCH et al., 2014). Predisposições genéticas à doenças crônicas do intestino como a Síndrome de Lynch ou também denominada câncer colorretal não poliposo (HNPCC, do inglês *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) e a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP, do inglês *familial adenomatous polyposis*) são responsáveis por 2-4% e menos de 1% respectivamente, do total de casos de CCR (LYNCH et al., 2014; LICCARDO et al., 2017). Portanto, esses fatores podem dividir as manifestações do CCR em três formas distintas: a forma esporádica, familiar e hereditária.

A forma esporádica representa 70% dos casos de CCR, e acomete pacientes com média de idade entre 70-75 anos na parte distal do cólon. Ocorre em decorrência da ação cumulativa de fatores ambientais, levando alterações na estrutura do DNA (mutações) ou função (epigenética) (YAMAGISHI et al., 2016). Muitas dessas mutações acontecem em genes supressores de tumor (por exemplo, *APC*, *SMAD4* e *TP53*) e oncogenes (por exemplo, *KRAS* e *BRAF*). As mutações nesses genes condutores (*drivers*) geram vias de sinalização intracelulares aberrantes favorecendo a formação de pólipos intestinais adenomatosos. Por meio de mutações sucessivas, ao longo de anos, o adenoma transforma-se em carcinoma de cólon (YAMAGISHI et al., 2016).

Aproximadamente 20-30% dos casos totais de CCR possuem algum componente hereditário. É nesse contexto que as síndromes genéticas de alta penetrância se inserem, representando 5% do total de casos do CCR. A etiologia dos 15-25% restantes não é completamente entendida. Essas síndromes são causadas por mutações na linhagem

germinativa, e podem ser divididas em síndromes não poliposas e poliposas (MILLER et al., 2016; OBUCH; AHNEN, 2016).

Dentre as síndromes não poliposas destaca-se a de Lynch, que é a mais comum dentre todas associadas ao CCR. Indivíduos com essa síndrome têm predisposição a vários tipos de cânceres, especialmente colón (50-80%) e endométrio (40-60%) (JASPERSON et al., 2010). É causada por mutação na linhagem germinativa em pelo menos um dos genes de reparo de pareamento incorreto do DNA. Essa síndrome também é caracterizada pela presença de alta instabilidade de microssatélites, os genes *MLH1* e *MSH2* estão envolvidos em 90% dos casos, enquanto *MSH6* e *PMS2* em 10-20% dos mesmos. Embora a polipose seja rara, os indivíduos acometidos podem desenvolver adenomas colônicos com frequência muito superior ao restante da população (LICCARDO et al., 2017; RODRIGUEZ-SALAS et al., 2017).

A FAP é uma síndrome poliposa associada a uma mutação na linhagem germinativa no gene *APC* (do inglês *adenomatous poliposis coli*), o que induz a formação de pólipos intestinais. Na forma clássica o indivíduo pode desenvolver de centenas a milhares de adenomas colônicos. Já na forma atenuada, forma menos severa, esse número varia de dez a cem. Na forma clássica da doença, o desenvolvimento dos pólipos começa já na adolescência, e, caso não sejam tratados, o desenvolvimento de CCR se torna inevitável (JASPERSON et al., 2010).

Já a Síndrome Polipose Serrilhada (SPS, do inglês *serrated hyperplastic polyposis Syndrome*) é uma condição rara associada com numerosos pólipos hiperplásicos no intestino grosso. A anormalidade molecular dessa síndrome envolve hipermetilação das ilhas CpG, além de mutações em *BRAF* (do inglês *v-rafmurine sarcoma viral oncogene homolog B*) ou em *KRAS* (do inglês *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) e instabilidade cromossômica (KIM; KIM, 2018). Tais pólipos eram considerados benignos, porém vários trabalhos descrevem o pólipo displásico serrilhado como lesão precursora do carcinoma serrilhado. O adenocarcinoma serrilhado representa 15% a 30 % do total dos CCR, e é atualmente considerado como sendo resultado de uma via alternativa de progressão, que não evolui de acordo com o modelo clássico pela transição adenoma-carcinoma (KIM; KIM, 2018).

#### **1.4 Bases moleculares do câncer colorretal**

O CCR desenvolve-se na mucosa colônica normal por meio de mutações sucessivas e alterações genéticas em genes que regulam o crescimento e diferenciação celular. A progressão da doença a partir de uma célula glandular normal até a formação de um adenocarcinoma pode levar décadas (MUNDADE et al., 2014). O acúmulo de mutações em

genes específicos resulta na desregulação de vias de sinalização que controlam o comportamento maligno: como a proliferação celular, diferenciação, apoptose, imortalização, angiogênese e invasão (GRADY; MARKOWITZ, 2015).

Estudos moleculares identificaram anormalidades gênicas cruciais que predis põe ao CCR esporádico. Os três principais mecanismos moleculares são: instabilidade cromossômica (CIN, do inglês *Chromosomal Instability*), instabilidade de microssatélites (MSI, do inglês *Microsatellite Instability*) e metilação das ilhas CpGs (CIMP, do inglês *CpG Island Methylator Phenotype*). A maior parte dos casos de CCR esporádico (70%) é resultado de aberrações na via de CIN (MUNDADE et al., 2014).

Tumores com CIN exibem acúmulos de aberrações numéricas (aneuploidia) e/ou alterações estruturais dos cromossomos, com frequente perda de heterozigosidade em loci de genes supressores tumorais e rearranjos cromossômicos. Essa instabilidade genômica gerada favorece mutações gênicas (YAMAGISHI et al., 2016).

O modelo tradicional adenoma-carcinoma de desenvolvimento do CCR foi proposto por Fearon & Vogelstein em 1990. Esse modelo sugere que mutações sequenciais em proto-oncogenes e inativação de genes supressores de tumor culmina no CCR (FEARON; VOGELSTEIN, 1990). A maior parte dos CCR é composta de adenocarcinomas e seus subtipos histológicos incluem: medular, micropapilar, mucinoso, serrilhado e anel de sinete. As principais anormalidades genômicas observadas nos diferentes subtipos são nos genes de *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* (do inglês *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*), *APC*, *TP53* (do inglês *Tumor Protein p53*) e *SMAD4* (do inglês *SMAD family member 4*) (RASKOV et al., 2014; RODRIGUEZ-SALAS et al., 2017).

Em etapas iniciais o gene *APC* é inativado. A mutação em *APC* é tida como evento chave para a transformação maligna por favorecer a proliferação celular exacerbada. A principal função de *APC* é a regulação da via de sinalização de Wnt/ $\beta$ -catenina (YAMAGISHI et al., 2016). Uma vez mutada, *APC* aumenta a estabilização de  $\beta$ -catenina levando seu acúmulo no citoplasma. Níveis aumentados  $\beta$ -catenina citoplasmática favorecem sua translocação para o núcleo co-ativando os fatores de transcrição TCF/LEF (do inglês *T-cell factor/lymphoid enhancer factor family*) envolvidos na proliferação celular, evasão da apoptose e redução da diferenciação celular (MUNDADE et al., 2014).

O gene *KRAS* pertence à família dos oncogenes *RAS*. As mutações em *KRAS* são relativamente comuns e surgem em 30-50% dos casos de CCR. *KRAS* está envolvido na tumorigênese por desregular a sinalização por MEK (do inglês *Mitogen-activated protein kinase*) e ERK (do inglês *Extracellular signal-Regulated Kinase*), que é reguladora do controle de progressão do ciclo celular. Mutações podem prejudicar também a atividade

GTPase de KRAS, permitindo que esta se acumule na conformação ligada à GTP, levando a ativação constitutiva de vias *downstream* pró-proliferativas (MUNDADE et al., 2014).

Mutações somente em KRAS não são suficientes para levar a transformação maligna. Embora seja encontrada majoritariamente em lesões iniciais displásicas (95%), pode ser encontrada também em lesões tardias. Por outro lado, se torna importante a ordem de ocorrência em relação à mutação em APC. Se a mutação em KRAS ocorrer depois da mutação em APC, a lesão displásica frequentemente progredirá para lesão neoplásica (RASKOV et al., 2014).

A deleção do 18q resulta em mutações em SMAD4, membro da via de sinalização de TGFBI (do inglês *transforming growth factor-β*) mediando a homeostase tecidual e suprimindo a tumorigênese. A diminuição da expressão de SMAD4 é associada ao prognóstico ruim (MUNDADE et al., 2014). No entanto, vale ressaltar o papel dual da via de TGF-β durante a progressão tumoral. Durante eventos iniciais, essa via tem atividade supressora à proliferação celular, promovendo a apoptose. Em estágios tardios, elevados níveis de TGF-β favorecem a formação tumoral por facilitar a migração, invasão, angiogênese, evasão do sistema imune, além de sinalizações com células do microambiente tumoral (YANG; YANG, 2010).

O gene TP53 encontra-se geralmente mutado em CCR. Sua função está intimamente relacionada à manutenção da integridade genômica, pelo controle da progressão do ciclo celular e apoptose. A mutação de TP53 é um evento chave na tumorigênese, levando o tumor não invasivo para sua forma invasiva. Sua frequência relaciona-se com a extensão da doença; é encontrado mutado em 5% de adenomas, 50% de pólipos malignos, e 75% de CCR invasivos (MUNDADE et al., 2014; RASKOV et al., 2014).

Inicialmente acreditava-se que as mutações aconteciam sempre nessa ordem discutida acima (iniciando por APC, seguida por KRAS e outros oncogenes, e finalizada por TP53), conferindo vantagens seletivas e propiciando a progressão do CCR. Atualmente acredita-se que o carcinoma seja formado não necessariamente por mutações nessa ordem sequencial (DIENSTMANN et al., 2017).

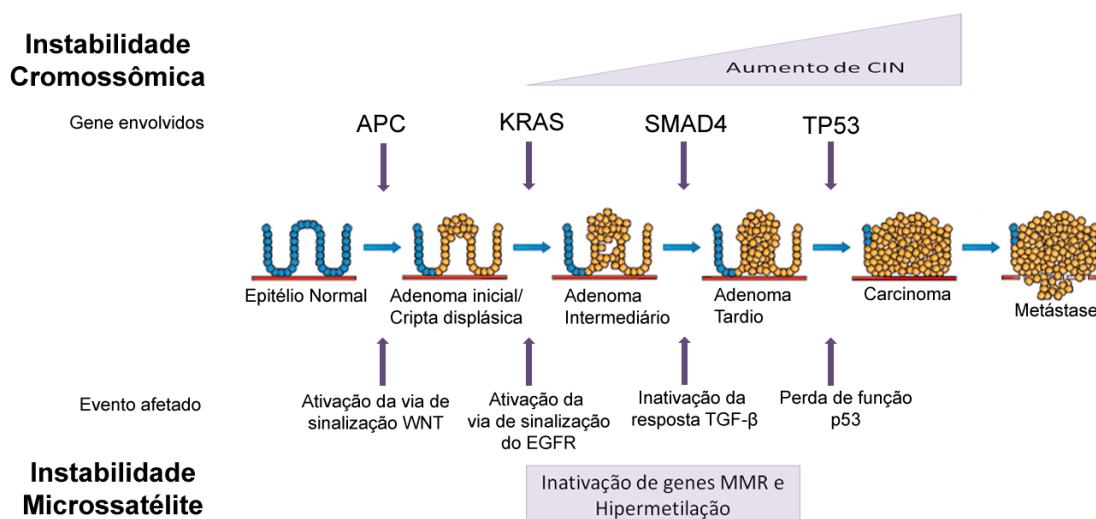
Outro mecanismo molecular envolvido no desenvolvimento do CCR é a MSI. Tal mecanismo envolve inativação de genes da via de reparo de pareamento incorreto do DNA (MMR, do inglês *DNA Mismatch Repair*), devido à metilação aberrante do DNA ou mutações somáticas. Dessa forma, as células com o MMR anormal não conseguem corrigir os erros gerados (inserções ou deleções) na sequência do DNA durante a replicação, principalmente em regiões de sequência de nucleotídeos com muitas repetições, como as regiões de microssatélite (WALTHER et al., 2009). Consequentemente, as células filhas herdam



mutações e instabilidade na região de microssatélites, favorecendo o estabelecimento do processo neoplásico. Os principais genes da via MMR que são mutados e sua frequência são: *MLH1* (49%), *MSH2* (38%), *MSH6* (9%), *PSM2* (2%), e *PMS1* (0.3%) (YAMAGISHI et al., 2016; RODRIGUEZ-SALAS et al., 2017).

A via de CIMP exhibe instabilidade epigenética caracterizada pela hipermetilação de sítios promotores que contêm ilhas CpGs, causando inapropriado silenciamento da expressão gênica (YAMAGISHI et al., 2016). Tumores com CIMP geralmente apresentam alta instabilidade de microssatélites, devido à metilação do promotor do gene *MLH1*. Além disso, apresentam também mutações em *BRAF* (MOJARAD et al., 2013).

A Fig.1.2 ilustra de forma resumida a sequência adenoma-carcinoma e os outros mecanismos moleculares envolvidos na progressão do CCR.



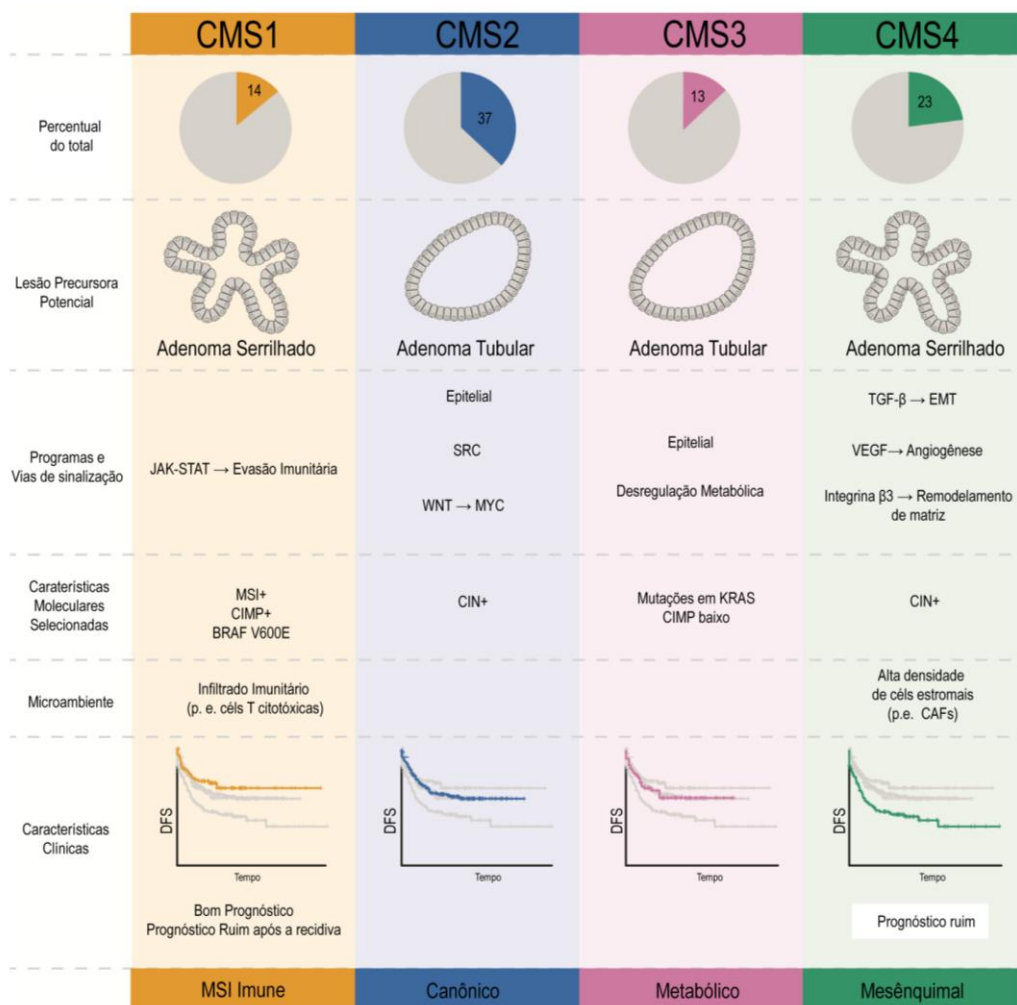
**Figura 1.2 - Modelo da sequência adenoma-carcinoma para CCR.** Este modelo representa simplificada as alterações clínico-patológicas e anormalidade genéticas encontradas durante o CCR. Adaptada de WALTHER et al, 2009 e RASKOV et al, 2014.

#### 1.4.1 Novos subtipos moleculares do câncer colorretal

Considerando a alta heterogeneidade do CCR as pesquisas têm buscando integrar dados de expressão gênica com dados biológicos do tumor, com o intuito de estratificar os pacientes para futuramente melhorar a resposta às terapias. A base molecular do CCR é intimamente ligada ao fenótipo celular e, ao longo dos anos, pesquisadores buscam encontrar subtipos biológicos homogêneos da doença (DIENSTMANN et al., 2017). Recentemente, um consórcio internacional integrou dados provenientes de diferentes análises em larga escala realizadas em um grande número de amostras (n= 3.325) para identificar subtipos moleculares do CCR. Esse trabalho resultou na identificação de quatro subtipos com características

gênicas, fenotípicas, e sobrevidas bem definidos (GUINNEY et al., 2015), os quais foram denominados CMS (do inglês *consensus molecular subtype*). O grupo CMS1 (ou MSI-imune) exibe infiltrado imunitário (principalmente composto por TH1 citotóxicas), com forte ativação de vias de evasão imunitária e são frequentemente associados com MSI, CIMP, além da mutação BRAFV600E. Esse grupo foi o que apresentou pior sobrevida após a recidiva, fato que talvez seja explicado pelo MSI e mutações BRAF. O grupo CMS2 (ou canônico), é caracterizado por uma assinatura de expressão gênica do tipo epitelial. Este grupo é tido como o que representa o CCR do tipo clássico, exibindo altos níveis de CIN, forte hiper-regulação da via de WNT e de vias *downstream* como MYC. Esse foi o grupo que apresentou maiores taxas de sobrevida após a recidiva em relação aos outros subtipos. O CMS3 (ou metabólico) apresenta forte componente epitelial e com desregulação em vias que controlam o metabolismo. Tais tumores exibem mutações em *KRAS*, corroborando a reprogramação metabólica exibida incluindo ativação glutaminólises e lipidogênese, além de geralmente terem CIMP baixo, e estabilidade microssatélite. Já o subtipo CMS4 (ou mesenquimal) exibe uma grande quantidade de células estromais infiltradas, hiper-regulação de genes da via de transição epitélio-mesenquimal (TEM), e assinaturas associadas com ativação de TGF- $\beta$ , angiogênese, remodelamento de matriz extracelular, e ativação de vias do complemento associadas à inflamação. Apresenta baixos níveis de hipermetilação, e estabilidade de microssatélites. O subtipo mesenquimal é o que apresenta as piores taxas de sobrevida global e sobrevida livre de doença (GUINNEY et al., 2015; FESSLER et al., 2016; DIENSTMANN et al., 2017). Assim, alguns grupos atualmente buscam identificar esses pacientes CMS4 em estádios iniciais (por imunohistoquímica ou análise de microRNAs), com a finalidade intervir e evitar o desfecho ruim (DUNNE et al., 2016; FESSLER et al., 2016; TRINH et al., 2017). A figura 1.3 ilustra as diferentes características dos quatro subtipos aqui discutidos.

No entanto, deve-se ter cautela na abordagem e uso desses subtipos moleculares, já que 13% de todas as amostras do CCR não puderam ser classificadas nestes 4 subtipos, e representam amostras indeterminadas ou mescladas (GUINNEY et al., 2015). Além disso, pode ter ocorrido representatividade inadequada da amostragem das peças tumorais analisadas, uma vez que foi utilizada somente uma pequena amostra do tecido tumoral, e sabendo que dada a comum a heterogeneidade intratumoral há possibilidade de dentro de um subtipo ter os outros 3 perfis mesclados em distintas regiões. De qualquer maneira vale destacar que um dos subtipos mais agressivos do CCR está relacionado com vias de sinalização que controlam a TEM.



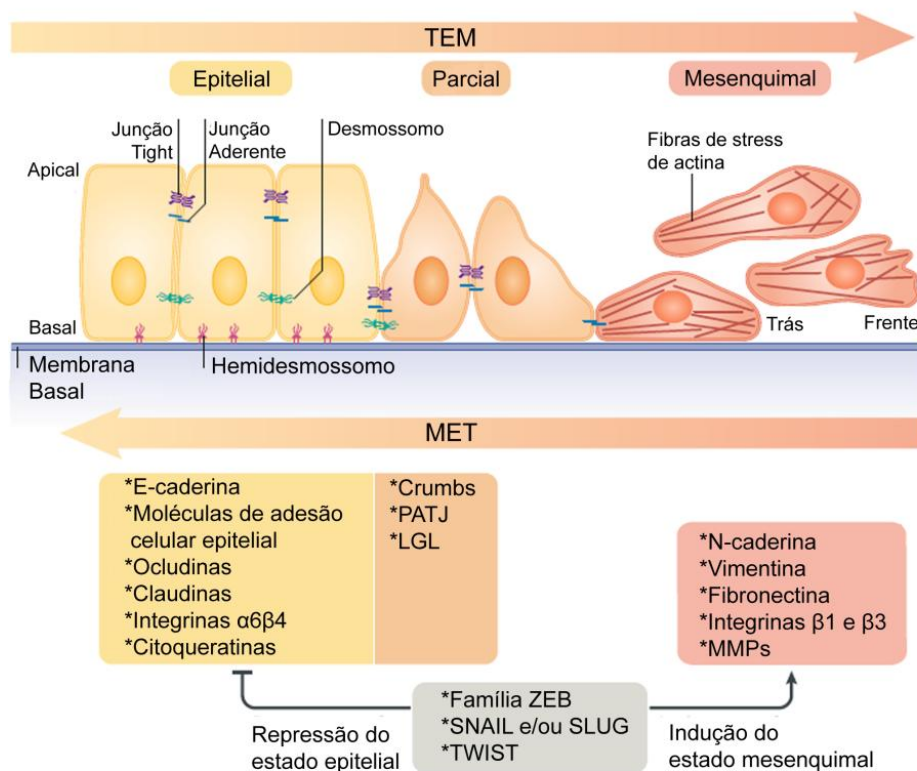
**Figura 1.3 - Subtipos moleculares do CCR.** A figura ilustra os diferentes subtipos moleculares do CCR considerando as características biológicas e clínicas. Enquanto a perda de APC resulta em adenomas tubulares, observado em CMS2 e CMS3, relativamente com bom prognóstico, a ativação do oncogene BRAF desencadeia a formação de adenomas serrilhados com alto potencial para ser de prognóstico ruim. Programas de vias de sinalização ativas em cada subtipo também são exibidos. Adaptado de FESSLER, MEDEMA 2016.

### 1.5 Transição epitélio-mesenquimal –TEM

A TEM foi descrita inicialmente em células de diferenciação normais durante o desenvolvimento embrionário. Atualmente, sabe-se que este evento também acontece durante a cicatrização tecidual, fibrose e durante a carcinogênese. A TEM é um programa celular reversível, onde as células podem transitar de modo dinâmico entre estados epiteliais, mesenquimais e intermediários (DONGRE; WEINBERG, 2018). As células neoplásicas malignas em TEM se reprogramam e modificam os níveis de proteínas estruturais envolvidas na adesão célula-célula que estão presentes tanto nas junções *tight* (como as claudinas e ocludinas) quanto nas junções aderentes (p. ex., E-caderina). Além disso, passam a sintetizar proteínas relacionadas ao fenótipo mesenquimal (como a vimentina, N-caderina,  $\alpha$ -SMA e fibronectina), levando assim a alterações na polaridade apical-basal, o que favorece o

comportamento migratório e invasivo e por fim metastático (YE; WEINBERG, 2015; YEUNG; YANG, 2017). Adicionalmente, acredita-se ainda que a TEM possa conferir às células do carcinoma resistência a apoptose, a tratamentos com quimioterápicos e a radioterapia. É importante ressaltar que também tem sido relatada a associação entre TEM e a aquisição de características relacionadas às células tronco (MANI et al., 2008; DONGRE; WEINBERG, 2018).

A TEM é considerada por muitos autores como um regulador central da progressão maligna de tumores epiteliais. Uma das características geralmente observadas em tumores é a diminuição dos níveis de E-caderina, proteína fundamental para a adesão celular (DONGRE; WEINBERG, 2018). Tanto a diminuição de expressão quanto sua localização aberrante pode afetar significativamente sua função. A TEM é modulada em diferentes níveis; por modificações epigenéticas (modificações em histonas e metilação), controle transcricional, *splicing* alternativo, estabilidade proteica, e localização subcelular. No grupo dos fatores transcricionais reguladores da TEM, destacam-se SNAIL1, SNAIL2, ZEB1, ZEB1, e TWIST1, responsáveis pela inibição da transcrição de centenas de genes epiteliais e transcrição de genes mesenquimais. Sabe-se que esses fatores de transcrição regulam a expressão um dos outros em diferentes combinações (DONGRE; WEINBERG, 2018). Porém, seus transcritos ainda podem ser processados por micro-RNAs (miRNA), sendo também considerados reguladores chaves da TEM (YE; WEINBERG, 2015; YEUNG; YANG, 2017). Esse programa também pode ser reprimido pela família do miR-200, inibindo a ligação de fatores de transcrição ao DNA, e inibindo o programa de TEM. As células tumorais podem regular a expressão de miRNA de modo dinâmico; células da borda tumoral invasiva diminuem a expressão de miR-200, permitindo que tais células sofram TEM e deixem o sítio primário. No sítio secundário metastático o processo é revertido, levando novamente à aquisição do fenótipo epitelial, em um processo conhecido como transição mesenquimal epitelial (MET - do inglês *mesenchymal-epithelial transition*) (YEUNG; YANG, 2017). A figura 1.4 ilustra esquematicamente as principais características envolvidas na TEM e na MET, demonstrando a mudança do fenótipo epitelial para mesenquimal assim como a desmontagem das junções aderentes e *Tight*.



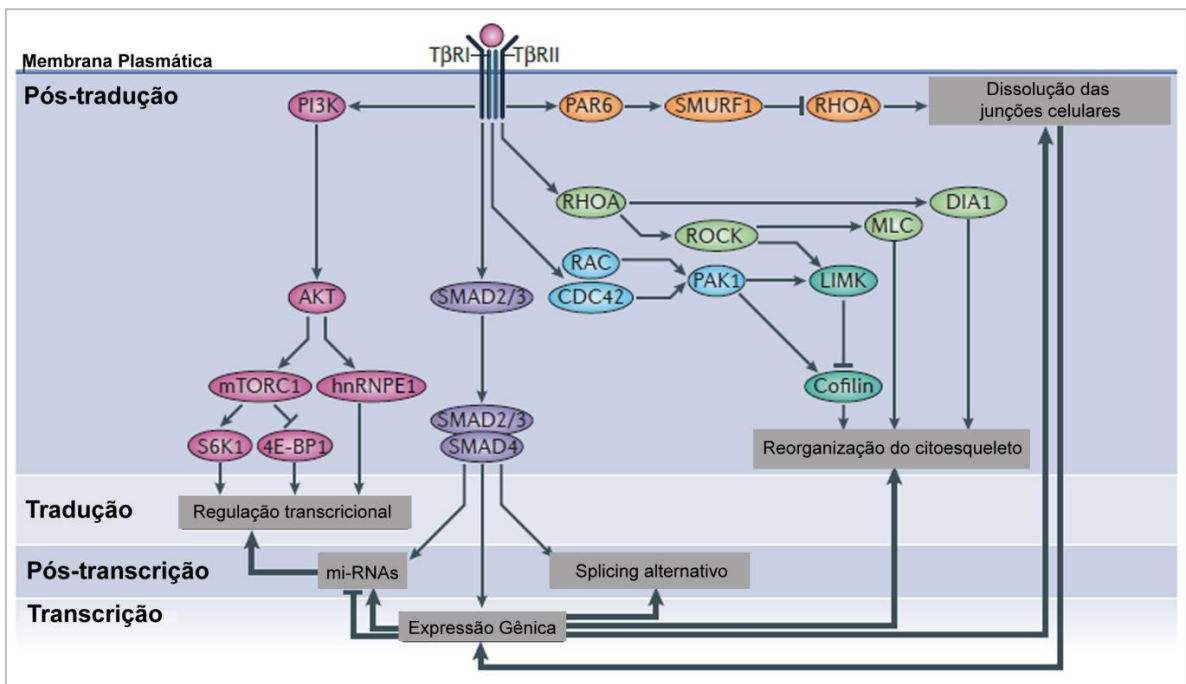
**Figura 1.4- Representação esquemática da TEM e MET.** A TEM é um evento celular plástico, variando entre os estados epiteliais, parciais ou mistos e mesenquimais. Fatores de transcrição, como o ZEB, SNAIL, SLUG e TWIST regulam a repressão do estado epitelial onde proteínas das junções aderentes e tight são reprimidas e genes que regulam a codificação de proteínas mesenquimais são estimulados. As junções celulares são desmontadas, e os complexos que regulam a polaridade celular - Crumbs, PATJ e LGL - são reprimidos. A polaridade ápico-basal é perdida e a célula se polariza da forma ântero-posterior. As células se tornam mais migratórias e invasivas. A TEM é um processo reversível, e o estado mesenquimal pode se reverter para o epitelial, chamado de transição mesenquimal-epitelial (MET). Adaptada de DONGRE; WEINBERG, 2018.

Curiosamente, um estudo recente verificou que a principal rede regulatória do subtipo mesenquimal (CMS4) do CCR consiste na família do miR-200. A repressão de miR-200 por meio de metilação de sua região promotora, os torna os principais genes diferencialmente expressos durante a TEM. De acordo com os autores, tal abordagem possivelmente permite identificar pacientes do subtipo mesenquimal – considerado o de pior prognóstico – em estágios iniciais (estágio II) do tumor (identificando níveis de metilação de miR-200) (FESSLER et al., 2016).

As células que compõem o microambiente tumoral incluindo fibroblastos associados ao câncer CAFs (do inglês *cancer-associated fibroblasts*), macrófagos, linfócitos T entre outras células, podem secretar uma série de citocinas e interleucinas, estimulando as células do carcinoma de modo parácrino ou por contato promovendo a progressão tumoral e metástases (DONGRE; WEINBERG, 2018). Vários estímulos desencadeiam a TEM desde fatores solúveis como EGF (do inglês *epidermal growth factor*), HGF (do inglês *hepatocyte*

*growth factor*), e FGF (do inglês *fibroblast growth factor*), bem como vias de sinalizações (p. ex., via de Wnt/ $\beta$ -catenina e a via de Notch). A via de sinalização do TGF- $\beta$  é uma das vias principais na indução da TEM, e, como dito anteriormente, exibe papel dual durante a progressão tumoral. A via canônica da sinalização de TGF- $\beta$  se inicia quando o TGF- $\beta$  se liga ao TGF $\beta$ RI e II, ativando-os, subsequentemente proteínas SMAD2 e SMAD3 associam-se a TGF $\beta$ RI e são fosforiladas. Uma vez fosforiladas, SMAD2 e 3 formam um complexo com SMAD4 e translocam para o núcleo, regulando a ativação ou repressão gênica de genes alvos, por meio de interação com coativadores transcricionais e/ou co-repressores transcricionais (O'CONNOR; GOMEZ, 2014). Assim, durante a TEM SMAD3 e SMAD4 formam um complexo com fatores transcricionais como o SNAIL, inibindo a transcrição de genes epiteliais tais como E-caderina e ocludina. A via de TGF- $\beta$  também estimula a expressão de ZEB 1 e TWIST, todos envolvidos no silenciamento epigenético do promotor da E-caderina, por meio de hipermetilação e desacetilação de histonas. Por fim, as proteínas SMADS podem estimular diretamente a transcrição de genes mesenquimais como fibronectina, vimentina e N-caderina, consideradas primordiais para a migração celular (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014).

Outras vias, ditas não canônicas, podem ser estimuladas pelo receptor de TGF- $\beta$ . As vias de sinalização de Rho-GTPases, PI3K e MAPK contribuem também para o desenvolvimento da TEM. Ativação de Rho, Rac e Cdc42 estimulam a reorganização do citoesqueleto de actina para a formação de estruturas membranares, tais como lamelipódios e filopódios, além do estímulo para a mudança de polaridade da célula, formação de fibras de stress e regulação da expressão de proteínas contráteis. Em estágios iniciais, PAR6 é fosforilado pelo T $\beta$ RII recrutando SMURF1 (do inglês *E3 ubiquitin ligase SMAD ubiquitylation regulatory factor 1*), mediando a ubiquitinação e degradação local de RhoA, levando a degradação e dissolução das junções celulares. Porém, a via de TGF- $\beta$  estimula a expressão de GEFs (do inglês *guanine nucleotide exchange factors*), estimulando parcialmente a ativação de RhoA, e seus alvos a jusante como ROCK, LIMKs e cofilina-1. Assim, o citoesqueleto cortical é reorganizado permitindo o alongamento dinâmico e motilidade direcional. Projeções membranares ricas em actina são formadas para facilitar o movimento e direcionar, por meio de extensões sensoriais do citoesqueleto, o sentido do movimento. Além disso, estruturas ricas em actina capazes de degradar a MEC (pela liberação de metaloproteases) são formadas facilitando a invasão celular e degradação da membrana basal (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014). A via de TGF- $\beta$  pode ser observada na figura 1.5.



**Figura 1.5 - Mecanismo molecular de indução a TEM pela via de sinalização TGF- $\beta$ .** A iniciação e a progressão da TEM são reguladas nos níveis de transcrição, pós-transcrição, tradução e pós-tradução. O TGF- $\beta$  induz a TEM atuando em vários destes níveis e através da sinalização mediada por SMAD e pela via não canônica. A via de SMAD atua modificando a expressão gênica e também no *splicing* alternativo de proteínas epiteliais e mesenquimais, assim como regulando a expressão de mi-RNAs. A via não canônica de PI3K/AKT regula a atividade transcricional de muitas proteínas envolvidas na TEM. Já a via de Rho-GTPases atua na regulação do citoesqueleto de actina e na dissolução das junções celulares. Adaptada de LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014.

Muitos estudos têm demonstrado a importância da TEM para a disseminação inicial de células tumorais, sendo considerado um evento chave para a invasão e metástase, relacionando-se assim com maior agressividade e progressão tumoral (RHIM et al., 2012; HARPER et al., 2018). A expressão de SLUG em amostras de tecido é considerada marcador de pior prognóstico em pacientes com CCR (SHIOIRI et al., 2006). Além disso, a perda de E-caderina, e da  $\beta$ -catenina membranar é associada com agressividade tumoral em amostras de tecidos de pacientes com CCR (KEVANS et al., 2011; HORCIC et al., 2013). A análise da borda invasiva do tumor primário pode proporcionar um alerta e ser um fator prognóstico importante e promissor em relação ao crescimento do tumor. Essa análise em pacientes com CCR foi significativamente associada com alto grau do tumor, borda infiltrativa tumoral, invasão vascular, invasão perineural, todos esses fatores associados com pior prognóstico (OHTSUKI et al., 2008).

Como visto, é possível que os sistemas celulares mais afetados no início da TEM sejam o complexo juncional apical (terminologia utilizada para designar conjuntamente junções tight e aderentes) e, particularmente, o citoesqueleto de actina, o qual associado com suas proteínas reguladoras contribui para migração e invasão celular, sendo, portanto considerado como alvo promissor no controle inicial da doença.

## 1.6 Adesões celulares e citoesqueleto de actina

### 1.6.1 Adesões celulares

Epitélios exercem a função primária de barreira, uma vez que separam órgãos e tecidos do ambiente externo. No caso do intestino, o epitélio separa o conteúdo luminal do restante do interstício subjacente (SMITH; VELLANKI; HOPKINS, 2016; SLUYSMANS et al., 2017). As células epiteliais se organizam formando junções intercelulares ancoradas pelo citoesqueleto de actina que as mantêm as firmemente aderidas entre si. Os contatos célula a célula formam domínios com gradiente de concentração de componentes celulares distintos na superfície basal, lateral e apical do epitélio, desse modo exercendo funções distintas. O principal sistema de adesão que regula a integridade da barreira intestinal é o complexo junctional apical (CJA), constituído pelas junções *tight* (JT) e junções aderentes (JA), responsáveis pela manutenção da polaridade ápico-basal (GEHREN et al., 2015; ZIHNI; TERRY, 2015). As JT são formadas pelas proteínas transmembranares claudinas e ocludinas que se ligam citoplasmaticamente às proteínas ZO (ZO, do inglês *zonula occludens*). Já as JA são formadas pela glicoproteína E-caderina ligada a sua porção citoplasmática às proteínas cateninas, e estas por sua vez se conectam ao citoesqueleto de actina (DANJO; GIPSON, 1998). Na figura 1.6 é possível observar como é montado o CJA, e como cada complexo é ancorado na membrana plasmática.

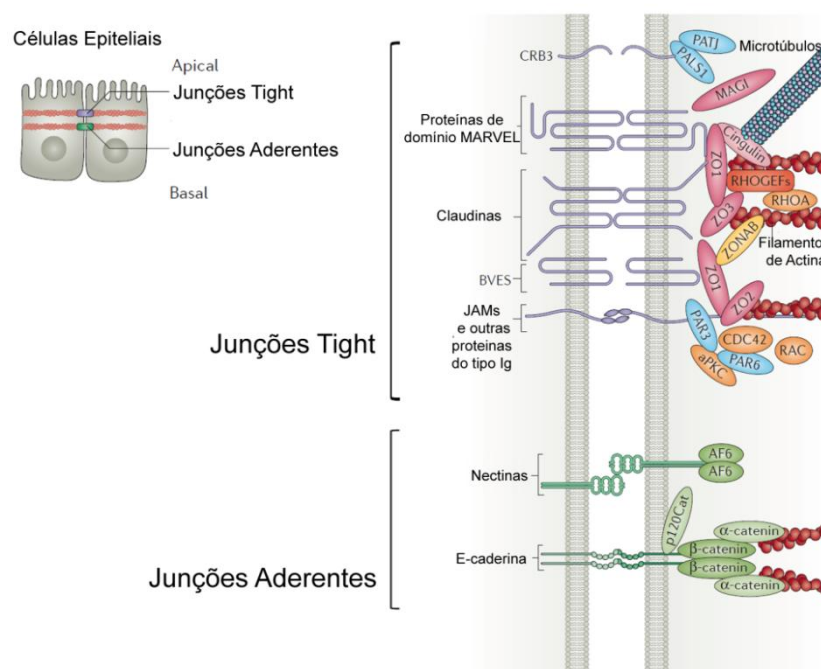
No contexto da tumorigênese as adesões celulares, principalmente as mediadas pela E-caderina exercem um papel de supressor tumoral uma vez que impedem que as células se destaquem uma das outras, e por inibir vias de sinalização que favorecem a ruptura dos contatos celulares e da polaridade ápico-basal, o que estimularia a migração e invasão de células tumorais (COOPMAN; DJIANE, 2016). Assim, a redução da expressão de E-caderina em tumores é uma das características da carcinogênese. Sua expressão ou função geralmente encontra-se diminuída ou ausente em tumores que estão ou não em TEM devido à: mutações no gene *CDH1* (codifica proteína E-caderina), hipermetilação de seu promotor, hiperativação de repressores transcricionais como, SNAIL, SLUG e TWIST e, por modificações pós-transcricionais (p. ex. glicosilação aberrante) entre outros (SERRANO-GOMEZ; MAZIVEYI; ALAHARI, 2016).

Digno de nota, alguns tumores mantém a expressão de E-caderina e junções celulares bem estabelecidas. Alguns, mesmo com expressão de E-caderina, são considerados tumores de alto grau de malignidade e agressividade, possivelmente por exibirem migração celular do tipo coletiva. Nesse tipo de migração, os contatos celulares não são rompidos e as células tumorais migram aos grumos, ligadas umas as outras. A migração coletiva depende de uma



série de fatores, desde tipo celular, estado de ativação de receptores tirosina-quinase, ao tipo de dinamicidade ou estabilidade dos contatos celulares. Assim, esse tipo de migração ocorre com mais frequência em tumores como o de mama, endometrial, colorretal, e o melanoma (VAN ZIJL; KRUPITZA; MIKULITS, 2011; FRIEDL; MAYOR, 2017).

Em adição, a expressão das claudinas (família composta por 27 membros) encontra-se alteradas em células neoplásicas malignas. As principais alteradas são as claudinas-1, -3, -4 e -7 tanto em nível transcricional como pós-transcricional. A claudina-3, por exemplo, apresenta altos níveis de expressão em vários tumores como o de pulmão, de esôfago, estômago, cólon, rim, próstata; por outro lado, níveis baixos no carcinoma de mama, ovário e pâncreas (DE OLIVEIRA et al., 2005; SALVADOR; BUREK; FÖRSTER, 2016; OSANAI et al., 2017). Portanto, tanto o aumento/diminuição de expressão, como a desregulação em sua localização são observadas em células tumorais.



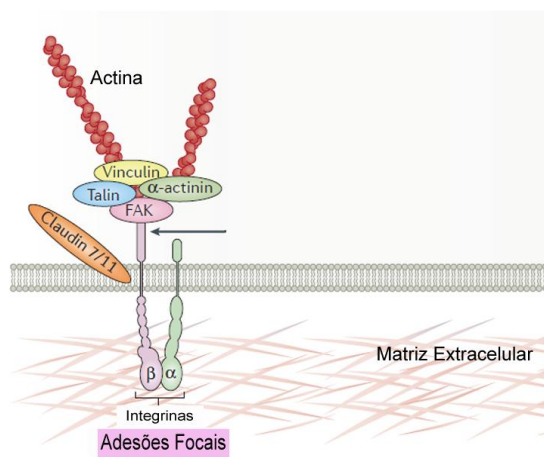
**Figura 1.6 - Esquema da estrutura molecular do Complexo Juncional Apical (CJA).** Este complexo é formado pelas Junções *Tight* (TJ), localizada na parte apical de células epiteliais, e pelas Junções Aderentes (AJ) subjacentes das primeiras. Proteínas transmembranais são representadas por fios roxos, incluem CRB3, proteínas de domínio MARVEL como a ocludina e tricelulina; claudinas, BVES, moléculas de adesão juncional JAMs. Proteínas adaptadoras e ligadoras ao citoesqueleto de actina estão representadas em estruturas ovais rosa, proteínas relacionadas à polaridade estão representadas em estruturas ovais azuis, incluem nesse grupo as proteínas ZO, cingulina, MAGI, PAR3, PAR6, PALS1, e PATJ. Componentes sinalizadores envolvidos com as TJ estão representados estruturas ovais laranja, incluem a PKC, Rho-GTPases RhoA, Cdc42, e Rac1 e seus reguladores, Rho-GTPases (RHOGEFS, retângulo vermelho). A interação entre ZO1 e seu regulador transcricional ZONAB é mostrada em amarelo. As nectinas estão representadas em verde e se ligam à suas parceiras afadinas. A E-caderina está representada de verde e interage com as cateninas que por sua vez se ligam ao citoesqueleto de actina. CRB3 - do inglês *protein crumbs homologue 3*, BVES - do inglês *blood vessel epicardial substance*, JAMs - do inglês *junctional adhesion molecules*, MAGI - do inglês *membrane-associated guanylate kinase inverted*, PAR3 - do inglês *partitioning defective*, PATJ - do inglês *PALS1-associated tight junction*, PKC - do inglês *atypical protein kinase C* e ZONAB - do inglês *transcriptional regulator*. Adaptado de ZIHNI et al, 2015.

Para que alguns tecidos estejam em homeostase, é necessário que as células interajam com a matriz extracelular (MEC). A comunicação entre as células e a MEC é mediada por receptores transmembranais focais incluindo: *sindecans*, receptores com domínio DDR (do inglês *discoidin domain receptors*), CD44 e integrinas. Dentre esses, os mais bem caracterizados são as integrinas, que são também proteínas constituintes das adesões focais (SMITH; VELLANKI; HOPKINS, 2016). As integrinas são receptores heterodiméricos transmembranais compostos por subunidade  $\alpha$  e  $\beta$ . Há mais de 24 tipos e as combinações entre as diferentes isoformas geram receptores específicos que medeiam a ligação da MEC com seu domínio extracelular. Já seu domínio citoplasmático interage com proteínas adaptadoras do citoesqueleto de actina (SMITH; VELLANKI; HOPKINS, 2016; LÓPEZ-COLOMÉ et al., 2017).

As integrinas na membrana plasmática podem tanto gerar sinais para dentro da célula que geram mudanças no meio extracelular ("*inside-out*" *signaling*), como por exemplo ativação de sinalização que resulta no aumento da deposição de colágeno na MEC, quanto ativar por meio de interação com componentes extracelulares, como os da MEC, vias que serão sentidas no meio intracelular ("*outside-in*" *signaling*), como por exemplo a ligação fibronectina-integrinas regulando a sinalização de RhoA. A via de sinalização intracelular desencadeada por integrinas é mediada por diferentes proteínas incluindo quinase de adesão focal (FAK, do inglês *focal adhesion kinase*), MAPK, paxilina, vinculina, talina, e membros da família Rho-GTPases. Ligantes extracelulares incluem o colágeno e a laminina por exemplo. As integrinas participam em muitos eventos celulares, como migração, proliferação, sobrevivência celular, e diferenciação (SMITH; VELLANKI; HOPKINS, 2016; BAYS; DEMALI, 2017).

Outra proteína constituinte das nas adesões focais é a vinculina. Ela apresenta uma cauda citoplasmática, capaz de se ligar ao citoesqueleto de actina nas junções intercelulares (SMITH; VELLANKI; HOPKINS, 2016). Como não possui atividade enzimática ela regula a adesão pela ligação à actina, estimulando a polimerização da actina e recrutamento de outras proteínas. Vinculina está envolvida em muitas etapas da migração celular, podendo interagir com o complexo Arp2/3 (do inglês *actin-related protein 2/3*) em adesões focais nascentes na parte frontal da célula (conhecida como *leadgin edge*), promovendo protrusões de membrana. Pode participar também na geração de força de tração, ligando as integrinas ao citoesqueleto de actina, o que garante suporte às forças geradas durante a motilidade. E por fim, pode interagir com PIP2 (do inglês *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*), o que leva uma mudança em sua conformação, reduzindo sua interação com a actina, e promovendo a desmontagem das adesões focais (BAYS; DEMALI, 2017).

Uma das características principais das células transformadas é a habilidade de sobreviver e proliferar na ausência de contato com a MEC, evento esse intimamente relacionado com as adesões focais. Durante a migração celular, que envolve a polarização da célula e extensões das protrusões membranares, é necessário que novas adesões focais sejam formadas na borda migratória, e que as adesões focais velhas sejam recicladas na parte posterior da célula. Evento esse, estritamente controlado por diferentes vias de sinalização intracelulares dependentes do citoesqueleto de actina. A figura 1.7 representa de modo simplificado como uma adesão focal se dispõe na membrana plasmática.



**Figura 1.7 - Modelo esquemático das Adesões Focais.** As adesões focais são formadas por complexo proteico formado por proteínas como a vinculina,  $\alpha$ -actinina, talina, FAK, conectadas ao citoesqueleto de actina e as integrinas  $\alpha$  e  $\beta$ , e adicionalmente sugere-se participação das claudinas 7 e 11. Adaptada de ZIHNI et al, 2015.

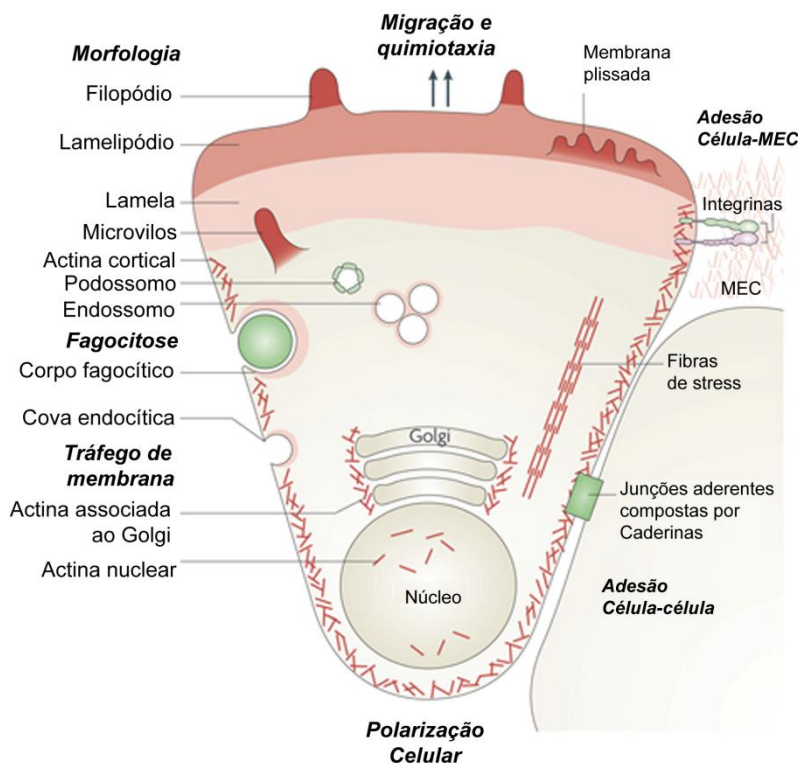
Os complexos de adesão, JT, JA e adesões focais estão intimamente relacionados com o citoesqueleto de actina, várias proteínas presentes nesses complexos são ancoradas e reguladas espacialmente pelo citoesqueleto de actina. A dinâmica dessas estruturas é estritamente controlada, pois são importantes para a homeostase, morfogênese e para o movimento celular.

### 1.6.2 O Citoesqueleto de actina

As células tumorais, como toda célula eucariota, possuem grande capacidade de organização interna, formando assim várias estruturas subcelulares que exercem funções distintas. O citoplasma dessas células é organizado por uma rede de três tipos de proteínas filamentosas conhecidas como citoesqueleto, responsáveis pela organização espacial e com propriedades mecânicas. Esta rede contém os seguintes tipos de filamentos: os microtúbulos, os filamentos intermediários e os filamentos de actina. O citoesqueleto é responsável pela forma celular, suporte mecânico, morfogênese, motilidade, contração, adesão célula-célula, endocitose, e transporte intracelular (OLSON; NORDHEIM, 2010; HUBER et al., 2015). Pelo contexto do presente trabalho, aqui abordaremos apenas os filamentos de actina, os quais são amplamente modificados durante a TEM e o câncer.

Os filamentos de actina, conhecidos também como microfilamentos, são os mais abundantes nas células eucariotas. São os mais finos (menor diâmetro - entre 6 e 8nm) e flexíveis entre os componentes do citoesqueleto (POLLARD; COOPER, 2009). A actina é a principal proteína dos microfilamentos, e é por meio da associação de seus monômeros (actina globular- G-actina) que os filamentos são formados (actina filamentosa - F-actina). O processo de formação destes filamentos é um evento dinâmico conhecido como polimerização

da actina. Ambas as extremidades do filamento podem ganhar ou perder monômeros, a extremidade "mais" do filamento é o local que geralmente é adicionado os monômeros, e a extremidade "menos" o local que é retirado os monômeros (conhecido como despolimerização). Após a incorporação de sucessivos monômeros de actina ligados a ATP na extremidade em crescimento do filamento (*free barbed end*), os filamentos de actina nas suas isoformas  $\alpha$ -actina e  $\beta$ -actina são formados (BLANCHOIN et al., 2014). A figura 1.8 ilustra a distribuição e organização do citoesqueleto de actina no contexto celular.

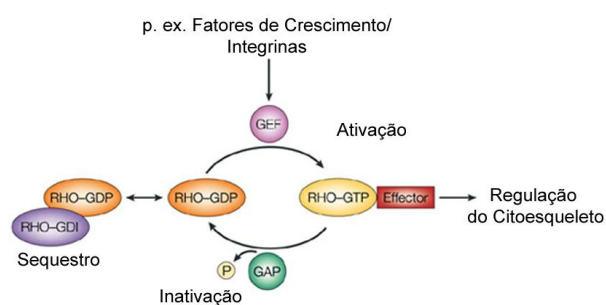


**Figura 1.8 - Citoesqueleto de actina e suas funções celulares.** As diversas estruturas de actina estão representadas de vermelho. As atividades celulares que podem ser reguladas pela actina estão destacadas em negrito. MEC, matriz extracelular. Adaptada de OLSON; NORDHEIM, 2010.

Nesse contexto, sabe-se que durante a progressão tumoral algumas células adquirem vantagens adaptativas que lhes conferem aumento na capacidade migratória, invasiva e por fim metastática. O citoesqueleto de actina orchestra o movimento celular. Portanto, compreender como o citoesqueleto se envolve nesses eventos se tornou alvo de muitos estudos, no intuito de descobrir novos alvos terapêuticos que bloqueiam a doença metastática (FIFE; MCCARROLL; KAVALLARIS, 2014). A organização e dinâmica do citoesqueleto de actina se dão pelas vias de sinalização da família Rho-GTPases (do inglês *small G proteins Ras-like GTPases*).

## Rho-GTPases

As Rho-GTPases são proteínas monoméricas de baixo peso molecular (21 kDa) pertencentes à família das pequenas GTPases que incluem as famílias: RAS, RAN, RAB, ARF, RHEB e Rho (RIDLEY; HALL, 1992; HALL, 1998). Mamíferos expressam 22 Rho-GTPases, incluindo as três isoformas de Rho (A, B e C), três isoformas de Rac (1, 2 e 3), e Cdc42. Ao longo de anos, muitos estudos têm demonstrado tais proteínas como essenciais para a homeostase celular, tanto em condição normal como associado a doenças (LEVE; MORGADO-DÍAZ, 2012). As principais e talvez mais bem caracterizadas funcionalmente sejam as proteínas: RhoA (do inglês *Ras homolog gene family*), Rac1 (do inglês *Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1 (Rho Family, Small GTP Binding Protein Rac1)*) e Cdc 42 (do inglês *Cell Division Cycle 42*). Essas proteínas ciclam entre a forma inativa (ligada a guanosina difosfato, GDP) e a forma ativa (ligada a guanosina trifosfato, GTP), funcionando como "interruptores celulares" em cascatas de sinalização intracelulares (SIT; MANSER, 2011). As atividades biológicas das proteínas Rho, são controladas por três famílias de proteínas reguladoras: as GEFs (do inglês *guanine-nucleotide exchange factors*), GAPs (do inglês *GTPase-activating proteins*) e as GDIs (do inglês *guanine-nucleotide dissociation inhibitors*). As proteínas GEFs catalisam a troca de GDP para GTP, assim ativam as Rho-GTPases translocando-as para a membrana, enquanto as GAPs catalisam a retirada do fosfato do GTP, inibindo a atividade das Rho-GTPases, porém quando se encontram ligadas a GDI são sequestradas para o citoplasma (UNGEFROREN; WITTE; LEHNERT, 2018). A figura 1.9 exemplifica o ciclo da ativação das proteínas da família Rho.

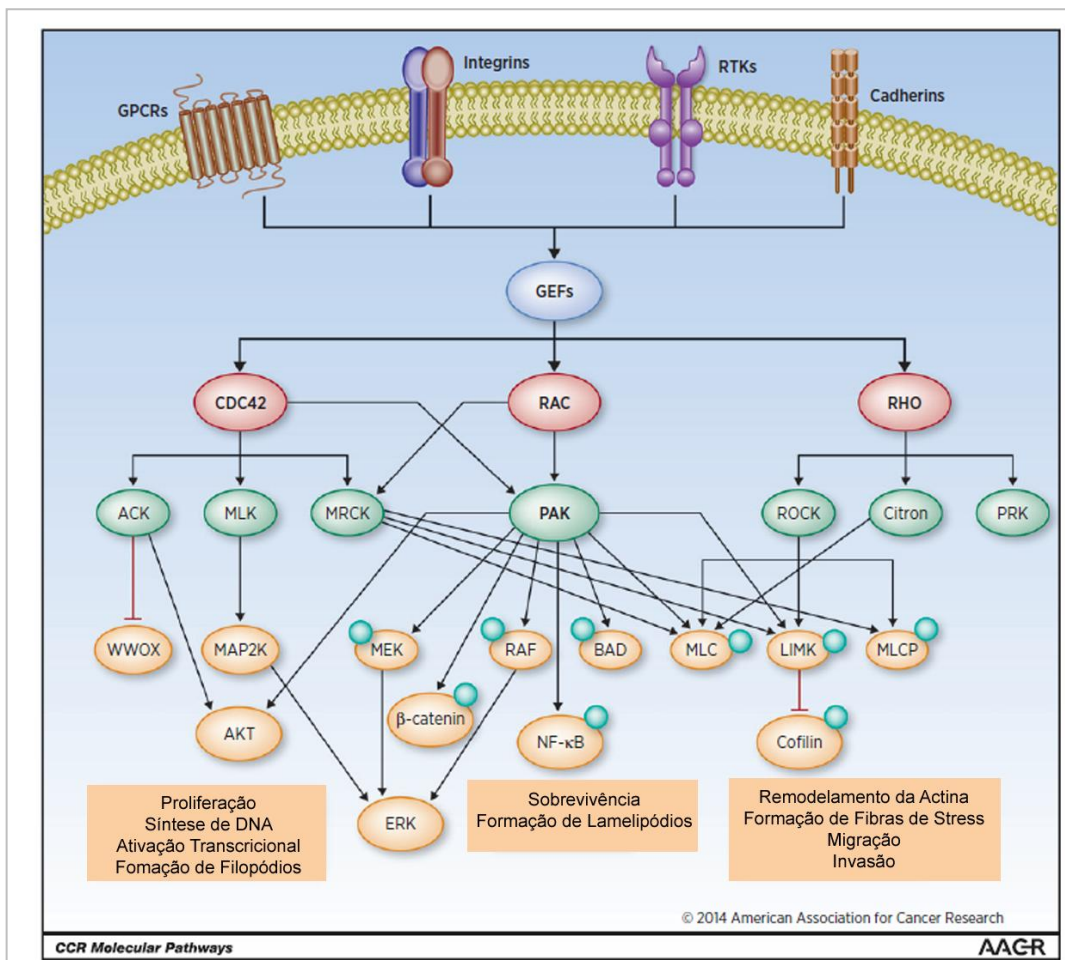


**Figura 1.9 - Regulação das proteínas Rho-GTPases.** As proteínas GEFs catalisam a troca de GDP para GTP, ativando Rho-GTPases. A retirada do fosfato do GTP é catalisada pela proteína GAP, o que leva à inibição da atividade das Rho-GTPases, já as GDI sequestram Rho para o citoplasma, inibindo sua atividade. Adaptada de SAHAI; MARSHALL 2002.

Vários estímulos externos podem ativar receptores de membrana (como receptores tirosina quinases e acoplados à proteína G) desencadeando vias de sinalização que ativam as proteínas Rho. Estas podem ativar outras proteínas *downstream* responsáveis pela formação

de várias estruturas de actina ordenadas espaço-temporalmente (SAHAI; MARSHALL, 2002; UNGEFROREN; WITTE; LEHNERT, 2018). A via de sinalização de Rho pode recrutar efetoras kinases como CITRON, PRK1 e ROCK, todos envolvidos em processos celulares que contribuem para a tumorigênese, como a invasão e metástase. A ativação de ROCK1/2 é um evento chave na via da Rho, sendo capaz fosforilar efetores *downstream*, como as proteínas LIMKs (do inglês *LIM domain kinase*), que por sua vez fosforilam cofilina-1, inativando-a e levando a estabilização do filamento de actina. ROCK1/2 pode fosforilar também MLC (do inglês *myosin light chain*) regulando a contração celular do filamento de actina mediado por miosinas (WEI et al., 2016). A ativação de ROCK está associada com a progressão tumoral, sua expressão encontra-se alterada em muitos tipos de cânceres. Inibidores de ROCK têm sido pesquisados, uma vez que mostram redução do crescimento tumoral e metástases em modelos *in vivo* (OHTA et al., 2012; CHEN et al., 2014b; WEI et al., 2016).

Outras Rho-GTPases, como Rac e Cdc42, possuem a proteína PAK (do inglês *p21-activated kinases*) como alvo *downstream*, desencadeando vias envolvidas na transformação oncogênica, incluindo proliferação celular, sobrevivência, adesão e migração. Outro efetor incomum das duas GTPases, é a proteína MLK (do inglês *mixed lineage kinases*) (CITI et al., 2011). Tais proteínas pertencem a família de serina-treonina quinases, atuando na transdução de sinais de receptores de superfície celular para as MAPKs. A via de Cdc42 possui efetores *downstream*, como AKT, WWOX, MAP2K, ERK, envolvidos na proliferação celular, síntese de DNA e ativação transcricional. Já a via de Rac relaciona-se com os alvos *downstream* como: MEK, RAF, BAD, ERK, e NF- $\kappa$ B, relacionados com a sobrevivência celular (FIFE; MCCARROLL; KAVALLARIS, 2014; PRUDNIKOVA; RAWAT; CHERNOFF, 2015). A figura 1.10 ilustra alguns efetores da via de sinalização das proteínas Rho e seus respectivos efeitos biológicos.



**Figura 1.10 - Via de sinalização das proteínas Rho-GTPases.** Rho, Rac e Cdc42 são ativadas por GEFs, que por sua vez são regulados por sinais originados da superfície celular. Após sua ativação, as proteínas Rho recrutam e ativam uma série de proteínas quinases citoplasmáticas, indicadas em verde. Estas proteínas, por sua vez, regulam as atividades de várias de proteínas efetoras adicionais, incluindo as que modulam proliferação celular, sobrevivência, migração e invasão. Adaptada de PRUDNIKOVA; RAWAT; CHERNOFF, 2015.

O citoesqueleto de actina é essencial para o estabelecimento, manutenção, e desmontagem das junções celulares, sendo regulado finamente de maneira espaço-temporalmente. A organização da actina juncional desenvolve-se a partir da maturação das junções (PRUDNIKOVA; RAWAT; CHERNOFF, 2015). As vias de sinalização de Rac e Cdc42 estimulam o complexo Arp2/3 e WAVE (do inglês *WASP family Verprolin-homologous protein*), o que favorece a criação de uma rede de actina ramificada entre células adjacentes nucleando a actina nas junções e estimulando a ligação das caderinas (CITI et al., 2011). À medida que as junções amadurecem, RhoA estimula a polimerização da actina via ativação de forminas, desse modo a rede de actina é convertida em feixes de filamentos de actina lineares decorados com miosina do tipo II, formando uma rede de actomiosina estendendo-se na faixa médio-apical na célula (ARNOLD; STEPHENSON; MILLER, 2017).

A minuciosa regulação espaço temporal da via de RhoA, bem como de seus reguladores, é um fator chave na para montagem e estabilidade das junções celulares. RhoA



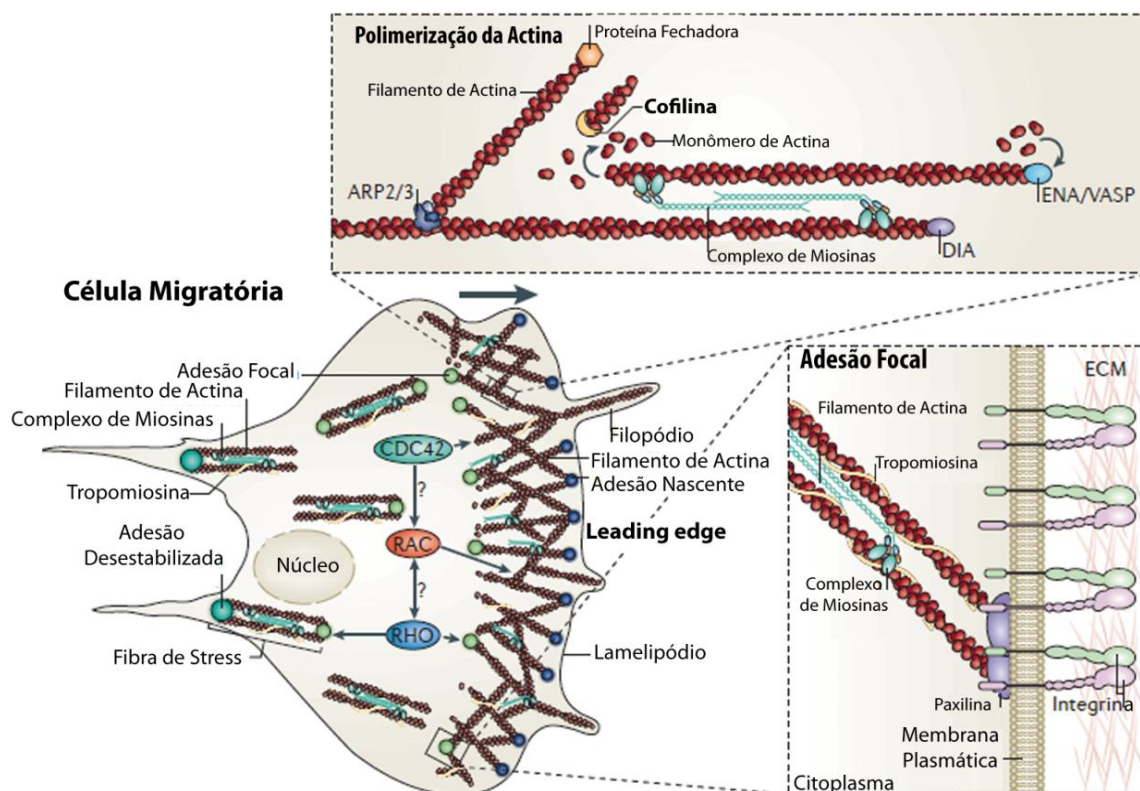
ativa diferentes proteínas como a mDia (do inglês *Diaphanous-related formin-1*), envolvida na nucleação e polimerização da actina nas JA, além de atuar como sensora e geradora de forças mecânicas sob os filamentos de actina. As miosinas são ativadas por RhoA via ativação de ROCK (do inglês *Rho-associated protein kinase*). As miosinas II podem utilizar sua atividade motora e deslizar filamentos de actina conectados ao CJA, aplicando força tensora nas junções e entre células adjacentes. Essa tensão gerada é importante para integridade das junções intercelulares, pois inibe a endocitose da caderinas e favorece a manutenção da atividade de barreira das JT. O balanço fisiológico entre ROCK e mDia é necessário para a manutenção das JA, a diminuição de mDia, ou o aumento da ativação de ROCK, podem induzir a transição da JA para estruturas pontuais, ou seja, desestabilizando-as. Adicionalmente, ativação constante de ROCK por citocinas e estímulos externos é um dos principais mecanismos que culminam no rompimento juncional (CITI et al., 2011; ARNOLD; STEPHENSON; MILLER, 2017).

As Rho-GTPases encontram-se superexpressas ou com ativação aumentada em alguns tipos de cânceres. Por exemplo, níveis aumentados da proteína RhoA foram observados em câncer de mama, cólon, fígado, pulmão, cabeça e pescoço entre outros. Rac1 encontra-se superexpressa ou com ativação aumentada em câncer de mama e pâncreas. Já sua isoforma Rac1b encontra-se com expressão aumentada em mama, cólon e pulmão. Além disso, Cdc42 está superexpressa geralmente em câncer de mama (ORGAZ; HERRAIZ; SANZ-MORENO, 2014; UNGEFROREN; WITTE; LEHNERT, 2018).

Muitos trabalhos demonstraram que diferentes perfis de expressão e distribuição subcelular das Rho-GTPases podem contribuir para o aumento do potencial invasivo de células tumorais (BRAVO-CORDERO et al., 2011; JERRELL; PAREKH, 2016; GASPARSKI; OZARKAR; BENINGO, 2017). De fato, estruturas membranares invasivas repletas de MMPS e ricas em actina e proteínas ligadoras à actina, denominadas de invadopódios, já foram observadas em linhagens celulares de CCR (VISHNUBHOTLA et al., 2007).

A via de sinalização de Rac reorganiza o citoesqueleto de actina por promover a formação de extensas protrusões de membrana conhecidas como lamelipódios, que direciona a migração celular. Para a formação e regulação dessas estruturas membranares, Rac atua em conjunto com os complexos Arp2/3, WAVE e WASP (do inglês *WASP family Verprolin-homologous protein*), coordenando a dinâmica do citoesqueleto de actina próximo à região membranares. Já a via de Cdc42 promove a formação de estruturas membranares finas rica em actina, chamadas de filopódios, responsáveis pela quimiotaxia e início do movimento celular (PRUDNIKOVA; RAWAT; CHERNOFF, 2015; RIDLEY, 2015).

A ativação de Rho favorece a formação de filamentos de actina robustos interconectados conhecidos como fibras de stress. Essas estruturas fornecem a força motora para o movimento celular, além de contração e retração da parte traseira da célula. As fibras de stress conectam desde as adesões focais à membrana nuclear, impulsionando a célula para a direção do movimento. Dessa forma, Rac e Cdc42 atuam na parte anterior da célula, direcionando o movimento celular e gerando protrusões membranares coordenadas pela rápida polimerização/despolimerização de actina. Por outro lado, Rho, na parte posterior da célula, atua formando estruturas de actina mais rígidas possibilitando a ancoragem e transporte do núcleo durante o movimento celular (MONTELL; YOON; STARZ-GAIANO, 2012). Assim, dentro de uma célula dois gradientes de actina são formados; na parte anterior da célula há intensa conversão de F-actina em G-actina, assim como a nucleação e ramificação de redes de actina, gerando lamelipódios. E por outro lado, na parte posterior a actina deve-se manter filamentosa e rígida para sustentar a célula, portanto não há quebra e conversão de F-actina em G-actina de forma intensa. Na figura 1.11 é possível observar a dinâmica do citoesqueleto de actina reguladas pelas proteínas Rho em uma célula migratória. Durante o movimento celular este processo é regulado espaço temporalmente pelo balanço entre as proteínas LIMK e cofilina-1 (SPIERING; HODGSON, 2011; FIFE; MCCARROLL; KAVALLARIS, 2014).



**Figura 1.11 - Representação esquemática da dinâmica da actina reguladas pelas proteínas Rho.** A ativação de Rho, RAC e CDC42 ocorre ao longo da célula controlando diferentes estruturas de actina. Além do cortex de actina, na parte anterior da célula há formação de lamelipódios, filopódios, adesões focais nascentes e intensa ramificação e polimerização/despolimerização mediada por cofilina-1. Na parte posterior da célula fibras de stress contrácteis são encontradas, assim como adesões focais fornecendo a força de tração necessária para a migração celular. Adaptado de MONTELL; YOON; STARZ-GAIANO, 2012.

## 1.7 Cofilina-1

Diversos estudos têm demonstrado que a motilidade celular é coordenada por proteínas ligadoras à actina (ABPs, do inglês *actin-binding proteins*), controlando a formação, função e reestruturação do citoesqueleto de actina (WANG et al., 2007; BRAVO-CORDERO et al., 2013; BLANCHOIN et al., 2014).

A família mais bem estudada e caracterizada entre as ABPs é a ADF (do inglês *actin depolymerizing factor*)/cofilina. Estas proteínas foram descobertas em 1980 devido à sua capacidade de se ligar a actina, e decorar o filamento. A família é composta por proteínas pequenas (17-19 kDa) que podem se ligar tanto à G-actina quanto à F-actina e são amplamente conhecidas pela sua habilidade em regular a dinâmica do citoesqueleto de actina por meio do corte de F-actina aumentando a despolimerização do filamento (BAMBURG; HARRIS; WEEDS, 1980). As três isoformas das proteínas são: a ADF (também conhecida com destrina), cofilina-1 (CFL-1, tipo de cofilina não muscular) e cofilina-2 (CFL-2, tipo de

cofilina muscular). Tais proteínas apresentam alta similaridade em nível de aminoácidos. Estudos *in vitro* indicam que ADF e cofilina-1 possuem graus de afinidade diferentes pela actina, porém ambas podem se ligar ao filamento, estabilizando-o. Já a cofilina-2, embora também seja capaz de se ligar ao filamento, é, entre as diferentes ADF/cofilina, a que apresenta menor eficiência. Assim, a expressão de cofilina-2 é restrita ao tecido muscular que não possui alto *turnover* de actina, porém alguns trabalhos têm relatado evidências de sua expressão em células tumorais. Por outro lado, a ADF é principalmente expressa em tecidos neuronais e epiteliais, enquanto a cofilina-1 é expressa de modo ubíquo (KANELLOS; FRAME, 2016; SHISHKIN et al., 2016).

### ***Cofilina-1 e dinâmica organizacional da actina***

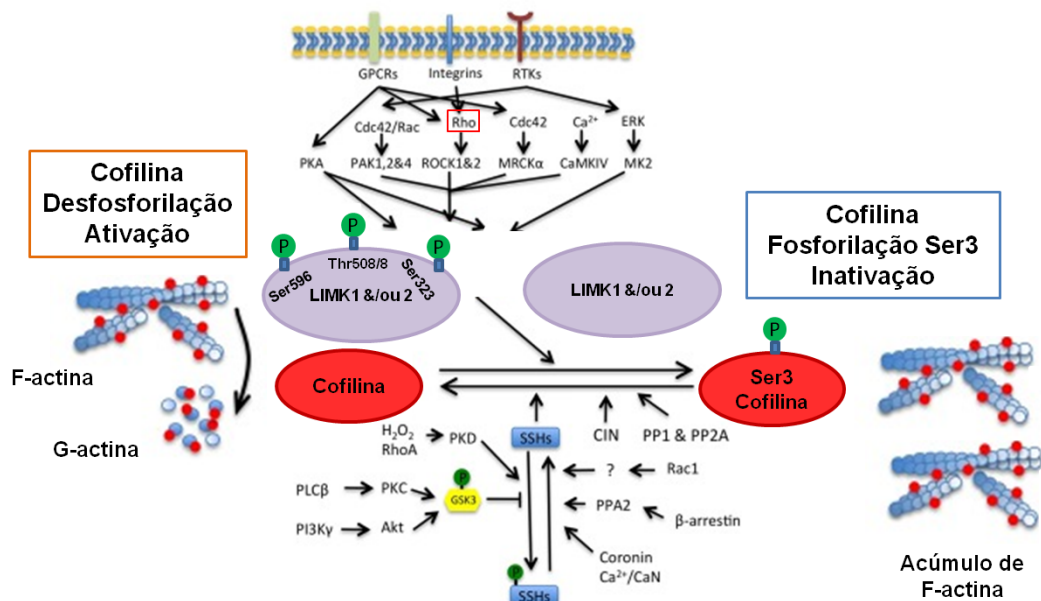
A função primordial da cofilina-1 é modular a dinâmica do citoesqueleto de actina por catalisar a polimerização/despolimerização da actina através do corte de F-actina. O efeito do da cofilina-1 sobre o corte do filamento (em regiões de ADP) dependerá da concentração de G-actina, e da concentração da própria cofilina-1, além de outros cofatores (como as proteínas AIP1, CAP1, e as coroninas). Em baixas concentrações, cofilina-1 corta F-actina e promove a despolimerização do restante de filamento. Alta concentração de cofilina-1 estimula a nucleação bem como a saturação e estabilização do filamento (KANELLOS; FRAME, 2016; SHISHKIN et al., 2016). Adicionalmente, cofilina-1 pode contribuir para a polimerização da actina através: 1) da produção de *free barbed ends*, extremidades do filamento de actina ligados a ATP, que podem ser usadas para a sua nucleação; 2) do fornecimento de *pool* de monômeros de actina. Atualmente, sabe-se também que a cofilina-1 pode atuar em sinergismo ou competição com o complexo Arp2/3, modulando a nucleação e ramificação do filamento. Conforme pode ser observado na figura 1.11 (parte superior), cofilina-1 desramifica o filamento mais antigo (ligado a ADP), já Arp2/3 preferencialmente se liga ao ATP de actina recentemente polimerizada, nucleando novos filamentos e introduzindo ramos em 70° sob F-actina (DESMARAIS et al., 2005).

### ***Regulação da atividade de cofilina-1***

A atividade de cofilina-1 pode ser regulada por vários mecanismos. O pH influencia sua atividade de corte e despolimerização, sendo a atividade mais potente em pH 8,0. Além disso, sabendo que cofilina-1 pode se ligar ao PIP2 de membrana, a diminuição do pH pode influenciar a concentração de PIP2 na membrana, levando a liberação local de cofilina-1 e sua ativação (BRAVO-CORDERO et al., 2013). Ainda, a regulação da atividade de cofilina-1 pela

actina pode se dar por meio da oxidação de seus resíduos de cisteína (CAMERON et al., 2015).

Outro modo de regulação de cofilina-1 é através de sua fosforilação. Estímulos externos podem ativar receptores tirosina quinases, proteínas transmembranas e integrinas acopladas à membrana plasmática, os quais subsequentemente podem ativar Rho, RAC e CDC42, desencadeando cascatas de sinalização intracelular. As proteínas quinases LIMK1/2 e as TESK1/2 (do inglês *testicular protein kinase 1/2*) após ativadas fosforilam cofilina-1 no terceiro resíduo de serina (Ser-3). Uma vez fosforilada, acredita-se que cofilina-1 se torne inativa, ou seja, perde sua capacidade de corte dos filamentos devido à redução de afinidade à actina. Por outro lado, se torna ativa novamente quando proteínas fosfatases SSH (*slingshot*), e *chronophin* (sua fosfatase específica) retiram o fosfato presente na Ser-3. As SSHs podem também interagir com as LIMKs desfosforilando-as, o que as tornam inativas, regulando assim a cofilina-1 de outro modo, mais especificamente por meio da regulação de sua reguladora negativa (KANELLOS; FRAME, 2016). A figura 1.12 ilustra de modo esquemático e com mais detalhes a regulação por fosforilação de cofilina-1.



**Figura 1.12 - Representação esquemática da regulação por fosforilação da proteína cofilina-1.** Estímulos externos podem estimular receptores de membrana que subsequentemente ativam proteínas da família Rho desencadeando vias de sinalizações. No final das vias de sinalizações, LIMK1 e/ou 2 podem ser fosforiladas nos resíduos de Ser598, Thr508 e Ser323, o que leva a regulação da atividade quinase sobre a proteína cofilina-1. Uma vez fosforilada na Ser3 por LIMK1, cofilina-1 se torna inativa, o que favorece o acúmulo de actina na forma polimerizada (F-actina). As proteínas da família SSH, como as SSH1, são responsáveis pela ativação de cofilina-1 por meio da retirada do fosfato na Ser3. Cofilina-1 desfosforilada, corta F-actina e/ou estimula despolimerização do filamento, aumentando o pool de G-actina. Por outro lado, várias proteínas intracelulares como PKD, PPA2, Coroninas, GSK3 podem regular a fosforilação das SSHs por meio de sua fosforilação. Adaptada de COUMANS; DAVEY; MOENS, 2018.

## ***Papel de cofilina-1 na migração, invasão e metástase***

Como a cofilina-1 regula a dinâmica do citoesqueleto, aumentando a quantidade de extremidades de F-actina ligados à ATP (*free barbed ends*) que serão usados para a formação de novos filamentos e o *pool* de G-actina, sua função está intimamente associada com a migração celular. Quando sua atividade é inibida, a migração celular é comprometida, do mesmo modo que quando sua atividade é aumentada a migração é estimulada (WANG et al., 2006; SIDANI et al., 2007). Além disso, sabe-se que sua atividade também estimula protrusões membranares, direcionando o movimento celular (OSER et al., 2009). Cofilina-1 também é encontrada em invadopódios (estruturas tridimensionais ricas em F-actina capazes de degradar MEC), onde a sua presença é necessária para estabilidade e dinâmica desta estrutura, assim como para a degradação da MEC. Contudo, indícios sugerem que sua regulação seja associada primariamente à cortactina, cuja ligação inibe a atividade de corte de cofilina-1 (OSER et al., 2009; HAGEDORN et al., 2014).

Durante a progressão tumoral, níveis aberrantes de cofilina-1 foram encontrados em diversos tipos de cânceres. Níveis elevados de cofilina-1 foram encontrados em células invasivas de glioblastoma murino (YAP et al., 2005), células de carcinoma de mama (WANG et al., 2006), próstata (COLLAZO et al., 2014), vulva (WU et al., 2016) de bexiga (HENSLEY et al., 2016), esôfago (WANG et al., 2010) entre outros. Sugere-se que sua atividade poderia definir o fenótipo invasivo e metastático de células epiteliais tumorais (WANG; EDDY; CONDEELIS, 2007), além de estar associado com prognóstico ruim de pacientes com câncer de mama (MAIMAITI et al., 2016), de próstata (LIU et al., 2014), e de pulmão (MÜLLER et al., 2011). Por outro lado, a linhagem celular de carcinoma hepatocelular MHCC97-H (que apresenta alta capacidade metastática), tumores de ovário, e alguns tumores de mama (HAO et al., 2004) apresentaram baixos níveis de cofilina-1 (DING et al., 2004; SMITH-BECKERMAN et al., 2005). Portanto, os estudos não apresentam um consenso a respeito da correlação entre os níveis de cofilina-1 e a agressividade tumoral, assim, se torna necessária a avaliação de outros componentes da via de sinalização para que seja possível prever a contribuição de cofilina-1 no contexto tumoral (WANG; EDDY; CONDEELIS, 2007).

Como mencionado anteriormente, as vias de Rho, RAC e CDC42 podem levar a fosforilação das proteínas LIMKs, regulando espaço-temporalmente e de forma sincronizada a função da cofilina-1 sob o filamento de actina (FIFE; MCCARROLL; KAVALLARIS, 2014). A restrição espaço-temporal de atividade de cofilina-1 é requerida para a quimiotaxia, uma vez que organiza e estrutura o citoesqueleto de actina, de modo a direcionar o movimento

celular em direção ao quimioatraente (MOUNEIMNE et al., 2006). Além disso, a expressão aumentada de LIMK1 foi observada em muitos tipos de tumores e relacionada com aumento do potencial invasivo, enquanto sua baixa atividade foi associada com diminuição do fenótipo invasivo (FIFE; MCCARROLL; KAVALLARIS, 2014). O balanço entre LIMKs e cofilina-1 é importante para determinar a resposta celular, pois pequenas mudanças na dinâmica do citoesqueleto de actina podem aumentar ou diminuir a invasividade de células tumorais (WANG et al., 2006; SCOTT et al., 2010).

Desse modo, muitos estudos apontam que tanto a forma inativa quanto a ativa de cofilina-1 são importantes para a progressão tumoral, porém os mecanismos moleculares que regulam suas atividades podem variar dependendo do tipo celular. Diante de suas importantes funções na homeostase celular e, possivelmente, durante a tumorigênese no contexto da migração celular, o presente estudo buscou avaliar a contribuição de cofilina-1 durante a TEM no CCR. A principal hipótese deste estudo é que a cofilina, por meio de sua regulação da dinâmica do citoesqueleto de actina, pode mediar a dissolução das junções celulares levando também a aquisição de propriedades migratórias e invasiva durante a TEM em células de CCR.

## 2 JUSTIFICATIVA

O CCR é uma doença heterogênea, multifatorial e intimamente associada com a ocidentalização. Devido às suas altas taxas de incidência, se torna um alvo de estudo importante na saúde pública nacional e mundial. Sabe-se que a metástase é a principal causa de morte entre os pacientes com câncer em estádios avançados. Portanto, a identificação de vias de sinalização cruciais para migração, invasão e metástase de células tumorais representa uma estratégia promissora na busca por novos alvos terapêuticos, assim como na estratificação de pacientes com potencial chance de doença metastática.

Uma vez que o citoesqueleto de actina é determinante para os eventos celulares de migração e invasão, o estudo da mecânica da principal proteína reguladora de sua dinâmica, a cofilina-1, se torna importante para a compreensão de seu papel durante a progressão do CCR, principalmente em eventos que regulam a TEM e finalmente a formação da metástase. Compreender detalhadamente o papel desta proteína pode resultar na identificação de novos alvos terapêuticos relacionados com sua via de sinalização, impedindo a progressão da doença metastática.

Além disso, pouco se sabe sobre a participação da cofilina-1 e suas principais proteínas reguladoras durante a progressão tumoral do CCR, além da correlação de seus níveis com parâmetros clinicopatológico dos pacientes. Assim, diante de tudo que foi abordado, fica clara a importância de identificar e caracterizar parâmetros distintos que possam revelar diferenças específicas entre os diferentes estádios da doença, auxiliando desta forma na identificação de novos biomarcadores, na criação de assinaturas de predição e, possivelmente no desenvolvimento de novas drogas que visam vulnerabilidades específicas durante a progressão da doença.



### **3 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o papel da proteína cofilina-1 na dinâmica do citoesqueleto de actina durante a desorganização das junções celulares e em eventos da TEM em câncer colorretal, através de estudos *in vitro*, verificando também sua participação durante a progressão da doença utilizando amostras de pacientes.

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

No modelo experimental de TEM *in vitro*:

- 1- Determinar qual linhagem celular de CCR é o modelo mais adequado para indução da TEM *in vitro* pelo tratamento com TGF- $\beta$ .
- 2- Verificar os níveis de ativação da via não canônica de RhoA/LIMK2/cofilina-1.
- 3- Analisar a distribuição e organização subcelular das formas fosforilada e total de cofilina-1 e seu impacto na dinâmica do citoesqueleto de actina.
- 4- Determinar se a cofilina-1, através da regulação de actina, tem papel na mudança do fenótipo epitelial para mesenquimal.
- 5- Avaliar se a cofilina-1 é necessária para a desmontagem juncional.
- 6- Analisar se a cofilina-1 contribui na migração, invasão celular e na organização das adesões focais.

Em relação às amostras de CCR:

- 7- Determinar os níveis de proteína e transcritos de cofilina-1, e suas proteínas reguladoras LIMK1 e SSH1 em amostras de pacientes em diferentes estádios da doença.
- 8- Avaliar a associação dos dados obtidos com parâmetros clinicopatológicos dos pacientes.
- 9- Analisar os níveis do RNAm de cofilina-1, LIMK1 e SSH1 a partir de dados depositados no TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) de acordo com o estadiamento.

## 4 MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1 Anticorpos e reagentes

Os anticorpos monoclonais de coelho anti-  $\alpha$ -tubulina e claudina-3 foram adquiridos da Invitrogen (*Carlsbad, CA, EUA*). O anticorpo monoclonal de camundongo anti-E-caderina (clone 36) foi adquirido da BD Biosciences (*San Diego, CA, EUA*). Os anticorpos monoclonais de coelho anti-cofilina-1, anti-pcofilina-1(ser-3), anti-FAK, e anti-pFAK (T390) foram obtidos da Cell Signaling (*Beverly, MA, EUA*). O anticorpo monoclonal de camundongo anti-actina (clone C4) foi adquirido da Millipore (*Temecula, CA, USA*). O anticorpo monoclonal de camundongo anti-GAPDH foi obtido da Ambion (*Carlsbad, CA, USA*). O anticorpo policlonal de coelho anti-LIMK2, anti-vinculina e vimentina (clone V9) foram obtidos da Sigma (*St Louis, MO, USA*). O anticorpo policlonal de coelho anti-pLIMK2 (T505) foi adquirido da Abcam (*Cambridge, UK*). O anticorpo monoclonal de coelho anti-ROCK1 foi obtido da Santa Cruz (*Biotech Dallas, TX, EUA*) assim como o anticorpo monoclonal anti-vimentina conjugado à Cy3 (# C9080) foi adquirido da Sigma - Aldrich (*St. Louis, MO, EUA*). Os anticorpos secundários Alexa Fluor® 488 IgG-goat-anti-camundongo e Alexa Fluor® 546 IgG-anti-coelho foram obtidos da Molecular Probes (*Eugene, Oregon, USA*). Anti-camundongo e anti-coelho IgG conjugado a HRP foram adquiridos da Sigma.

A toxina Faloidina conjugada à TRITC (# P1951) e ao Atto 655 (# 18846), e 4' - dicloridrato de 6 - diamidino - 2 - fenilindole (DAPI) foram adquiridos da Sigma.

O Fator de Crescimento Transformante Beta 1 (TGF- $\beta$ 1) foi obtido da GIBCO (*Life Technologies, Carlsbad, EUA*), diluído em PBS + 0,1% de BSA (albumina sérica bovina) mantido na concentração estoque de 1000ng/ml e utilizado a concentração final de 10ng/ml. A Citocalasina D (*Sigma*) foi diluída a 10 $\mu$ M em DMSO (dimetil sulfoxido) e utilizada na concentração final de 20nM. O inibidor do receptor de TGF- $\beta$ , SB431542 (*Sigma*) foi diluído em DMSO na concentração estoque de 1000 $\mu$ M/mL e foi utilizado na concentração final de 15  $\mu$ g/mL.

### 4.2 Amostras de tecido obtidas de pacientes

As amostras de tecidos do cólon e reto foram obtidas a partir de peças cirúrgicas provenientes de colectomias e retossigmoidectomias de pacientes atendidos no Hospital do Câncer-I do Instituto Nacional de Câncer (INCA - Rio de Janeiro - Brasil). O presente estudo obteve aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa da instituição para a utilização de amostras biológicas (Protocolo 84/4, renovado 02/06/17). O estadiamento das amostras foi realizado pela classificação TNM (tumor/linfonodo/metástase), de acordo com as diretrizes contidas na

7ª edição do Manual de estadiamento de câncer editado pelo Comitê Conjunto Americano sobre Câncer (EDGE; COMPTON, 2010). A graduação histopatológica das amostras tumorais foi dada desde: bem diferenciado, moderadamente diferenciado, pouco diferenciado e indiferenciado em tumores adenocarcinoma, mucinosos e/ou anel de sinete. Tanto o estadiamento quanto a graduação histopatológica foram realizados por patologistas da Divisão de Patologia do INCA. Foram utilizadas amostras de tecido tumoral e do normal adjacente (aproximadamente 10 cm do limite tumoral). Todas as amostras foram coletadas entre o período de 2012-2018 em colaboração com o Banco Nacional de Tumores (BNT) após a aplicação e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Para análise dos níveis proteicos, as amostras foram acondicionadas em *freezer* -80°C para posterior extração de proteínas totais. Para avaliação da expressão gênica, o tecido foi mantido em RNAlater® Solution a -20°C, segundo instruções do fabricante para posterior extração de RNA. A tabela 4.1 exibe o número de amostras de pacientes utilizados no estudo e os ensaios em que foram utilizados.

**Tabela 4.1 - Relação de amostras de pacientes e ensaios utilizados**

Ensaio	Cofilina-1	LIMK1	SSH1
RT-PCR	n=32- I(4); II(13); III (12); IV (3)	n=28- I(3); II(13); III (9); IV (3)	-
WB	n=39- I(6); II(10); III (19); IV (4)	-	-
IHC	n=49- I (13); II (12); III (14); IV (10) metástase hepática (10)	n=49 - I (13); II (12); III (14); IV (10) metástase hepática (10)	n=49 - I (13); II (12); III (14); IV (10); metástase hepática (10)

### 4.3 Cultura de células

Linhagens celulares de adenocarcinoma colorretal humano HT-29 (HTB-38 TM), carcinoma colorretal humano HCT-116 (CCL-247 TM), e carcinoma de pulmão A549 (# CCL-185), foram obtidas da *American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, EUA)*. As células HT-29 são moderadamente diferenciadas, com invasividade intermediária, com mutações em *BRAF*, *PIK3CA*, *TP53*, *SMAD4* e *APC* (ROWAN et al., 2000; WOODFORD-RICHENS et al., 2001; FLATMARK et al., 2004). As células HCT-116 possuem mutações em *KRAS*, *PIK3CA* e  $\beta$ -catenina, sendo *TP53* selvagem, com um fenótipo indiferenciado e alto potencial tumorigênico (JAWHARI et al., 2003; AHMED et al., 2013). A linhagem celular A549 foi utilizada como controle positivo da indução de TEM pelo tratamento com TGF-  $\beta$  *in vitro* (KASAI et al., 2005; KAWATA et al., 2012). As células foram mantidas em meio *Eagle* modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle*

*medium - DMEM*) GIBCO (*Life Technologies*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina G (100 mg/L) e estreptomicina (60 mg/L). As células foram cultivadas e mantidas a 37° C em estufa com 5 % de CO<sub>2</sub>. Para a realização dos experimentos, as células foram mantidas em semi-confluência (60-70%) em garrafas T25, lavadas com PBS, tripsinizadas (com 0,05% de tripsina / 0,02% de EDTA diluídos em PBS); contadas e plaqueadas em baixa densidade em placas de 6, 12 e/ou 24 poços.

#### **4.4 Tratamento com TGF- $\beta$ e inibição com SB431542**

Para o tratamento com TGF- $\beta$ , as células foram cultivadas em baixa confluência com DMEM a 10% SFB. Após a formação de pequenas ilhas de células, o meio foi trocado por DMEM contendo a 1% de SFB por 4 horas. Subsequentemente as células foram tratadas com 10ng/mL de TGF- $\beta$  (KASAI et al., 2005) em meio DMEM 1% de SFB nos tempos de 24 e 48 horas. Para os experimentos de silenciamento de cofilina-1 e tratamento com TGF- $\beta$ , as células foram tratadas com DMEM a 2% de SFB. Para o tratamento com inibidor do receptor de TGF- $\beta$ , SB431542, as células foram cultivadas da mesma forma como indicado acima usando DMEM e 1% de SFB. As células foram pré-tratadas com 15  $\mu$ g/mL deste inibidor por 1 hora, antes do tratamento com TGF- $\beta$ .

#### **4.5 Silenciamento de cofilina-1**

Para o silenciamento de cofilina-1 foi utilizado o Hs\_CFL2\_5 FlexiTube siRNA (# SI00299838, *Qiagen, Valencia, CA, USA*) na concentração final de 30 pmol/3x10<sup>5</sup> células em conjunto com Lipofectamine® RNAiMAX (*Invitrogen Inc. Carlsbad, CA, EUA*), segundo as instruções dos fabricantes. Para cultivo das células silenciadas, utilizamos o meio Opti-MEM® (*Invitrogen*) e DMEM com 2% de SFB. As células foram incubadas por 30 h com os complexos (siRNA+Opti-MEM+RNAiMAX) e subsequentemente plaqueadas para os experimentos. Como controle negativo do silenciamento foi utilizado o Silencer® Select Negative Control siRNA (*Ambion*) nas mesmas condições descritas acima. As células foram utilizadas nos experimentos após 2 ou 3 dias do silenciamento. O silenciamento foi quantificado por análise da densitometria das bandas obtidas por *western blot*.

#### **4.6 Geração de células com cofilina-1 mutante**

Com a finalidade de gerar células mutantes para cofilina-1, plasmídeos de expressão (pmRFP-N1) que codificam para o tipo selvagem (WT) de cofilina (#50856), cofilina constitutivamente ativa S3A (#50857) e a pseudo-fosforilada, forma não ativável de cofilina S3E (#50858) (*Addgene, Watertown, MA, USA*) foram utilizados (GARVALOV et al.,

2007).As células foram transfectadas com os plasmídeos de expressão utilizando o reagente de transfecção Lipofectamine® 2000 (*Invitrogen*) seguindo o protocolo do fabricante. A quantidade de DNA plasmidial utilizado em cada transfecção foi mantida em  $2 \mu\text{g}/4 \times 10^3$  células. Quando utilizada a transfecção transiente foi obtida até 70% de eficiência de transfecção, indicado pela expressão da proteína vermelha fluorescente (RFP), fusionada no domínio C terminal de cofilina-1. Células HT-29 a partir de transfecção estável foram geradas com o tratamento com Geneticin® (1 mg/mL) (*Invitrogen*) por 2 meses. Os clones foram selecionados, expandidos e utilizados em experimentos subsequentes.

#### **4.7 Obtenção de lisados celulares e Western Blotting**

Para obtenção do extrato de proteínas totais, as células/tecidos foram homogeneizados em tampão de lise RIPA (1 % NP-40, 0,5% deoxicolato de sódio, 0,2 % SDS, 150 mM de NaCl, 50mM de Tris-HCL (pH 7,4) e 20 mM NaF) contendo ortovanadato de sódio 1 mM e coquetel de inibidores de protease (1:100) (*Sigma*) durante 30 min a 4°C. Os lisados celulares foram submetidos a centrifugação (10.000 g/10 min/4°C) e os sobrenadantes recolhidos e armazenados a -80°C para análise subsequente. A concentração de proteínas foi estimada por leitura espectrofotométrica à 562nm empregando-se o kit comercial de BCA (*BioAgency, São Paulo Brasil*), segundo instruções do fabricante. Lisados proteicos contendo 20, 30 ou 50  $\mu\text{g}$  de proteínas totais de cada amostra foram submetidos à eletroforese em gel de poliácridamida contendo dodecil sulfato de sódio (*Sodium Duodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis - SDS-PAGE*) e transferidas para membranas de nitrocelulose (*Boston, MA, USA*) empregando equipamento *Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell* (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA*). Subsequentemente, foi realizado bloqueio das membranas com leite desnatado a 5% diluído em TBS-Tween 0,1% durante 1 hora. Posteriormente as membranas foram incubadas por 16 horas com os seguintes anticorpos primários: anti-  $\alpha$ -tubulina (1:1500), anti-claudina-3 (1:1500), anti-E-caderina (clone 36) (1:2500), anti-cofilina-1(1:2500) e anti-pcofilina-1(ser-3) (1:1000), anti-actina (clone C4) (1:2500), anti-LIMK2 (1:100), anti-pLIMK2 (T505) (1:500), anti-vinculina (1:200), anti FAK (1:500), anti-pFAK(T397) (1:500), anti-vimentina (1:1500) e anti-ROCK1 (1:500). Somente o anti-GAPDH (1:50.000) foi utilizado por período de 1 h. Após sucessivas lavagens, as membranas foram incubadas por 1 h com anticorpos secundários correspondentes, anti-camundongo ou anti-coelho conjugados à peroxidase, na diluição de 1:40000 ou 1:150000 em TBS-T 0,1%, por 60 min. As membranas foram lavadas com TBS-T 0,1% e o sinal foi detectado por quimiluminescência utilizando o kit ECL (*Amersham Biosciences GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, Reino Unido*).

## 4.8 Extração de RNA e síntese de cDNA

### Para cultura de células

Para análise da expressão gênica nas culturas celulares, extraiu-se o RNA pelo método de Trizol® (*Invitrogen*) conforme as instruções do fabricante (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

### Para amostras de tecido

Para análise da expressão gênica de tecidos colorretais (tumoral e normal adjacente), o RNA foi extraído de amostras e mantidas a -20°C em RNAlater® Solution (*Ambion*) utilizando-se o Kit RNeasy® Mini Kit (*Qiagen*) ou pelo método de Trizol® segundo o protocolo do fabricante.

Após a extração, tanto para linhagens celulares quanto para as amostras de tecido, o RNA total obtido foi tratado com DNase (*Invitrogen*) e quantificado por microespectrofotometria UV utilizando o equipamento *Nano Drop*. Posteriormente foi sintetizado DNA complementar (cDNA) para execução da Reação em Cadeia da Polimerase acoplada a transcrição reversa (*Reverse Transcription-coupled Polymerase Chain Reaction – RT-PCR*) empregando a enzima *SuperScript II RT*® (*Invitrogen*).

## 4.9 RT-qPCR

A quantificação da expressão gênica dos genes selecionados foi efetuada por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase e quantitativa em tempo real (*Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction - qPCR*) utilizando *SYBR Green*® *PCR Master Mix* (*Invitrogen*) em termociclador da Applied Biosystems 7500 (*Foster City, CA, USA*). Em cada reação foram utilizados 200-500ng de concentração final do cDNA das amostras para cada amostra de paciente, condição e período estabelecido, 5,0µL do reagente *SYBR*® *Green* e iniciadores na concentração final de 0,2-0,5 µM no volume de 2,5µL. Os perfis de ciclagem foram os seguintes: 40 ciclos de 95°C - 30s /60°C - 30s/72°C – 30s para os iniciadores relativos a TEM, cofilina-1 e LIMK2 e 40 ciclos de 95°C - 30s /65°C - 45s para os iniciadores de LIMK1. As sequências dos iniciadores utilizadas no presente estudo estão detalhadas na Tabela 4.2.

Os valores de expressão dos transcritos analisados foram normalizados com base na análise concomitante da expressão do gene codificador da proteína β-Actina ou 18S. Para as análises de expressão gênica referentes às amostras de tecido utilizou-se somente a expressão o gene constitutivo β-Actina (RUBIE et al., 2005), já para as culturas celulares utilizou-se tanto a β-Actina quanto o 18S. O cálculo da expressão diferencial dos genes selecionados foi

efetuado pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008) para as culturas de células. Para o cálculo das amostras de tecido (tumoral e normal adjacente) utilizou-se o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  além do  $\Delta CT^{-1}$  (CT do gene alvo – CT do gene constitutivo) (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008; OSTROP et al., 2015; MAERTZDORF et al., 2016). Os iniciadores utilizados foram retirados dos seguintes trabalhos: alvos da TEM - BASTOS et al., 2014; cofilina-1 e LIMK2- SOUSA-SQUIAVINATO et al., 2018; e LIMK1-LI et al., 2017.

**Tabela 4.2-** Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a análise da expressão gênica

<b>Alvo</b>	<b>Oligonucleotídeo</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>
18S	18S-Forward	AACCCGTTGAACCCCAT
	18S-Reverse	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
$\beta$ -ACTINA	$\beta$ -Actina Forward	TACAATGAGCTGCGTGTGG
	$\beta$ -Actina Reverse	TAGCACAGCCTGGATAGCAA
E-CADERINA	E-caderina Forward	GAATGACAACAAGCCCGAAT
	E-caderina Reverse	GACCTCCATCACAGAGGTTCC
CLAUDINA-3	CLD3-Forward	CTGCTCTGCTGCTCGTGTC
	CLD3-Reverse	TTAGACGTAGTCCTTGCGGTCGTAG
COFILINA-1	CFL-1-Forward	GATAAGGACTGCCGCTATGC
	CFL-1-Reverse	GCTTGATCCCTGTCAGCTTC
LIMK-1	LIMK1 Forward	CAAGGGACTGGTTATGGTGGC
	LIMK1 Reverse	CCCCGTCACCGATAAAGGTC
LIMK-2	LIMK-2-Forward	GACTGAGGTGAAAGTGATGCGC
	LIMK-2-Reverse	AACCTGACCTTCTGCTGCCA
SNAIL-1	Snail-1-Forward	TCGGAAGCCTAACTACAGCGA
	Snail-1-Reverse	AGATGAGCATTGGCAGCGAG
SLUG	Slug-Forward	AAGCATTTC AACGCCTCCAAA
	Slug-Reverse	GGATCTCTGGTTGTGGTATGACA
TWIST	Twist-Forward	GGCACCATCCTCACACCTCT
	Twist-Reverse	TGGCTGATTGGCACGACCT
VIMENTINA	Vimentina-Forward	GCCAGATGCGTGAAATGGAA
	Vimentina-Reverse	CTGTCCATCTCTAGTTTCAACCG
N-CADERINA	N-caderina-Forward	ACCAGGACTATGACTTGAGCC
	N-caderina-Reverse	GGCGTGGATGGGTCTTTCA

Para testar a qualidade das reações de RT-qPCR realizadas, foi preparada uma curva de diluição seriada na proporção de 1:5 de cDNA proveniente da linhagem celular A549 e HT-29. As amostras da curva de diluição seriada bem como as equivalentes aos experimentos e das amostras de tecido, a  $\beta$ -Actina ou 18S de cada amostra e o controle negativo da reação (*No template Control* – NTC; sem cDNA) foram analisadas em duplicatas. Cada reação fornece dados sobre a linearidade e inclinação da reta ( $R^2$  e *slope*, respectivamente) e

eficiência. A regressão linear da curva-padrão permite a obtenção de valores do  $R^2$  e *slope*; o que possibilita calcular a eficiência da reação, cujo valor ideal deve estar entre 90-100%.

#### 4.10 Imunohistoquímica (IHC)

Para a análise por imunohistoquímica das proteínas cofilina-1, LIMK1 e SSH1 de tecidos de pacientes com CCR, blocos de parafina armazenados na Divisão de Patologia do INCA foram utilizados. Para tal, 59 pacientes (49 com tumores primários e 10 com metástases) submetidos à cirurgia de ressecção do cólon, foram selecionados para a análise. Para a técnica de IHC as lâminas comerciais pré-tratadas (*immunoSlide-Easy Path*) contendo fatias de 3 micrometros de espessura foram imersas por 3 vezes de 5 min em banhos de xilol seguidos de banhos rápidos de álcool 100%, 90%, 80% e 70%. O excesso de álcool foi retirado sob água corrente por 3 min. A recuperação antigênica foi realizada em tampão *trilogy* (*Cell Marque*) a 98° C, utilizando calor úmido e a vaporização por 30 min. Para evitar marcações inespecíficas, o bloqueio da peroxidase e o bloqueio de proteínas foram feitos usando o kit *NovoLink Max Polymer Detection* (*Leica Microsystems*) por 5 min cada. As incubações com o anticorpo monoclonal de coelho anti-cofilina na concentração de 1:2500 (*Cell Signaling*); o anticorpo policlonal de coelho anti-LIMK1- 1:1400 (*Thermo Fisher*) e o anticorpo policlonal de coelho anti-SSH1- 1:600 (*Sigma*) foram realizadas por 16 h a 4°C.

Subsequentemente, as lâminas foram incubadas com o reagente pós-primário e com o polímero (*Novolink*), ambos por 30 min. Para a revelação da reação utilizou-se o cromógeno DAB (Diaminobenzidina), por 5 minutos. A contra coloração foi feita com a hematoxilina, por 30 segundos. Após a retirada do excesso de hematoxilina em água corrente, as lâminas foram imersas em banhos de 70%, 80%, 90%, 100% xilol. Após a montagem com bálsamo, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico.

As lâminas foram então enviadas para um patologista (não familiarizado com os grupos experimentais) para avaliação da intensidade (+ a +++) e porcentagem (0 a 100%) de cada anticorpo em cada lâmina. Os resultados referentes à marcação do epitélio foram então agrupados e, para fins quantitativos, definimos um escore de marcação. O escore consistiu na multiplicação da intensidade de coloração (1 a 3 cruces) e percentual de marcação em toda lâmina (0,00 a 1,00). Por exemplo, uma lâmina na qual a pontuação do patologista +++ cruces, e intensidade em 70% da lâmina teria uma pontuação de 2,1 ( $3 \times 0,7 = 2,1$ ). A mediana do escore entre todos os pacientes foi utilizada para separação entre alta e baixa expressão das proteínas analisadas.



#### 4.11 Fracionamento de G/F actina

A quantificação de G e F-actina foi realizada por fracionamento em Triton X-100 da actina celular, como previamente descrito (WANG et al., 2016). Após aproximadamente 70% de confluência, as células foram lavadas com PBS; como G-actina é solúvel em Triton X-100, sua extração ocorreu por agitação leve por 5 minutos a temperatura ambiente em tampão de estabilização do citoesqueleto de actina (10 mM de MES, 140 mM de KCl, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de EGTA, 280 mM de sacarose, pH 6.1), suplementado com 0,5% de Triton X-100, coquetel inibidor de protease, e 1mg/mL de Faloidina para evitar a despolimerização do filamento. Subsequentemente, o lisado foi recolhido e misturado (1:1) em tampão 2x SDS e fervido. As células foram novamente lavadas com PBS, e foi adicionado o tampão 1x SDS no mesmo volume final da fração de G-actina, seguiu-se com homogeneização e raspagem das células com a fração de F-actina (que é insolúvel em Triton X-100), finalmente ocorreu a passagem do lisado em seringa de calibre fino com posterior fervura. A quantidade de cada fração foi determinada por gel de eletroforese e análise por *western blot* com utilização de anticorpo anti-actina que reconhece todas as isoformas da proteína. Como controle da técnica, as células foram tratadas com Citocalasina D na concentração final de 20nM por 16 horas (HAYOT et al., 2006). Uma vez dentro da célula, a Citocalasina se liga na extremidade crescente do filamento de actina (*barbed end*) e impede a polimerização e despolimerização de G-actina (GODDETTE; FRIEDEN, 1986).

#### 4.12 Crescimento celular

A proliferação celular foi avaliada de modo indireto pelo crescimento celular e mensurado a partir no número de células coradas com o corante cristal violeta. As células foram plaqueadas na concentração final de  $4 \times 10^3$  em quintuplicatas, em placas de 96 poços e mantidas em meio DMEM 10% SFB. Após 5 horas as células já estavam aderidas, foram então tratadas com TGF- $\beta$  e si-CFL-1 em meio DMEM 1% SFB por 0, 24 e 48hs. Após os respectivos tempos, a monocamada foi lavada 2x com PBS (pH 7.0) e fixada com etanol por 10 min. Em seguida, o corante cristal violeta (20% de etanol + 0,05% de cristal violeta) foi adicionado aos poços contendo as células, durante 10 min. O excesso do corante foi eliminado pela lavagem com água Milli-Q e a eluição do cristal violeta restante foi realizada com metanol por 5min. A quantificação do crescimento celular foi realizada por espectrofotometria no comprimento de onda de 595 nm, utilizando o leitor de Elisa Spectra Max 190 (*Sunnyvale, CA, USA*). Foram realizados no mínimo três experimentos independentes.

### 4.13 Análise da migração celular

#### *Wound healing assay*

As células foram cultivadas em placas de 12 poços em DMEM 10% SFB até atingirem a confluência, 4 horas antes do risco o meio foi trocado para DMEM 1% SFB e posteriormente submetidas a um risco com ponteira estéril. Para cada poço, cinco campos ao longo da extensão do risco foram selecionados, marcados e analisados em microscópio Axio Observer. Z1 equipado com uma Axio Cam HRc e Axio Vision Release 8.2 Image Analyzer (Carl Zeiss, Inc., Jena, Alemanha). Em seguida, as células foram tratadas com TGF- $\beta$  e si-CFL-1 em meio DMEM 1% SFB e incubadas durante 24 h para permitir que as células migrassem pela abertura na monocamada formada pelo risco. As micrografias dos poços foram captadas imediatamente após o risco (0 hs) e no final do experimento (24 hs). A quantificação da migração foi realizada através de medições da área da lesão utilizando o programa *Icy* (DE CHAUMONT et al., 2012). Os valores de migração celular estão representados como a porcentagem de migração (que correspondem ao fechamento da lesão produzida na monocamada), sendo as barras dos gráficos correspondentes a médias  $\pm$  SEM de ensaios em duplicatas, de pelo menos três experimentos independentes.

#### *Rastro Fagocinético*

Inicialmente, placas de 24 poços estéreis foram sensibilizadas com BSA 1% (p/v) durante 3 horas a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>. Subsequentemente, a solução contendo albumina livre foi removida e os poços lavados com etanol absoluto. A solução de precipitação do ouro foi preparada através da fervura de 14,5 mM de AuHCl<sub>4</sub> (*Sigma*), 36,5 mM de carbonato de sódio, seguida da adição de 0.1% de formaldeído na solução previamente fervida. Em seguida, 400  $\mu$ l da solução foram adicionados nos poços e as placas foram incubadas em estufa a 37°C a 5% CO<sub>2</sub> para a precipitação das partículas de ouro na superfície dos poços. Após a deposição das partículas de ouro no fundo da placa, a solução de ouro foi removida e os poços lavados 3 vezes com PBS 1X. Para este ensaio,  $2 \times 10^3$  células foram plaqueadas e tratadas em meio DMEM com 2% SFB e incubadas na estufa durante 20 horas. Tal metodologia visa a avaliação da capacidade de uma célula se deslocar, removendo partículas de ouro ao longo do percurso, criando uma faixa livre visível e mensurável sobre a superfície revestida com ouro. Assim, há a preparação prévia da superfície a qual a célula será plaqueada revestida com nano partículas de ouro (Au<sup>0</sup>), que são geradas pela redução de ácido cloroáurico (Au<sup>3+</sup>) por citrato de sódio. Como resultado dessa reação química, partículas de ouro com 10-20 nm de diâmetro precipitam, recobrando a superfície, proporcionando

substrato para a análise de motilidade de célula única (MENDONÇA et al., 2017). Para análise do potencial de motilidade das células, imagens foram capturadas em microscópio Axio Observer. Z1 equipado com um Axio Cam HRc e Axio Vision Release 8.2 Image Analyzer (Carl Zeiss) em aumento de 10X. Para a quantificação do rastro produzido pelo deslocamento das células na superfície revestida com ouro, utilizou-se o programa *Icy* em conjunto com o *ImageJ*. Os valores representados nos gráficos referem-se a área livre deixada pelas células em pixel x 10<sup>4</sup>. Os ensaios foram realizados em duplicata, no mínimo 10 fotos de cada condição foram capturadas e três experimentos independentes foram realizados.

#### **4.14 Ensaios para avaliar atividade de RhoA**

##### ***Ensaio utilizando luminescência***

Para avaliação dos níveis de atividade da GTPase RhoA, foi realizado o plaqueamento na concentração de 2 x 10<sup>4</sup> células em placas de 6 poços. Subsequentemente, após as células atingirem a confluência de 70% foi realizado o tratamento com TGF-β nos tempos de 2, 5, 10 e 15 min. Em seguida, foi utilizado o protocolo de detecção de RhoA, *G-Lisa® RhoA Activation Assay Biochem Kit®* (# BK121, Cytoskeleton, EUA, CO), de acordo com as instruções do fabricante. A leitura da atividade da proteína foi realizada por captação da luminescência emitida pelas amostras utilizando-se o aparelho Veritas® Microplate Luminometer (Turner Biosystems, EUA, CA).

##### ***Pull-down***

A atividade da proteína RhoA foi determinada utilizando o ensaio de *Pull-down* (Thermo Fisher Scientific, # 89854) de acordo com as instruções do fabricante. Células HT-29 foram plaqueadas em garrafas T-25 com DMEM + 10% de SFB e tratadas com TGF-β por 48h. A proteína Rhotekin RBD (uma efetora de RhoA) ligada às esferas de glutathiona-agarose foram utilizadas para precipitar a RhoA ligada à GTP do lisado celular. A forma ativa de RhoA ligada em sua efetora, e RhoA total foram separadas por SDS-PAGE a 13% e visualizados por *western blotting* utilizando anticorpo contra RhoA (1: 1.000).

#### **4.15 Análise da invasão celular**

Para avaliação da invasividade celular, as células foram plaqueadas na concentração de 6x10<sup>4</sup> e cultivadas em 200ul de DMEM com 1% SFB na superfície superior de insertos de membrana de policarbonato Transwell ® (poro de 8 um; Costar), revestido com 50 µL de Matrigel ® (BD Biosciences) diluído 1:10 em DMEM 1% SFB. Posteriormente ao plaqueamento nos insertos, as células foram tratadas por 48 h com TGF-β. Utilizou-se meio

DMEM com 10% de SFB como um quimioatratante na parte inferior da câmara, e após 48 hs de incubação a 37° C o gel que reveste a superfície superior da membrana foi retirado com uma haste de algodão. As células que atravessaram o gel são aquelas que invadiram e consequentemente encontram-se na parte inferior da membrana. Posteriormente, os insertos foram lavados com PBS, e fixados com etanol absoluto gelado por 10 min, em seguida o excesso de etanol foi retirado com água Milli-Q. As células invasivas foram coradas com cristal violeta (0,05% em etanol 20%) em seguida lavadas sucessivamente com água Milli-Q. Para análise da invasividade das células, imagens de cinco campos dos insertos foram capturadas em microscópio Axio Observer. Z1 equipado com um Axio Cam HRc e Axio Vision Release 8.2 Image Analyzer (*Carl Zeiss*), onde mensurou-se o número de células que atravessaram o matrigel.

#### **4.16 Análise da atividade de metaloproteases por zimografia**

As células foram cultivadas em placa de 6 poços, e tratadas com TGF- $\beta$  e/ou si-CFL-1 em meio DMEM 1% SFB nos tempos de 24 h e/ou 48 h. Os meios condicionados das culturas celulares foram colhidos e o conteúdo proteico foi quantificado. Utilizou-se 40  $\mu$ g de proteínas provenientes do meio condicionado das células controle e tratadas para eletroforese em gel de acrilamida (10%) contendo 0,2% de gelatina (*Porcine skin, tipo A, #G2500-Sigma*). Após a eletroforese, os géis foram incubados com tampão de lavagem (10 mM de Tris / HCl, pH 8,8 contendo 2,5% de Triton X-100) 2 vezes, por 30 min cada, em temperatura ambiente e em seguida incubadas em tampão de ativação (5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,02% de NaN<sub>3</sub>, e 50 mM Tris / HCl, pH 8,0) a 37 ° C por aproximadamente 20 horas. Em seguida, os géis foram corados com Comassie Azul Brilhante R-250 e incubados em solução descorante (10% (v/v) de ácido acético e 40% (v/v) de metanol). A atividade gelatinolítica das metaloproteases (MMPs) foi detectada através da visualização de bandas não coradas sobre o fundo azul nos géis digitalizados. Como controle positivo utilizou-se meio condicionado de células tronco estromais mesenquimais da medula óssea (PMCS).

#### **4.17 Imunofluorescência e fluorescência direta**

As células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro na concentração final de  $3 \times 10^3$  em placa de 12 poços, e após os respectivos tratamentos, lavadas 2 x com PBS e fixadas com paraformaldeído e/ou metanol, dependendo da proteína a ser analisada.

Para imunofluorescência das proteínas E-caderina e claudina-3, as células foram fixadas com metanol puro gelado (-20°C) durante 20 min. Depois foram lavadas e reidratadas com PBS/CM (PBS com 100mM de CaCl<sub>2</sub> e 100mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 8,0). Posteriormente,

foram bloqueadas com 0,2% BSA e permeabilizadas com 0,1% Triton X-100 (60 min). Após lavagens com PBS, as lamínulas foram incubadas por 16 h com os anticorpos primários anti-E-caderina (1:300) e anti-claudina-3 (1:30). Para a imunofluorescência das proteínas cofilina-1, pcofilina-1 e vinculina as células foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS/CM (PBS contendo CaCl<sub>2</sub> 100 mM e MgCl<sub>2</sub> 100 mM, pH 8,0) durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, foram bloqueadas com 0,2% de BSA e 0,1% de Triton X-100 (pH 8,0) por 30 min. Foram lavadas com PBS por 3 vezes e incubadas com NH<sub>4</sub>Cl (20 mM, pH 8,0) em PBS/CM (pH 8,0) por 10 min. Após novas lavagens com PBS, seguiu-se com a incubação com anticorpos primários anti-vinculina (1:200), anti-cofilina-1 (1:200), ou anti-pcofilina-1 (1:100) em solução de bloqueio por 16 horas. Posteriormente, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e o anticorpo secundário conjugadas a Alexa fluor 488 ou 546 (diluição 1:200) foi adicionado por 1 h.

Para a marcação da actina e vimentina utilizamos fluorescência direta, as lamínulas foram lavadas com PBS e incubadas com Faloidina-TRITC (500ng/mL) ou com Faloidina-Atto 655 (0,4µM) por 30 min. As lamínulas foram novamente lavadas (4x) com PBS e incubadas com DAPI por 1 min, lavando em seguida por 4 vezes com PBS. Para a marcação da vimentina, após fixação, as células foram bloqueadas em solução contendo 0,2% de BSA e 0,1% de Triton-X-100 em PBS/CM durante 30 min, e após lavagens com PBS, foram incubadas por 15 min com NH<sub>4</sub>Cl (50 mM pH 8.0), em temperatura ambiente. Foi utilizado o anticorpo anti-vimentina conjugado ao fluorocromo Cy3 (diluição 1:300) por 30 min.

Por fim, todas as lâminas foram montadas em solução contendo reagente Antifade Gold ProLong (*Invitrogen*). Todas as imagens foram capturadas em microscópio confocal a laser (*Fluoview FV10i Overview, Olympus, EUA*) nos planos X, Y ou Z, em zoom de 1x ou 2x. Para análise das imagens, ajuste de coloração e contraste utilizou-se o *ICY bioimage analysis software*.

### **Microscopia de super resolução**

As imagens de super resolução foram obtidas usando a LSM 710 *microscope* (*Carl Zeiss, Germany*) equipado com PCO Edge sCMOS camera (PCO AG, Germany) utilizando as lentes PlanApochromat 63×/1.4 Oil DIC M27 e lasers 488 e 561-nm. A aquisição da imagem, e alinhamento para Microscopia de Iluminação Estruturada (*Structured Illumination Microscopy – SIM*) foram realizados utilizando o *software* Zeiss ZEN 2012 SP1 (*black edition, version 8.1.5.484*). Após a reconstrução e alinhamento das imagens, gerou-se imagens com visualizações de máxima projeção (*Maximum Intensity Projection-MIP*) por meio do Zeiss ZEN 2012 SP1 software. Para a determinação do perfil de intensidade de fluorescência

utilizou-se a função de perfil de plotagem do Zeiss ZEN 2012 SP1 software, assim traçou-se uma linha ao longo da imagem e mediu-se a intensidade de pixel ao longo dessa linha tracejada. O valor foi plotado contra a distância ao longo da linha. Para ajuste de coloração e contraste utilizou-se o *software ICY bioimage analysis*.

#### **4.18 Análises morfométricas**

##### ***Análise da circularidade, área e perímetro celular***

As células foram fixadas, coradas utilizando TRITC-faloidina e subsequentemente padrões morfométricos foram analisados. As imagens obtidas foram convertidas para 8 bits, as imagens fluorescentes foram alteradas para tons de cinza e *thresholded*, assim os perímetros celulares foram identificados. Para a avaliação do grau de polaridade celular (alongamento celular) utilizou-se o comprimento celular através do parâmetro *Feret's diameter* (que é o cálculo da distância entre dois pontos ao longo da borda) e a largura celular, que foi mensurada pelo eixo secundário (*Minor*) do *best fit ellipse* das células circulares (SIDANI et al., 2007). A polaridade, a área, o perímetro e a circularidade das células foram mensurados utilizando o *software ImageJ*. A circularidade foi calculada usando a fórmula  $4\pi \times [\text{Área}] / [\text{Perímetro}]^2$ . Na análise da circularidade o valor de 1 indica um círculo perfeito. Pelo menos duzentas células altamente distintas foram calculadas para cada condição (CAIN; VANHAESEBROECK; RIDLEY, 2010).

##### ***Análise do comprimento dos filamentos de actina e tamanho das adesões focais***

Para a análise quantitativa do comprimento médio dos filamentos de actina celular as células foram fixadas e marcadas utilizando TRITC-faloidina. As imagens microscópicas foram processadas nos *softwares* FV10-ASW e *ICY bioimage analysis*. Vinte células representativas por condição em cinco fotos de três experimentos independentes foram analisadas.

Para a quantificação da adesão focal, as células foram fixadas e marcadas com anticorpo anti-vinculina. As imagens obtidas foram convertidas para 8 bits e as imagens coloridas foram transformadas em escala de cinza. As células foram limitadas para evitar preenchimento artificial de áreas (STEFFEN et al., 2013). O tamanho das adesões focais foi quantificado usando o *software ImageJ*.

#### **4.19 Análises utilizando banco de dados TCGA**

Para análise da expressão gênica dos genes selecionados utilizou-se o banco de dados do projeto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (<https://cancergenome.nih.gov/>). Foram

selecionadas 622 amostras de RNA seq de tumores de cólon e reto depositados nesse banco de dados, assim como 51 amostras de RNA de cólon e reto normais. As amostras de RNA de CCR também foram classificadas segundo os estádios: I, II, III e IV.

#### **4.20 Análise estatística**

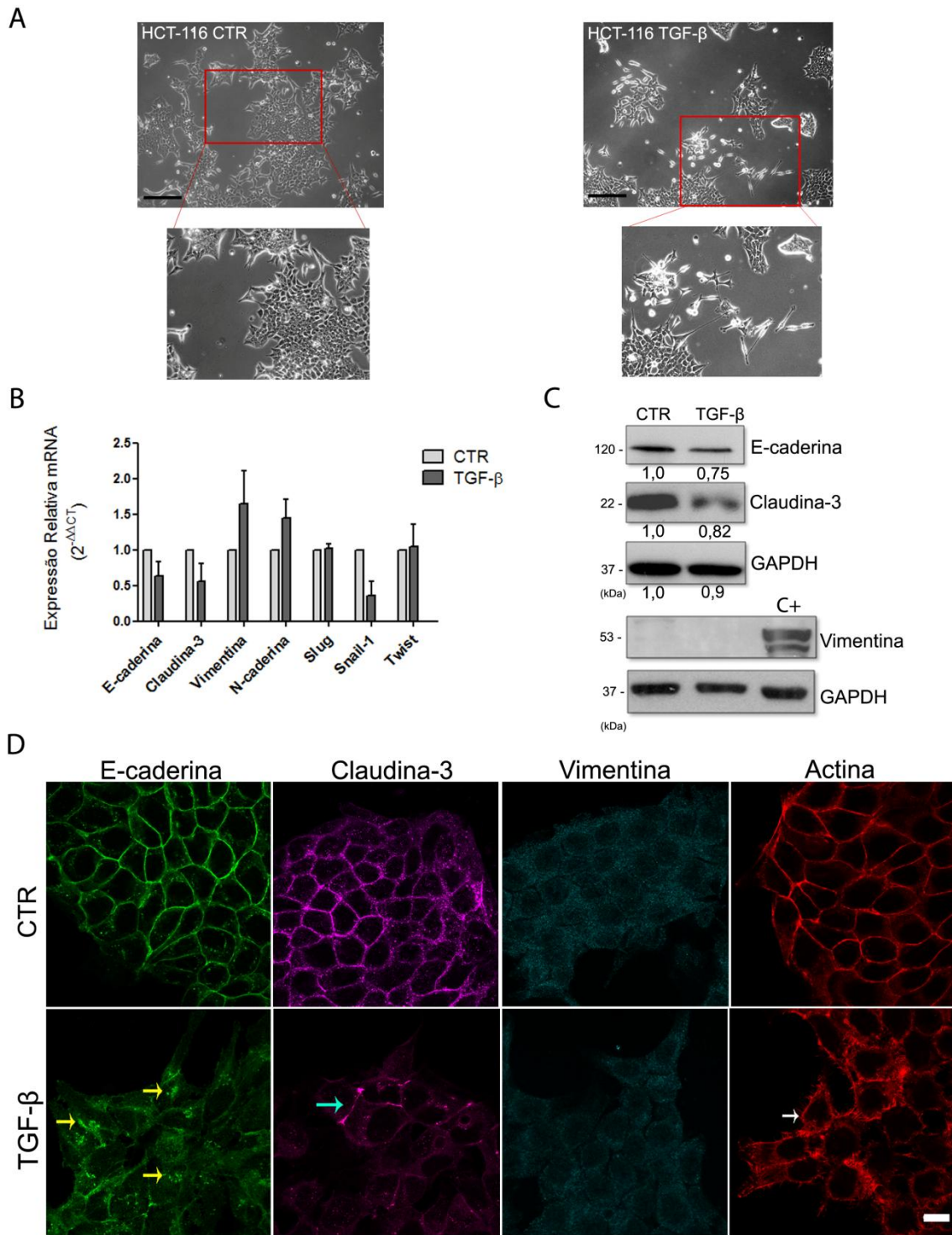
Para análise quantitativa dos experimentos, os valores foram calculados a partir de pelo menos três experimentos independentes usando o GraphPad Prism 5.0 (*GraphPad*™ *Software, San Diego, CA, EUA*), e imagens representativas foram exibidas. Os testes de normalidade (teste de Shapiro-Wilk e de D'Agostino-Pearson) foram utilizados para determinar se os dados das amostras possuíam distribuição normal usando o *software SPSS versão 25 (IBM Corporation)*. Para análise entre dois grupos utilizou-se o teste-*t* de *Student*. Para análise paramétrica, a análise da variância (ANOVA) *one-way* com pós-teste de Bonferroni foram utilizados para comparações entre grupos. Para análise não paramétrica, o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn foram utilizados para comparações entre os grupos. Em relação aos dados das amostras de pacientes, foi utilizado o teste-*t* de *Student* (não pareado) para análise entre 2 estádios. Para as análises de associação entre parâmetros clinicopatológicos e níveis das proteínas analisadas foi utilizado o teste de Qui-quadrado seguido do cálculo do valor de Fisher's. Para os dados do TCGA, o teste estatístico utilizado foi o de *Kruskal-Wallis* com o pós-teste de *Wilcoxon rank sum*. A correlação utilizando o coeficiente de *Pearson* e a análise de regressão linear foi realizada. As diferenças foram consideradas significativas quando: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  e \*\*\*\*  $P < 0,0001$ .

## 5 RESULTADOS PARTE I

### 5.1 Caracterização de modelo de indução da TEM *in vitro* em células HCT-116 e HT-29 pelo tratamento com TGF- $\beta$

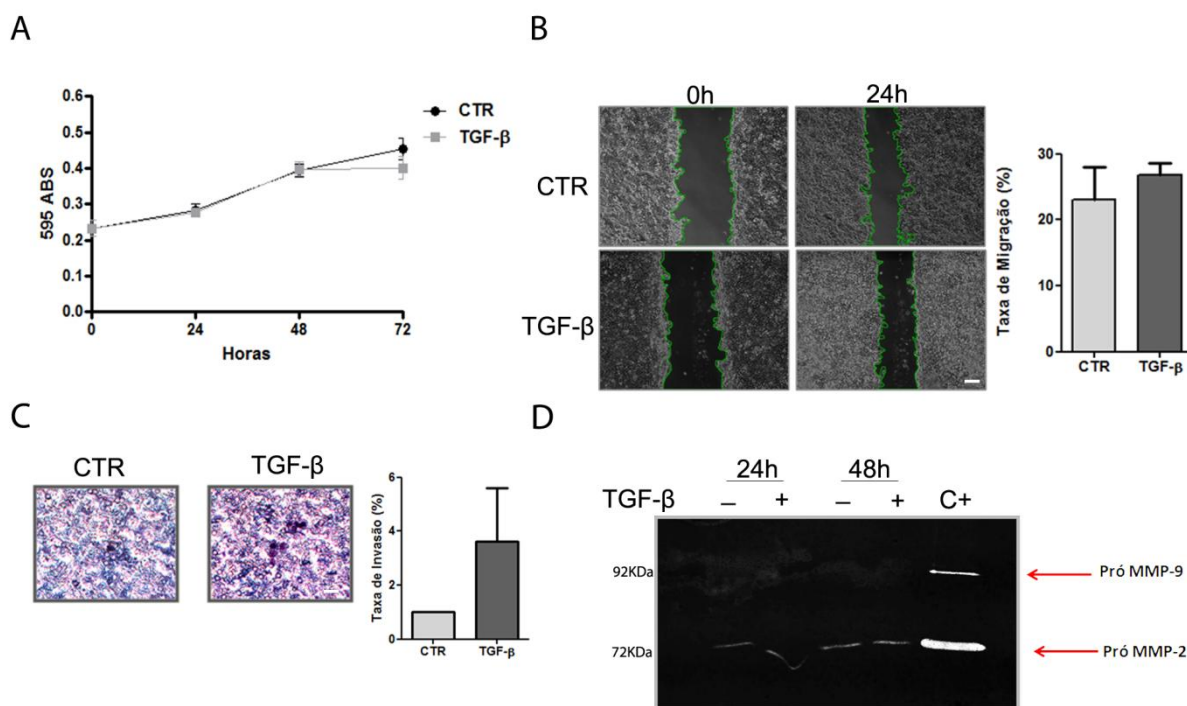
Inicialmente, foi avaliado se células de adenocarcinoma de cólon, HCT-116 e HT-29, poderiam entrar em TEM *in vitro*. Para isso utilizou-se o tratamento com TGF- $\beta$ , um indutor bem conhecido da TEM (KASAI et al., 2005; KAWATA et al., 2012). Como as células HCT-116 são indiferenciadas e com morfologia fusiforme, não foi possível avaliar morfológicamente a TEM pelo tratamento com este indutor, embora as células tratadas exibiram maior quantidade de filopódios que as células controle (Fig. 5.1A). Quando se avaliou a expressão dos fatores transcricionais SLUG, TWIST e SNAIL, foi verificado que o tratamento com TGF- $\beta$  não alterou significativamente os níveis de transcritos dos mesmos. Do mesmo modo, os transcritos de E-caderina e claudina-3 encontraram-se reduzidos, porém sem relevância estatística. O mesmo ocorreu com os níveis de RNAm de proteínas mesenquimais vimentina e N-caderina (Fig. 5.1B). Por outro lado, os níveis proteicos de E-caderina e claudina-3 mostraram-se reduzidos nas células tratadas, assim como exibiram redistribuição saindo dos contatos celulares e acumulando na região citoplasmática. Finalmente, o tratamento com TGF- $\beta$  não foi capaz de induzir a síntese da proteína vimentina (Fig. 5.1C e D). Em relação ao citoesqueleto de actina, foi possível observar pequenas projeções de membrana nas células tratadas (Fig. 5.1A e D).





**Figura 5.1- Análise da expressão e localização de proteínas epiteliais e mesenquimais em células HCT-116 tratadas com TGF-β.** (A) Imagens obtidas por microscopia de contraste de fase de células HCT-116 controle e tratadas com TGF-β por 48h. Barra: 50 μm. (B) Perfil de expressão gênica de fatores transcricionais, de genes mesenquimais e epiteliais obtidos por RT-qPCR. (C) Análise dos níveis proteicos das proteínas E-caderina, claudina-3 e vimentina. Como proteína constitutiva, controle endógeno, utilizou-se marcação da proteína GAPDH. Como controle positivo da marcação da proteína vimentina utilizou-se lisado de proteínas totais extraídas da linhagem celular A549 (C+). Os números abaixo das bandas referem-se a média de valores da densitometria normalizados pelo controle. Em B e C, dados representativos da média ± SEM de no mínimo três experimentos independentes. (D) Imunofluorescência obtidas por microscopia confocal das proteínas indicadas. As setas amarelas indicam localização aberrante de E-caderina na região citoplasmática. A seta ciana indica região com resquício de claudina-3 nas junções *Tight*. A seta branca indica formação de filopódios. Barra: 20μm.

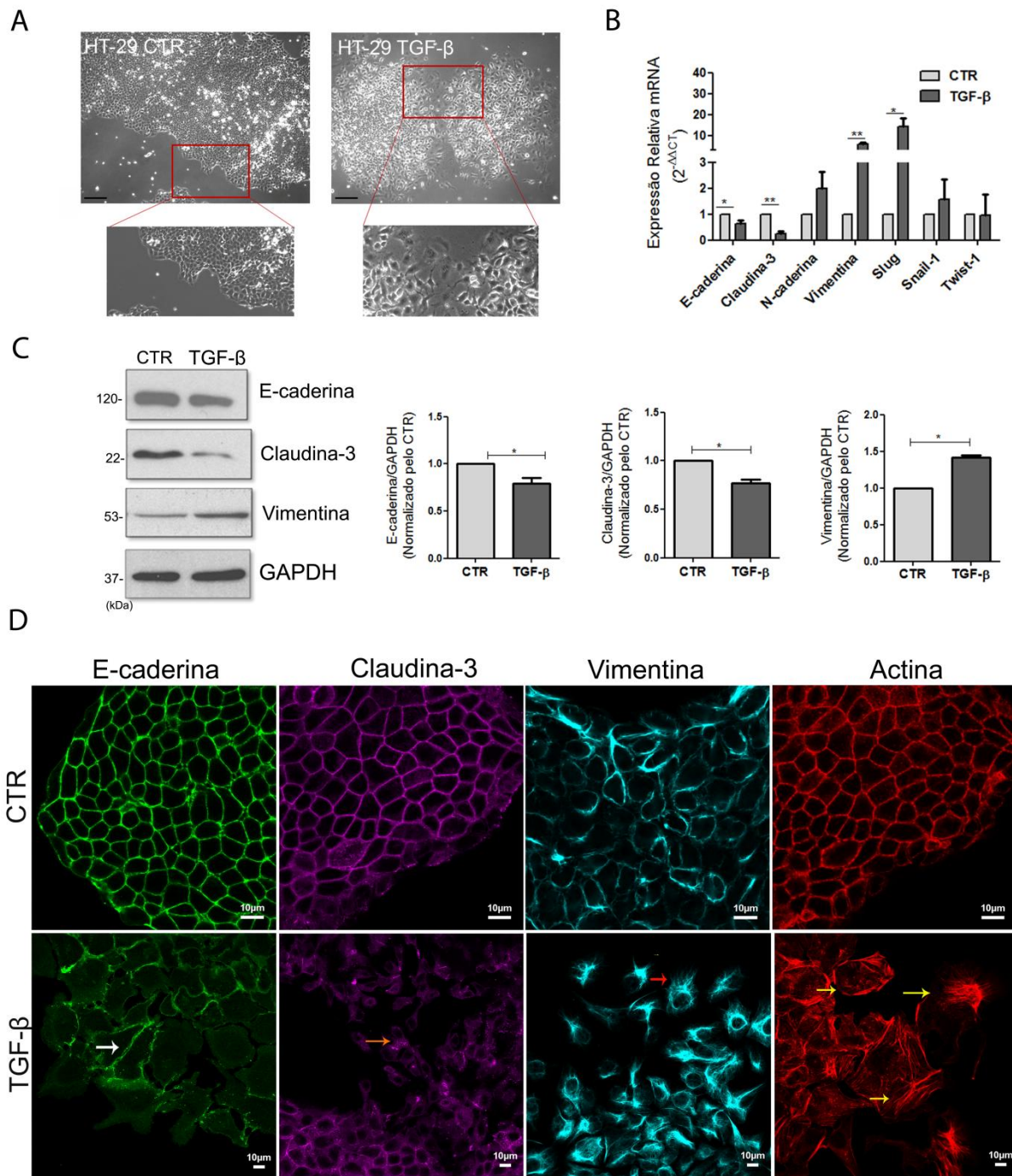
Subsequentemente para validar a indução da TEM em termos funcionais, o potencial maligno das células HCT-116 sob tratamento com o TGF- $\beta$  foi avaliado. Não houve diferenças significativas nas taxas de crescimento celular (Fig.5.2A), migração (Fig.5.2B), invasão (Fig.5.2C), e na atividade de metaloproteases (Fig.5.2D) em células HCT-116 tratadas com TGF- $\beta$  em relação às células controle. Esse conjunto de dados sugere o tratamento com TGF- $\beta$  em células HCT-116 não estimula a TEM.



**Figura 5.2 - Análise do potencial maligno de células HCT-116 tratadas com TGF- $\beta$ .** (A) Crescimento celular utilizando a técnica de coloração por cristal violeta. (B) As células foram cultivadas até atingirem a confluência, submetidas a técnicas de Wound Healing, e em seguida tratadas com TGF- $\beta$  por 24 h para avaliação da migração celular. (C) Para análise do ensaio de invasão, as células foram adicionadas aos insertos revestidos de matrigel sendo estimuladas com TGF- $\beta$  por 24 h. Como quimioatraente utilizou-se DMEM à 10% de SFB (D) Meios de cultura condicionados derivados de células controle e tratadas com TGF- $\beta$  foram submetidos ao ensaio de zimografia para avaliar a atividade de metaloproteases. Como controle positivo utilizou-se meio condicionado de células tronco embrionárias mesenquimais da medula óssea (C+). Em C e D análise estatística realizada pelo teste-t de Student - n.s. (não significativo). Os gráficos de C e D representam os dados normalizados como porcentagem de migração ou invasão de células tratadas em relação às células controle. Dados representativos da média  $\pm$  SEM de no mínimo três experimentos independentes. Barra: 50 $\mu$ m.

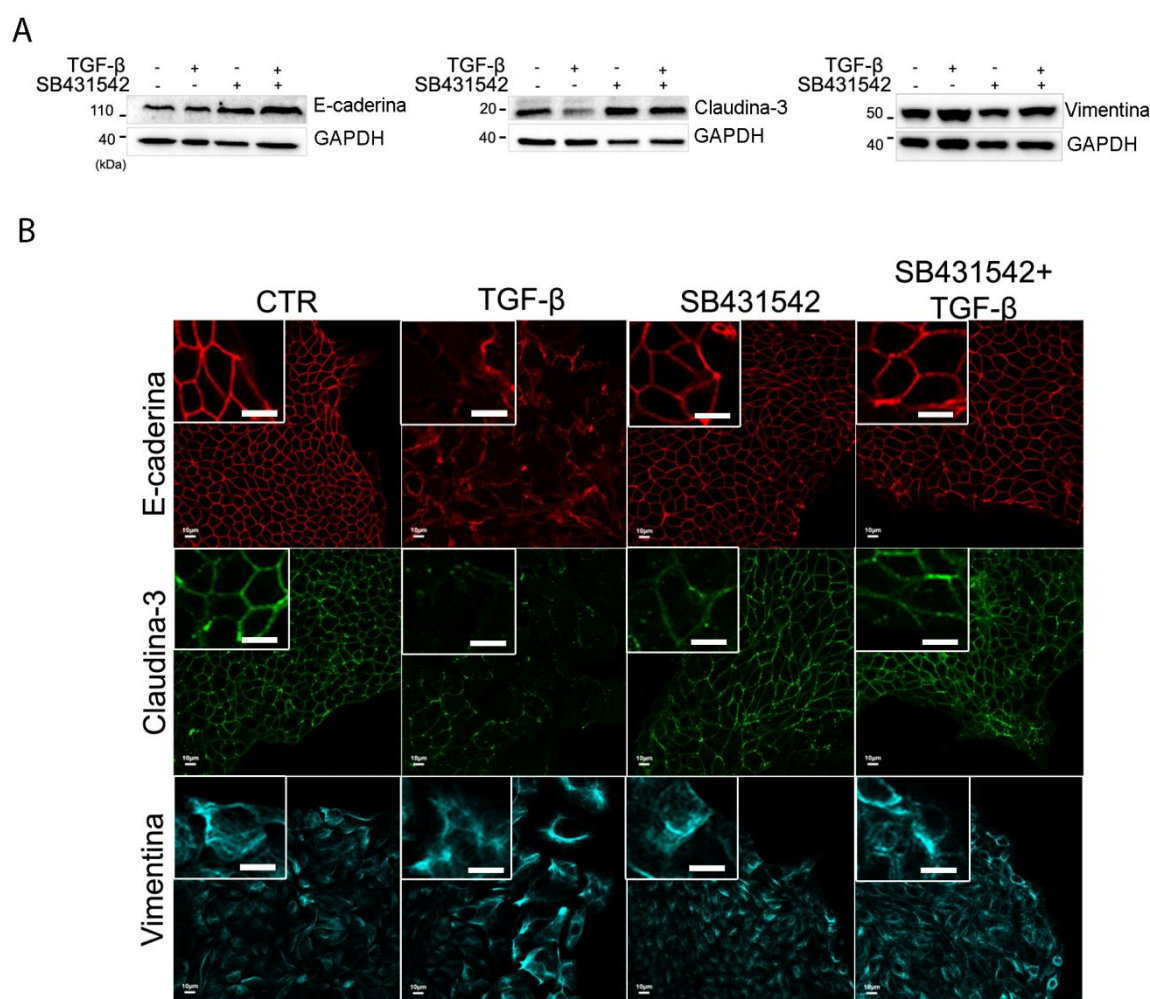
Em seguida foi avaliado se células HT-29, que são moderadamente diferenciadas e com invasividade intermediária, poderiam iniciar o programa de TEM pelo tratamento com TGF- $\beta$ . Foi verificado que após 48 h de tratamento com esse indutor as células das bordas das ilhas exibiram morfologia fusiforme e começaram a destacar uma das outras (Fig.5.3A). Observou-se também aumento da expressão gênica de SLUG, e consequentemente redução na expressão gênica de E-caderina e claudina-3 e aumento significativo de vimentina (Fig.5.3B). Contudo, não se observou aumento de expressão de SNAIL e TWIST. Nas células tratadas os níveis proteicos de E-caderina e claudina-3 foram reduzidos significativamente em relação ao

controle, por outro lado os níveis de vimentina aumentaram nestas células (Fig.5.3C). Os níveis transcricionais de N-caderina apresentaram-se elevados nas células tratadas, porém sem relevância estatística. Em adição, foi possível observar mudança de localização juncional para a citoplasmática, tanto para a E-caderina quanto para a claudina-3, no entanto, algumas células ainda apresentaram localização juncional de E-caderina (Fig.5.3D). Em relação às proteínas mesenquimais, nas células controle a vimentina exibiu localização perijuncional, já as células tratadas exibiram estruturas filamentosas distribuídas em redes ao longo das células (Fig.5.3D). O citoesqueleto de actina nas células controle apresentou-se bem delimitado, circundando entre uma célula a outra (actina cortical), já as células tratadas exibiram-se mais desagregadas, as células das bordas das ilhas exibiam lamelipódios e fibras de stress. Assim, esse conjunto de dados demonstra que a linhagem celular HT-29 sob tratamento com TGF- $\beta$  foi mais apropriada para ser usada como modelo de indução da TEM.



**Figura 5.3 - Análise da expressão e localização de proteínas epiteliais e mesenquimais em células HT-29 tratadas com TGF-β.** (A) Imagens obtidas por microscopia por contraste de fase de células HT-29 controle e tratadas com TGF-β por 48h para análise de morfologia. Barra: 50 μm. (B) Perfil de expressão gênica de fatores transcricionais, genes mesenquimais e epiteliais avaliados por RT-qPCR. (C) Análise dos níveis proteicos das proteínas E-caderina, claudina-3, e vimentina. Como proteína constitutiva utilizou-se marcação da proteína GAPDH. Os gráficos representam os dados normalizados dos níveis proteicos em relação ao controle (CTR=1). Dados representativos da média ± SEM de no mínimo três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste-t de Student e a diferença foi considerada significativa quando: \* P<0,05, e \*\* P<0,01. (D) Localização subcelular das proteínas indicadas por imunofluorescência e microscopia confocal. A seta branca indica a E-caderina nas junções celulares. A seta laranja indica acúmulo citoplasmático de claudina-3. A seta vermelha mostra a reorganização em rede dos filamentos de vimentina, e as amarelas indicam a formação de lamelipódio e fibras de stress em células marcadas para F-actina.

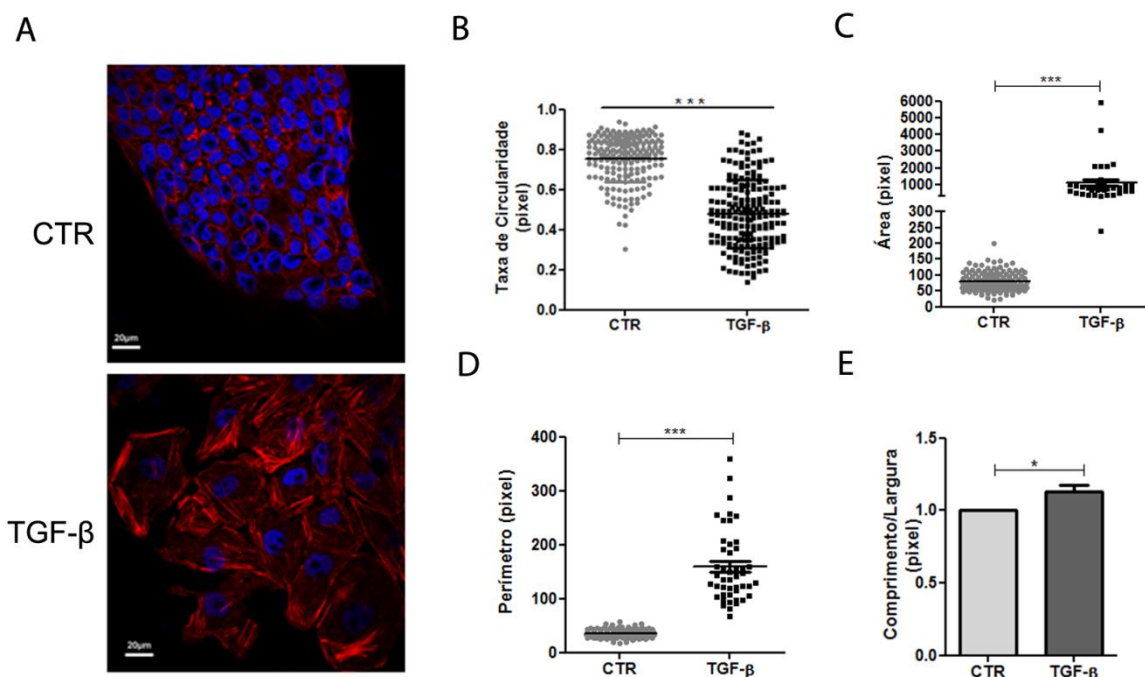
Subsequentemente, para demonstrar que os efeitos observados eram via a sinalização do TGF- $\beta$  as células foram tratadas com SB434215, um inibidor do receptor 1 do TGF- $\beta$ . A figura 5.4A demonstra que os níveis proteicos de E-caderina e claudina-3 foram restabelecidos no grupo TGF- $\beta$  + SB434215, onde os níveis de E-caderina se apresentaram até aumentados em relação ao controle, tanto no tratamento em conjunto com TGF- $\beta$ , quanto administrado sozinho. Em adição, os níveis de vimentina apresentaram-se reduzidos quando as células foram tratadas com TGF- $\beta$  + SB434215 em relação ao grupo tratado somente com TGF- $\beta$ . Foi constatado também que o inibidor SB434215 foi capaz de reverter a localização subcelular das proteínas E-caderina e claudina-3 do citoplasma para as junções nas células cotratadas com TGF- $\beta$  e SB431542. Por outro lado, o padrão morfológico de vimentina não se alterou mediante o tratamento com TGF- $\beta$  e SB434215 (Fig.5.4B). Quanto à morfologia celular, foi possível observar que o tratamento com este inibidor restabeleceu o formato cuboide de células epiteliais, além de não se observar projeções de membrana em células cotratadas com TGF- $\beta$  e SB431542. Dessa forma, esses dados demonstram que os efeitos anteriormente observados se devem a ativação da via de TGF- $\beta$ .



**Figura 5.4 - Análise dos níveis proteicos e localização subcelular de marcadores da TEM em células HT-29 tratadas com TGF- $\beta$  e SB431542.** As células foram pré-tratadas por 1 h com o SB431542 e em seguida tratadas com TGF- $\beta$  por 48 h. (A) Análise dos níveis proteicos por *Western Blotting* das proteínas E-caderina, claudina-3 e vimentina. Como controle endógeno utilizou-se a marcação da proteína GAPDH. (B) Localização subcelular das proteínas indicadas por imunofluorescência e microscopia confocal. Observe o efeito inibidor do SB431542 sobre o tratamento com TGF- $\beta$ . Dados representativos de quatro experimentos independentes. Análise estatística foi realizada pelo teste *One Way ANOVA*, os dados não apresentaram diferença estatística.

Em continuidade, para refinar a análise do padrão morfológico exibido pelas células HT-29 tratadas com TGF- $\beta$ , foram realizadas análises morfométricas dessas células (ZAMAN et al., 2006; SIDANI et al., 2007; LEHMANN et al., 2017). Quando as células foram tratadas com TGF- $\beta$  exibiram aumento de tamanho, efeito observado tanto em relação ao núcleo quanto ao restante da célula (Fig. 5.5A). As células epiteliais apresentaram padrão morfológico cuboide a cilíndrico, já as células mesenquimais eram mais esticadas e apresentaram padrão fusiforme à semi-fusiforme, nesse sentido foi avaliado o grau de circularidade das células controle e das células tratadas. O gráfico da figura 5.5B, reflete o quanto as células controle são próximas de um círculo perfeito morfológicamente (igual a 1), porém quanto mais distante de 1, mais mesenquimal a célula pode ser, padrão esse exibido pelas células tratadas e com relevância estatística. Posteriormente, foram avaliados a área e o perímetro das células. Conforme observado na figura 5.5C e D, as células tratadas exibiram

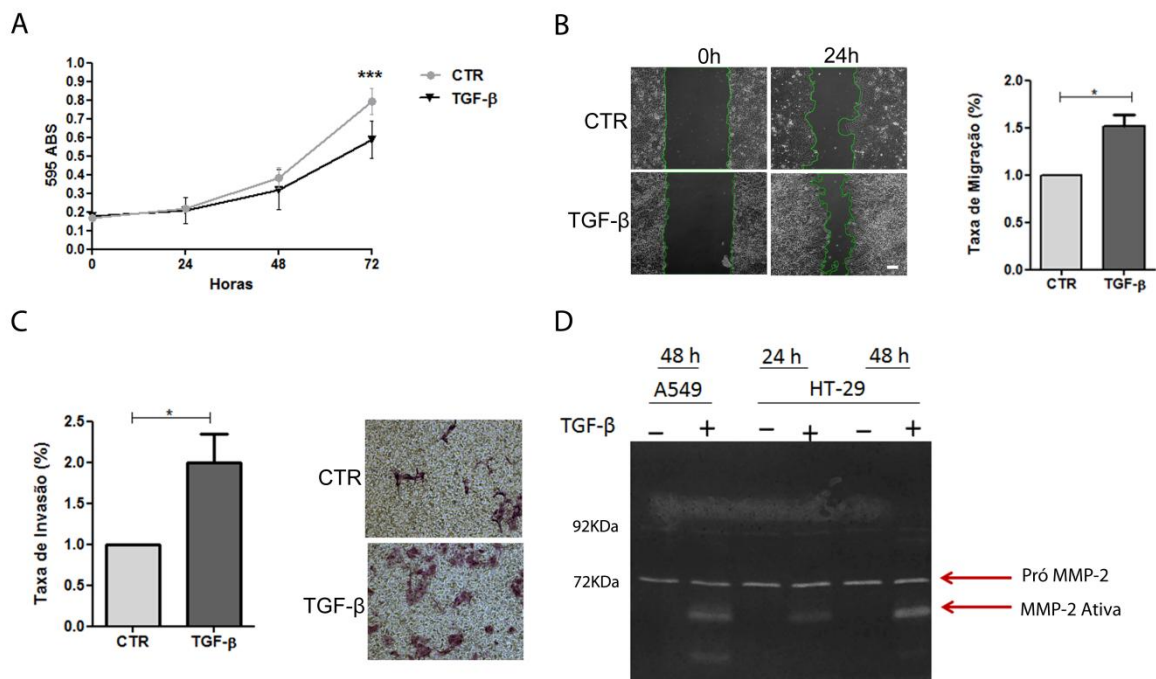
valores maiores em ambos os parâmetros, demonstrando o quanto são maiores do que as células controle. Possivelmente devido ao aumento de projeções de membrana bem como aumento do volume nuclear e citoplasmático exibido por estas células. Por fim, analisou-se o comprimento/largura das células com a finalidade de avaliar o alongamento celular, e conforme indicado na figura 5.5E, as células tratadas apresentaram-se mais alongadas em relação às células controle, compatível para parâmetros de células mesenquimais.



**Figura 5.5 - Análises morfométricas de células HT-29.** (A) Micrografias de células HT-29 tratadas ou não com TGF- $\beta$  por 48hs. As células foram marcadas para actina com Faloidina-TRITC (vermelho), o núcleo foi marcado com DAPI (Azul) e avaliadas em microscopia confocal. Barra: 20 $\mu$ m. (B), (C), (D) e (E) Análises dos parâmetros de circularidade, área, perímetro e comprimento/largura. Utilizou-se aproximadamente 150 células, de 3 ou mais micrografias de experimentos independentes. Os dados foram dados em pixel. Análise estatística realizada pelo teste-*t* de Student e a diferença foi considerada significativa quando: \* P<0,05, \*\* P<0,01 e \*\*\* P<0,001.

O próximo passo foi avaliar eventos funcionais relacionados com o desenvolvimento da TEM. Inicialmente foi avaliado o efeito do TGF- $\beta$  no crescimento celular. Observou-se que o tratamento com este indutor promoveu redução do crescimento após 48 h de tratamento em relação ao controle, este efeito foi mais acentuado e relevante em 72 h de tratamento (Fig. 5.6A). Além disso, foi observado que o TGF- $\beta$  estimulou aumento da migração e invasividade assim como maior atividade da metaloprotease MMP2 nas células tratadas (Fig. 5.6 B, C e D).

Juntos, esse conjunto de dados demonstra que células HT-29 podem entrar em TEM nas condições experimentais estabelecidas.



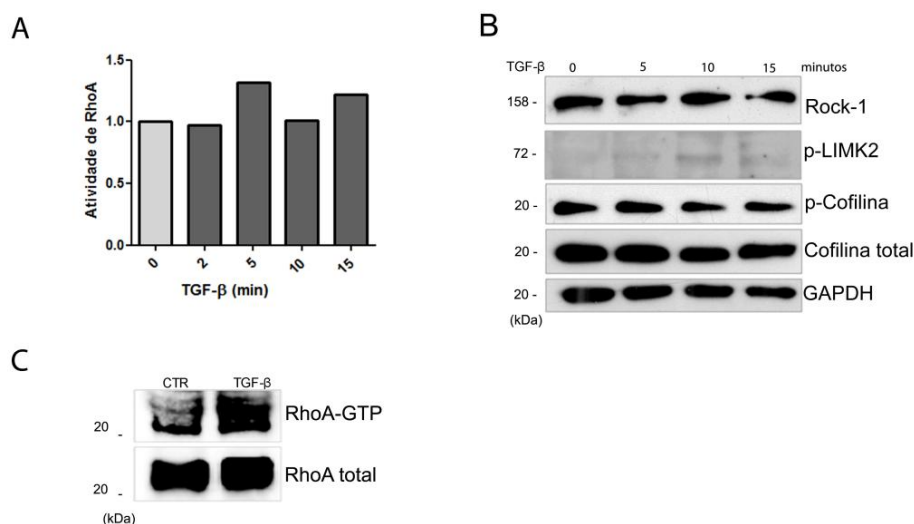
**Figura 5.6 - Análise do potencial maligno de células HT-29 tratadas com TGF-β.** (A) Análise do crescimento celular pela técnica de coloração por cristal violeta. (B) As células foram cultivadas em duplicatas até atingirem a confluência, submetidas a técnicas de *Wound Healing*, e em seguida tratadas com TGF-β por 24 h para avaliação da migração celular. (C) Para análise do ensaio de invasão, as células foram adicionadas aos insertos revestidos de matrigel sendo estimuladas com TGF-β por 24 h. Como quimioatratante utilizou-se meio DMEM a 10% de SFB. (D) Meios de cultura condicionados derivados de células controle e tratadas com TGF-β foram submetidos ao ensaio de zimografia para análise da atividade de metaloproteases. Como controle positivo utilizou-se meio condicionado de células A549. Os gráficos de barra representam os dados normalizados como porcentagem de migração ou invasão de células tratadas em relação as células controle. Dados representativos da média ± SEM de no mínimo três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste-*t* de Student e a diferença foi considerada significativa quando: \* P<0,05, \*\* P<0,01 e \*\*\* P<0,001. Barra: 50µm.

## 5.2 Avaliação da via de sinalização não canônica RhoA-pLIMK2-pcofilina-1 quanto à indução do fenótipo TEM mediante tratamento com TGF-β em células HT-29

Durante a TEM a polaridade celular de apical-basal é alterada para ântero-posterior, com isso a organização dos filamentos da actina também é modificada resultando no alongamento do formato celular, propiciando o direcionamento e o aumento da capacidade migratória das células tumorais (FIFE; MCCARROLL; KAVALLARIS, 2014; UNGEFROREN; WITTE; LEHNERT, 2018). A via de sinalização não canônica do TGF-β envolve a ativação das Rho-GTPases, onde nos estágios iniciais RhoA é ativada a *downstream* à ativação dos receptores de TGF-β. Nesse contexto, sabendo que o tempo de ativação desta GTPase é curto, a atividade de RhoA nos tempos de 2, 5, 10 e 15 min após o tratamento do TGF-β foram avaliados. Conforme observado na figura 5.7A, o TGF-β induziu aumento da atividade de RhoA nos tempos de 5 e 15 min. Em seguida com a finalidade de confirmar esse resultado, avaliou-se por *Western Blotting* a fosforilação dos alvos *downstream* de RhoA. No tempo 10 min ocorreu aumento da fosforilação de LIMK2, contudo



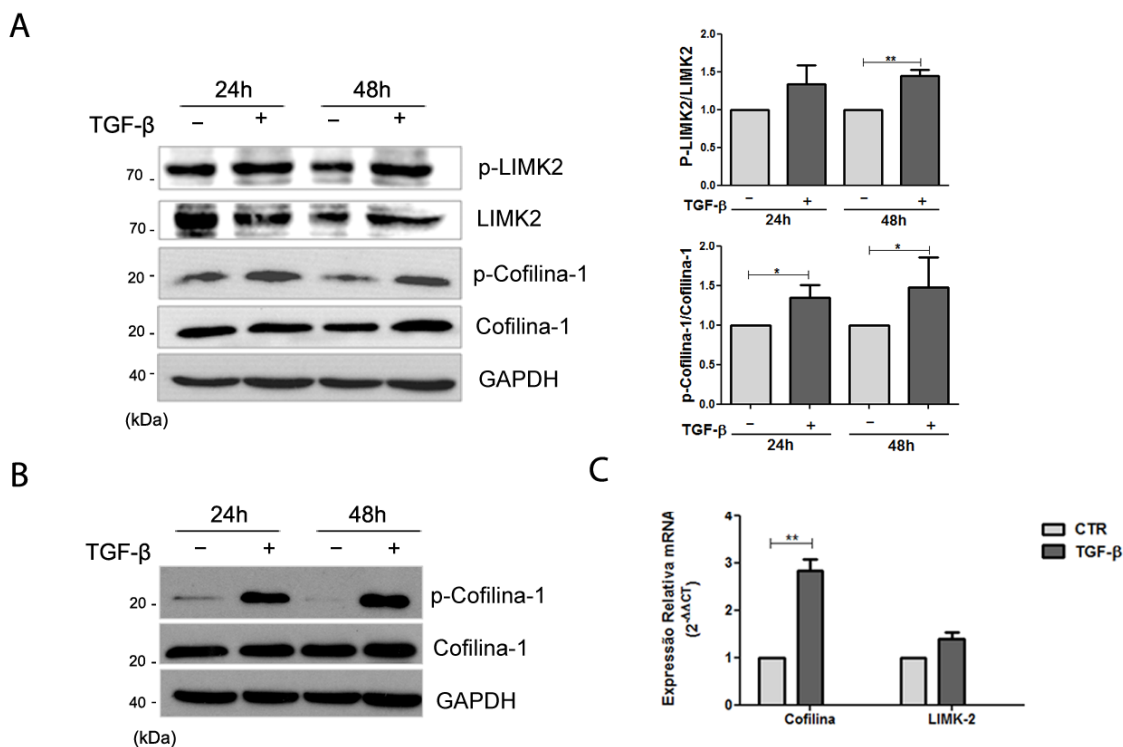
no tempo de 15 min observou-se diminuição da fosforilação desta proteína, demonstrando assim ativação subsequente à ativação de RhoA. Uma vez fosforilada, LIMK2 pode fosforilar a proteína cofilina-1 (inativando-a), por essa razão analisou-se seu *status* de fosforilação e observou-se que com 5 min de tratamento com TGF- $\beta$  seus níveis de fosforilação começam a aumentar, porém redução nos tempos subsequentes foi observada (Fig.5.7B). Como os experimentos relativos à TEM serão conduzidos no tempo 48h após o tratamento com TGF- $\beta$ , decidiu-se avaliar a atividade de RhoA por detecção de RhoA-GTP utilizando o ensaio de *pull-down* nesse tempo. A figura 5.7C demonstra níveis maiores de RhoA-GTP em células tratadas com TGF- $\beta$  quando comparadas com o controle. Assim, esses dados demonstram que a via de sinalização RhoA-pLIMK2-pcofilina-1 é ativada em tempos iniciais e em 48 h mediante tratamento com TGF- $\beta$ .



**Figura 5.7 - Análise da ativação da via de sinalização de RhoA após o tratamento com TGF- $\beta$  em células HT-29.** (A) Células foram tratadas como indicado e a atividade da proteína RhoA foi detectada e quantificada utilizando o kit G-lisa®. Dados representam um experimento. (B) Análise dos níveis proteicos de alvos *downstream* da proteína RhoA. As células foram tratadas nos tempos indicados e em seguida ocorreu a extração de proteínas totais e *Western blotting*. Como proteína constitutiva utilizou-se marcação da proteína GAPDH. Dados representam um experimento. (C) Ensaio de *Pull-down* para determinar níveis de atividade de RhoA por detecção de RhoA-GTP com Rhotekin RBD. Células HT-29 foram plaqueadas e estimuladas com TGF- $\beta$  por 48 h. Após o *Pull-down* o lisado e precipitado foram usados para determinar os níveis de RhoA-GTP por *Western blotting*. Dados representam dois experimentos.

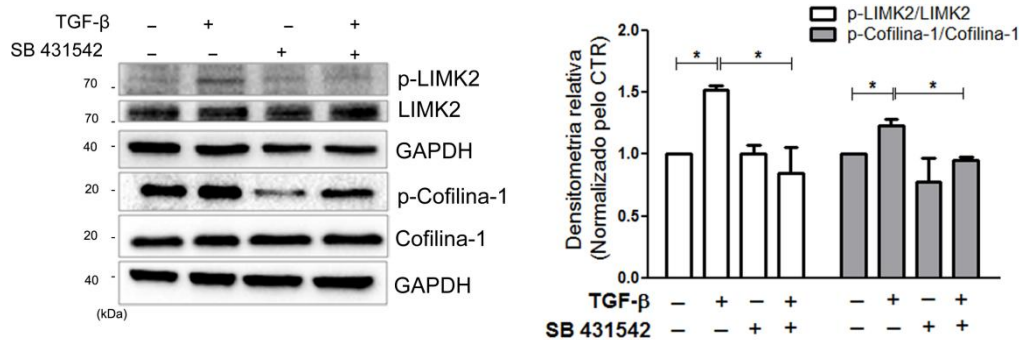
Como efetora final da via de RhoA, a proteína cofilina-1 possui papel central no controle da dinâmica da actina. Através da sua atividade de corte catalisa a polimerização e despolimerização da actina, além de induzir a nucleação dendrítica e a ruptura dos filamentos de actina. Uma das formas de sua regulação consiste na fosforilação de ROCK, que fosforila as proteínas LIMKs, que em seguida fosforila cofilina-1, inativando-a, e assim impedindo que cofilina-1 corte o filamento de actina (UNGEFROREN; WITTE; LEHNERT, 2018). Nesse

contexto, o próximo passo foi a avaliação da atividade do eixo LIMK2-pcofilina-1 nas células HT-29 tratadas com TGF- $\beta$ . Para verificar se o tratamento com TGF- $\beta$  poderia ativar LIMK2 em tempos tardios (24 e 48 h) avaliou-se por *Western Blotting* os níveis de fosforilação de LIMK2. A figura 5.8A demonstra que a fosforilação de LIMK2 encontrou-se aumentada tanto nos tempos de 24 e 48 h de tratamento. Corroborando esse dado, as células HT-29 exibiram aumento significativo da fosforilação do cofilina-1 nesses mesmos tempos (Fig. 5.8A). Esses resultados foram comparados pela mesma análise agora utilizando a linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão A549, sabidamente conhecida na literatura por ativar a via de RhoA e por desenvolver TEM sob tratamento com TGF- $\beta$  (BIONDINI et al., 2015). A figura 5.8B demonstra que tal linhagem tem altos níveis de pcofilina-1 quando aplicado o mesmo protocolo de tratamento, confirmando os dados referentes à linhagem intestinal HT-29. Em adição, foi avaliado se o tratamento poderia interferir na expressão do RNAm de LIMK2 e cofilina-1. Conforme pode-se observar na figura 5.8C, os níveis de RNAm de cofilina-1 apresentaram-se aumentados nas células tratadas com TGF- $\beta$  em relação às controle. A mesma tendência observou-se para a expressão gênica de LIMK2, embora sem relevância estatística. Portanto, esse conjunto de dados demonstra que TGF- $\beta$  induz aumento de expressão gênica de cofilina-1 assim como ativação de LIMK2, por meio de sua fosforilação com consequente fosforilação de cofilina-1.



**Figura 5.8 - Análise da atividade de cofilina-1 e expressão gênica em células HT-29 após o tratamento com TGF-β.** (A) Análise do perfil de fosforilação de LIMK2 (Thr505) e cofilina-1 (Ser3) após tratamento com TGF-β. (B) Como controle utilizou-se o padrão de fosforilação de cofilina-1 da linhagem celular A549. Blottings representativos de 3 experimentos independentes. Em A e B a proteína constitutiva utilizada foi GAPDH. (C) Avaliação por RT-PCR dos níveis do RNAm de cofilina-1 e LIMK2 em células controle e tratadas por 48h. Os gráficos representam os dados normalizados como porcentagem a partir de valores da densitometria de células tratadas em relação as células controle. Dados representativos da média ± SEM de no mínimo três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste-*t* de Student e a diferença foi considerada significativa quando: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$ .

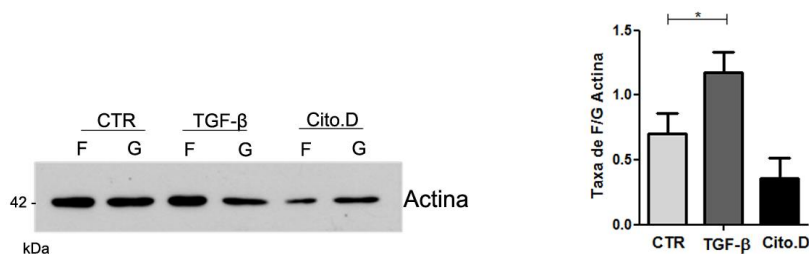
Com a finalidade de confirmar essa ativação do eixo LIMK2/pcofilina-1 observada, células HT-29 foram tratadas novamente com SB434215 inibidor do receptor 1 do TGF-β. Como demonstrado na figura 5.9, o tratamento com o SB431542 reverteu a fosforilação em LIMK2, e conseqüentemente a fosforilação de cofilina-1 nas células tratadas com TGF-β em níveis próximos exibidos pelo controle. As células tratadas somente com SB431542 apresentaram níveis de fosforilação de cofilina-1 menores que as células controle. Esses dados confirmam que o TGF-β pode modular o eixo LIMK-2/pcofilina-1 em células HT-29.



**Figura 5.9- Análise dos níveis totais e fosforilados de LIMK2 e cofilina-1 em células HT-29 tratadas com SB431542.** As células foram pré-tratadas por 1 h com o SB431542 e em seguida tratadas com TGF-β por 48 h. Análise dos níveis proteicos por *Western Blotting* da fosforilação de LIMK2 (Thr505) e cofilina-1 (Ser3). O gráfico representa dados normalizados como porcentagem a partir de valores da densitometria de células tratadas em relação as células controle. Como proteína constitutiva utilizou-se marcação da proteína GAPDH. Dados representativos da média ± SEM de no mínimo três experimentos independentes. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e a diferença foi considerada significativa quando: \* P<0,05.

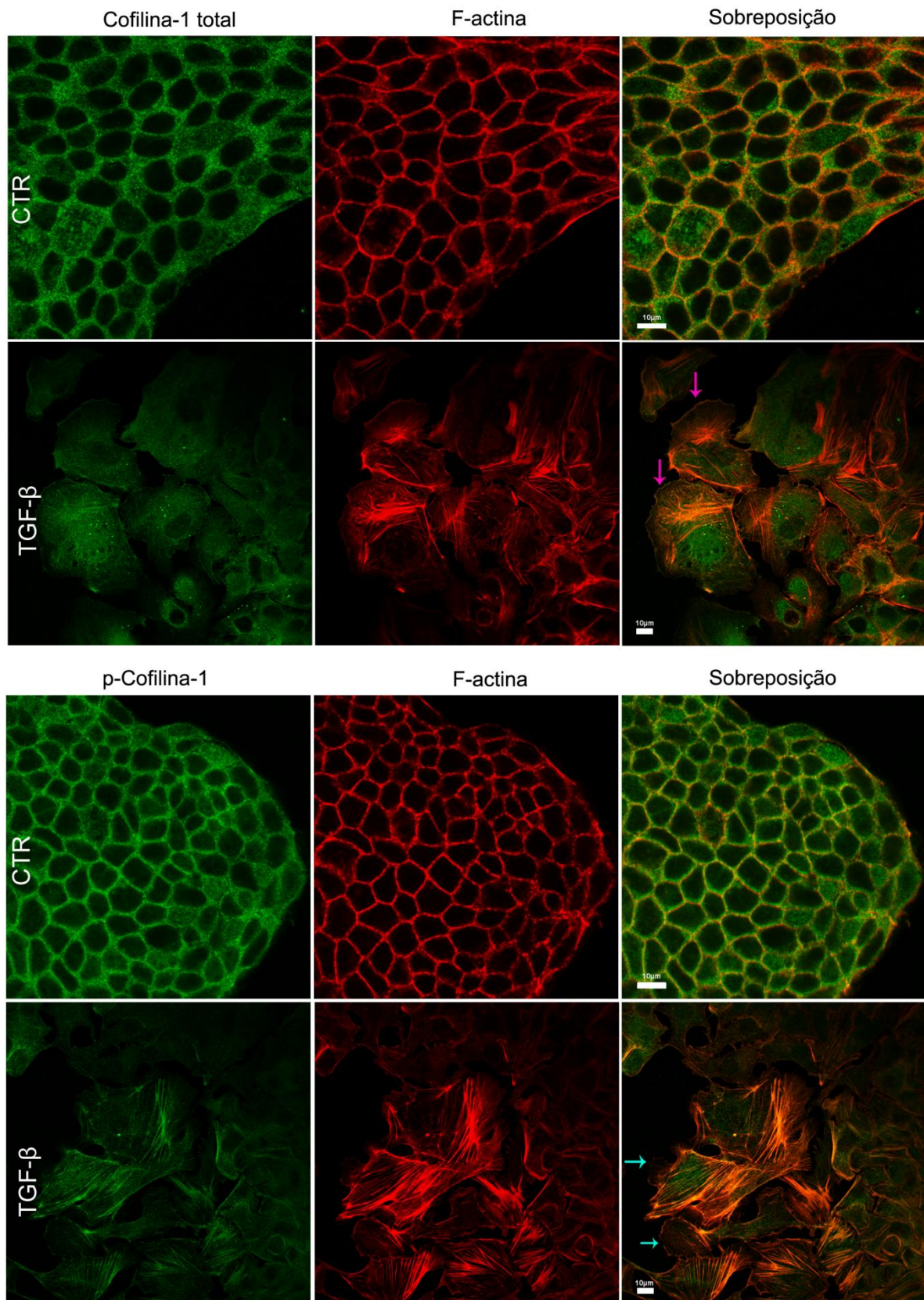
Para determinar se a fosforilação de cofilina-1 teve impacto na dinâmica do citoesqueleto de actina, uma vez que a actina é seu substrato de ação, o *pool* de G-actina e F-actina após o tratamento com TGF-β foram quantificados por meio da técnica de fracionamento celular de F-actina e G-actina mediante solubilidade em Triton-X100. Observou-se que células tratadas com TGF-β tiveram níveis mais elevados de F-actina do que as células controle. Como controle da técnica utilizou-se células tratadas com Citocalasina D, que impede a polimerização dos filamentos de actina, aumentando o *pool* de actina globular (G-actina). Uma vez fosforilada, cofilina-1 perde sua afinidade pela actina, impedindo seu corte e o efeito disso é o aumento da quantidade de F-actina celular e redução nos níveis de G-actina, conforme aqui observado nas células HT-29 tratadas (Fig. 5.10).

Esses dados demonstram que a via LIMK2/pcofilina-1 é ativa mediante sinalização de TGF-β e aumenta os níveis celulares de F-actina.



**Figura 5.10 - Análise do *pool* de G-actina e F-actina mediante tratamento com TGF- β em células HT-29.** As células foram tratadas com TGF- β por 48 h e em seguida ocorreu o fracionamento da actina. Como controle da técnica utilizou-se o tratamento com Citocalasina D. Dados representativo da três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste-t de *Student* e a diferença foi considerada significativa quando: \* P<0,05.

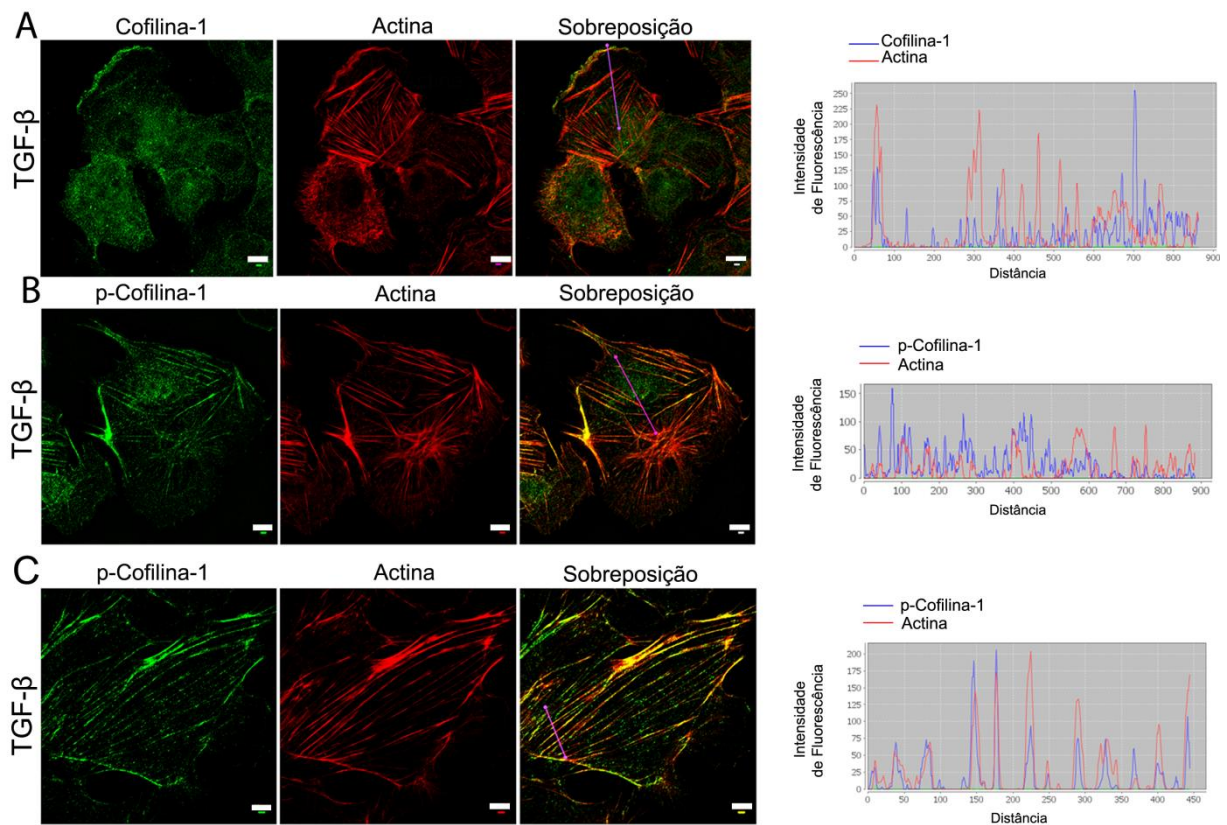
Uma vez constatada a ativação da via de sinalização RhoA-pLIMK2-pcofilina-1 e consequente efeito sob o citoesqueleto de actina nas células tratadas, a localização subcelular da cofilina-total e pcofilina-1 além do padrão organizacional do citoesqueleto de actina nas células em TEM induzidas pelo TGF- $\beta$  foram avaliados por microscopia confocal (Fig. 5.11). Foi possível observar que células controle exibiram cofilina-total marcada principalmente nos contatos celulares, algumas células apresentaram marcação no núcleo. Pela sobreposição de imagens da marcação de cofilina-total e actina nas células controle, sugere-se colocalização de cofilina-total com a actina cortical. O mesmo padrão para a pcofilina-1 foi observado nas células controle, porém a marcação nos contatos celulares foi mais evidente, sugerindo que há mais pcofilina-1 nos contatos celulares. Em relação às células tratadas com TGF- $\beta$ , a cofilina-total localizou-se ao longo da célula, marcação foi observada no citoplasma e em algumas células também no núcleo, com colocalização com as fibras de stress. Nas células tratadas observou-se projeções de membrana do tipo lamelipódio e a cofilina-total acompanhou a localização da actina na membrana plasmática. Já a pcofilina-1 colocalizou-se com os filamentos de actina e distribuiu-se fracamente em lamelipódios. Assim, esses dados sugerem que durante a TEM em células HT-29 induzidas pelo tratamento com TGF- $\beta$ , há um padrão diferencial de distribuição organizacional da cofilina-1 não fosforilada e fosforilada, indicando possivelmente um controle espacialmente refinado da dinâmica de actina.



**Figura 5.11 - Análise da localização subcelular de cofilina-1 e pcofilina-1 em células HT-29 após tratamento com TGF- $\beta$ .** As células HT-29 foram cultivadas em lamínulas de vidro até a formação de pequenas colônias, tratadas por 48 h e analisada por microscopia confocal. As setas magentas indicam região de lamelipódio com marcação de cofilina-actina. As setas cianas indicam marcação fraca de pcofilina-1 em projeções de membrana. Barra: 10µm.

Para confirmar esse padrão de distribuição diferencial de cofilina-total e fosforilada, foi utilizado a técnica de microscopia de fluorescência por super resolução. Por meio da microscopia de iluminação estruturada e pela máxima intensidade de projeção verificou-se a localização subcelular das proteínas analisadas no resultado anterior. O gráfico exibe o perfil de intensidade de fluorescência ao longo da linha traçada (Fig.5.12) referente a marcação de cofilina-total e actina em células tratadas com TGF- $\beta$  por 48 h. A imagem demonstra que cofilina-1 tem elevada fluorescência na borda da membrana plasmática em uma área de lamelipódio, a qual é acompanhado pela fluorescência da actina. Em regiões próximas à membrana plasmática (parte anterior) a intensidade de fluorescência para cofilina-total e actina é diminuída, e os picos de fluorescência de ambos voltam a subir em áreas com fibras de stress. Em relação a distribuição da pcofilina-1, o perfil de intensidade de fluorescência ao longo da linha traçada demonstra que em áreas próximas a membrana plasmática há pouca localização de pcofilina-1, e conforme a linha avança ao longo da célula a fluorescência aumenta, se concentrando na parte posterior da célula.

Assim esses dados confirmam a disposição espacialmente controlada de cofilina-total e fosforilada em células HT-29 em TEM, indicando possivelmente papéis distintos dependendo da região celular localizada. Cofilina-total concentra-se majoritariamente na parte de lamelipódio, e na borda da membrana, enquanto a pcofilina-1 exibe maior localização na parte interna e posterior à membrana celular. Ambas proteínas exibiram picos em conjunto com a actina, sugerindo proximidade.

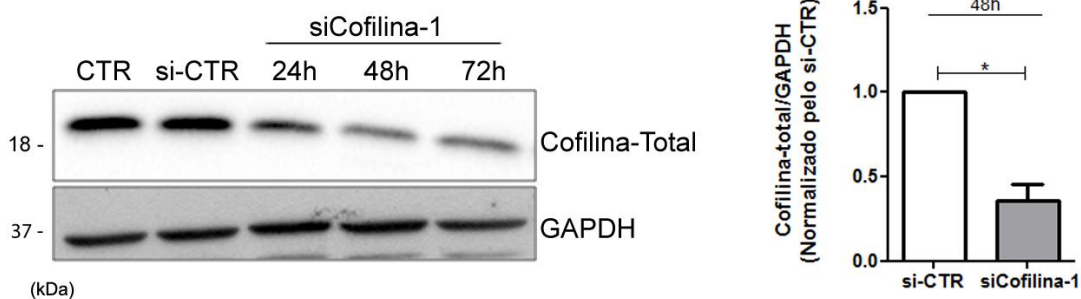


**Figura 5.12 - Análise da localização subcelular de cofilina-total e pcofilina-1 por microscopia de super resolução em células HT-29 após tratamento com TGF- $\beta$ .** As células HT-29 foram cultivadas em lamínulas de vidro até a formação de pequenas colônias e tratadas por 48 h. As imagens de imunofluorescência foram avaliadas por microscopia de iluminação estruturada e máxima intensidade de projeção para a detecção das marcações e avaliação das imagens. O perfil de intensidade de fluorescência á direita da imagem de ambos os canais (488 e 561 nm) foi gerado a partir de linhas traçadas nas imagens sobrepostas em relação à distância da linha. As imagens são de células tratadas com TGF- $\beta$  marcadas com cofilina-total (A) e pcofilina-1 (B e C), todas marcadas em conjunto com a actina. Barra: 10  $\mu$ m.

### 5.3 Efeitos do silenciamento de cofilina-1 quanto à ativação da via LIMK2/cofilina-1 em células HT-29 tratadas com TGF- $\beta$

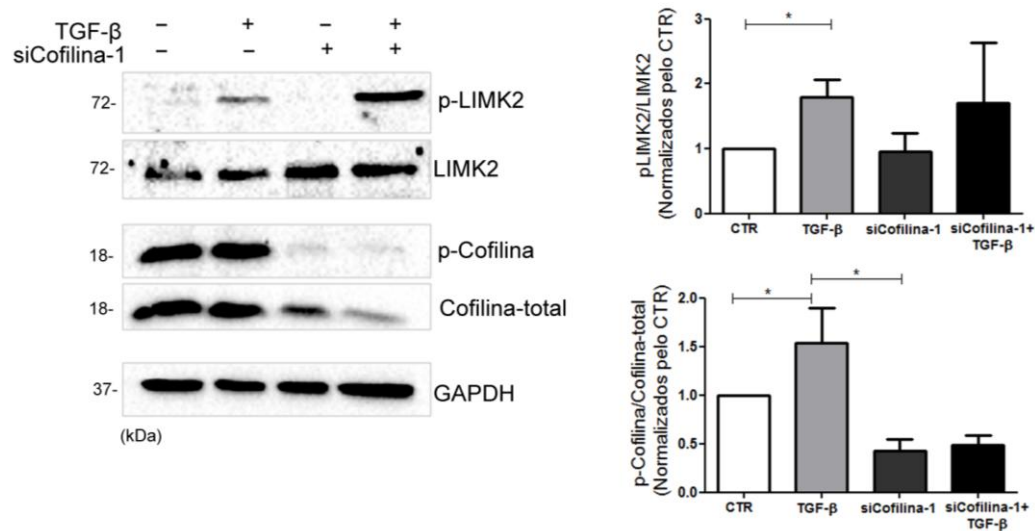
Ao longo dos anos, muitos estudos vêm sugerindo um papel central da proteína cofilina-1 na tumorigênese desde a migração, invasão, sensibilidade quimiotática e metástase (SIDANI et al., 2007; WANG; EDDY; CONDEELIS, 2007; BRAVO-CORDERO et al., 2013). Nesse contexto é importante determinar o papel da cofilina-1 durante a TEM. Para isso, a proteína cofilina-1 foi silenciada transientemente por meio da técnica de siRNA. Conforme pode ser observado na figura 5.13, houve redução dos níveis proteicos nos tempos de 48 e 72 h. O tempo de silenciamento de 48 h obteve redução nos níveis proteicos em aproximadamente 75%, desse modo esse tempo foi escolhido para a realização dos experimentos subsequentes.





**Figura 5.13 - Silenciamento da cofilina-1 usando siRNA em células HT-29.** Análise da expressão proteica por *Western Blotting*. Como proteína constitutiva utilizou-se marcação da proteína GAPDH. CTR= MOCK, si-CTR=Controle negativo do siRNA, *scramble*. O gráfico representa dados normalizados como porcentagem a partir de valores da densitometria de células silenciadas no tempo de 48h em relação as células controle. Dados representativos da média  $\pm$  SEM de no mínimo três experimentos independentes. Análise estatística foi realizada pelo teste-*t Student* e a diferença foi considerada significativa quando: \*  $P < 0,05$ .

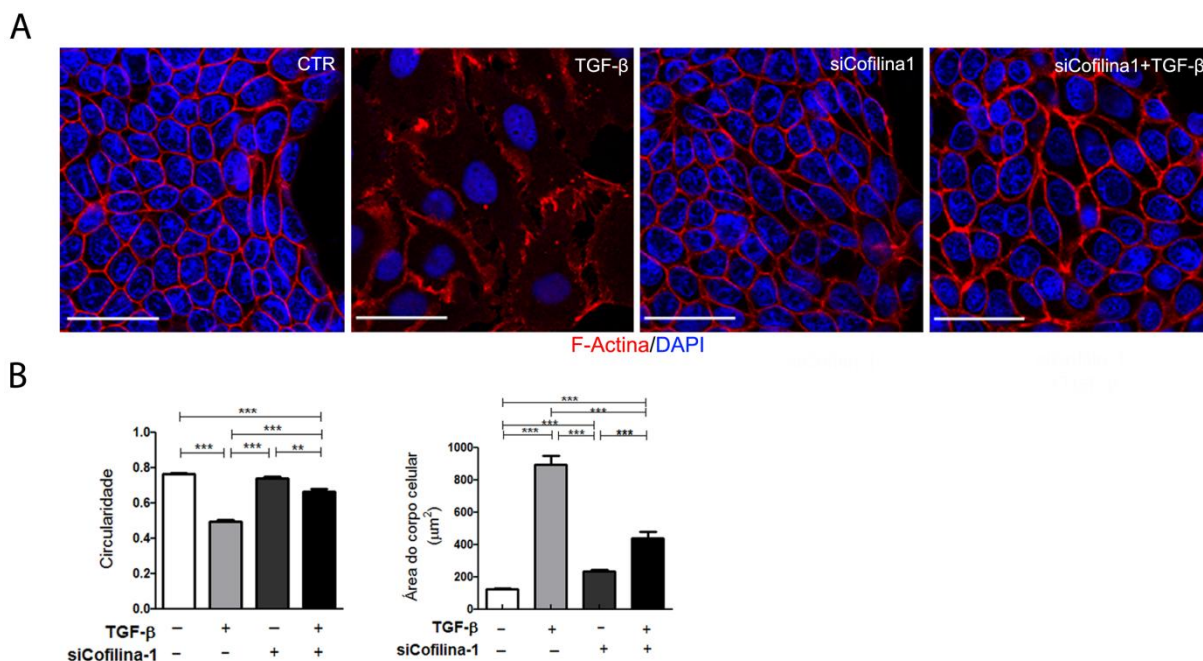
Em seguida, para provar que o eixo de sinalização envolvendo LIMK2, cofilina-1 e pcofilina-1 estava realmente inibido devido o silenciamento de cofilina-1, os seus respectivos níveis proteicos de células tratadas ou não com TGF- $\beta$  foram avaliados. A figura 5.14 demonstra que as células silenciadas e tratadas com TGF- $\beta$  (siCofilina-1 + TGF- $\beta$ ) exibiram aumento da fosforilação de LIMK2 em relação às células somente tratadas com TGF- $\beta$ . Em relação aos níveis de pcofilina-1, como esperado, foi possível observar que o silenciamento reduziu os níveis desta proteína tanto células silenciadas como nas células silenciadas e tratadas com TGF- $\beta$ . Assim, esses dados demonstram que TGF- $\beta$  mantém a ativação de LIMK2 nas células silenciadas para cofilina-1, porém sem cofilina-1 disponível os níveis de sua proteína fosforilada diminuem impedindo que os efeitos finais dessa via de sinalização ocorram.



**Figura 5.14 - Análise da ativação de LIMK2 e pcofilina-1 em células HT-29 mediante silenciamento de cofilina-1 e tratamento com TGF-β.** As células foram silenciadas utilizando siRNA por 30 h e subsequentemente tratadas com TGF-β por 48 h. Análise dos níveis proteicos foi realizada por *Western Blotting*. Como proteína constitutiva utilizou-se marcação da proteína GAPDH. Dados representativos da média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e a diferença foi considerada significativa quando: \*  $P < 0,05$ .

#### 5.4 Avaliação do papel de cofilina-1 na mudança morfológica de epitelial para mesenquimal nas células HT-29 tratadas com TGF-β

Para determinar se cofilina-1 é requerida para a mudança de fenótipo epitelial para mesenquimal no modelo aqui utilizado, as alterações na morfologia celular de células silenciadas para cofilina-1 foram mensuradas por análise da circularidade e da área celular. Imagens de fluorescência marcadas com actina foram utilizadas nas análises (Fig 5.15 A). Nesse experimento, células controle exibiram morfologia cuboide similar a um círculo perfeito (igual a 1), porém células com morfologia fusiforme ou semi-fusiforme exibiram valores mais distantes de 1. Durante a padronização do modelo de TEM nessa linhagem celular, a circularidade e a área das células controle e tratadas com TGF-β já foram avaliadas (Fig 5.5 B e C). O padrão de circularidade apresentado pelas células tratadas com TGF-β ( $0,49 \pm 0,16$ ) foi menor que as células controle ( $0,76 \pm 0,10$ ). Já o grupo das células silenciadas e tratadas com TGF-β exibiram parcial restauração da morfologia cuboide ( $0,66 \pm 0,15$ ) bem como restauração do tamanho celular (Fig 5.15 B). Esses resultados sugerem que cofilina-1 é necessária para o estabelecimento da morfologia mesenquimal durante a TEM por meio de rearranjos do citoesqueleto de actina.

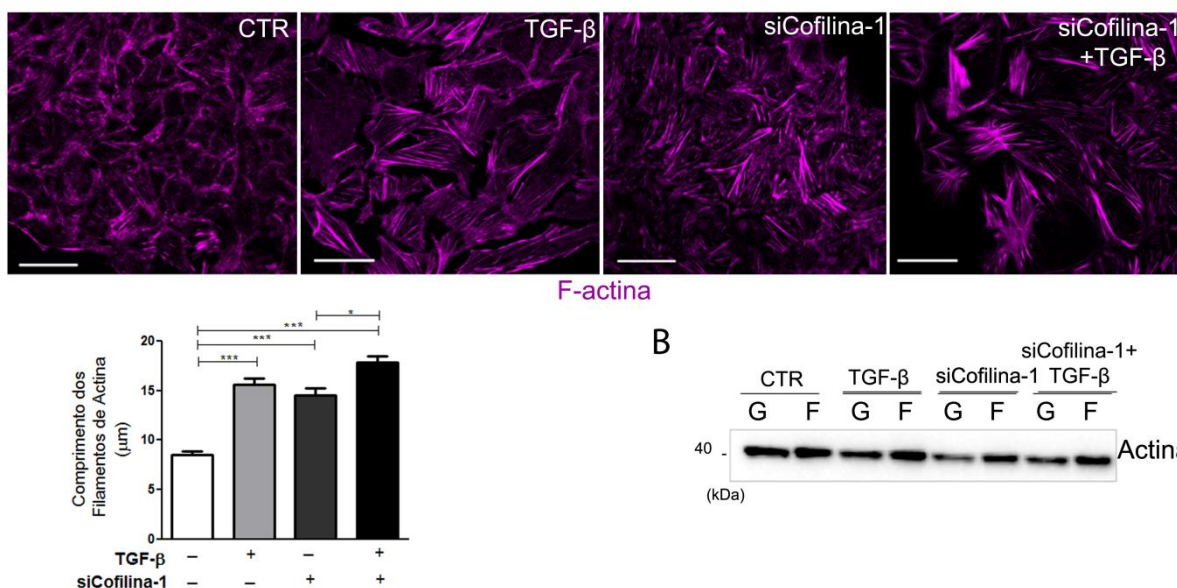


**Figura 5.15 - Efeitos do silenciamento de cofilina-1 na morfologia celular em células tratadas com TGF- $\beta$ .** As células HT-29 silenciadas para cofilina-1 (siRNA) foram tratadas por 48 h com TGF- $\beta$ , a circularidade e a área celular foram avaliadas. **(A)** Imagem representativa das células usadas nas análises. Actina foi marcada com TRITC-faloidina e o núcleo com DAPI. **(B)** Análises de circularidade e área celular foram determinadas por imagens em corte Z na região mediana das células utilizando o *software Image J*. Em cada caso, o mínimo 90 células foram quantificadas (~20 células por campo) em pelo menos três experimentos independentes. Análise estatística foi realizada pelo teste-*Kruskal-Wallis* seguido do pós teste de *Dunn's* e a diferença foi considerada significativa quando: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$ . Barra: 30 $\mu$ m.

O próximo passo foi avaliar o impacto do silenciamento de cofilina-1 sobre a dinâmica dos filamentos de actina. A hipótese aqui levantada era de que células tratadas com TGF- $\beta$  poderiam aumentar as taxas de polimerização da actina por meio de pcofilina-1 e consequentemente levando ao aumento da formação de fibras de stress. Contudo, células silenciadas e tratadas com TGF- $\beta$  não exibiram inibição da polimerização de actina, posto que a análise do comprimento de F-actina demonstrou aumento no empacotamento de F-actina, o que sugere instabilidade do filamento (Fig 5.16 A). De fato, o fracionamento bioquímico de F-actina apresentou níveis similares nas células tratadas com TGF- $\beta$ , silenciadas e cotratadas com TGF- $\beta$  (Fig 5.16 B). Porém, os níveis de G-actina apresentaram-se reduzidos nos grupos silenciados para cofilina-1 quando comparados com as células somente tratadas com TGF- $\beta$ , indicando que despolimerização estaria prejudicada.

Esse conjunto de dados demonstra que cofilina-1 tem papel significativo no controle da dinamicidade do citoesqueleto de actina, refletido pela estabilidade dos filamentos e regulação da morfologia celular durante a TEM.

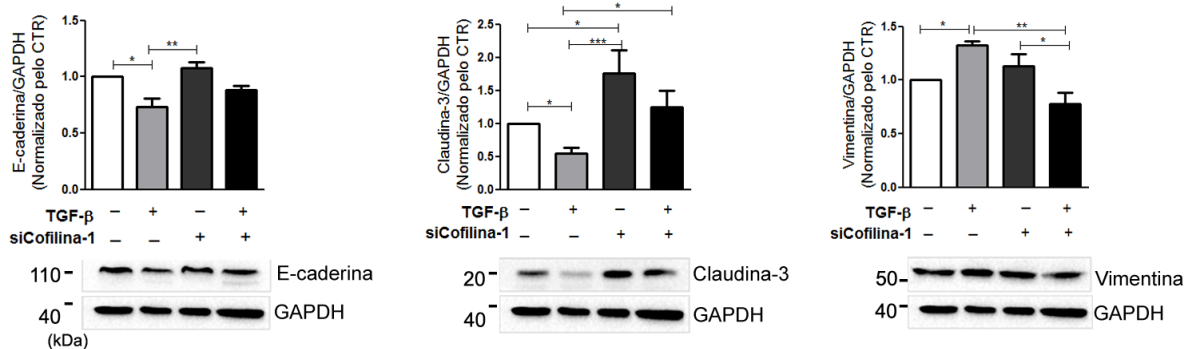
A



**Figura 5.16 - Efeitos do silenciamento de cofilina-1 na dinâmica do citoesqueleto de actina em células HT-29 tratadas com TGF-β.** (A) As células silenciadas para cofilina-1 (siRNA) foram tratadas por 48 h com TGF-β e analisadas por fluorescência. Foi avaliado o comprimento dos filamentos de actina, a actina foi marcada com TRITC-faloidina. O comprimento dos filamentos de actina foram detectados utilizando máxima intensidade de projeção em microscopia confocal e quantificado por meio do *software Image J*. Em cada caso, no mínimo 90 células foram quantificadas (~20 células por campo) em pelo menos três experimentos independentes. Análise estatística foi realizada pelo teste-ANOVA seguido do pós teste de *Bonferroni* e a diferença foi considerada significativa quando: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$ . Dados representativos da média  $\pm$  SEM de no mínimo três experimentos independentes. Barra: 30  $\mu\text{m}$ . (B) Quantificação de frações celulares correspondentes a G e F-actina obtidas por fracionamento utilizando Triton X-100. Uma imagem representativa é demonstrada.

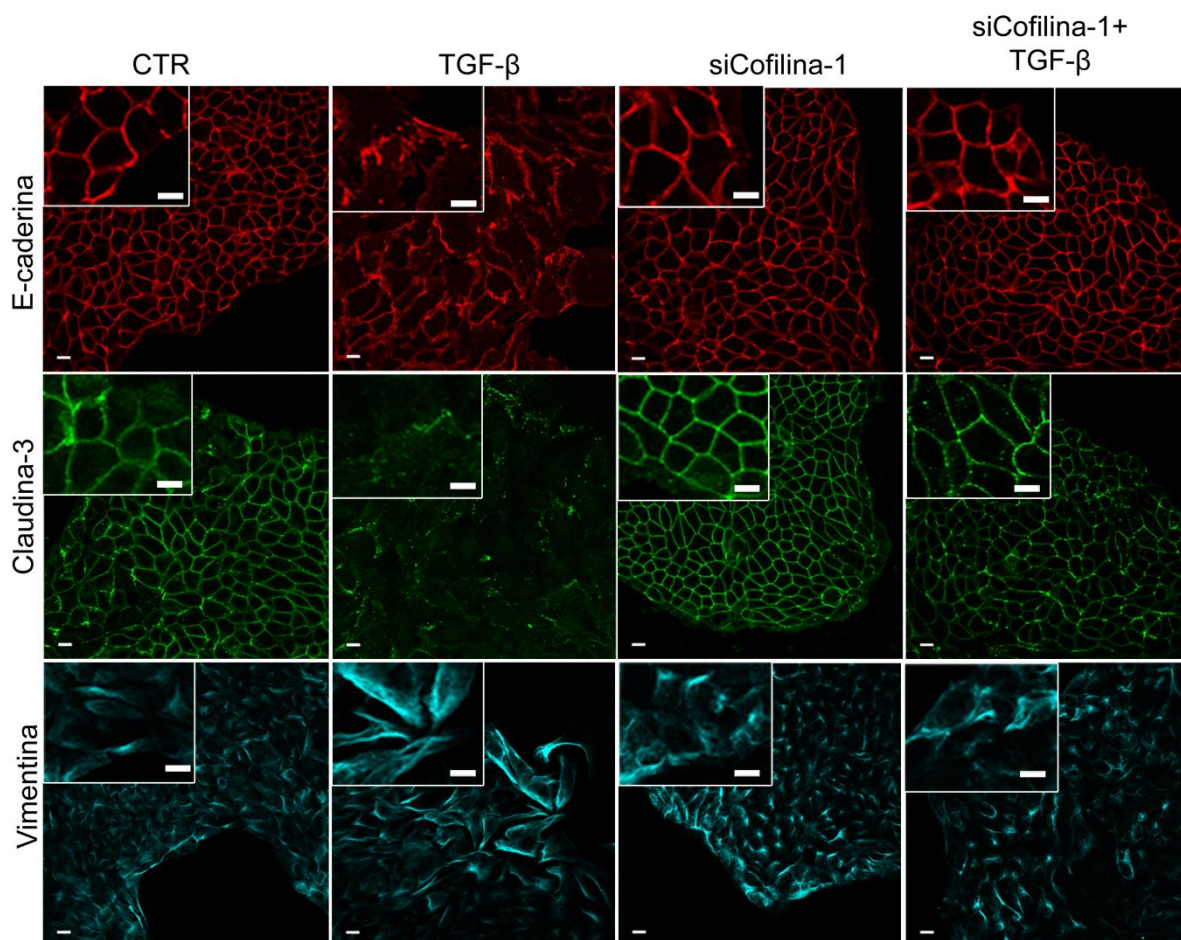
### 5.5 Análise da contribuição de cofilina-1 na desmontagem juncional em células HT-29 tratadas com TGF-β

As células epiteliais intestinais possuem um anel de actina cortical que ancora as TJs e AJs e é responsável pela regulação de sua montagem e função (ARNOLD; STEPHENSON; MILLER, 2017). Nesse contexto, foi investigado o papel de cofilina-1 durante a desmontagem dos contatos célula-célula que acontece em estágios iniciais da TEM (Fig 5.17). Como esperado, células tratadas com TGF-β exibiram níveis proteicos de E-caderina e claudina-3 diminuídos em relação às células controle. Contudo, células silenciadas e tratadas com TGF-β exibiram restauração dos níveis proteicos de claudina-3 com relevância estatística, mas não de E-caderina, quando comparadas com o grupo tratado com TGF-β. Do mesmo modo, o grupo de células tratadas com TGF-β exibiram aumento nos níveis de vimentina com relevância estatística, quando as células foram silenciadas e tratadas com TGF-β exibiram discreta redução dos seus níveis proteicos, embora com diferença estatística. Juntos, esses dados dão indícios que cofilina-1 pode contribuir na modulação dos níveis de proteínas epiteliais e mesenquimais durante a TEM.



**Figura 5.17 - Análise dos níveis proteicos de marcadores epiteliais e mesenquimal em células HT-29 mediante silenciamento de cofilina-1 e tratamento com TGF- $\beta$ .** Após o silenciamento, as células foram tratadas com TGF- $\beta$  por 48 h e os níveis proteicos analisados por *Western Blotting*. Os gráficos representam dados normalizados a partir de valores da densitometria de células silenciadas e ou/tratadas em relação as células controle. Como proteína constitutiva utilizou-se a marcação da proteína GAPDH. Dados representativos da media  $\pm$  SEM de quatro experimentos independentes. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e a diferença foi considerada significativa quando: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$ .

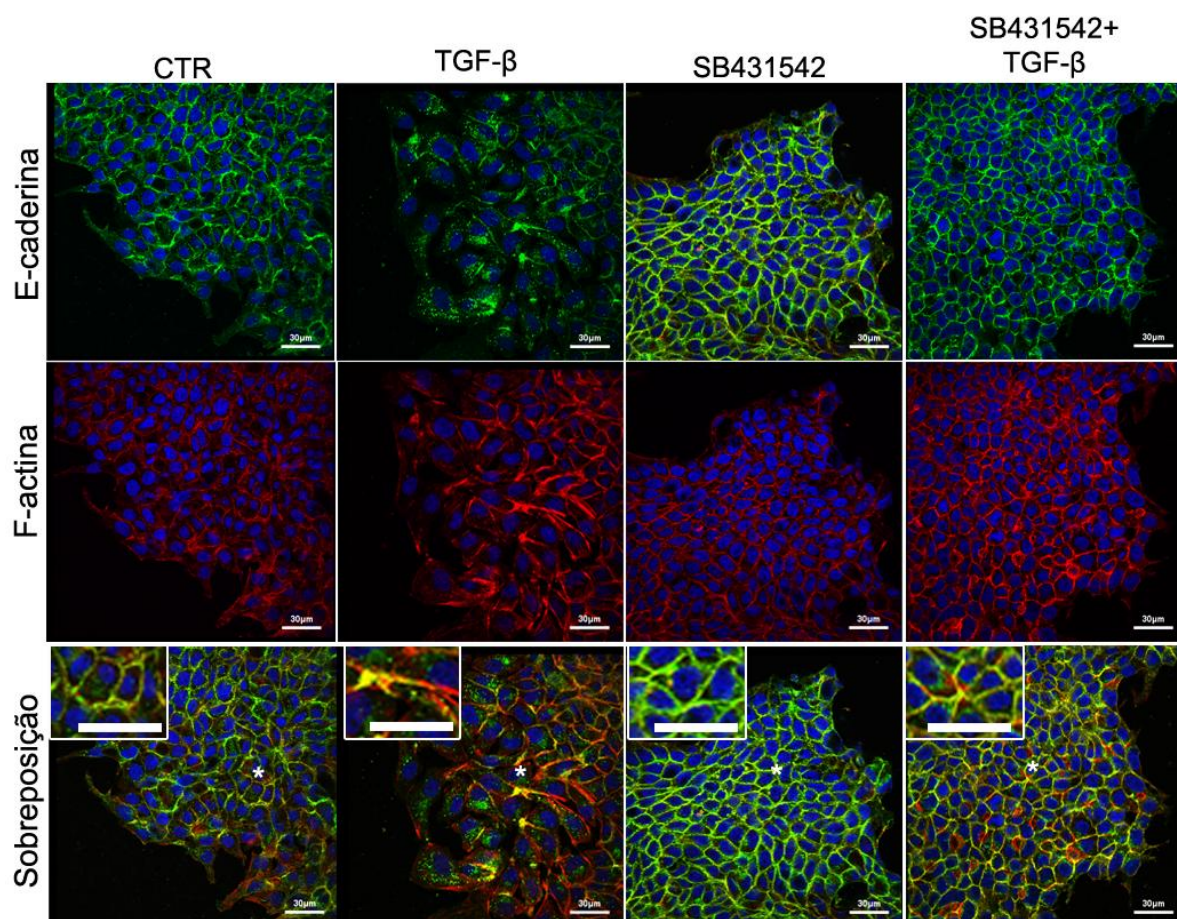
Subsequentemente, o papel da cofilina-1 na modulação da localização subcelular dessas proteínas foi analisado. Os resultados indicam que o silenciamento em conjunto com o tratamento TGF- $\beta$  inibiu parcialmente o destacamento das células a partir da monocamada celular, a formação de protrusões membranares, além de restaurar os níveis de E-caderina e claudina-3 nos contatos celulares. Além disso, as células silenciadas e tratadas com TGF- $\beta$  exibiram reorganização da rede de filamentos intermediários compostos por vimentina (Fig. 5.18). Assim, esses dados indicam que o silenciamento de cofilina-1 restaurou parcialmente a localização de E-caderina e claudina-3 nos contatos celulares em células em TEM.



**Figura 5.18-** Análise da localização subcelular de E-caderina, claudina-3 e vimentina em células HT-29 silenciadas para cofilina-1 mediante ao tratamento com TGF- $\beta$ . As células HT-29 silenciadas para cofilina-1 por 30 h foram tratadas por 48 h com TGF- $\beta$ . Posteriormente foi avaliada a localização subcelular das proteínas indicadas por imunofluorescência. Imagem representativa obtida por microscopia confocal. Barra: 10 $\mu$ m.

Corroborando esses dados, o tratamento isolado com inibidor SB431542 restaurou parcialmente a redistribuição da actina e E-caderina causado pelo TGF- $\beta$ . O tratamento dessas células com SB431542 na presença do TGF- $\beta$  reverteu parcialmente a formação de agregados de actina em regiões próximas de depósitos citoplasmáticos de E-caderina observados no grupo TGF- $\beta$ , o que sugere que a reorganização e/ou dinâmica da actina cortical contribui para a desmontagem das junções durante a TEM (Fig. 5.19).

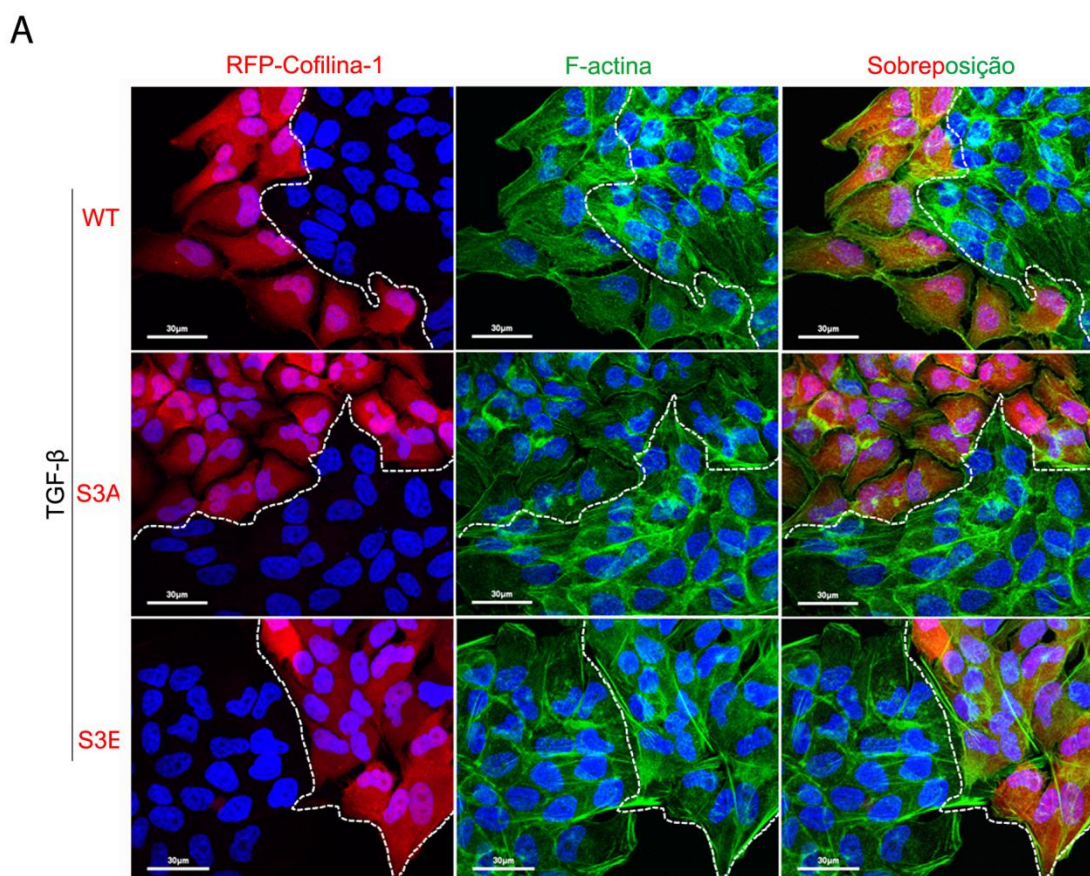
Esse conjunto de dados sugere que a sinalização de cofilina-1 é requerida para a mudança do estado epitelial para o mesenquimal e para a desmontagem juncional regulada pela dinâmica do citoesqueleto de actina.



**Figura 5.19 - Análise da localização de E-caderina e actina mediante tratamento com SB431542.** As células HT-29 foram cultivadas em seguida foram pré-tratadas por 1 h com o SB431542 e tratadas com TGF- $\beta$  por mais 48 h. Posteriormente a localização subcelular das proteínas indicadas foram avaliadas por imunofluorescência. Imagem representativa obtida por microscopia confocal. Asterisco indica região do inserto na figura. Barra: 30 $\mu$ m.

A fim de validar o papel da via de sinalização RhoA-pLIMK2-pcofilina-1 na desmontagem juncional durante a TEM, foram utilizados plasmídeos mutantes de cofilina-1 para mimetizar o efeito observado pelo TGF- $\beta$ . Células HT-29 mutantes foram geradas por transfecção estável e transiente com os seguintes construtos: RFP-WT-cofilina-1, RFP-S3A-cofilina-1 e RFP-S3E-cofilina-1. O plasmídeo RFP-S3A foi utilizado para mimetizar a cofilina-1 desfosforilada (forma ativa), onde a serina 3 é substituída por alanina (S3A). Já o plasmídeo RFP-S3E para mimetizar a forma fosforilada de cofilina-1 (forma inativa), com a serina 3 sendo substituída por ácido glutâmico (S3E). O primeiro passo foi avaliar a formação de F-actina em células RFP positivas e negativas obtidas por transfecção transiente e tratadas com TGF- $\beta$  (Fig. 5.20). Como esperado, células WT-RFP positivas e negativas tratadas com TGF- $\beta$  exibiram projeções de membrana e aumento da formação de F-actina. Células mutantes S3A-RFP e S3E-RFP não apresentam mudança no status de fosforilação de cofilina-1 depois do tratamento com TGF- $\beta$  devido às mutações inseridas. Assim, células S3A-RFP (cofilina-1 ativa) exibiram agregados de actina e diminuição da formação de F-actina, em

contraste com as células RFP negativas responsivas ao tratamento, que exibiram estruturas de F-actina típicas de células que sofreram TEM. Além disso, confirmou-se que células S3A-RFP com cofilina-1 ativa, foram efetivas na intensificação da atividade de corte de F-actina e na promoção de padrões distintos de estruturas de actina em células em TEM. Por outro lado, células S3E-RFP positivas (cofilina-1 inativa) e RFP negativas exibiram o mesmo padrão de formação de F-actina, incluindo fibras de stress após o tratamento com TGF- $\beta$ , indicando papel essencial da forma inativa S3E-RFP-cofilina-1 em induzir a formação de fibras de stress durante a TEM.

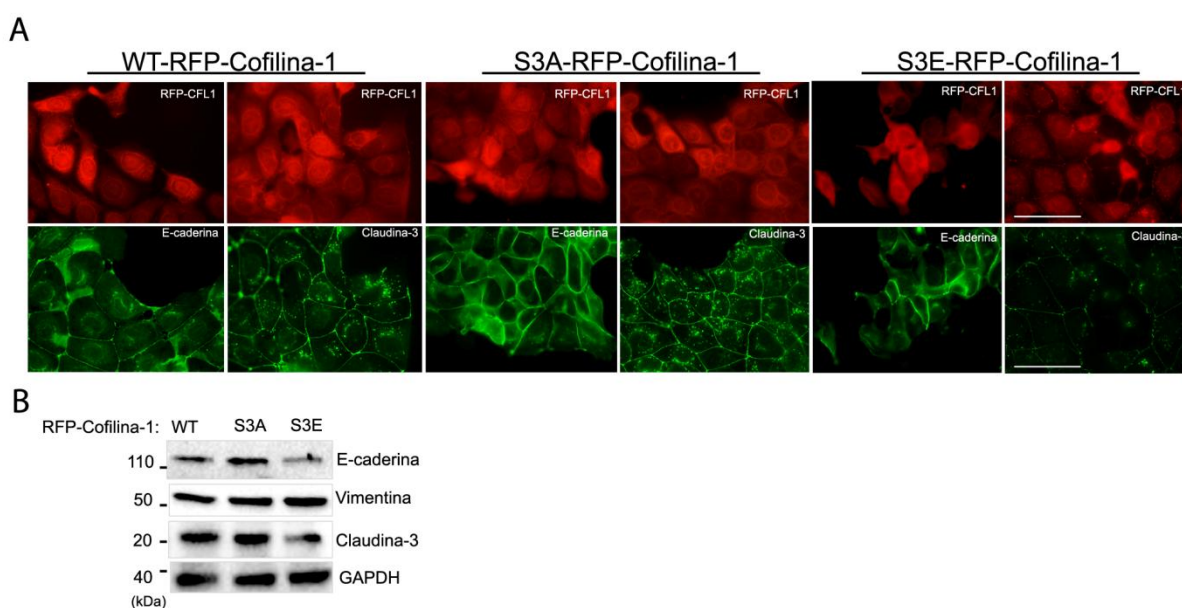


**Figura 5.20 - Análise do padrão organizacional do citoesqueleto de actina em células expressando mutantes de cofilina-1.** Células HT-29 foram transientemente transfectadas com os plasmídeos: *Wild-Type* (WT) RFP-cofilina-1, RFP-cofilina-1 S3A (forma ativa), e com o que mimetiza sua fosforilação RFP-cofilina-1S3E (forma inativa). As células foram cultivadas em lamínulas de vidro e estimuladas com TGF- $\beta$  por 48h. Em seguida, foram sujeitas á técnica de imunofluorescência e o padrão organizacional de actina foi avaliado. A linha tracejada separa células RFP positivas e RFP negativas. Utilizando máxima intensidade de projeção por microscopia confocal, ambas células (RFP positivas e RFP negativas) da mesma imagem de cada grupo foram analisadas. Os filamentos de actina e o núcleo foram marcados com Atto 655-faloidina e DAPI respectivamente. Barra: 30 $\mu$ m.

Em seguida, foram avaliados a localização subcelular e os níveis proteicos de E-caderina, claudina-3 e vimentina de células expressando mutantes de cofilina-1 na forma estável. Células com cofilina-1 ativa (S3A) exibiram E-caderina e claudina-3 no contato célula-célula de forma similar às células WT. Por outro lado, células com a forma inativa de



cofilina-1 (S3E) exibiram diminuição de E-caderina e claudina nas junções célula-célula (Fig. 5.21 A). Em adição, as células estávelmente expressando S3A-RFP, S3E-RFP e as células WT-RFP exibiram morfologia semelhante, demonstrando a importância das duas formas de cofilina-1 (fosforilada/desfosforilada) na mudança do fenótipo epitelial a mesenquimal. De fato, níveis proteicos aumentados de E-caderina e claudina-3 foram encontrados em células S3A-RFP quando comparado com o WT-RFP. Enquanto células S3E-RFP exibiram níveis diminuídos dessas proteínas e aumento dos níveis de vimentina similarmente às células em TEM (Fig. 5.21 B). Esse conjunto de dados confirma que a fosforilação induzida por TGF- $\beta$  é importante para a diminuição dos marcadores epiteliais e para a desmontagem juncional durante a TEM.

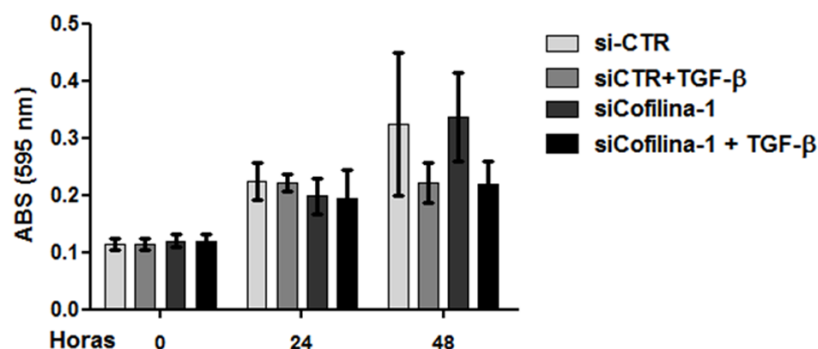


**Figura 5.21 - Avaliação do papel dos mutantes de cofilina-1 na desmontagem juncional.** (A) Células HT-29 foram transfectadas com *Wild-Type* (WT) RFP-cofilina-1, RFP-cofilina-1 S3A (forma ativa), e com o que mimetiza sua fosforilação RFP-cofilina-1S3E (forma inativa) e selecionadas por meio do tratamento com Geneticina®. Células estáveis foram geradas por seleção clonal. Células expressando os mutantes de cofilina-1 foram crescidas e submetidas à técnica de imunofluorescência para análise da localização subcelular de E-caderina e claudina-3. Barra: 50 $\mu$ m. (B) O lisado de proteínas totais obtidos de células expressando os mutantes de foram analisados por Western blot utilizando os anticorpos indicados. GAPDH foi utilizado como controle endógeno. Imagem representativa de um experimento.

## 5.6 Análise do papel de cofilina-1 na migração e invasão celular em células HT-29 tratadas com TGF- $\beta$

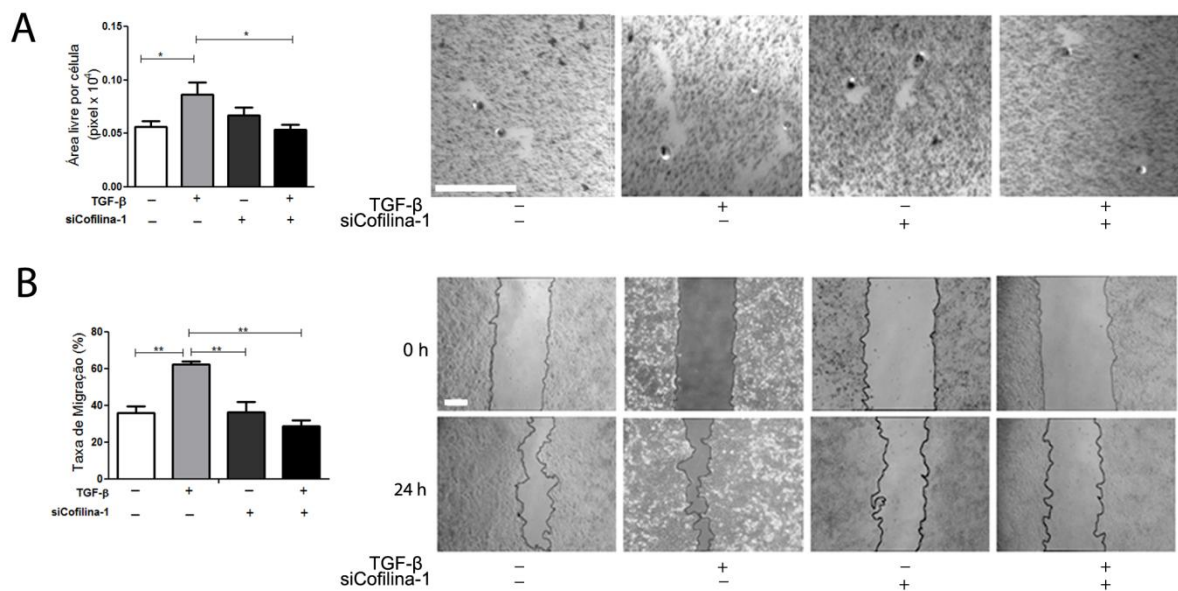
Sabe-se que a dinâmica do citoesqueleto de actina é importante para a progressão do ciclo celular e para a citocinese. Células em citocinese exibem cofilina-1 localizada no sulco de clivagem das células, regulando o anel contrátil rico em actomiosina, que é responsável pela separação das duas células no final da mitose (NAKANO; MABUCHI, 2006; CHEN; POLLARD, 2011). Assim, inicialmente para verificar se as células silenciadas para cofilina-1

exibem mudanças no crescimento celular, foi realizada uma curva de crescimento mediante os tratamentos. A figura 5.22 demonstra que o silenciamento de cofilina-1 não alterou de maneira significativa o número de células ao longo do tempo em relação às células controle. Porém no tempo de 48 h foi possível observar que tanto as células silenciadas e as mesmas tratadas com TGF- $\beta$  exibiram uma ligeira redução no crescimento celular. Assim, os experimentos funcionais subsequentes foram realizados 24h ou 48h após as 30h de silenciamento de cofilina-1.



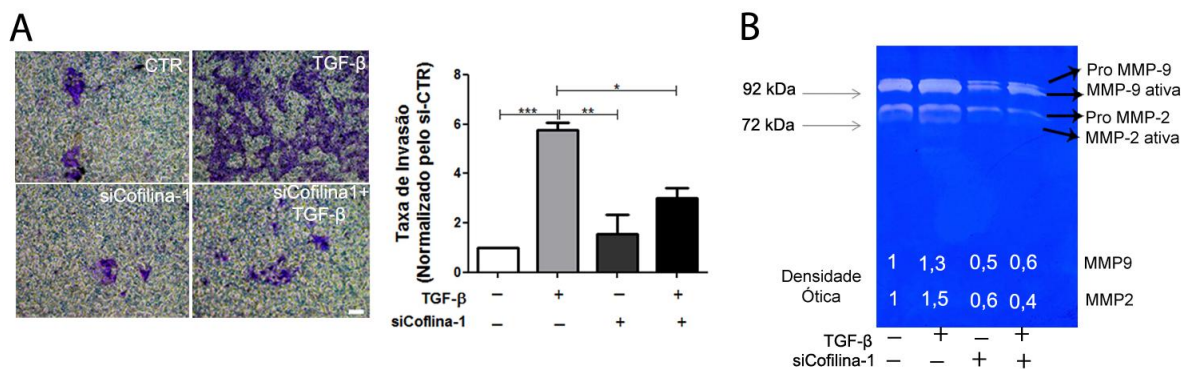
**Figura 5.22 - Análise do crescimento celular de células HT-29 silenciadas para cofilina-1 e tratadas com TGF- $\beta$ .** As células foram silenciadas para cofilina-1 e tratadas com TGF- $\beta$ . O crescimento celular foi quantificado nos tempos indicados pela técnica de cristal violeta. Para análise estatística utilizou-se o teste *one-way* ANOVA. Dados representativos da média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes.

O próximo passo foi determinar se cofilina-1 também é requerida para migração e invasão durante a TEM no modelo celular estudado. Para avaliar o papel da cofilina-1 no potencial migratório de células HT-29 em TEM, foram realizados os ensaios de rastro fagocinético e o *Wound Healing*. A figura 5.23A demonstra a motilidade de células únicas mediante os tratamentos. As células tratadas com TGF- $\beta$  exibiram área livre maior do que aquela deixada pelas células controle, indicando que as células tratadas com TGF- $\beta$  possuíam maior motilidade. Já as células silenciadas para cofilina-1 apresentaram área livre semelhante à células controle. As células silenciadas e tratadas com TGF- $\beta$  exibiram redução na motilidade celular, indicando que o silenciamento de cofilina-1 foi suficiente para comprometer o efeito do TGF- $\beta$  sobre a motilidade celular. Corroborando os dados, pela técnica de *Wound healing* células silenciadas para cofilina-1 exibiram redução na migração coletiva das células após o tratamento com TGF- $\beta$  (Fig. 5.23B). Juntos, esses dados indicam que cofilina-1 está envolvida com a regulação da migração celular durante a TEM.



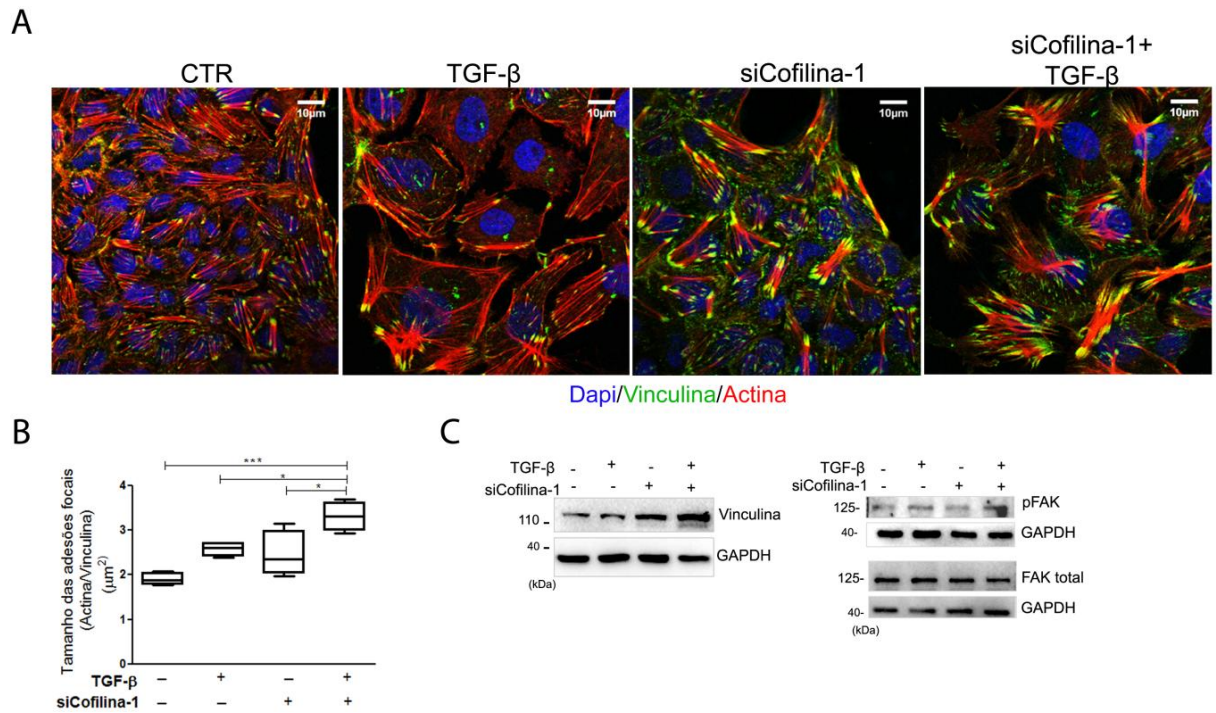
**Figura 5.23 - Análise do potencial migratório de células HT-29 silenciadas para cofilina-1 e tratadas com TGF-β.** (A) Ensaio de rastro fagocinético. A motilidade de células individuais foi determinada pela análise de suas trajetórias. As micrografias representativas foram capturadas 20 h depois do tratamento. O gráfico representa a média da área do rastro das células nos tratamentos estabelecidos. Aumento de 10x. Barra: 50µm. (B) As células foram cultivadas em confluência e submetidas à técnica de *Wound Healing*. O gráfico representa a média da área da ferida deixada pelas células nos tratamentos indicados por 0 h e 24 h. (Fechamento total do espaço entre as duas bordas = migração 100 %). Dados representativos da média ± SEM de quatro experimentos independentes. Barra: 5µm. Em A e B a análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e a diferença foi considerada significativa quando: \* P<0,05, \*\* P<0,01 e \*\*\* P<0,001.

Subsequentemente, o papel da cofilina-1 na invasão celular durante a TEM também foi avaliada. Como demonstrado na figura 5.24A, o silenciamento de cofilina-1 comprometeu a invasão nas células tratadas com TGF-β quando comparado com os níveis do grupo TGF-β. Consistente com esse resultado, tanto as células silenciadas para cofilina-1 quanto as mesmas tratadas com TGF-β exibiram redução na atividade das formas ativas de MMP-2 e 9 quando comparadas com o grupo TGF-β (Fig.5.24B). Juntos esses dados indicam que a atividade de cofilina-1 é necessária para a migração e invasão durante a TEM, possivelmente por meio do controle da organização do citoesqueleto de actina.



**Figura 5.24 - Avaliação do papel de cofilina-1 na invasão celular em células HT-29.** (A) Para análise da invasão celular, células HT-29 foram silenciadas e tratadas com TGF-β (48 h), cultivadas em insertos Transwell® cobertos com Matrigel® e submetidas ao ensaio de invasão. O gráfico de barras representa valores da quantificação relativa da invasão celular (onde células não tratadas = 1). Dados representativos da média ± SEM de três experimentos independentes. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e a diferença foi considerada significativa quando: \* P<0,05, \*\* P<0,01 e \*\*\* P<0,001. Barra: 2µm. (B) Meios de cultura condicionados derivados de células controle, silenciadas e/ou tratadas com TGF-β por 48 h, foram submetidos ao ensaio de zimografia para análise da atividade de metaloproteases. Números na porção inferior da figura representam a quantificação relativa da densidade ótica das bandas das metaloproteases ativas (onde células não tratadas = 1). Dados representativos da média ± SEM de quatro experimentos independentes.

Finalmente, considerando que as adesões focais são estruturas formadas por actina e proteínas como a vinculina, que conectam a matriz extracelular ao citoplasma, com fundamental papel na geração de força para a migração celular (CIOBANASU; FAIVRE; LE CLAINCHE, 2012; SMITH; VELLANKI; HOPKINS, 2016; BAYS; DEMALI, 2017). A avaliação dos efeitos de cofilina-1 na organização/formação e no tamanho das adesões focais durante a TEM foi realizada. Para tal, utilizou-se os ensaios de imunofluorescência, análise morfométrica e *western blot* (Fig. 5.25 A, B e C, respectivamente). Células tratadas com TGF-β exibiram reorganização de F-actina e aumento no tamanho das adesões focais quando comparado com as células controle. Contudo, a supressão de cofilina-1 resultou em significativa perturbação na dinâmica dessas estruturas, bem como no aumento dos níveis proteicos de vinculina, indicando aumento na adesão das células à matriz. O mesmo efeito foi observado nas células silenciadas e tratadas com TGF-β, com aumento do empacotamento das adesões focais quando comparado com as células controle. Células tratadas com TGF-β exibiram um discreto aumento auto fosforilação de FAK no resíduo da tirosina 397, porém a supressão de cofilina-1 não alterou esses níveis.



**Figura 5.25 - Análise do papel do silenciamento de cofilina-1 sob o padrão organizacional das adesões focais.** As células HT-29 foram silenciadas para cofilina-1e tratadas com TGF- $\beta$  por 48h. (A) Imunofluorescência para análise da localização subcelular de vinculina e actina. Os filamentos de actina e núcleo foram marcados com TRITC-faloidina e DAPI, respectivamente. Vinculina foi marcada com alexa-488. Barra: 10 $\mu$ m. (B) O tamanho das adesões focais foi calculado usando o *software ImageJ* por meio da colocalização de vinculina e actina. No mínimo 100 células foram quantificadas (~20 células por campo) em pelo menos três experimentos independentes. (C) O lisado de proteínas totais obtidos de células silenciadas e tratadas com TGF- $\beta$  foram analisados por *Western blot* utilizando os anticorpos indicados. GAPDH foi utilizado como controle endógeno. Imagem representativa de dois experimentos.

## 6 DISCUSSÃO PARTE I

Células epiteliais malignas adquirem a capacidade de migrar e invadir tecidos adjacentes como resultado da ativação do programa transcricional-celular da TEM, tais células inicialmente perdem e/ou desorganizam os sistemas de junções intercelulares com reorganização do citoesqueleto de actina (DONGRE; WEINBERG, 2018). Neste contexto, a proteína cofilina-1, conhecida por ser uma das reguladoras da dinâmica da actina celular, desempenha funções importantes na manutenção de atividades celulares e várias evidências apontam seu papel crucial durante a progressão tumoral (WANG et al., 2004, 2006; KANELLOS; FRAME, 2016; COUMANS; DAVEY; MOENS, 2018). No entanto, pouco se sabe a respeito dos mecanismos moleculares que regulam a sinalização celular de cofilina-1 durante a TEM no câncer colorretal. Assim, avaliar o papel de cofilina-1 em eventos celulares relacionados com a TEM e analisar sua contribuição durante a progressão deste tipo de câncer se torna importante.

Inicialmente, buscou-se determinar qual linhagem celular de câncer colorretal seria adequada ao tratamento com TGF- $\beta$  de modo a desenvolver eventos relacionados com o programa da TEM detectáveis *in vitro*. Os resultados demonstraram que a linhagem celular HCT-116 não exibiu características de ativação da TEM, como verificado pela análise da expressão gênica e níveis proteicos de marcadores epiteliais e mesenquimais, assim como nas análises de crescimento celular, migração e invasão celular. Tal evidência parece derivar do fato que a linhagem HCT-116 apresenta instabilidade de microssatélite (MSI) e mutação em TGFBR2, e assim quando submetidas ao tratamento com TGF- $\beta$  não exibem fenótipo TEM. Tais células não reduziram os níveis de E-caderina e nem foram capazes de sintetizar vimentina, assim como as taxas de migração e invasão encontraram-se similares aos exibidos pelo controle, corroborando estudos da literatura (PINO et al., 2010).

Por outro lado, a linhagem celular HT-29 exibiu morfologia fusiforme e fenótipo condizente ao de células em TEM. Os dados obtidos demonstraram redução dos níveis da E-caderina e claudina-3 tanto transcricional quanto proteico, além de redistribuição da localização celular dos contatos celulares para o citoplasma. A proteína mesenquimal vimentina apresentou-se reorganizada em forma de redes filamentosas dispostas ao longo do citoplasma das células e com aumento de seus níveis proteico e transcricional. Tais eventos possivelmente ocorreram via fator transcricional SLUG, uma vez que é sabido que TGF- $\beta$  pode ativar SLUG de modo sustentado via SMADs e não-SMADs (ERK ou AKT), o que regula a transcrição de proteínas mesenquimais e reprime a transcrição de proteínas epiteliais (VINCENT et al., 2009; PINO et al., 2010; AOMATSU et al., 2011). Adicionalmente, as

células HT-29 foram observadas se destacando da monocamada celular, perdendo o citoesqueleto cortical e exibindo fibras de stress, condizente com células mesenquimais, eventos que podem ser explicados pela conhecida sinalização das Rho-GTPases via TGF- $\beta$  (BHOWMICK et al., 2001; CHO; YOO, 2007; UNGEFROREN; WITTE; LEHNERT, 2018). Em seguida, para confirmar que os efeitos observados eram devido ao tratamento com TGF- $\beta$  e não por outro fator, as células foram tratadas com SB431542 - inibidor do receptor de TGF- $\beta$ . De fato, constatou-se que os efeitos ocorreram devido a ativação do receptor de TGF- $\beta$ , uma vez que se observou aumento dos níveis proteicos e relocalização para membrana de E-caderina e claudina-3 exibidos no grupo TGF- $\beta$  +SB431542. Dados na literatura já indicaram que o tratamento com esse inibidor poderia restaurar os níveis de E-caderina (DAS et al., 2009). Mesmo as células somente tratadas com SB431542 exibiram níveis proteicos de E-caderina e claudina-3 superiores aos encontrados nas células controle, sugerindo secreção autócrina de TGF- $\beta$  pelas células HT-29. Corroborando, um estudo demonstrou que essa linhagem celular é capaz de sintetizar e secretar TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 3 (CHEN et al., 2017b).

As células HT-29 tratadas com TGF- $\beta$  exibiram aumento de tamanho celular, demonstrado pelas análises da área e do perímetro, e de acordo com as análises de circularidade e do comprimento/largura tais células se tornaram mais alongadas. Estudos já demonstraram que o tratamento com TGF- $\beta$  pode ativar a via de sinalização PI3K-AKT-mTOR, regulando o aumento de tamanho e síntese proteica da célula em TEM (LAMOUILLE; DERYNCK, 2007). Outro estudo indica também que a glicose disponível no meio de cultura pode ser um fator determinante na ativação da sinalização de TGF- $\beta$  e consequentemente no aumento do tamanho celular (DAS et al., 2008).

Além disso, como esperado a sinalização do TGF- $\beta$  reprimiu o crescimento celular. Sua sinalização ativa inibidores de CDKs, o CDKN2B e CDKN1A, além da reprimir fatores transcricionais que favorecem o crescimento celular, como c-MYC, e os fatores inibidores de ligação ao DNA, ID-1 e ID-2, o que leva o arresto das células em fase G1 (SIEGEL; MASSAGUÉ, 2003). Em adição, observou-se que o TGF- $\beta$  aumentou as taxas de migração e invasão celular, além de atividade de MMP-2, características de células em TEM, corroborando os dados encontrados na literatura (PINO et al., 2010; LIU et al., 2014).

Uma vez validado o modelo de TEM nas células HT-29 a regulação de cofilina-1 durante a TEM foi avaliada. Para tal o status de ativação da via de sinalização RhoA-LIMK2-ppcofilina-1 foi determinado. Os dados demonstram ativação de RhoA a partir de 5 minutos após o tratamento com TGF- $\beta$ , porém após 48 horas de tratamento ainda foi possível observar níveis de RhoA-GTP (forma ativa). Este resultado é consistente com o observado em miofibroblastos (MANICKAM et al., 2014) e em células de câncer de próstata (COLLAZO et

al., 2014), embora o tempo de ativação possa apresentar variações de acordo com o tipo celular. Como controle positivo da fosforilação de cofilina-1 utilizou-se a linhagem celular A549 sob o mesmo tratamento. Como esperado, as células A549 exibiram altas taxas de fosforilação de cofilina-1, corroborando os estudos que demonstraram que células A549 tratadas com TGF- $\beta$  ativavam a via de RhoA, e estimulavam migração e invasão celular (BIONDINI et al., 2015). Do modo semelhante, as células HT-29 exibiram ativo o eixo de sinalização pLIMK2-pcofilina-1 após o tratamento com TGF- $\beta$  mesmo em tempo tardios (48h), e de forma similar ao controle positivo utilizado (células A549). E de fato, o tratamento com o inibidor do receptor de TGF- $\beta$ , SB431542, reprimiu a fosforilação de LIMK2 e cofilina-1, confirmando a ativação da via não canônica de TGF- $\beta$  no nosso modelo experimental. Dados da literatura já indicaram que o tratamento com esse inibidor pode diminuir os níveis basais de RhoA, com conseqüente redução na formação de fibras de stress e adesões focais, eventos esses regulados pela sinalização de RhoA/ROCK (FLEMING et al., 2009; DAS et al., 2009).

A proteína cofilina-1 é a última proteína da via de sinalização RhoA, sua função decorre sob os filamentos de actina, por essa razão analisou-se as frações de actina celular no modelo experimental estudado. Como esperado, a sinalização de TGF- $\beta$  levou a inativação (pela fosforilação) de cofilina-1 favorecendo o aumento da quantidade da fração de F-actina e diminuição da fração de G-actina. Esses filamentos de actina são estruturas responsáveis pela criação da força motora para o movimento celular, além de contração e retração da parte traseira de células em movimento (SPIERING; HODGSON, 2011).

Como a localização e função de proteínas relacionadas ao citoesqueleto de actina estão correlacionadas, a distribuição de cofilina total/fosforilada e actina foram avaliadas no modelo experimental estudado. Os dados apontam para a formação de um padrão organizacional de cofilina-total e fosforilada distinto nas células em TEM, possivelmente regulando a reorganização da actina em diferentes regiões subcelulares. As vias de sinalizações que regulam a fosforilação das proteínas LIMKs regulam subsequentemente a atividade de corte de cofilina-1. Além de RhoA, tanto Rac quanto Cdc 42 podem de modo indireto (via PAKs) regular as LIMKs e a fosforilação de cofilina-1 (EDWARDS et al., 1999). Assim, acredita-se que as RhoA-GTPases regule de modo diferencial o padrão estrutural formado pela actina, através da regulação da cofilina-1 em distintas regiões subcelulares. As imagens por microscopia confocal e de super resolução confirmam e demonstram que a proteína cofilina-1 desfosforilada (ativa) é distribuída em regiões próximas à membrana plasmática, onde é necessário o rápido *turnover* da actina para o crescimento do lamelipódio, e ao longo da célula co-localiza-se com as fibras de stress, regulando a formação dessas estruturas. Já a



pcofilina-1 concentra-se na parte posterior da célula, com sua atividade de corte inibida fibras de stress são formadas nessa região. Portanto, é possível especular que a sinalização de TGF- $\beta$  ative e direcione tanto Rac e Cdc42 para a parte anterior da célula, quanto RhoA para a parte posterior da célula, desse modo a distribuição e atividade espacial de cofilina-1 seriam regulados em células em TEM. De fato, alguns estudos demonstraram que RhoA e Rac atuam de modo antagônico, separadas espaço-temporalmente. RhoA está envolvida na formação inicial das protrusões e na retração da parte posterior da célula, enquanto Rac1 e Cdc42 são responsáveis pela ativação de vias implicadas na robustez e estabilização de protrusões recém expandidas, como lamelipódios e filopódios respectivamente (MACHACEK et al., 2009; MARTIN et al., 2016).

Quando silenciou-se cofilina-1, foi observado aumento de pLIMK2 nas células tratadas com TGF- $\beta$  em relação às células somente tratadas com TGF- $\beta$ . Como nas células silenciadas não havia cofilina-1 disponível para pLIMK2 fosforilar, é provável que isso tenha estimulado a uma retroalimentação positiva da via acarretando em aumento dos níveis de pLIMK2, ou pode ter acontecido acúmulo de pLIMK2 devido a inibição de atividade de proteínas fosfatases. São necessários mais estudos para determinar a correlação da fosforilação de LIMK2 com a presença ou ausência de cofilina-1.

Como células em TEM podem ativar a genes que regulam a diferenciação morfológica e consequente reorganização do citoesqueleto de actina, buscou-se determinar se cofilina-1 estaria envolvida nesse evento. O aumento de tamanho e alongamento celular observado nas células tratadas com TGF- $\beta$  foi parcialmente abolido pelo silenciamento de cofilina-1. Além disso, projeções membranares típicas de células tratadas com TGF- $\beta$  não foram observadas nas células silenciadas, indicando que o papel de cofilina-1 na formação dessas estruturas é provavelmente devido ao controle organizacional diferencial do citoesqueleto de actina em compartimentos celulares distintos. Corroborando essa ideia, um trabalho demonstrou que cofilina-1 eleva as taxas de G-actina citoplasmática, provavelmente atuando na manutenção do *pool* de monômeros, aumentando a montagem de filamentos de actina na ponta do lamelipódio (KIUCHI et al., 2007). Outro trabalho também relacionou a via de RhoA/LIMK2/pcofilina-1 estimulada por TGF- $\beta$  com a reorganização/estabilidade do citoesqueleto de actina e formação de fibras de stress (VARDOULI; MOUSTAKAS; STOURNARAS, 2005). Esse dado é uma evidência direta que cofilina-1 é necessária para as mudanças morfológicas das células em TEM. Dados indicam que não é incomum ABPs estarem intimamente relacionadas com a regulação dessas alterações. Como dito anteriormente, a via de sinalização PI3K-AKT-mTOR pode regular essas mudanças morfológicas via TGF- $\beta$ , porém além dessa via ABPs relacionadas com a dinâmica da actina,

como a miosina do tipo II, tropomiosinas e as forminas são consideradas essenciais na construção, reorganização e modulação do citoesqueleto importantes nas mudanças morfológicas (NALLURI; O'CONNOR; GOMEZ, 2015; SUN et al., 2015).

Adicionalmente, foi observado acúmulo de F-actina em forma de fibras de stress no grupo das células siCofilina-1 + TGF- $\beta$ , o que reforça o requerimento de cofilina-1 na regulação da dinâmica de actina durante a TEM. De fato, um estudo já demonstrou que a depleção de cofilina-1 pode promover instabilidade severa do empacotamento de F-actina devido à ativação de miosinas com formação de fibras contráteis e instáveis (KANELLOS et al., 2015).

A regulação fina e precisa entre a formação/estabilidade/função das junções celulares e a migração celular é fundamental durante a homeostase e no desenvolvimento de doenças incluindo a formação de metástases (YAMADA; NELSON, 2007). Porém, ainda não é completamente elucidada a inter-relação de mecanismos celulares que regulam as junções celulares e a migração celular. Contudo, sabe-se que durante a TEM o complexo juncional é desmontado seguido de mudanças na actina membranar e cortical resultando em aumento da motilidade celular (DONGRE; WEINBERG, 2018). Dados na literatura têm demonstrado que durante a TEM, RhoA/ROCK exerce papel fundamental na ruptura dos complexos juncionais pelo remodelamento do actina cortical, levando a saída da E-caderina das adesões celulares e favorecendo a migração celular (BHOWMICK et al., 2001; CHO; YOO, 2007; SHANKAR; NABI, 2015). Consistente com essa ideia, nossos resultados demonstraram que a regulação do citoesqueleto de actina mediada por cofilina-1 pode modular eventos envolvidos no potencial maligno, modulando a organização do complexo juncional durante a TEM em células de câncer de cólon. Embora o grupo de células siCofilina-1 + TGF- $\beta$  tenha exibido instabilidade em F-actina, as proteínas juncionais E-caderina e claudina-3 retornaram às adesões célula-célula, e os níveis proteicos de claudina-3 foram restaurados. Interessantemente, os níveis proteicos de E-caderina não foram restaurados com o silenciamento indicando que sua regulação (gênica e/ou transcricional) acontece por outras vias de sinalizações e com pouca influência do citoesqueleto de actina. Em adição, estudos indicam que a progressão da TEM é um processo não linear envolvendo plasticidade transcricional e celular, cujas células podem oscilar entre um espectro de fases intermediárias, chamado de TEM parcial (DONGRE; WEINBERG, 2018). Corroborando, células siCofilina-1 + TGF- $\beta$  exibiram amplo espectro de fases epiteliais e mesenquimais, onde algumas células exibiram parcial restauração de E-caderina e claudina-3 nos contatos celulares, porém ainda exibindo tamanho celular aumentado indicando restauração parcial dos efeitos de TGF- $\beta$ . Enquanto outras células

exibiram restauração quase total das proteínas juncionais aos contatos célula-célula e diminuição do tamanho celular, o que pode indicar reversão total dos efeitos de TGF- $\beta$ .

De modo interessante, além da restauração parcial ou total de proteínas epiteliais as células siCofilina-1 + TGF- $\beta$  exibiram discreta diminuição dos níveis proteicos de vimentina. Corroborando esse dado, um estudo com modelo de câncer gástrico demonstrou que a depleção de cofilina-1 poderia aumentar os níveis de proteínas mesenquimais como a vimentina e a N-caderina (WANG et al., 2017). Uma hipótese para esse efeito observado é a regulação de sua expressão gênica através da modulação do citoesqueleto de actina. Sabe-se que a organização da actina pode afetar a expressão gênica por meio da interação e controle da localização subcelular de fatores de transcrição, incluindo os reguladores transcricionais da TEM como os fatores transcricionais relacionados com miocardina (do inglês *myocardin related transcription factors (MRTF)-A e -B*) e as proteínas coativadoras transcricionais YAP e TAZ (do inglês *yes-associated protein -YAP e transcriptional co-activator with PDZ-binding motif -TAZ*). Adicionalmente Liu e colaboradores, utilizando linhagem celular de câncer de mama, demonstraram que a vimentina pode atuar na reorganização da arquitetura do citoesqueleto de actina, além de repolarizar a rede de microtúbulos e participar na maturação das adesões focais, tudo isso favorecendo o aumento da força mecânica das células e a capacidade de migração direcional (LIU et al., 2015). Nesse sentido, há indícios que a dinâmica de ambos os filamentos possam estar interligados, onde tanto vimentina controla a organização do citoesqueleto de actina, quanto o citoesqueleto de actina por meio da cofilina-1 regula a distribuição de vimentina em células TEM. Contudo, mais ensaios devem ser realizados para identificar o mecanismo ou a relação precisa entre as proteínas cofilina-1 e vimentina.

Reforçando a ideia do papel de cofilina-1 sob a dinâmica da actina, há indícios que as formas de cofilina-1 desfosforilada (ativa) e fosforilada (inativa) podem ter papel importante de acordo com suas regulações e localizações subcelulares durante a TEM. Para testar essa hipótese foram geradas células HT-29 expressando cofilina-1 mutantes: cofilina selvagem (WT), cofilina-1 ativa (S3A) e cofilina-1 inativa (S3E). Como esperado, nossos resultados indicam o papel distinto de cada mutante de cofilina-1 utilizado sob a actina. Em relação à desmontagem juncional os dados demonstraram que células cofilina-1 S3E mutantes, forma de cofilina-1 constitutivamente fosforilada, exibiram padrão similar às células tratadas com TGF- $\beta$ , exibindo redução dos níveis proteicos de E-caderina e claudina-3 nas junções célula-célula. No entanto, embora a fosforilação de cofilina-1 seja requerida para o fenótipo de TEM, é importante destacar que a forma desfosforilada de cofilina-1 também possui papel crítico na regulação desses eventos. O balanço fino entre níveis proteicos e localização subcelular de

cofilina-1 (fosforilada e desfosforilada) e seu regulador LIMKs é determinante para a modulação de pequenas mudanças observadas no citoesqueleto de actina (WANG et al., 2006). Além disso, os níveis de LIMK2 desfosforilada pode ter uma indireta, porém significativa participação na desmontagem juncional durante a TEM, aumentando os níveis de cofilina-1 ativa nos contatos célula-célula o que poderia levar ao aumento das taxas de despolimerização/corte da actina cortical e consequente desagregação das proteínas juncionais ancoradas ao citoesqueleto de actina. De fato, dados na literatura descrevem o papel crítico das proteínas LIMKs e cofilina-1 na desaceleração e aceleração do fluxo retrógrado da polimerização de actina respectivamente, na regulação da dinâmica de actina durante a extensão do lamelipódio (OHASHI et al., 2011). Desse modo, é possível que a atividade de cofilina-1 atue na forma de um ciclo de desativação/ativação entre os estados fosforilado e desfosforilado de maneira distinta em diferentes compartimentos subcelulares.

A atividade de cofilina-1 na remodelagem a actina é importante também na regulação da motilidade celular (BRAVO-CORDERO et al., 2013). Estudos já haviam descrito como a regulação de cofilina-1 pode determinar o comportamento migratório de alguns tipos de cânceres incluindo o de mama, próstata, e gástrico (TAHTAMOUNI et al., 2013; COLLAZO et al., 2014; WANG et al., 2017). Os dados aqui apresentados corroboram tais estudos, células siCofilina-1 + TGF- $\beta$  exibiram redução na migração de células individuais e coletivas. De fato, a migração celular depende da reorganização finamente coordenada do citoesqueleto de actina e do controle da dinâmica de formação de protusões membranares como os lamelipódios e filopódios direcionando a migração celular (BRAVO-CORDERO et al., 2013).

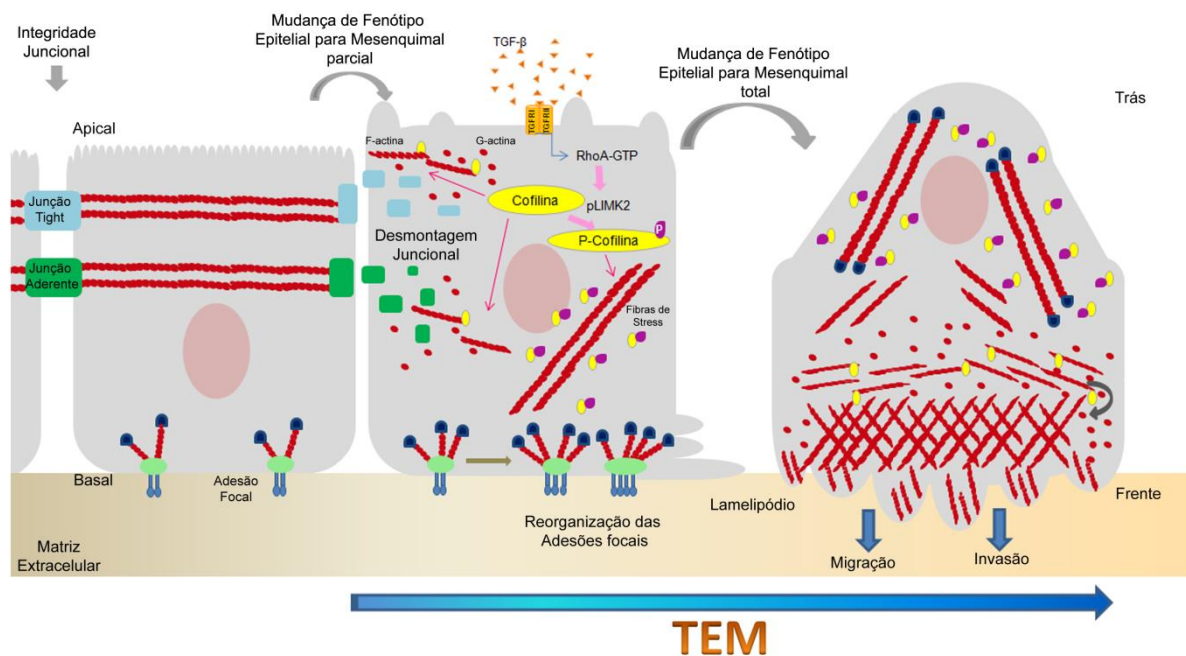
Em adição, as células siCofilina-1 + TGF- $\beta$  também apresentaram níveis de invasão celular reduzidos assim como redução da atividade de MMP-2 e 9. Tais dados estão de acordo com dados da literatura (COLLAZO et al., 2014; WU et al., 2016; WANG et al., 2017). Estudos já encontram cofilina-1 em regiões de invadopódios associada com a proteína cortactina, regulando a estabilidade e dinâmica dessas estruturas tridimensionais membranares o que provavelmente pode refletir no recrutamento de vesículas com MMPs para essa região da célula (OSER; CONDEELIS, 2009; OSER et al., 2009; HAGEDORN et al., 2014).

A dinâmica do citoesqueleto de actina e das adesões focais é crucial para a migração celular, modulando a adesão célula-matriz e o espalhamento celular. O complexo proteico que compõe as adesões focais, entre várias proteínas, é formado por fibras de stress, intimamente associados com a dinâmica das adesões focais. As fibras de stress conectadas às adesões focais devem ser cortadas para iniciação, estabilização, propagação e finalização do *turnover* das adesões focais. Em resposta à vias de sinalizações, as adesões focais nascentes podem se desmontar ou se tornar maduras e organizadas de modo a fornecer em conjunto com a actina e

actomiosina (fibras de stress) a força motora e a contratilidade necessárias para o movimento celular (CIOBANASU; FAIVRE; LE CLAINCHE, 2012; SMITH; VELLANKI; HOPKINS, 2016; BAYS; DEMALI, 2017). Os resultados aqui apresentados demonstram significativo aumento de F-actina associada com aumento de tamanho das adesões focais e aumento dos níveis proteicos de vinculina nas células siCofilina-1 + TGF- $\beta$ . Estes dados encontram-se de acordo com outros estudos, onde foi descrito aumento do tamanho e número de adesões focais em células com depleção de cofilina-1 (TAHTAMOUNI et al., 2013; KANELLOS et al., 2015). Consistente com essas observações, um estudo demonstrou que a localização de cofilina-1 em regiões próximas à adesões focais, e a regulação de sua atividade de corte por fosfatases específicas, poderia regular o *turnover* das adesões focais (MARSHALL; ALOOR; BEAR, 2009). Além disso, dados na literatura apontam que a depleção de cofilina-1 poderia aumentar a adesão das células à matriz extracelular através de colágeno tipo I e fibronectina (TAHTAMOUNI et al., 2013; COLLAZO et al., 2014). Embora os dados apontem que cofilina-1 seja importante para a organização das fibras de actina e vinculina na dinâmica das adesões focais, os dados também demonstram que cofilina-1 parece não alterar os níveis de auto fosforilação de FAK. Em contraste, um estudo demonstrou que células de melanoma murino, que exibiam cofilina-1 ativa aumentaram a taxa e a extensão da formação de adesões focais, além da aceleração na fosforilação de FAK no resíduo Y397 (sítio de auto fosforilação) e em Y576 (domínio quinase) (DANG; BAMBURG; RAMOS, 2006). Possivelmente, essas controvérsias em relação aos níveis de fosforilação de FAK tenham ocorrido por diferenças no modelo experimental ou por discrepância na taxa de atividade de cofilina-1 entre as células estudadas. Ensaios adicionais devem ser conduzidos para determinar se cofilina-1 pode modular os níveis de fosforilação de FAK em outros resíduos.

Embora muitos trabalhos cite a cofilina-1 participando no desenvolvimento da progressão de diversos carcinomas, como descrito nos parágrafos anteriores, somente dois trabalhos recentes relacionam suas atividades com a TEM durante a carcinogênese. Collazo e colaboradores demonstraram em modelo de carcinoma de próstata *in vitro* e *in vivo* (inoculação subcutânea em camundongos nude) que cofilina-1 desfosforilada (ativa) favorece o aumento das taxas de migração, invasão e metástases (COLLAZO et al., 2014). Wang e colaboradores demonstraram utilizando linhagem de carcinoma gástrico a importância de cofilina-1 na reversão do fenótipo TEM. Uma vez silenciada por lentivírus, a depleção de cofilina-1 aumentou os níveis proteicos de E-caderina e reduziram os níveis de SNAIL, vimentina e N-caderina, além de reduzir a migração, invasão e metástases no modelo analisado (WANG et al., 2017). Nossos conjuntos de dados corroboram os dois trabalhos e é o primeiro trabalho a detalhar o mecanismo celular de cofilina-1 em eventos relacionados com

TEM em modelo de CCR. A figura 6.1 ilustra o papel de cofilina-1 no modelo estudado. A regulação do citoesqueleto de actina mediado por cofilina-1 modula: (1) a mudança de morfologia de epitelial para mesenquimal, (2) a desmontagem das junções aderentes e *tight*, (3) a regulação do tamanho e a organização das adesões focais, (4) os níveis de migração e (5) invasão celular, além da (6) atividade de metaloproteases em células HT-29 em TEM.



**Figura 6.1 - Representação esquemática do papel de cofilina-1 em eventos da TEM.** O TGF- $\beta$  liberado da matriz extracelular pode ativar seus receptores (T $\beta$ R-I e II), em seguida ativar RhoA e componente *downstream* ROCK. Posteriormente, LIMK2 é ativada por ROCK (fosforilação) e regula a inativação da cofilina-1 por fosforilação. A ativação da cofilina-1 é mediada por fosfatases (SSHs) por desfosforilação. O ciclo de atividade da cofilina-1 (LIMKs/cofilina-1) ocorre em diferentes regiões celulares, regulando localmente os ciclos de polimerização/despolimerização da actina, levando ao aumento das taxas de dissociação dos monômeros de actina (G-actina) ou aumento da formação de filamentos de actina (F-actina). Inicialmente, cofilina-1 ativa localizaria na região anterior celular e nos contatos célula-célula mediando a dissolução da actina cortical, resultando na desmontagem juncional, favorecendo o acúmulo das proteínas das junções aderente e junções *tight* no citoplasma. Desse modo, as células epiteliais iniciariam parcialmente a troca de sua polaridade ápico-basal para ântero-posterior, impulsionada também pela mudança na expressão de proteínas epiteliais para mesenquimais por meio de fatores de transcrição (ex. SNAIL, SLUG e TWIST). Posteriormente, cofilina-1 desfosforilada (ativa) é direcionada e concentra-se no córtex da membrana e através da polimerização e despolimerização rápida da actina desempenha papel importante na extensão das projeções de membrana como os lamelipódios. Por outro lado, a cofilina-1 fosforilada (inativa) e seu regulador LIMK2 concentram-se na parte posterior da célula, estimulando a formação de fibras de stress pela inibição do corte de actina, estruturas importantes para a geração da força de contração intracelular que resulta no avanço do corpo celular durante a migração. As junções basais formadas pelas adesões focais são reorganizadas pelo rearranjo de actina dirigidos pelo ciclo de atividade de cofilina-1, refletindo no empacotamento e organização das adesões focais. A reorganização da actina favorece a troca de fenótipo epitelial para mesenquimal, o que aumenta as taxas de migração e invasão.

## 7 RESULTADOS PARTE II

Variações nos níveis de cofilina-1 e de seus reguladores (LIMK1 e SSH1) podem exercer efeito sobre a motilidade de células tumorais, afetando diretamente agressividade tumoral (WANG et al., 2006). Desse modo, a segunda parte do presente estudo consistiu na análise retrospectiva dos níveis de cofilina-1, LIMK1 e SSH1 em amostras de pacientes com câncer colorretal atendidos no HC-I do INCA (ver Tabela 4.1, seção matérias e métodos onde se detalha a seleção e número de amostras utilizadas nos diferentes ensaios). A tabela 7.1 exhibe os dados clinicopatológicos dos pacientes inseridos no estudo.

A maior parte dos pacientes do estudo possuía mais de 60 anos (64%) na data da colectomia, além disso, nossa coorte foi composta por mais pacientes do sexo feminino (57%). Como o CCR é uma doença cujo diagnóstico geralmente não ocorre em fases iniciais, somente 21% dos pacientes eram do estadio I. Os estadios II (30%) e III (36%) foram os mais frequentes, e, como a cirurgia é pouco recomendada para estadios IV, o estudo contou com somente 13% de casos desse estadio. Quanto a localização do tumor primário, houve um predomínio no cólon direito, envolvendo o ceco e/ou a parte ascendente do cólon (44%). O percentual de pacientes com tumores primários na parte sigmoide e no reto foi de 33%. Já os tumores na parte esquerda descendente e transversa do cólon representaram respectivamente 16% e 6% da nossa coorte. A graduação histológica mais comum foi de adenocarcinoma moderadamente diferenciado. Contudo, pacientes com perfil tumoral mais agressivo, com morfo patologia mucinosa (17%) e de anel de sinete (5%), também foram incluídos no estudo (Tabela 7.1).

**Tabela. 7.1 - Dados clinicopatológicos de pacientes com câncer colorretal inseridos no estudo**

---

<b>Idade</b>	<i>n</i>
> 60 anos	35 (36%)
≤ 60 anos	62 (64%)
<b>Gênero</b>	
Masculino	42 (43%)
Feminino	55 (57%)
<b>Estadiamento (CJAC v.7)</b>	
I	20 (21%)
II	29 (30%)
III	35 (36%)
IV	13 (13%)
<b>Localização</b>	
Ceco/ascendente	43 (44%)
Transverso	6 (6%)
Descendente	15 (16%)
Sigmóide/reto	33 (34%)
<b>Tipo histológico</b>	
Adenocarcinoma	76 (78%)
Mucinoso	17 (17%)
Anel de sinete	4 (5%)
<b>Grau de diferenciação</b>	
Bem	4 (5%)
Moderadamente	86 (89%)
Pouco	7 (7%)
<b>Metástase linfonodal</b>	35(III) e 5 (IV)
<b>Metástase hepática</b>	13
<b>Total</b>	97

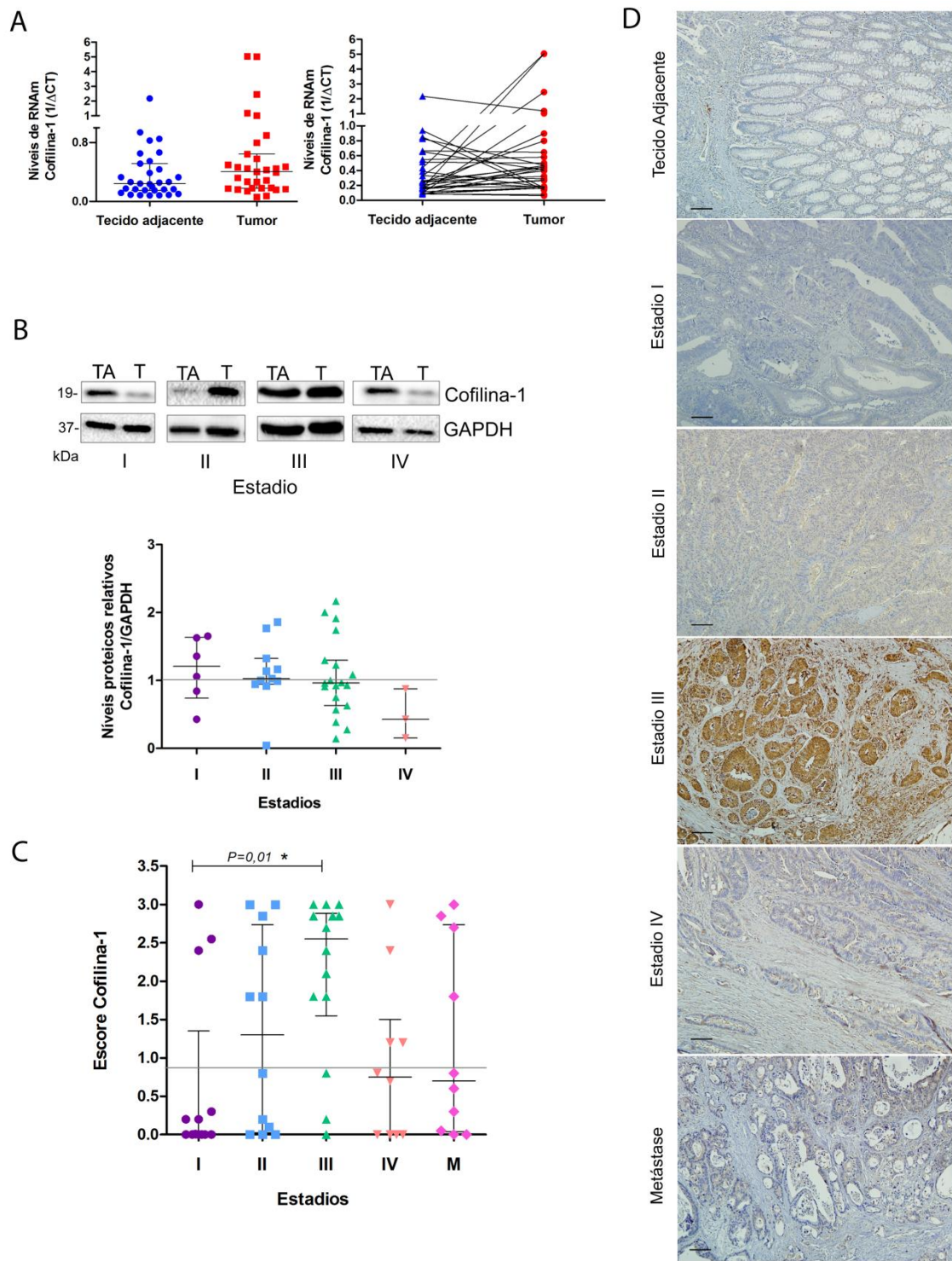
---



Inicialmente, avaliamos os níveis transcricionais de cofilina-1 na coorte selecionada. Foi observado que os níveis de RNAm nos tumores são semelhantes aos do tecido adjacente (Fig. 7.1 A). Porém, quando avaliamos de forma pareada os níveis de RNAm de cofilina-1 do tecido adjacente e tumoral de cada paciente, verificamos que seus níveis variam de forma heterogênea em relação ao tecido adjacente, ou seja, em alguns pacientes os níveis no tumor encontram-se aumentados, em outros reduzidos, e, ainda, há pacientes em que não são observadas diferenças quando são confrontados os níveis no tumor e no tecido adjacente.

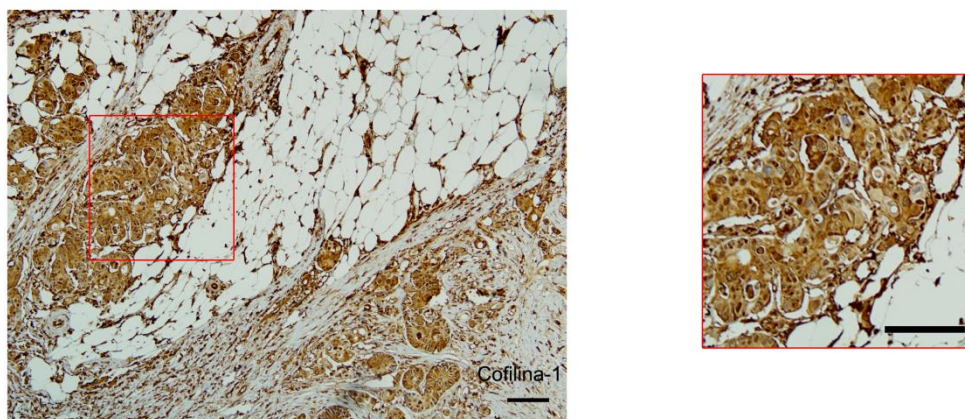
Em seguida, avaliamos por *Western Blotting* os níveis proteicos de cofilina-1 em diferentes estádios do CCR (Fig. 7.1 B). Os estádios I e II exibiram mais pacientes com níveis proteicos relativos de cofilina-1 acima dos níveis do tecido adjacente. Por outro lado, os estádios III e IV exibiram níveis relativos, em sua maioria, abaixo dos níveis do tecido adjacente. Esses dados sugerem que em estádios iniciais os tumores exibem aumento nos níveis proteicos de cofilina-1, porém, a medida que a progressão tumoral avança, esses níveis são reduzidos. No entanto, devido ao baixo número de pacientes nos estádios I e IV, essas hipóteses não foram ainda confirmadas.

Com a finalidade de contornar o baixo número de pacientes em estágio I e IV inseridos no estudo, utilizamos a análise por imunohistoquímica (IHC) a partir de blocos de parafina. Utilizamos 13 amostras de tecido em estágio I, 12 em estágio II, 14 em estágio III, 10 em estágio IV e 10 amostras de tecido metastático hepático. O gráfico da figura 7.1 C exibe os escores de marcação (intensidade x porcentagem de células marcadas) de cofilina-1 nos diferentes estádios e nas metástases hepáticas analisadas. Conforme pode-se observar, tumores com o estágio III exibiram marcação mais proeminente (mediana 2,5) quando comparados com outros estádios e metástases hepática. As amostras do estágio I exibiram mediana de 0,01, demonstrando níveis baixos de cofilina-1 no estágio inicial. Já as amostras do estágio II apresentaram mediana de 1,3 enquanto no estágio IV a mediana foi de 0,75. As amostras de metástase hepática apresentaram mediana de 0,7. Esses dados confirmam a observação anterior que durante a progressão tumoral os níveis de cofilina-1 aumentam conforme a doença progride, porém, uma vez estabelecida a doença metastática, tanto o tumor primário (estádio IV) quanto o secundário voltam a apresentar os níveis cofilina-1 reduzidos. A figura 7.1 D exibe imagens representativas de marcação de cofilina-1 por IHC.



**Figura 7.1 - Análise dos níveis cofilina-1 em amostras de CCR.** (A) Avaliação dos níveis de RNAm de cofilina-1 por RT-qPCR (1/ΔCT) em amostras de tecido adjacente e tumoral (n=32). Dados apresentados com mediana e interquartil (B) Análise por *Western Blotting* dos níveis proteicos relativos de cofilina-1 no tecido adjacente (TA) e no tecido tumoral (T), separados pelos estádios I, II III e IV (n=39). Imagens representativas dos níveis proteicos de cofilina-1 em amostras de pacientes com CCR, tecido adjacente (TA) e tecido tumoral (T). Como proteína constitutiva utilizou-se marcação da proteína GAPDH. A normalização ocorreu pelos níveis do tecido adjacente, a linha cinza indica essa normalização (=1). (C) Gráfico com quantificação dos dados de IHC. Os escores foram determinados pela intensidade x área de marcação. Os altos e baixos níveis de cofilina-1 foram determinados por valores acima e abaixo da mediana (0,8) respectivamente (alto n=27 e baixo n=23). A linha cinza representa o escore mediano (0,8). A dispersão dos dados foi dada em mediana e interquartil. Análise estatística foi realizada pelo teste *t-student* não pareado e a diferença foi considerada significativa quando: \*  $P<0,05$ . (D) Imagens representativas da análise por IHC de cofilina-1. Imagens do tecido adjacente, diferentes estádios (I-IV) e metástase hepática. Barra:100μm.

A marcação para cofilina-1 foi primordialmente citoplasmática tanto no tecido adjacente quanto no tecido tumoral (Fig. 7.2). O músculo liso, o endotélio vascular e o plexo nervoso em geral também apresentaram marcação positiva para esta proteína. Além disso, o infiltrado inflamatório presente como plasmócitos e linfócitos também foram positivos.



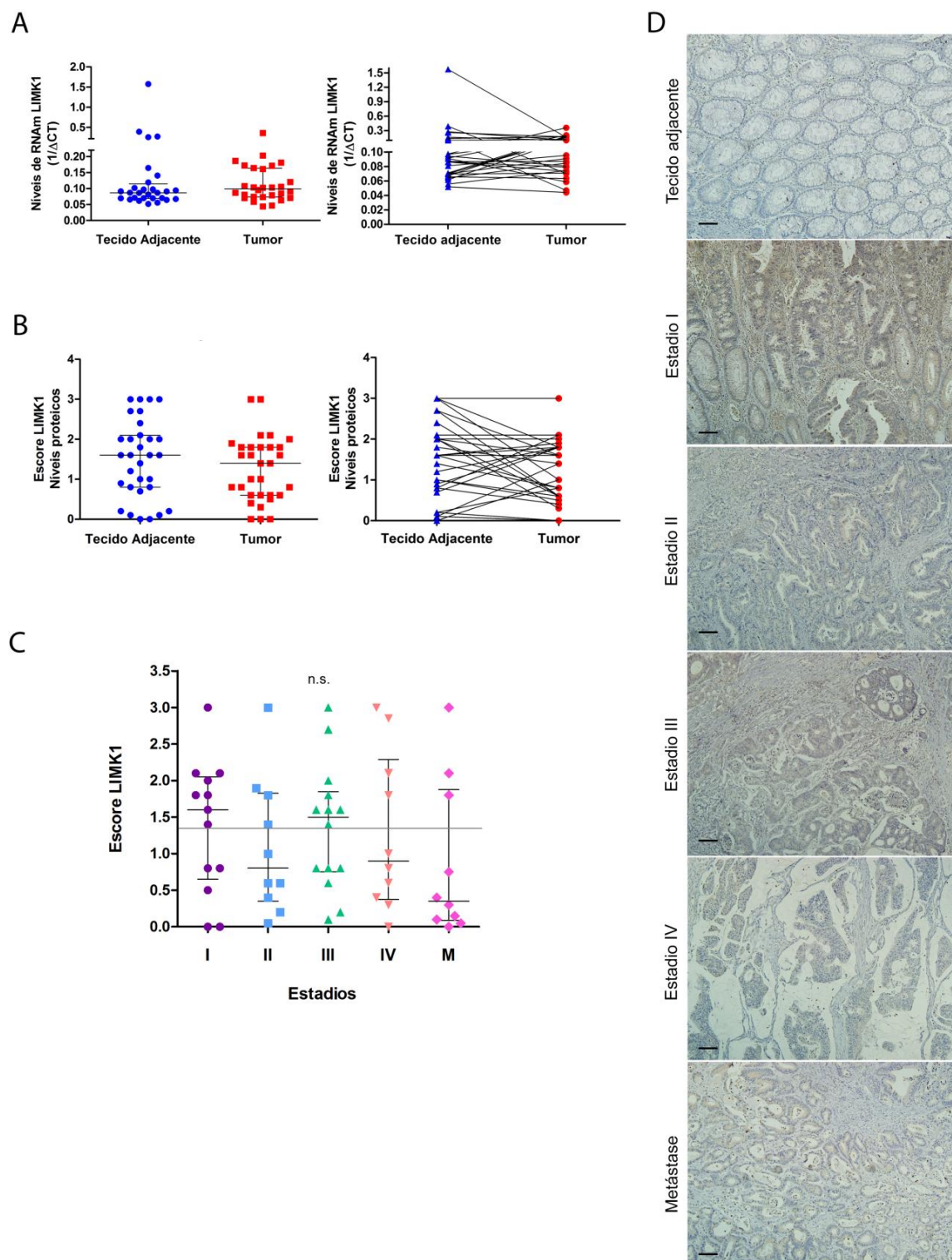
**Figura 7.2 - Imagem representativa da distribuição citoplasmática de cofilina-1 em amostras de CCR por IHC. Amostra de paciente em estadio III. Barra:100 $\mu$ m.**

Em seguida, com a finalidade de avaliar se os níveis de cofilina-1 têm associação com parâmetros clinicopatológicos dos pacientes, os níveis (escores) foram classificados como baixos ou altos tomando como referência o valor da mediana (0,8), assim valores iguais ou acima da mediana foram classificados como alto, e valores abaixo foram classificados como baixo. A tabela 7.2 exhibe os resultados das associações. Os altos níveis de cofilina-1 não tiveram associação com o gênero, idade, localização, grau de diferenciação, invasão perineural - angiolinfática e metástase hepática ( $P>0,05$ ). Contudo, os altos níveis correlacionaram-se positivamente com metástase linfonodal ( $P<0,01$ ). Além disso, pacientes com tumores mucinosos exibiram altos níveis de cofilina-1 ( $P<0,01$ ). De fato, pacientes do estadio III (com metástase linfonodal positivo) apresentaram altos níveis de cofilina-1 quando comparados com pacientes do estadio I (com metástase linfonodal negativo) ( $P<0,01$ ). Esses dados de correlação com parâmetros de progressão tumoral sugerem que níveis aumentados de cofilina-1 podem ser potenciais fatores preditores de acometimento linfonodal, além de prever tumores com fenótipo mais agressivo como os mucinosos.

Tabela 7.2 - Associação dos níveis de cofilina-1 com parâmetros clinicopatológicos de pacientes com CCR

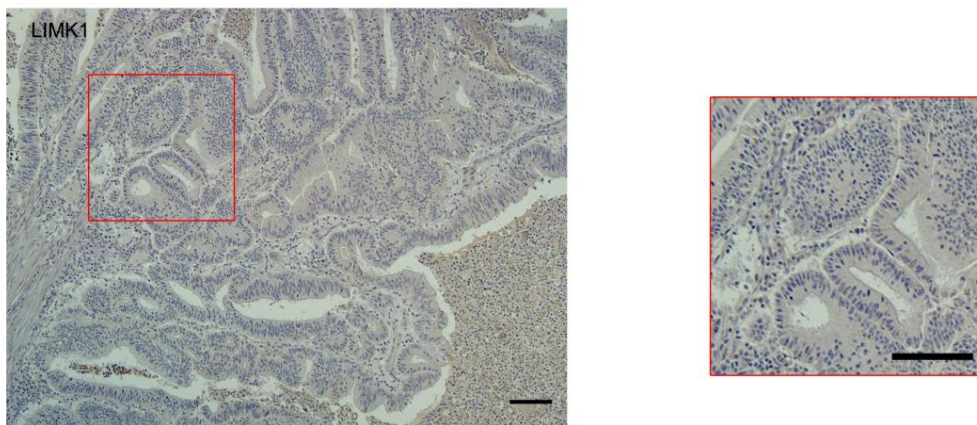
Parâmetro	n	Escore cofilina-1		Valor de P
		Baixo	Alto	
<b>Gênero</b>				
Masculino	19	7	12	0,589
Feminino	30	15	15	
<b>Idade</b>				
<60	17	10	7	0,224
≥60	32	12	20	
<b>Localização</b>				
Ceco/ascendente	14	3	11	0,325
Transverso	3	1	2	
Descendente	10	5	5	
Sigmóide/reto	22	13	9	
<b>Tipo histológico</b>				
Adenocarcinoma	41	21	20	*0,03
Adenocarcinoma/Mucinoso	8	1	7	
<b>Grau de diferenciação</b>				
Bem	1	1	0	0,508
Moderadamente	45	20	25	
Pouco	3	1	2	
<b>Volume tumoral</b>				
<27	24	13	11	0,32
≥27	25	10	15	
<b>Invasão perineural</b>				
Negativo	38	17	21	0,91
Positivo	11	5	6	
<b>Invasão angiolímfática</b>				
Negativo	36	15	21	0,218
Positivo	13	7	6	
<b>Metástase linfonodal</b>				
Negativo	30	19	11	**0,001
Positivo	19	3	16	
<b>Metástase hepática</b>				
Negativo	39	17	22	0,827
Positivo	10	5	5	
<b>Estádio (CJAC)</b>				
I	13	10	3	**0,001
III	14	2	12	
I	13	10	3	0,122
IV	10	5	5	

Em seguida, considerando que as proteínas LIMKs são as reguladoras que inibem a função de cofilina-1 através de sua fosforilação, buscamos avaliar os níveis de LIMK1 e não LIMK2 nas amostras de tecido já que há trabalhos que descrevem níveis muito baixos de LIMK2 em amostras de CCR (LOURENÇO et al., 2014). Os níveis (scores) e a expressão gênica de LIMK1 foram analisados por IHC e RT-qPCR respectivamente. Os resultados apresentados na figura 7.3 A e B demonstram que os níveis tanto de RNAm quanto da proteína encontram-se próximos aos observados nos tecidos adjacentes. Porém, seus níveis são distribuídos de forma heterogênea entre os pacientes, semelhantemente ao encontrado para os níveis de cofilina-1. Em relação a distribuição de LIMK-1 entre os estadios, os dados também demonstraram heterogeneidade, não havendo diferenças entre os estadios ( $P>0,05$ ) (Fig. 7.3 C e D).



**Figura 7.3- Análise dos níveis LIMK1 em amostras de CCR.** (A) Avaliação dos níveis de RNAm de LIMK1 por RT-qPCR (1/ΔCT) em amostras de tecido adjacente e tumoral (n=28). Dados apresentados com mediana e interquartil (B) Análise dos níveis proteicos de LIMK1 através de escores obtidos por IHC do tecido adjacente e tecido tumoral. Os escores foram determinados pela intensidade x área de marcação. (C) Gráfico com quantificação dos dados de IHC da marcação de LIMK1. Os escores foram determinados pela intensidade x área de marcação. A linha cinza representa o escore mediano (1,4). Os altos e baixos níveis de LIMK1 foram determinados por valores acima e abaixo da mediana (1,4) respectivamente (alto n=27 e baixo n=22). A dispersão dos dados foi dada em mediana e interquartil. Análise estatística foi realizada pelo teste *t*-*student* não pareado e a diferença foi considerada significativa quando: \* P<0,05, não significativo (n.s.) (D) Imagens representativas da análise por IHC de LIMK1. Imagens do tecido adjacente, diferentes estádios (I-IV) e metástase hepática. Barra: 100μm.

A localização subcelular de LIMK1, demonstrada pela análise de IHC foi majoritariamente citoplasmática (Fig. 7.4), porém, alguns pacientes apresentaram marcação nuclear, tanto no tecido adjacente quanto no tumoral. O músculo liso, endotélio e células inflamatórias foram positivas.



**Figura 7.4 - Imagem representativa da distribuição citoplasmática de LIMK1 em amostras de CCR por IHC. Amostra de paciente em estadio II. Barra: 100  $\mu$ m.**

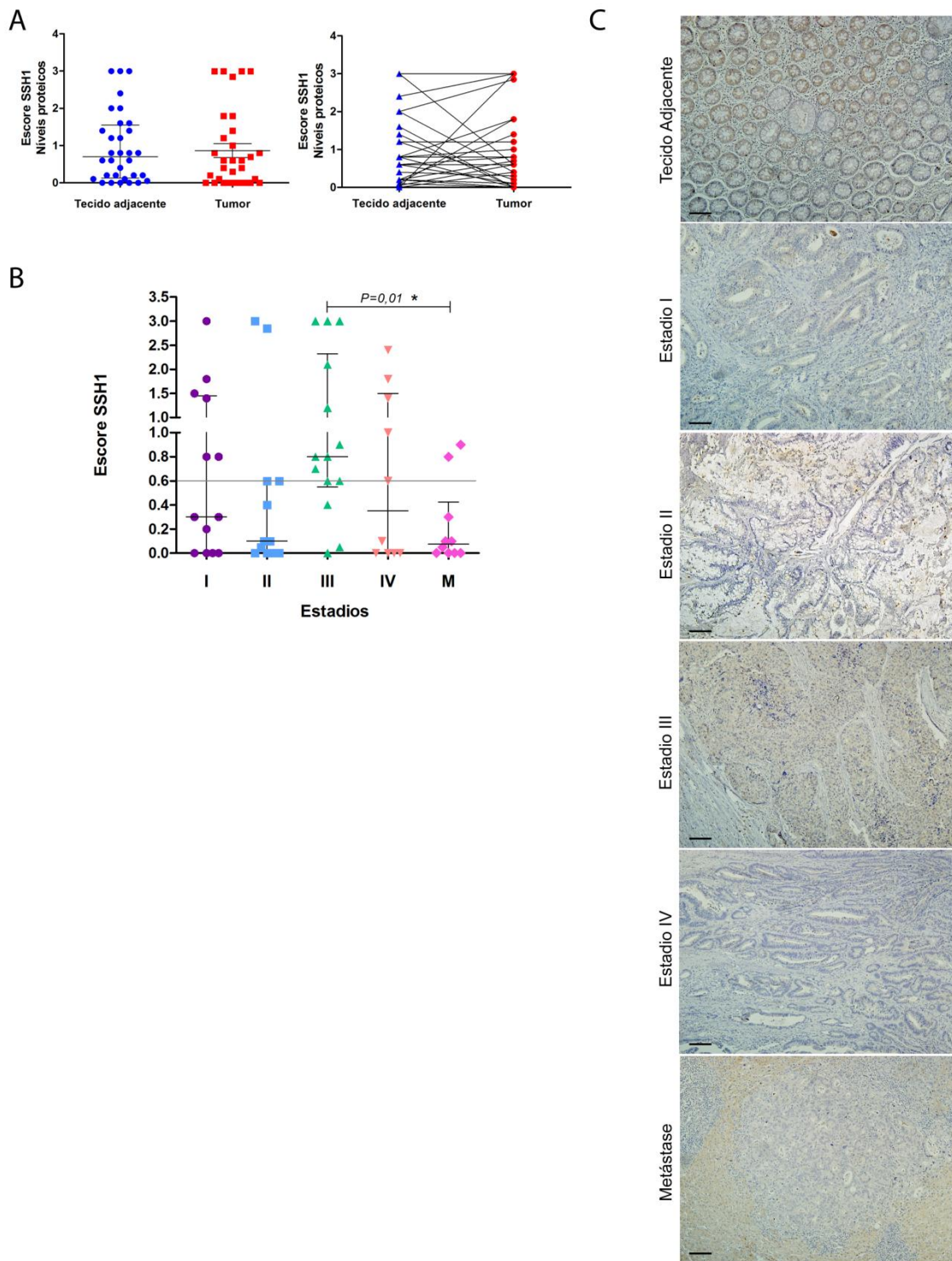
Do mesmo modo que nas análises de cofilina-1, os níveis (scores) de LIMK1 foram classificados como baixos ou altos tomando como referência o valor da mediana (1,4), assim valores iguais ou acima da mediana foram classificados como alto, e valores abaixo foram classificados como baixo. Conforme pode ser observado na tabela 7.3, os níveis de LIMK1 não se correlacionaram com nenhum dos parâmetros analisados.

Tabela 7.3 - Associação dos níveis de LIMK1 com parâmetros clinicopatológicos de pacientes com CCR

Parâmetro	n	Escore LIMK1		Valor de P
		Baixo	Alto	
<b>Gênero</b>				
Masculino	19	9	10	0,782
Feminino	30	13	17	
<b>Idade</b>				
<60	17	8	9	0,846
≥60	32	14	18	
<b>Localização</b>				
Ceco/ascendente	14	6	8	0,309
Transverso	3	0	3	
Descendente	10	4	6	
Sigmóide/reto	22	12	10	
<b>Tipo histológico</b>				
Adenocarcinoma	41	20	21	0,216
Adenocarcinoma/Mucinoso	8	2	6	
<b>Grau de diferenciação</b>				
Bem	1	1	0	0,155
Moderadamente	45	21	24	
Pouco	3	0	3	
<b>Volume tumoral</b>				
<27	24	11	13	0,874
≥27	25	11	14	
<b>Invasão perineural</b>				
Negativo	38	17	21	0,966
Positivo	11	5	6	
<b>Invasão angiolinfática</b>				
Negativo	36	16	20	0,915
Positivo	13	6	7	
<b>Metástase linfonodal</b>				
Negativo	30	13	17	0,782
Positivo	19	9	10	
<b>Metástase hepática</b>				
Negativo	39	17	22	0,736
Positivo	10	5	5	
<b>Estadio (CJAC)</b>				
I	13	8	5	0,816
III	14	8	6	
I	13	8	5	0,580
IV	10	5	5	

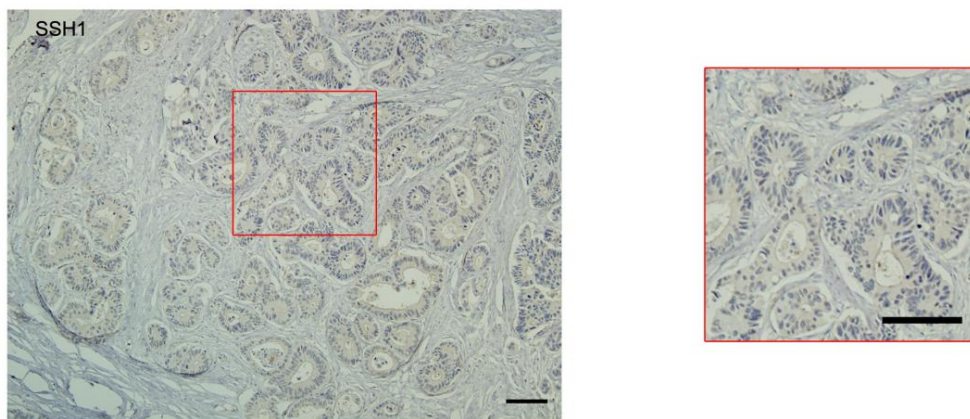


Considerando que a proteína fosfatase SSH1 desfosforila cofilina-1, ativando-a, o próximo passo foi avaliar os níveis (escores) deste regulador positivo. Os dados apontam que o tecido adjacente e tumoral apresenta níveis similares de SSH1 (Fig. 7.5 A). Por outro lado, quando os escores foram separados por estadio, níveis altos de SSH1 foram observados no estadio III, semelhantemente aos escores de cofilina-1 nesse estadio (Fig. 7.5 B e C). Já as amostras do estadio II e as amostras metastáticas apresentaram níveis baixos de SSH1. Os estadios I e IV exibiram níveis similares entre si.



**Figura 7.5 - Análise dos níveis SSH1 em amostras de CCR.** (A) Análise dos níveis proteicos de SSH1 através de escores de imunoreatividade do tecido adjacente e tecido tumoral. Os escores foram determinados pela intensidade x área de marcação. (B) Gráfico com quantificação dos dados de IHC da marcação de SSH1. Os escores foram determinados pela intensidade x área de marcação. Os altos e baixos níveis de SSH1 foram determinados por valores acima e abaixo da mediana (0,6) respectivamente (alto n=26 e baixo n=23). Dados apresentados com mediana e interquartil. A linha cinza representa o escore mediano (0,6). A dispersão dos dados foi dada em mediana e interquartil. Análise estatística foi realizada pelo teste *t-student* não pareado e a diferença foi considerada significativa quando: \*  $P < 0,05$ . (C) Imagens representativas da análise por IHC de SSH1. Imagens do tecido adjacente, diferentes estádios (I-IV) e metástases hepáticas. Barra: 100 $\mu$ m

A localização subcelular de SSH1 analisada por IHC foi citoplasmática e nuclear, distribuindo-se em alguns agrupamentos de células no tecido tumoral (Fig. 7.6 C). Esta proteína também se localizou em gânglios e nervos tanto no tecido adjacente quanto no tumoral.



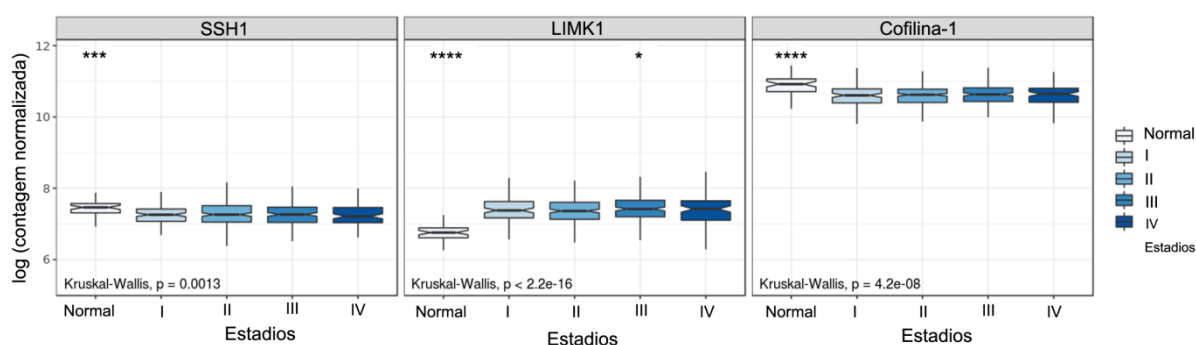
**Figura 7.6 - Imagem representativa da distribuição citoplasmática de SSH1 em amostras de CCR por IHC.** Amostra de paciente em estadio III. Barra:100 $\mu$ m.

Finalmente, avaliamos a associação dos níveis de SSH1 com parâmetros clinicopatológicos, desse modo dividimos através da mediana (0,6) os escores de SSH1 entre altos e baixos níveis (Tabela 7.4). Os dados demonstram que não há correlação dos níveis de SSH1 com o gênero, idade, localização, grau de diferenciação, invasão perineural/angiolinfática e metástase hepática ( $P>0,05$ ). Por outro lado, houve correlação positiva entre altos níveis de SSH1 com o tipo histológico mucinoso ( $P<0,05$ ) e com metástase linfonodal ( $P<0,05$ ). Interessantemente, houve similaridade entre os resultados de cofilina-1 e SSH1, uma vez que em ambas o estadio III obteve os maiores níveis, e os mesmos parâmetros obtiveram associação com ambas proteínas. Possivelmente, isso pode indicar correlação entre as duas proteínas durante a progressão do CCR.

Tabela 7.4 - Associação dos níveis de SSH1 com parâmetros clinicopatológicos de pacientes com CCR

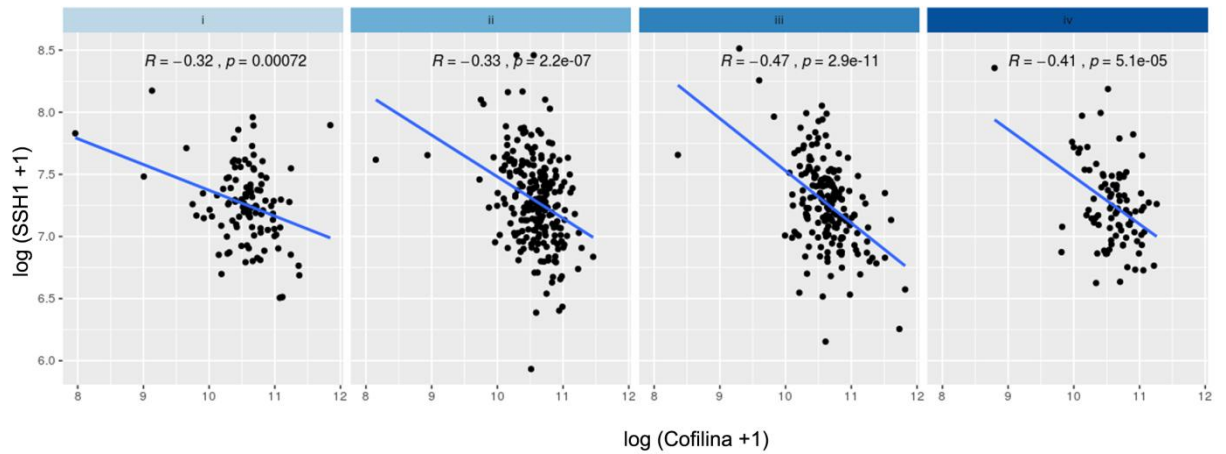
Parâmetro	n	Escore SSH1		Valor de P
		Baixo	Alto	
<b>Gênero</b>				
Masculino	19	6	13	0,086
Feminino	30	17	13	
<b>Idade</b>				
<60	17	9	8	0,539
≥60	32	14	18	
<b>Localização</b>				
Ceco/ascendente	14	5	9	0,575
Transverso	3	1	2	
Descendente	10	6	4	
Sigmóide/reto	22	17	15	
<b>Tipo histológico</b>				
Adenocarcinoma	41	22	19	0,03
Adenocarcinoma/Mucinoso	8	1	7	
<b>Grau de diferenciação</b>				
Bem	1	1	0	0,508
Moderadamente	45	21	24	
Pouco	3	1	2	
<b>Volume tumoral</b>				
<27	24	9	15	0,565
≥27	25	14	11	
<b>Invasão perineural</b>				
Negativo	38	17	21	0,565
Positivo	11	6	5	
<b>Invasão angiolinfática</b>				
Negativo	36	16	20	0,560
Positivo	13	7	6	
<b>Metástase linfonodal</b>				
Negativo	30	18	12	*0,02
Positivo	19	5	14	
<b>Metástase hepática</b>				
Negativo	39	18	21	0,827
Positivo	10	5	5	
<b>Estadio (CJAC)</b>				
III	14	3	11	**0,004
Metástase hepática	10	8	2	

Com a finalidade de avaliar a expressão gênica de cofilina-1 e suas reguladoras, LIMK1 e SSH1, em uma coorte maior, os dados de RNA-seq depositados no TCGA (*The Cancer Genome Atlas - TCGA*) em diferentes estádios do CCR foram utilizados e analisados por bioinformática. A figura 7.7 demonstra que os níveis de cofilina-1 e SSH1 exibiram-se reduzidos em todos os estádios em relação ao tecido normal ( $P < 0,00001$ ), já os níveis de LIMK1 apresentaram-se aumentados em todos os estádios em relação ao tecido normal ( $P < 0,00001$ ). As amostras em estadio III exibiram os níveis maiores de LIMK1 em relação aos outros estádios ( $P < 0,05$ ). Os dados demonstram que os níveis do RNAm de cofilina-1 e SSH1 não possuem diferenças ao longo da progressão do CCR.



**Figura 7.7 - Análise da expressão gênica de cofilina-1, LIMK1 e SSH1 em diferentes estádios do CCR.** Para as análises utilizaram-se dados de RNA seq de 622 amostras de tumores de cólon e reto depositados no banco de dados TCGA, assim como 51 amostras de RNA de cólon e reto normais. As amostras foram separadas nos Estádios I, II, III, e IV. Para análise estatística empregou-se o de *Kruskal-Wallis* e o pós-teste de *Wilcoxon rank sum*. A diferença foi considerada significativa quando: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*  $P < 0,0001$  e \*\*\*\*  $P < 0,00001$ . Os símbolos de relevância estatística exibidos acima dos grupos revela a diferença entre todos os outros grupos.

Considerando que nas análises por IHC foram observadas associações entre os mesmos parâmetros clinicopatológicos para cofilina-1 e SSH1, decidimos determinar se há correlação entre os níveis do RNAm entre essas duas proteínas em cada estadio (I, II, III IV). Para tal, utilizamos os dados do TCGA e avaliamos essa correlação. Os dados apresentados no painel da figura 7.8 demonstram que em todos os estádios houve correlação negativa entre os níveis de ambas ( $P < 0,0001$  e  $P < 0,00001$ ), isto é, quando há elevada expressão gênica de SSH1 há redução na expressão de cofilina-1 e vice-versa, o que pode indicar um controle fino e complexo de suas atividades. Curiosamente, essa correlação apresentou-se crescente entre os estádios I-II-III. Embora o estadio IV também tenha apresentado correlação entre cofilina-1 e SSH1 ( $P < 0,00001$ ), as amostras do estadio III foram as que exibiram maior correlação.



**Figura 7.8 - Análise de correlação entre cofilina-1 e SSH1 entre os estadios do CCR.** Os gráficos de correlação exibem a relação entre a expressão gênica de cofilina-1 e SSH1 de dados depositados no TCGA (estadios I, II, III e IV). Para as análises foram utilizados dados de RNA seq de 622 amostras de tumores de cólon e reto, assim como 51 amostras de RNA de cólon e reto normais depositados no banco de dados. A correlação de Pearson e a análise de regressão linear foram realizadas (valor de R e valor de P). A diferença foi considerada significativa quando: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*  $P < 0,0001$  e \*\*\*\*  $P < 0,00001$ .

## 8 DISCUSSÃO PARTE II

O CCR é conhecido por apresentar alta heterogeneidade intratumoral e entre os pacientes (BLANK et al., 2018). Desse modo, a descoberta de novos alvos preditores de agressividade e/ou resposta à terapia representa um desafio para medicina de precisão. Nesse sentido, o objetivo desta segunda parte do estudo foi avaliar os níveis de cofilina-1, LIMK1 e SSH1 e sua significância para o CCR usando amostras de pacientes acometidos com esta doença.

Em relação à coorte de pacientes com CCR utilizada neste estudo, a maioria (64%) apresentava mais de 60 anos na data da cirurgia, sendo que 57% destes eram mulheres (Tabela 7.1). Mesmo que a coorte de pacientes utilizada no presente estudo seja pequena (n=49 na análise por IHC), os dados corroboram as estimativas mundiais do GLOBOCAN e os dados do Ministério da Saúde, as quais demonstraram que a incidência do CCR em mulheres é mais alta do que em homens (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; BLANK et al., 2018). Também de acordo com as estimativas supracitadas, no presente estudo a localização anatômica com maior incidência foi a parte ascendente do cólon (44%), que corresponde ao lado direito do intestino grosso.

Os subtipos histológicos encontrados no presente estudo foram: adenocarcinoma, adenocarcinoma mucinoso e carcinoma com componente anel de sinete. Sabe-se que o adenocarcinoma é o subtipo mais frequente, sendo observado em cerca de 85% dos casos de CCR e geralmente está associado com microssatélites estáveis. Já o carcinoma na forma mucinosa é encontrado em cerca de 10-15% dos casos, sendo caracterizado por abundante mucina extracelular que consiste em mais de 50% do volume celular. Este subtipo mucinoso apresenta pior prognóstico em relação ao adenocarcinoma e caracteriza-se por apresentar tanto instabilidade de microssatélites quanto elevada síntese de mucina, o que pode ajudar a proteger as células tumorais das células imunitárias através da formação de uma camada espessa de muco. Além disso, tumores mucinosos que apresentam adicionalmente o componente morfológico de anel de sinete (mucina intracelular) têm sido associados ao um pior prognóstico (HUGEN et al., 2016). Na coorte analisada neste estudo, somente 5% dos tumores exibiram a morfologia anel de sinete. O subtipo anel de sinete é mais raro, correspondendo a menos de 1% dos casos. Também se associa com instabilidade de microssatélites e, frequentemente, é diagnosticado em estágios avançados apresentando pior sobrevida em relação aos demais subtipos. É considerado altamente infiltrativo devido à baixa adesão entre as células e com frequência desenvolvem metástases linfonodais, acometendo

também estruturas adjacentes como o peritônio e o ovário (ARIFI; ELMESBAHI; AMARTI RIFFI, 2015).

Pacientes mulheres tendem a ter lesões localizadas mais no lado direito do cólon. Um estudo prospectivo demonstrou que tais mulheres apresentam em estágios iniciais da doença lesões gordurosas e não palpáveis o que dificulta o diagnóstico precoce além de responderem pior ao tratamento por características biológicas ainda desconhecidas (GAITONDE et al., 2017). As lesões neoplásicas no lado direito, além de serem mais frequentes em mulheres, ocorrem também em idosos e são geralmente do tipo indiferenciada, mucinosas e exibem anel de sinete. Os adenomas túbulo-vilinosos são mais comuns do lado esquerdo, e os adenomas sésil serrateis ocorrem com mais frequência do lado direito. Em relação aos subtipos moleculares, tanto os do lado esquerdo quanto os do lado direito exibem o subtipo 4 (mesenquimal). O subtipo1 (imune) é encontrado majoritariamente no lado direito, e o subtipo 2 (canônico) é mais comum no lado esquerdo (LEE; MENTER; KOPETZ, 2017).

Em relação aos níveis de cofilina-1 encontrados nas amostras de CCR de pacientes atendidos no INCA, os resultados demonstraram níveis similares do RNAm e da proteína no tecido adjacente e tumoral (Fig. 7.1 A e B). Contudo, claramente alguns pacientes exibiram altos níveis e outros baixos níveis, demonstrando grande heterogeneidade. Porém, vale ressaltar que a coleta do material é realizada através de um pequeno fragmento do tumor, e dados na literatura apontam que a distribuição de cofilina pode ser distinta e pontual na massa tumoral, acredita-se que se acumule mais na borda invasiva do tumor (WANG et al., 2017; AGGELOU et al., 2018). Além disso, nas células, a organização e a localização de proteínas associadas ao citoesqueleto de actina têm impacto direto na funcionalidade das mesmas (MOUNEIMNE et al., 2006; KANELLOS; FRAME, 2016). A atividade de diferentes vias de sinalização pode modular a quantidade de proteínas disponíveis, a localização subcelular, e o padrão de ativação da cofilina-1 e de seus reguladores, articulando eventos como migração, invasão e a capacidade metastática (POPOW-WOŹNIAK et al., 2012). Acredita-se que na massa tumoral haja uma heterogeneidade de expressão gênica e localização de cofilina-1. É possível que somente algumas células, talvez aquelas próximas à borda tumoral, modulem a expressão/regulação de cofilina-1 a fim de estimular a disseminação tumoral. Estudos demonstraram que essas células da borda tumoral e agrupamentos de células que já se destacaram do tumor primário apresentam baixos níveis de E-caderina e  $\beta$ -catenina, tal padrão é associado e caracterizado também com a agressividade tumoral em amostras de tecidos de pacientes com CCR (KEVANS et al., 2011; HORCIC et al., 2013). Recentemente, outro estudo demonstrou que tais células da borda têm características migratórias, exibindo aumento de expressão de genes relacionados ao citoesqueleto de actina, além de apresentarem



assinatura do subtipo mesenquimal (DE SMEDT et al., 2017). Desse modo, há possibilidade de que a amostra coletada não represente fidedignamente a massa tumoral em sua totalidade.

Uma forma que encontramos para resolver esse problema da representatividade da amostra, pelo menos em parte, foi a análise por IHC, assim, foi possível avaliar a distribuição intracelular e entre regiões do tumor. De fato, nossos dados demonstraram que cofilina-1 distribuiu-se de modo difuso nos tumores analisados (Fig. 7.1 C e D). Quando os escores foram avaliados quanto ao estadiamento, houve uma tendência de aumento de células marcadas para cofilina-1 entre os estádios I-II-III gradativamente. Pacientes com estadio IV e metástases hepáticas exibiram de modo geral escores baixos, sugerindo que uma vez estabelecida a metástase os níveis de cofilina-1 são reduzidos.

Adicionalmente, foi observado que tumores em estadio I têm escores mais baixos de imunorreatividade para cofilina-1 do que em estadio III ( $P > 0,05$ ). De acordo o sistema de classificação TNM, tumores em estadio I são aqueles que invadem somente a submucosa do cólon, por outro lado os de estadio III possuem uma capacidade infiltrativa e invasiva superior atingindo além da muscular própria, tecidos peri-cólicos e peri-retais. Assim, cofilina-1 pode estar envolvida na regulação da migração e invasividade desses tumores durante a saída do sítio primário até atingirem os linfonodos regionais.

De modo interessante, encontramos correlação entre altos níveis de cofilina-1 com o subtipo mucinoso e com metástase linfonodal, sugerindo contribuição e/ou envolvimento desta proteína na progressão do CCR (Tabela 7.2). Adenocarcinomas mucinosos frequentemente exibem mutações em *BRAF* ou *KRAS*, além de *PIK3*, apresentando também a super-expressão do gene *MUC2* que codifica a proteína mucina-2 (HUGEN et al., 2016). Como dito anteriormente, carcinomas mucinosos são considerados mais agressivos que os adenocarcinomas, acometendo geralmente pacientes jovens e levando ao desenvolvimento de metástases linfonodais, além de serem comumente diagnosticados em estágios avançados (SUNG et al., 2008). De fato, um estudo demonstrou que adenocarcinoma mucinosos de cólon apresentaram pior sobrevida quando comparados com adenocarcinoma não mucinosos em pacientes de estadio III e IV. Possivelmente a habilidade dos tumores mucinosos em disseminar e infiltrar mais agressivamente que os não mucinosos parece, pelo menos em parte, ser responsável nessa diferença de sobrevida citada (NUMATA et al., 2012). É importante destacar que diversas evidências na literatura apontam que a cofilina-1 é essencial para a formação de protrusões membranares, direcionamento quimiotático da migração celular e invasão celular (COUMANS; DAVEY; MOENS, 2018). Diversos estudos têm demonstrado que altos níveis de cofilina-1 em tumores como os de mama, próstata, glioblastoma, bexiga, vulva, pulmão e esôfago, estando este aumento relacionado com maior

agressividade tumoral e pior prognóstico (COLLAZO et al., 2014; LU et al., 2015; MAIMAITI et al., 2016; WU et al., 2016; WANG et al., 2017). Portanto, nossos resultados sugerem que a adição da análise do perfil de marcação de cofilina-1 poderia contribuir na identificação de pacientes com potencial risco de metástases linfonodais.

Embora a expressão gênica de cofilina-1 esteja reduzida e os níveis proteicos estejam similares em tumores de cólon e reto em relação ao tecido adjacente, informações relativas à imunohistoquímica depositadas no bando de dados Proteína Atlas demonstram que em amostras de CCR os níveis proteicos de cofilina-1 variam de mediano a alto. Além disso, foi possível observar que alguns tumores exibiam ainda marcação nuclear, sugerindo atividades nucleares ligadas à progressão tumoral (UHLÉN et al., 2005). Linhagens celulares de câncer de cólon também apresentam níveis proteicos altos de cofilina-1; as linhagens Caco-2, HT-29, HCT-116, DLD-1, RKO e SW620 apresentam altos níveis de cofilina-1, a linhagem celular bem diferenciada Caco-2 é a que apresenta os níveis mais baixos, já a linhagem indiferenciada HT-29 exibe os maiores níveis desta proteína, sugerindo que seus níveis aumentem de acordo com a progressão da doença (FERRARO; BONI; PINTZAS, 2014). Zhao e colaboradores demonstraram também que a linhagem de cólon SW480, conhecida por seu alto potencial metastático, exibe altos níveis de cofilina-1, indicando possível papel na metástase (ZHAO et al., 2007).

Subsequentemente, a avaliação de LIMK1 na coorte analisada demonstrou que seus níveis são distribuídos de forma heterogênea entre os pacientes, de forma semelhante ao encontrado para níveis de cofilina-1 (Fig. 7.3). Ademais, não encontramos correlação de seus níveis com nenhum parâmetro clinicopatológico analisado (Tabela 7.3). Paradoxalmente, muitos estudos demonstraram que LIMK1 é super-expressa em vários tipos de tumores, como de ovário, pulmão e gástrico (CHEN et al., 2014; WAN et al., 2014; YOU et al., 2015). Da mesma forma, estudos também apontam para elevada expressão gênica de LIMK1 em tumores colorretais e correlacionado positivamente com metástase linfonodal (LIAO et al., 2017; AGGELOU et al., 2018). Estudos apontam também que as atividades desempenhadas pela LIMK1 podem ser essenciais para a motilidade e/ou invasão (NISHITA et al., 2005; PRUNIER et al., 2016; SU et al., 2017). Ainda, foi demonstrado que a expressão ectópica de LIMK1 foi capaz de aumentar o crescimento tumoral, angiogênese e a capacidade metastática em linhagem celular de câncer de mama (BAGHERI-YARMAND et al., 2006). Contudo, há controvérsias, pois outros estudos também demonstram que o aumento de expressão de LIMK1 pode ter efeitos inibitórios sobre a migração e invasividade celular em vários modelos (ZEBDA et al., 2000; WANG et al., 2006; SCOTT et al., 2010).

Ademais, a avaliação dos escores e associações da proteína fosfatase SSH1 na coorte analisada apresentou resultados compatíveis com os da cofilina-1. Assim, altos escores de SSH1 foram encontrados nos estadios III (Fig. 7.5), correlacionando-se com metástases linfonodais (Tabela 7.4). Corroborando tais dados, um estudo com amostras de tumores colorretais exibiram elevados níveis proteicos de SSH1 além de associação com metástases linfonodais (AGGELOU et al., 2018). De fato, a elevada expressão de SSH1 já foi observada em tumores como os de mama, pâncreas e gástrico, sendo que no de mama os altos níveis de SSH1 também foram associados com metástase linfonodal e pior prognóstico (WANG et al., 2015; CHEN et al., 2017a; MAIMAITI et al., 2018). As atividades da proteína SSH1 ciclam entre um estado de função fosfatase ativado e entre outro onde essa função é desativada. Assim, essas duas funções aparentemente opostas da SSH1 têm efeito direto na dinâmica dos filamentos de actina. Quando atua como fosfatase pode agir sobre a cofilina-1 de duas formas: 1- desfosforilando a cofilina-1 na Ser3, e assim estimulando a despolimerização e corte de F-actina importante para a migração celular; 2-desfosforilando e inativando LIMK1/2, inibindo indiretamente a inativação de cofilina-1. Quando atua em sua forma de fosfatase desativada, SSH1 pode se ligar em F-actina e estabilizá-la. Essa ligação SSH1-actina pode prevenir a despolimerização espontânea e corte de F-actina induzida por cofilina-1 (MIZUNO, 2013). Portanto, nossos resultados apontam que tanto cofilina-1 quanto SSH1 podem ter papéis centrais na progressão do CCR, especialmente na disseminação tumoral local.

Finalmente, de modo interessante, os dados de expressão gênica obtidos por análise de bioinformática, vão ao encontro com os obtidos no presente trabalho utilizando amostras de pacientes. Desse modo, os resultados indicam que o tecido tumoral, independente do estadio, não apresenta diferença quanto aos níveis de RNAm de cofilina-1 e SSH1 (Fig. 7.7 e 7.8). Por outro lado, encontramos correlação negativa entre os níveis de cofilina-1 e SSH1 em todos os estadios, exibindo maior correlação entre ambas no estadio III, indicando um mecanismo de *feedback* negativo no que diz respeito aos seus níveis de RNAm. Conforme foi dito em várias partes desse texto, a concentração das ABPs pode influenciar diretamente na dinâmica do citoesqueleto de actina, e, para a migração celular, é necessário a aquisição de estruturas robustas de actina como as fibras de stress, desse modo, possivelmente tanto cofilina-1 quanto suas reguladoras, como as LIMKs e a SSH1 são finamente reguladas durante a progressão do CCR. Esses dados fortemente indicam o papel de ambas proteínas na disseminação local, provavelmente envolvidas na migração e invasão das células tumorais com consequente acometimento linfonodal.

## 9 CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstraram a importante contribuição da dinâmica do citoesqueleto de actina na progressão do CCR. Sua regulação mediada por cofilina-1 pode ser importante na modulação de eventos essenciais para a disseminação tumoral. Tanto a mudança de morfologia de epitelial para mesenquimal, quanto a desmontagem das junções intercelulares mediadas por cofilina-1 são determinantes para a perda da adesão celular e para o favorecimento da migração celular. Finalmente, nossos dados com amostras de pacientes com CCR demonstraram correlação positiva do eixo cofilina-SSH1 com metástases linfonodais. Embora, ambas sejam cruciais para a homeostase de células normais, a identificação de vias centrais que regulem o potencial metastático é importante no sentido de criar novos quimioterápicos em adjuvância ou não com outros medicamentos que atuem evitando, pela inibição do desenvolvimento da transição epitélio mesenquimal, a disseminação tumoral.

## 10 REFERÊNCIAS

- AGGELOU, H. et al. LIMK/cofilin pathway and Slingshot are implicated in human colorectal cancer progression and chemoresistance. **Virchows Archiv: An International Journal of Pathology**, v. 472, n. 5, p. 727–737, maio 2018.
- AHMED, D. et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. **Oncogenesis**, v. 2, p. e71, 16 set. 2013.
- AOMATSU, K. et al. TGF- $\beta$  induces sustained upregulation of SNAI1 and SNAI2 through Smad and non-Smad pathways in a human corneal epithelial cell line. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 52, n. 5, p. 2437–2443, 14 abr. 2011.
- ARIFI, S.; ELMESBAHI, O.; AMARTI RIFFI, A. Primary signet ring cell carcinoma of the colon and rectum. **Bulletin Du Cancer**, v. 102, n. 10, p. 880–888, out. 2015.
- ARNOLD, T. R.; STEPHENSON, R. E.; MILLER, A. L. Rho GTPases and actomyosin: Partners in regulating epithelial cell-cell junction structure and function. **Experimental Cell Research**, v. 358, n. 1, p. 20–30, 01 2017.
- BAGHERI-YARMAND, R. et al. LIM kinase 1 increases tumor metastasis of human breast cancer cells via regulation of the urokinase-type plasminogen activator system. **International Journal of Cancer**, v. 118, n. 11, p. 2703–2710, 1 jun. 2006.
- BAMBURG, J. R.; HARRIS, H. E.; WEEDS, A. G. Partial purification and characterization of an actin depolymerizing factor from brain. **FEBS letters**, v. 121, n. 1, p. 178–182, 17 nov. 1980.
- BASTOS, LILIAN GONÇALVES DOS REIS et al. Progeny from irradiated colorectal cancer cells acquire an EMT-like phenotype and activate Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 115, n. 12, p. 2175–2187, 2014.
- BAYS, J. L.; DEMALI, K. A. Vinculin in cell-cell and cell-matrix adhesions. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 74, n. 16, p. 2999–3009, 2017.
- BHOWMICK, N. A. et al. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, n. 1, p. 27–36, jan. 2001.
- BIONDINI, M. et al. RalB regulates contractility-driven cancer dissemination upon TGF $\beta$  stimulation via the RhoGEF GEF-H1. **Scientific Reports**, v. 5, p. 11759, 8 jul. 2015.
- BLANCHOIN, L. et al. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 1, p. 235–263, jan. 2014.
- BLANK, A. et al. Tumor Heterogeneity in Primary Colorectal Cancer and Corresponding Metastases. Does the Apple Fall Far From the Tree? **Frontiers in Medicine**, v. 5, p. 234, 2018.

- BRAVO-CORDERO, J. J. et al. A novel spatiotemporal RhoC activation pathway locally regulates cofilin activity at invadopodia. **Current biology: CB**, v. 21, n. 8, p. 635–644, 26 abr. 2011.
- BRAVO-CORDERO, J. J. et al. Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 7, p. 405–415, jul. 2013.
- BRAY, F. et al. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. **The Lancet. Oncology**, v. 13, n. 8, p. 790–801, ago. 2012.
- BRAY, F. et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, 12 set. 2018.
- CAIN, R. J.; VANHAESEBROECK, B.; RIDLEY, A. J. The PI3K p110alpha isoform regulates endothelial adherens junctions via Pyk2 and Rac1. **The Journal of Cell Biology**, v. 188, n. 6, p. 863–876, 22 mar. 2010.
- CAMERON, J. M. et al. Polarized cell motility induces hydrogen peroxide to inhibit cofilin via cysteine oxidation. **Current biology: CB**, v. 25, n. 11, p. 1520–1525, 1 jun. 2015.
- CHEN, C. et al. Slingshot-1L, a cofilin phosphatase, induces primary breast cancer metastasis. **Oncotarget**, v. 8, n. 39, p. 66195–66203, 12 set. 2017a.
- CHEN, P. et al. Upregulation of Limk1 caused by microRNA-138 loss aggravates the metastasis of ovarian cancer by activation of Limk1/cofilin signaling. **Oncology Reports**, v. 32, n. 5, p. 2070–2076, nov. 2014a.
- CHEN, Q.; POLLARD, T. D. Actin filament severing by cofilin is more important for assembly than constriction of the cytokinetic contractile ring. **The Journal of Cell Biology**, v. 195, n. 3, p. 485–498, 31 out. 2011.
- CHEN, Q.-Z. et al. TGF- $\beta$ 1/PTEN/PI3K signaling plays a critical role in the anti-proliferation effect of tetrandrine in human colon cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 50, n. 3, p. 1011–1021, mar. 2017b.
- CHEN, W. et al. The role of the RhoA/Rho kinase pathway in angiogenesis and its potential value in prostate cancer (Review). **Oncology Letters**, v. 8, n. 5, p. 1907–1911, nov. 2014b.
- CHO, H. J.; YOO, J. Rho activation is required for transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in lens epithelial cells. **Cell Biology International**, v. 31, n. 10, p. 1225–1230, out. 2007.
- CIOBANASU, C.; FAIVRE, B.; LE CLAINCHE, C. Actin dynamics associated with focal adhesions. **International Journal of Cell Biology**, v. 2012, p. 941292, 2012.
- CITI, S. et al. Regulation of small GTPases at epithelial cell-cell junctions. **Molecular Membrane Biology**, v. 28, n. 7–8, p. 427–444, nov. 2011.

- COLLAZO, J. et al. Cofilin drives cell-invasive and metastatic responses to TGF- $\beta$  in prostate cancer. **Cancer Research**, v. 74, n. 8, p. 2362–2373, 15 abr. 2014.
- COOPMAN, P.; DJIANE, A. Adherens Junction and E-Cadherin complex regulation by epithelial polarity. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 73, n. 18, p. 3535–3553, 2016.
- COUMANS, J. V. F.; DAVEY, R. J.; MOENS, P. D. J. Cofilin and profilin: partners in cancer aggressiveness. **Biophysical Reviews**, v. 10, n. 5, p. 1323–1335, out. 2018.
- DANG, D.; BAMBURG, J. R.; RAMOS, D. M. Alphavbeta3 integrin and cofilin modulate K1735 melanoma cell invasion. **Experimental Cell Research**, v. 312, n. 4, p. 468–477, 15 fev. 2006.
- DANJO, Y.; GIPSON, I. K. Actin “purse string” filaments are anchored by E-cadherin-mediated adherens junctions at the leading edge of the epithelial wound, providing coordinated cell movement. **Journal of Cell Science**, v. 111 ( Pt 22), p. 3323–3332, nov. 1998.
- DAS, F. et al. Raptor-ricor axis in TGFbeta-induced protein synthesis. **Cellular Signalling**, v. 20, n. 2, p. 409–423, fev. 2008.
- DAS, S. et al. Complete reversal of epithelial to mesenchymal transition requires inhibition of both ZEB expression and the Rho pathway. **BMC cell biology**, v. 10, p. 94, 21 dez. 2009.
- DE CHAUMONT, F. et al. Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 690–696, 28 jun. 2012.
- DE OLIVEIRA, S. S. et al. Claudins upregulation in human colorectal cancer. **FEBS letters**, v. 579, n. 27, p. 6179–6185, 7 nov. 2005.
- DE SMEDT, L. et al. Expression profiling of budding cells in colorectal cancer reveals an EMT-like phenotype and molecular subtype switching. **British Journal of Cancer**, v. 116, n. 1, p. 58–65, 03 2017.
- DESMARAIS, V. et al. Cofilin takes the lead. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. Pt 1, p. 19–26, 1 jan. 2005.
- DIENSTMANN, R. et al. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v. 17, n. 2, p. 79–92, 2017.
- DING, S.-J. et al. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma cell strains, MHCC97-H and MHCC97-L, with different metastasis potentials. **Proteomics**, v. 4, n. 4, p. 982–994, abr. 2004.
- DONGRE, A.; WEINBERG, R. A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, 20 nov. 2018.

- DOUAIHER, J. et al. Colorectal cancer-global burden, trends, and geographical variations. **Journal of Surgical Oncology**, v. 115, n. 5, p. 619–630, abr. 2017.
- DUNNE, P. D. et al. Challenging the Cancer Molecular Stratification Dogma: Intratumoral Heterogeneity Undermines Consensus Molecular Subtypes and Potential Diagnostic Value in Colorectal Cancer. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 22, n. 16, p. 4095–4104, 15 ago. 2016.
- EDGE, S. B.; COMPTON, C. C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. **Annals of Surgical Oncology**, v. 17, n. 6, p. 1471–1474, jun. 2010.
- EDWARDS, D. C. et al. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. **Nature Cell Biology**, v. 1, n. 5, p. 253–259, set. 1999.
- FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, n. 5, p. 759–767, 1 jun. 1990.
- FERRARO, A.; BONI, T.; PINTZAS, A. EZH2 regulates cofilin activity and colon cancer cell migration by targeting ITGA2 gene. **PloS One**, v. 9, n. 12, p. e115276, 2014.
- FESSLER, E. et al. A multidimensional network approach reveals microRNAs as determinants of the mesenchymal colorectal cancer subtype. **Oncogene**, v. 35, n. 46, p. 6026–6037, 17 2016.
- FIFE, C. M.; MCCARROLL, J. A.; KAVALLARIS, M. Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 24, p. 5507–5523, dez. 2014.
- FLATMARK, K. et al. Twelve colorectal cancer cell lines exhibit highly variable growth and metastatic capacities in an orthotopic model in nude mice. **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 40, n. 10, p. 1593–1598, jul. 2004.
- FLEMING, Y. M. et al. TGF-beta-mediated activation of RhoA signalling is required for efficient (V12)HaRas and (V600E)BRAF transformation. **Oncogene**, v. 28, n. 7, p. 983–993, 19 fev. 2009.
- FRIEDL, P.; MAYOR, R. Tuning Collective Cell Migration by Cell-Cell Junction Regulation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 9, n. 4, 3 abr. 2017.
- GAITONDE, S. G. et al. Sex-Specific Differences in Colon Cancer when Quality Measures Are Adhered to: Results from International, Prospective, Multicenter Clinical Trials. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 225, n. 1, p. 85–92, jul. 2017.
- GARVALOV, B. K. et al. Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 48, p. 13117–13129, 28 nov. 2007.



- GASPARSKI, A. N.; OZARKAR, S.; BENINGO, K. A. Transient mechanical strain promotes the maturation of invadopodia and enhances cancer cell invasion in vitro. **Journal of Cell Science**, v. 130, n. 11, p. 1965–1978, 1 jun. 2017.
- GEHREN, A. S. et al. Alterations of the apical junctional complex and actin cytoskeleton and their role in colorectal cancer progression. **Tissue Barriers**, v. 3, n. 3, p. e1017688, set. 2015.
- GODDETTE, D. W.; FRIEDEN, C. Actin polymerization. The mechanism of action of cytochalasin D. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 34, p. 15974–15980, 5 dez. 1986.
- GRADY, W. M.; MARKOWITZ, S. D. The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential application to colorectal cancer screening. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 60, n. 3, p. 762–772, mar. 2015.
- GUINNEY, J. et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. **Nature Medicine**, v. 21, n. 11, p. 1350–1356, nov. 2015.
- HAGEDORN, E. J. et al. ADF/cofilin promotes invadopodial membrane recycling during cell invasion in vivo. **The Journal of Cell Biology**, v. 204, n. 7, p. 1209–1218, 31 mar. 2014.
- HALL, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. **Science (New York, N.Y.)**, v. 279, n. 5350, p. 509–514, 23 jan. 1998.
- HAO, X. et al. Differential gene and protein expression in primary breast malignancies and their lymph node metastases as revealed by combined cDNA microarray and tissue microarray analysis. **Cancer**, v. 100, n. 6, p. 1110–1122, 15 mar. 2004.
- HARPER, K. L. et al. Corrigendum: Mechanism of early dissemination and metastasis in Her2+ mammary cancer. **Nature**, v. 553, n. 7688, p. 366, 18 2018.
- HAYOT, C. et al. Characterization of the activities of actin-affecting drugs on tumor cell migration. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 211, n. 1, p. 30–40, 15 fev. 2006.
- HENSLEY, P. J. et al. Association of epithelial-mesenchymal transition and nuclear cofilin with advanced urothelial cancer. **Human Pathology**, v. 57, p. 68–77, 2016.
- HORCIC, M. et al. Tumor budding score based on 10 high-power fields is a promising basis for a standardized prognostic scoring system in stage II colorectal cancer. **Human Pathology**, v. 44, n. 5, p. 697–705, maio 2013.
- HUBER, F. et al. Cytoskeletal crosstalk: when three different personalities team up. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 32, p. 39–47, fev. 2015.
- HUGEN, N. et al. Advances in the care of patients with mucinous colorectal cancer. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 13, n. 6, p. 361–369, 2016.
- JASPERSON, K. W. et al. Hereditary and familial colon cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2044–2058, jun. 2010.

- JAWHARI, A. U. et al. Fascin, an actin-bundling protein, modulates colonic epithelial cell invasiveness and differentiation in vitro. **The American Journal of Pathology**, v. 162, n. 1, p. 69–80, jan. 2003.
- JERRELL, R. J.; PAREKH, A. Matrix rigidity differentially regulates invadopodia activity through ROCK1 and ROCK2. **Biomaterials**, v. 84, p. 119–129, abr. 2016.
- KANELLOS, G. et al. ADF and Cofilin1 Control Actin Stress Fibers, Nuclear Integrity, and Cell Survival. **Cell Reports**, v. 13, n. 9, p. 1949–1964, 1 dez. 2015.
- KANELLOS, G.; FRAME, M. C. Cellular functions of the ADF/cofilin family at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 17, p. 3211–3218, 01 2016.
- KASAI, H. et al. TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). **Respiratory Research**, v. 6, p. 56, 9 jun. 2005.
- KAWATA, M. et al. TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition of A549 lung adenocarcinoma cells is enhanced by pro-inflammatory cytokines derived from RAW 264.7 macrophage cells. **Journal of Biochemistry**, v. 151, n. 2, p. 205–216, fev. 2012.
- KEVANS, D. et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) protein expression in a cohort of stage II colorectal cancer patients with characterized tumor budding and mismatch repair protein status. **International Journal of Surgical Pathology**, v. 19, n. 6, p. 751–760, dez. 2011.
- KIM, S. Y.; KIM, T. I. Serrated neoplasia pathway as an alternative route of colorectal cancer carcinogenesis. **Intestinal Research**, v. 16, n. 3, p. 358–365, jul. 2018.
- KIUCHI, T. et al. Cofilin promotes stimulus-induced lamellipodium formation by generating an abundant supply of actin monomers. **The Journal of Cell Biology**, v. 177, n. 3, p. 465–476, 7 maio 2007.
- LAMOUILLE, S.; DERYNCK, R. Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. **The Journal of Cell Biology**, v. 178, n. 3, p. 437–451, 30 jul. 2007.
- LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 3, p. 178–196, mar. 2014.
- LEE, M. S.; MENTER, D. G.; KOPETZ, S. Right Versus Left Colon Cancer Biology: Integrating the Consensus Molecular Subtypes. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN**, v. 15, n. 3, p. 411–419, 2017.
- LEHMANN, S. et al. Hypoxia Induces a HIF-1-Dependent Transition from Collective-to-Amoeboid Dissemination in Epithelial Cancer Cells. **Current biology: CB**, v. 27, n. 3, p. 392–400, 6 fev. 2017.
- LEVE, F.; MORGADO-DÍAZ, J. A. Rho GTPase signaling in the development of colorectal cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 8, p. 2549–2559, ago. 2012.

- LI, DENG FENG et al. The microRNAs miR-200b-3p and miR-429-5p target the LIMK1/CFL1 pathway to inhibit growth and motility of breast cancer cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 49, p. 85276–85289, 2017.
- LIAO, Q. et al. LIM kinase 1 interacts with myosin-9 and alpha-actinin-4 and promotes colorectal cancer progression. **British Journal of Cancer**, v. 117, n. 4, p. 563–571, 8 ago. 2017.
- LICCARDO, R. et al. Novel Implications in Molecular Diagnosis of Lynch Syndrome. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2017, p. 2595098, 2017.
- LIU, C.-Y. et al. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. **Oncotarget**, v. 6, n. 18, p. 15966–15983, 30 jun. 2015.
- LIU, R.-Y. et al. JAK/STAT3 signaling is required for TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 44, n. 5, p. 1643–1651, maio 2014.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- LÓPEZ-COLOMÉ, A. M. et al. Paxillin: a crossroad in pathological cell migration. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 10, n. 1, p. 50, 18 2017.
- LOURENÇO, F. C. et al. Reduced LIMK2 expression in colorectal cancer reflects its role in limiting stem cell proliferation. **Gut**, v. 63, n. 3, p. 480–493, mar. 2014.
- LU, L. I. et al. Overexpression of cofilin 1 in prostate cancer and the corresponding clinical implications. **Oncology Letters**, v. 9, n. 6, p. 2757–2761, jun. 2015.
- LYNCH, H. T. et al. Genetics, biomarkers, hereditary cancer syndrome diagnosis, heterogeneity and treatment: a review. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 15, n. 3, p. 429–442, set. 2014.
- MACHACEK, M. et al. Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. **Nature**, v. 461, n. 7260, p. 99–103, 3 set. 2009.
- MAERTZDORF, J. et al. Concise gene signature for point-of-care classification of tuberculosis. **EMBO molecular medicine**, v. 8, n. 2, p. 86–95, 1 fev. 2016.
- MAIMAITI, Y. et al. Dephosphorylated cofilin expression is associated with poor prognosis in cases of human breast cancer: a tissue microarray analysis. **OncoTargets and Therapy**, v. 9, p. 6461–6466, 2016.
- MAIMAITI, Y. et al. SSH1 expression is associated with gastric cancer progression and predicts a poor prognosis. **BMC gastroenterology**, v. 18, n. 1, p. 12, 16 jan. 2018.

- MANI, S. A. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell**, v. 133, n. 4, p. 704–715, 16 maio 2008.
- MANICKAM, N. et al. RhoA/Rho kinase mediates TGF- $\beta$ 1-induced kidney myofibroblast activation through Poldip2/Nox4-derived reactive oxygen species. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 307, n. 2, p. F159-171, 15 jul. 2014.
- MARSHALL, T. W.; ALOOR, H. L.; BEAR, J. E. Coronin 2A regulates a subset of focal-adhesion-turnover events through the cofilin pathway. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. Pt 17, p. 3061–3069, 1 set. 2009.
- MARTIN, K. et al. Spatio-temporal co-ordination of RhoA, Rac1 and Cdc42 activation during prototypical edge protrusion and retraction dynamics. **Scientific Reports**, v. 6, p. 21901, 25 fev. 2016.
- MENDONÇA, B. D. S. et al. Suppression of MAGE-A10 alters the metastatic phenotype of tongue squamous cell carcinoma cells. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 267–275, jul. 2017.
- MILLER, K. D. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 66, n. 4, p. 271–289, 2016.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **ESTIMATIVA/2018 Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) - Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2017.
- MIZUNO, K. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. **Cellular Signalling**, v. 25, n. 2, p. 457–469, fev. 2013.
- MOJARAD, E. N. et al. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. **Gastroenterology and hepatology from bed to bench**, v. 6, n. 3, 2013.
- MONTELL, D. J.; YOON, W. H.; STARZ-GAIANO, M. Group choreography: mechanisms orchestrating the collective movement of border cells. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 10, p. 631–645, out. 2012.
- MOUNEIMNE, G. et al. Spatial and temporal control of cofilin activity is required for directional sensing during chemotaxis. **Current biology: CB**, v. 16, n. 22, p. 2193–2205, 21 nov. 2006.
- MÜLLER, C. B. et al. Validation of cofilin-1 as a biomarker in non-small cell lung cancer: application of quantitative method in a retrospective cohort. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 137, n. 9, p. 1309–1316, set. 2011.
- MUNDADE, R. et al. Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. **Oncoscience**, v. 1, n. 6, p. 400–406, 2014.
- NAKANO, K.; MABUCHI, I. Actin-depolymerizing protein Adf1 is required for formation and maintenance of the contractile ring during cytokinesis in fission yeast. **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, n. 4, p. 1933–1945, abr. 2006.

- NALLURI, S. M.; O'CONNOR, J. W.; GOMEZ, E. W. Cytoskeletal signaling in TGF $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition. **Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)**, v. 72, n. 11, p. 557–569, nov. 2015.
- NISHITA, M. et al. Spatial and temporal regulation of cofilin activity by LIM kinase and Slingshot is critical for directional cell migration. **The Journal of Cell Biology**, v. 171, n. 2, p. 349–359, 24 out. 2005.
- NORAT, T. et al. European Code against Cancer 4th Edition: Diet and cancer. **Cancer Epidemiology**, v. 39 Suppl 1, p. S56-66, dez. 2015.
- NUMATA, M. et al. The clinicopathological features of colorectal mucinous adenocarcinoma and a therapeutic strategy for the disease. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 10, p. 109, 15 jun. 2012.
- OBUCH, J. C.; AHNEN, D. J. Colorectal Cancer: Genetics is Changing Everything. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 45, n. 3, p. 459–476, 2016.
- O'CONNOR, J. W.; GOMEZ, E. W. Biomechanics of TGF $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition: implications for fibrosis and cancer. **Clinical and Translational Medicine**, v. 3, p. 23, 2014.
- OHASHI, K. et al. LIM kinase has a dual role in regulating lamellipodium extension by decelerating the rate of actin retrograde flow and the rate of actin polymerization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 42, p. 36340–36351, 21 out. 2011.
- OHTA, T. et al. Inhibition of the Rho/ROCK pathway enhances the efficacy of cisplatin through the blockage of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in human ovarian cancer cells. **Cancer Biology & Therapy**, v. 13, n. 1, p. 25–33, 1 jan. 2012.
- OHTSUKI, K. et al. Prognostic value of immunohistochemical analysis of tumor budding in colorectal carcinoma. **Anticancer Research**, v. 28, n. 3B, p. 1831–1836, jun. 2008.
- OLSON, E. N.; NORDHEIM, A. Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 5, p. 353–365, maio 2010.
- ORGAZ, J. L.; HERRAIZ, C.; SANZ-MORENO, V. Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells. **Small GTPases**, v. 5, p. e29019, 2014.
- OSANAI, M. et al. Claudins in cancer: bench to bedside. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 469, n. 1, p. 55–67, 2017.
- OSER, M. et al. Cortactin regulates cofilin and N-WASp activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation. **The Journal of Cell Biology**, v. 186, n. 4, p. 571–587, 24 ago. 2009.
- OSER, M.; CONDEELIS, J. The cofilin activity cycle in lamellipodia and invadopodia. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 108, n. 6, p. 1252–1262, 15 dez. 2009.

- OSTROP, J. et al. Contribution of MINCLE-SYK Signaling to Activation of Primary Human APCs by Mycobacterial Cord Factor and the Novel Adjuvant TDB. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 195, n. 5, p. 2417–2428, 1 set. 2015.
- PINO, M. S. et al. Epithelial to mesenchymal transition is impaired in colon cancer cells with microsatellite instability. **Gastroenterology**, v. 138, n. 4, p. 1406–1417, abr. 2010.
- POLLARD, T. D.; COOPER, J. A. Actin, a central player in cell shape and movement. **Science (New York, N.Y.)**, v. 326, n. 5957, p. 1208–1212, 27 nov. 2009.
- POPOW-WOŹNIAK, A. et al. Cofilin overexpression affects actin cytoskeleton organization and migration of human colon adenocarcinoma cells. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 138, n. 5, p. 725–736, nov. 2012.
- PRUDNIKOVA, T. Y.; RAWAT, S. J.; CHERNOFF, J. Molecular pathways: targeting the kinase effectors of RHO-family GTPases. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 21, n. 1, p. 24–29, 1 jan. 2015.
- PRUNIER, C. et al. LIM Kinase Inhibitor Pyr1 Reduces the Growth and Metastatic Load of Breast Cancers. **Cancer Research**, v. 76, n. 12, p. 3541–3552, 15 2016.
- RASKOV, H. et al. Colorectal carcinogenesis--update and perspectives. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 48, p. 18151–18164, 28 dez. 2014.
- RHIM, A. D. et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. **Cell**, v. 148, n. 1–2, p. 349–361, 20 jan. 2012.
- RIDLEY, A. J. Rho GTPase signalling in cell migration. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 36, p. 103–112, out. 2015.
- RIDLEY, A. J.; HALL, A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. **Cell**, v. 70, n. 3, p. 389–399, 7 ago. 1992.
- RODRIGUEZ-SALAS, N. et al. Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 109, p. 9–19, jan. 2017.
- ROWAN, A. J. et al. APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational “hotspot” and interdependence of the “two hits”. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 7, p. 3352–3357, 28 mar. 2000.
- RUBIE, C. et al. Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, n. 2, p. 101–109, abr. 2005.
- SAHAI, E.; MARSHALL, C. J. RHO-GTPases and cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v. 2, n. 2, p. 133–142, fev. 2002.
- SALVADOR, E.; BUREK, M.; FÖRSTER, C. Y. Tight Junctions and the Tumor Microenvironment. **Current Pathobiology Reports**, v. 4, p. 135–145, 2016.

- SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.
- SCOTT, R. W. et al. LIM kinases are required for invasive path generation by tumor and tumor-associated stromal cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 191, n. 1, p. 169–185, 4 out. 2010.
- SERRANO-GOMEZ, S. J.; MAZIVEYI, M.; ALAHARI, S. K. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. **Molecular Cancer**, v. 15, p. 18, 24 fev. 2016.
- SHANKAR, J.; NABI, I. R. Actin cytoskeleton regulation of epithelial mesenchymal transition in metastatic cancer cells. **PloS One**, v. 10, n. 3, p. e0119954, 2015.
- SHIOIRI, M. et al. Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. **British Journal of Cancer**, v. 94, n. 12, p. 1816–1822, 19 jun. 2006.
- SHISHKIN, S. et al. Cofilin-1 and Other ADF/Cofilin Superfamily Members in Human Malignant Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, 22 dez. 2016.
- SIDANI, M. et al. Cofilin determines the migration behavior and turning frequency of metastatic cancer cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 179, n. 4, p. 777–791, 19 nov. 2007.
- SIEGEL, P. M.; MASSAGUÉ, J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v. 3, n. 11, p. 807–821, nov. 2003.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7–30, jan. 2017.
- SIT, S.-T.; MANSER, E. Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. Pt 5, p. 679–683, 1 mar. 2011.
- SLUYSMANS, S. et al. The role of apical cell-cell junctions and associated cytoskeleton in mechanotransduction. **Biology of the Cell**, v. 109, n. 4, p. 139–161, abr. 2017.
- SMITH, Y. E.; VELLANKI, S. H.; HOPKINS, A. M. Dynamic interplay between adhesion surfaces in carcinomas: Cell-cell and cell-matrix crosstalk. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 64–77, 26 fev. 2016.
- SMITH-BECKERMAN, D. M. et al. Proteome changes in ovarian epithelial cells derived from women with BRCA1 mutations and family histories of cancer. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 4, n. 2, p. 156–168, fev. 2005.
- SPIERING, D.; HODGSON, L. Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. **Cell Adhesion & Migration**, v. 5, n. 2, p. 170–180, abr. 2011.
- SOUSA-SQUIAVINATO, ANNIE CRISTHINE MORAES et al. Cofilin-1 signaling mediates epithelial-mesenchymal transition by promoting actin cytoskeleton reorganization

and cell-cell adhesion regulation in colorectal cancer cells. **Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research**, v. 1866, 3, p. 418-429, 2019.

STEFFEN, A. et al. Rac function is crucial for cell migration but is not required for spreading and focal adhesion formation. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. Pt 20, p. 4572–4588, 15 out. 2013.

SU, J. et al. Downregulation of LIMK1-ADF/cofilin by DADS inhibits the migration and invasion of colon cancer. **Scientific Reports**, v. 7, p. 45624, 30 2017.

SUN, B. O. et al. Role of cellular cytoskeleton in epithelial-mesenchymal transition process during cancer progression. **Biomedical Reports**, v. 3, n. 5, p. 603–610, set. 2015.

SUNG, C. O. et al. Clinical significance of signet-ring cells in colorectal mucinous adenocarcinoma. **Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 21, n. 12, p. 1533–1541, dez. 2008.

TAHTAMOUNI, L. H. et al. Non-overlapping activities of ADF and cofilin-1 during the migration of metastatic breast tumor cells. **BMC cell biology**, v. 14, p. 45, 5 out. 2013.

TRINH, A. et al. Practical and Robust Identification of Molecular Subtypes in Colorectal Cancer by Immunohistochemistry. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 23, n. 2, p. 387–398, 15 jan. 2017.

UHLÉN, M. et al. A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 4, n. 12, p. 1920–1932, dez. 2005.

UNGEFROREN, H.; WITTE, D.; LEHNERT, H. The role of small GTPases of the Rho/Rac family in TGF- $\beta$ -induced EMT and cell motility in cancer. **Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, v. 247, n. 3, p. 451–461, mar. 2018.

VAN ZIJL, F.; KRUPITZA, G.; MIKULITS, W. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. **Mutation Research**, v. 728, n. 1–2, p. 23–34, out. 2011.

VARDOULI, L.; MOUSTAKAS, A.; STOURNARAS, C. LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 12, p. 11448–11457, 25 mar. 2005.

VINCENT, T. et al. A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 8, p. 943–950, ago. 2009.

VISHNUBHOTLA, R. et al. ROCK-II mediates colon cancer invasion via regulation of MMP-2 and MMP-13 at the site of invadopodia as revealed by multiphoton imaging. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 87, n. 11, p. 1149–1158, nov. 2007.



- WALTHER, A. et al. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v. 9, n. 7, p. 489–499, jul. 2009.
- WAN, L et al. MiR-27b targets LIMK1 to inhibit growth and invasion of NSCLC cells. **Mol Cell Biochem**, v. 390, n. 1, p. 85–91, maio. 2014.
- WANG, D. et al. Actin-Depolymerizing Factor and Cofilin-1 Have Unique and Overlapping Functions in Regulating Intestinal Epithelial Junctions and Mucosal Inflammation. **The American Journal of Pathology**, v. 186, n. 4, p. 844–858, abr. 2016.
- WANG, H. et al. Cofilin 1 induces the epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer cells by promoting cytoskeletal rearrangement. **Oncotarget**, v. 8, n. 24, p. 39131–39142, 13 jun. 2017.
- WANG, W. et al. Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors. **Cancer Research**, v. 64, n. 23, p. 8585–8594, 1 dez. 2004.
- WANG, W. et al. The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors. **The Journal of Cell Biology**, v. 173, n. 3, p. 395–404, 8 maio 2006.
- WANG, W. et al. Coordinated regulation of pathways for enhanced cell motility and chemotaxis is conserved in rat and mouse mammary tumors. **Cancer Research**, v. 67, n. 8, p. 3505–3511, 15 abr. 2007.
- WANG, W.; EDDY, R.; CONDEELIS, J. The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. **Nature Reviews. Cancer**, v. 7, n. 6, p. 429–440, jun. 2007.
- WANG, W.-S. et al. The expression of CFL1 and N-WASP in esophageal squamous cell carcinoma and its correlation with clinicopathological features. **Diseases of the Esophagus: Official Journal of the International Society for Diseases of the Esophagus**, v. 23, n. 6, p. 512–521, ago. 2010.
- WANG, Y. et al. Cofilin-phosphatase slingshot-1L (SSH1L) is over-expressed in pancreatic cancer (PC) and contributes to tumor cell migration. **Cancer Letters**, v. 360, n. 2, p. 171–176, 1 maio 2015.
- WEI, L. et al. Novel Insights into the Roles of Rho Kinase in Cancer. **Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis**, v. 64, n. 4, p. 259–278, ago. 2016.
- WOODFORD-RICHENS, K. L. et al. SMAD4 mutations in colorectal cancer probably occur before chromosomal instability, but after divergence of the microsatellite instability pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 17, p. 9719–9723, 14 ago. 2001.
- WORLD CANCER RESEARCH FUND. **American Institute for Cancer Research. Continuous Update Project Expert Report 2018. Diet, nutrition, physical activity and colorectal cancer.** Disponível em: <[dietandcancerreport.org](http://dietandcancerreport.org)>.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Observatory Geneva: World Health Organization**. Disponível em: <who.int/gho/database/en/>. Acesso em: 17 set. 2018.
- WU, Q. et al. The role of cofilin-1 in vulvar squamous cell carcinoma: A marker of carcinogenesis, progression and targeted therapy. **Oncology Reports**, v. 35, n. 5, p. 2743–2754, maio 2016.
- YAMADA, S.; NELSON, W. J. Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion. **The Journal of Cell Biology**, v. 178, n. 3, p. 517–527, 30 jul. 2007.
- YAMAGISHI, H. et al. Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. **Chinese Journal of Cancer**, v. 35, p. 4, 6 jan. 2016.
- YANG, G.; YANG, X. Smad4-mediated TGF-beta signaling in tumorigenesis. **International Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 1 jan. 2010.
- YAP, C. T. et al. The motility of glioblastoma tumour cells is modulated by intracellular cofilin expression in a concentration-dependent manner. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 60, n. 3, p. 153–165, mar. 2005.
- YE, X.; WEINBERG, R. A. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 11, p. 675–686, nov. 2015.
- YEUNG, K. T.; YANG, J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. **Molecular Oncology**, v. 11, n. 1, p. 28–39, 2017.
- YOU, T. et al. Overexpression of LIMK1 promotes tumor growth and metastasis in gastric cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 69, p. 96–101, fev. 2015.
- ZAMAN, M. H. et al. Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 29, p. 10889–10894, 18 jul. 2006.
- ZEBDA, N. et al. Phosphorylation of ADF/cofilin abolishes EGF-induced actin nucleation at the leading edge and subsequent lamellipod extension. **The Journal of Cell Biology**, v. 151, n. 5, p. 1119–1128, 27 nov. 2000.
- ZHAO, L. et al. Differential proteomic analysis of human colorectal carcinoma cell lines metastasis-associated proteins. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 133, n. 10, p. 771–782, out. 2007.
- ZIHNI, C.; TERRY, S. J. RhoGTPase signalling at epithelial tight junctions: Bridging the GAP between polarity and cancer. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 64, p. 120–125, jul. 2015.

## 11 ANEXOS

Artigo científico relacionado com o tema da tese publicado durante o período do doutorado:

**ANEXO 1- SOUSA-SQUIAVINATO, ANNIE CRISTHINE MORAES; ROCHA, MURILO RAMOS ; BARCELLOS-DE-SOUZA, PEDRO ; SOUZA, WALDEMIR FERNANDES ; MORGADO-DIAZ, JOSE ANDRES . Cofilin-1 signaling mediates epithelial-mesenchymal transition by promoting actin cytoskeleton reorganization and cell-cell adhesion regulation in colorectal cancer cells. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-MOLECULAR CELL RESEARCH, v. 1866, 3, p. 418-429, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.003>**

Disponível gratuitamente até o dia 14 de Fevereiro de 2019 através do link:  
<https://authors.elsevier.com/a/1YI3Tc5IDUhOc>



# Cofilin-1 signaling mediates epithelial-mesenchymal transition by promoting actin cytoskeleton reorganization and cell-cell adhesion regulation in colorectal cancer cells

Annie Cristhine Moraes Sousa-Squiavinato, Murilo Ramos Rocha, Pedro Barcellos-de-Souza, Waldemir Fernandes de Souza, Jose Andres Morgado-Diaz\*

Cellular and Molecular Oncobiology Program, Cellular Dynamic and Structure Group, Brazilian National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Cofilin-1  
Actin  
Cytoskeleton  
Cell-cell adhesion  
EMT  
Colorectal cancer

## ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is frequently a lethal disease because of metastasis. Actin cytoskeletal rearrangement is an essential step in cell migration during activation of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) program, which is associated with metastatic properties of cancer cells. Cofilin-1 protein modulates actin dynamics by promoting actin treadmilling, thereby driving membrane protrusion and cell migration and invasion. However, the role of cofilin-1 during EMT in CRC is unknown. Here, we show that cofilin-1 and p-cofilin-1 have distinct subcellular distribution in EMT cells, as determined by super-resolution microscopy images, indicating distinct roles in different areas of cells. Silenced cofilin-1 cells treated with TGF- $\beta$  (siCofilin-1/TGF- $\beta$ ) evaded p-LIMK2-p-cofilin-1 status, leading to recovery of E-cadherin and claudin-3 at the cell-cell contact and their respective protein levels, actin reorganization, and decreased mesenchymal protein level. Furthermore, siCofilin-1/TGF- $\beta$  cells exhibited decreased migration and invasion rates as well as MMP-2 and -9 activity and augmented focal adhesion size. The expression of an inactive phospho-cofilin-1 mimetic (S3E) reduced E-cadherin and claudin-3 in cell-cell contacts, reduced their protein levels, and increased vimentin protein. Based on our findings, we suggest that cofilin-1 is crucial to switching from epithelial to mesenchymal-like morphology and cell migration and invasion by regulating actin cytoskeleton organization through activation of RhoA-LIMK2-cofilin-1 signaling, impacting the cell-cell adhesion organization of colon cancer cells in EMT.

## 1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most frequent malignant cause of cancer-related death worldwide. The incidence and mortality rates are closely correlated with the adoption of a western lifestyle and are still rising rapidly in many low and middle-income countries [1]. Approximately 50% of patients will develop metastasis during the disease course, and the 5-year survival is usually only around 55% [2]. The tumor aggressiveness in each patient is strongly influenced by genetic heterogeneity and may reflect the activation of paracrine extracellular stimulus of the tumor microenvironment, triggering metastasis [3]. Cancer metastasis can be regulated by signaling of the epithelial–mesenchymal transition (EMT) program, which promotes cell detachment, migration, and invasion into the surrounding tissue and resistance to

apoptosis and anticancer drugs [4].

Intestinal epithelial cells have highly organized structures that regulate the intestinal barrier; these are known as apical junctional complex (AJCs), which are formed by tight junctions (TJs) and adherens junctions (AJs). TJs and AJs mediate cell-cell adhesion through interactions of their transmembrane proteins, such as occludin, claudins, and E-cadherin, with cytoplasmic proteins that directly or indirectly connect to the cortical actin, stabilizing cellular junctions [5]. During EMT, epithelial cells lose proteins of the junctional complex and acquire mesenchymal proteins, such as vimentin and N-cadherin, altering the apical-basal polarity to front-rear polarity, thereby remodeling cell-matrix adhesions and allowing increased migratory and invasive capabilities of tumor cells [4]. This process is also mediated by the dynamics of the actin cytoskeleton in which the cortical actin is

*Abbreviations:* AJCs, apical junctional complexes; AJs, adherens junctions; TJs, tight junctions; CRC, colorectal cancer; EMT, epithelial–mesenchymal transition; F-actin, filamentous actin; G-actin, globular actin; RFP, red fluorescent protein; siRNA, small interfering RNA; WT, wild type

\* Corresponding author at: Cellular and Molecular Oncobiology Program, Brazilian National Cancer Institute (INCA), 37 André Cavalcanti Street, 5th Floor, Rio de Janeiro, RJ 20230-051, Brazil.

E-mail address: [jmorgado@inca.gov.br](mailto:jmorgado@inca.gov.br) (J.A. Morgado-Diaz).

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.003>

Received 15 June 2018; Received in revised form 3 October 2018; Accepted 4 October 2018

Available online 05 October 2018

0167-4889/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

arranged, actin stress fibers are formed, and new actin-rich membrane projections such as lamellipodia are stimulated. The major regulators of the cytoskeleton, the Rho GTPases, can spatiotemporally regulate rapid polymerization/depolymerization of filamentous actin (F-actin) and formation of actin-based bundles and cellular protrusions [6]. In this context, cofilin-1 is one terminal effector protein of the Rho GTPase signaling cascades that is essential to regulating actin dynamics, severing F-actin, and increasing depolymerization of the filament. In addition, cofilin-1 can directly generate free actin barbed ends, which can be used for nucleation of the F-actin and provide a globular actin (G-actin) pool [7].

The activity of cofilin-1 is regulated by phosphorylation of residue Ser3 by LIM kinases (LIMK1 and LIMK2), whereas upstream activity is regulated by Rho GTPase signaling, such as RhoA, Rac1, and Cdc42. Once phosphorylated, cofilin-1 loses its affinity for actin, and depolymerization and severing are inhibited. Conversely, dephosphorylation of Ser3 by phosphatases leads to cofilin-1 activation [8]. Furthermore, the balance between synthesis of protein and subcellular localization of LIMKs/cofilin-1 and its activation/deactivation cycle is crucial to defining cellular response; thus, small changes in the dynamics of the actin cytoskeleton can increase or decrease the invasiveness of tumor cells [9]. Overexpression of cofilin-1 has been reported in human cancers [10–13] and implicated in tumor progression events, including migration, invasion, and metastasis [9,14,15]. However, its regulation and role during EMT development in CRC is still unknown. Thus, considering that actin cytoskeleton rearrangement is downstream of EMT activation, we hypothesize that there is a direct association between the loss of epithelial characteristics and gain of a migratory and mesenchymal phenotype with actin cytoskeleton reordering. Therefore, we believe that a better understanding of these dynamics may elucidate the role of cofilin-1 during EMT in CRC, facilitating the discovery of new therapeutic strategies for these metastases.

Here, we describe the molecular mechanisms by which cofilin-1 regulates events during EMT in TGF- $\beta$ -induced CRC cells. Together, these results provide important insights into the involvement of cofilin-1 in regulating actin cytoskeleton dynamics impacting the cell-cell adhesion organization during EMT in colon cancer cells.

## 2. Material and methods

### 2.1. Reagents and antibodies

The following antibodies were used: anti-claudin-3 (Invitrogen, #341700), anti-E-cadherin (BD Biosciences, #610182), anti-cofilin1, anti-p-cofilin1 (Ser-3) (Cell Signaling Technology, #5175 and #3313), anti-actin C4 (Millipore, #MAB1501), anti-GAPDH (Ambion, #AM4300), anti-LIMK2, anti-vinculin, anti-vimentin (Sigma-Aldrich, #HPA008183, #V4505, and #V6389, respectively), anti-p-LIMK2 (Thr505) (Abcam, #ab38499), peroxidase-conjugated anti-mouse and anti-rabbit produced in goat (Sigma-Aldrich). Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse and Alexa Fluor® 546 goat anti-rabbit molecular probes were acquired from Life Technologies. TRITC-conjugated phalloidin, Atto 655-conjugated phalloidin, anti-vimentin-conjugated Cy3, and DAPI were purchased from Sigma-Aldrich.

Transforming growth factor beta-1 (TGF- $\beta$ ) (Life Technologies, #PHG9204) was diluted in phosphate-buffered saline (PBS) + 0.1% bovine serum albumin (BSA) to obtain a stock concentration of 1000 ng/mL. Cytochalasin D (Sigma-Aldrich, #C6637) was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) to obtain a stock concentration of 10  $\mu$ M. Specific inhibitor of transforming growth factor-beta super family type, SB431542 (Sigma-Aldrich, #S4317), was diluted in DMSO to obtain a stock concentration of 1000  $\mu$ M/mL.

### 2.2. Cell culture/treatment with TGF- $\beta$ and SB431542

The human colorectal adenocarcinoma cell line HT-29 (ATCC,

#HTB-38 TM) was grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin G (100 mg/L), and streptomycin (60 mg/L) (Sigma-Aldrich) at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. For the experiments, cells were cultured in 6-well plates or on sterile glass coverslips. Cells were grown until 50% confluent and treated with TGF- $\beta$  (10 ng/mL) in 1% FBS-DMEM for 48 h until EMT induction. Cells were treated with SB431542 inhibitor (15  $\mu$ g/mL) for 1 h before TGF- $\beta$  treatment.

### 2.3. Cofilin-1 knockdown

Cells were transfected with either scrambled small interfering RNA (siRNA) as a control or cofilin-1-specific siRNA to a final concentration of 30 pmol/3  $\times$  10<sup>5</sup> cells. The cofilin-1 siRNA was purchased from QIAGEN (#SI00299838). The Silencer® Select Negative Control siRNA was purchased from Ambion and was used to assure the absence of any possible target sequence. Cells were transfected with the siRNA in the presence of Lipofectamine® RNAiMAX and Opti-MEM® (Invitrogen). Cells on days 2 and 3 after transfection were utilized for experiments.

### 2.4. Generation of stable Cofilin-1 mutant cells

Mammalian expression plasmids (pmRFP-N1) encoding wild-type (WT) human cofilin (#50856), constitutively active human cofilin S3A (#50857), and constitutively inactive human cofilin S3E (#50858) (Addgene) were used in this experiment [16]. The cells were transfected with the expression plasmids using Lipofectamine® 2000 transfection reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. The amount of plasmid DNA used in each transfection was maintained at 2  $\mu$ g/4  $\times$  10<sup>3</sup> cells. Transient transfection resulted in up to 70% modification efficiency as indicated by an integrated red fluorescence protein (RFP) reporter. A stable cell line was generated with Geneticin® treatment (1 mg/mL) (Invitrogen) for 2 months. Clones were selected, expanded, and used in subsequent experiments.

### 2.5. Cell extraction and Western blot analysis

Whole cell lysates were prepared and electrophoretically separated as described previously [17]. Membranes were incubated overnight with the following primary antibodies: anti-claudin-3 (1:1500), anti-E-cadherin (clone 36) (1:2500), anti-cofilin-1 (1:2500), anti-p-cofilin-1 (ser-3) (1:1000), anti-actin (clone C4) (1:2500), anti-LIMK2 (1:100), anti-p-LIMK2 (T505) (1:500), anti-vinculin (1:200), and anti-vimentin (1:1500). Membranes were then incubated with secondary antibodies, and protein bands were detected using a chemiluminescence kit (GE Healthcare). Bands were quantified by optical density using ImageJ software version 1.51r (<http://imagej.nih.gov/ij>).

### 2.6. G/F-actin quantification

G- and F-actin cellular fractions were quantified by Triton X-100 fractionation as previously described [18]. Briefly, cell monolayers at 70% confluence were washed with PBS. As G-actin is soluble in Triton X-100, it was extracted by gently shaking for 5 min at room temperature in cytoskeleton stabilization buffer (10 mmol/L MES, 140 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2 mmol/L EGTA, and 280 mmol/L sucrose, pH 6.1) supplemented with 0.5% Triton X-100, proteinase inhibitor cocktail, and 1 mg/mL phalloidin to prevent filament disassembly. The G-actin fraction was mixed with an equal volume of 2 $\times$  sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer and boiled. For the Triton X-100-insoluble F-actin fractionation, the same cells were briefly washed with PBS and collected by scraping cells in double the volume of SDS sample buffer, with posterior homogenizing in a fine-gauge syringe with boiling. The fractions are then separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), and the amount of actin in each fraction was quantified by western blotting.

## 2.7. RhoA pull-down assay

The activity of the RhoA protein was determined using a pull-down assay (Thermo Fisher Scientific, #89854) according to the manufacturer's instructions. HT-29 cells were seeded in a T-25 flask with DMEM + 10% FBS. Upon reaching about 80% confluence, the assay was performed. Rhotekin RBD bound to glutathione-agarose beads was used to precipitate GTP-bound RhoA from the cell lysate. The active and total Rho were separated by 13% SDS-PAGE and visualized by western blotting using antibody against Rho (1:1000).

## 2.8. Cell migration assays

Wound healing assay was performed as described previously [17]. Briefly, HT-29 cells were seeded in 12-well plates, 4 h before the medium was replaced with DMEM + 1% FBS. Upon reaching about 100% confluence, the cell monolayer was scraped by a sterile pipette tip to create wounds, and HT-29 cells were incubated with or without TGF- $\beta$  or siRNA for cofilin-1. Cells were photographed immediately after wounding (0 h) and after 24 h of incubation. The lesion area was manually quantified using ImageJ software. The values of cell migration were represented as percentages, with means  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of triplicate assays.

Phagokinetic track motility assay was also executed as described previously [19]. This assay measures motility of individual cells through the trajectory remaining as a result of phagocytosis of colloidal gold. HT-29 cells ( $2 \times 10^3$ ) with or without TGF- $\beta$  and siRNA were seeded in gold sol-coated wells and incubated in DMEM + 2% FBS at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> for 20 h. After incubation, the cells were photographed using the Axio Observer.Z1 microscope (Carl Zeiss) equipped with an Axio Cam HRc and Axio Vision Release 8.2 Image Analyzer. For quantification of the motility track area, ImageJ software was used. The tests were performed in duplicate, at least 10 photos of each condition were captured, and three independent experiments were performed.

## 2.9. Invasion assay

HT-29 cells treated with TGF- $\beta$  and/or cofilin-1 siRNA ( $6 \times 10^4$  cells) or untreated cells were seeded in DMEM + 1% FBS in the upper surface of 8- $\mu$ m-pore Polycarbonate Membrane Transwell® Inserts (Costar) that were coated with 50  $\mu$ L of Matrigel® (BD Biosciences). DMEM + 10% FBS was added as a chemoattractant in the lower chamber. After 48 h of incubation, the invaded cells on the lower membrane of the inserts were fixed with ethanol (10 min), stained with 1% violet crystal (10 min), and analyzed and counted under a microscope. The tests were performed in duplicate, and three independent experiments were performed.

## 2.10. Zymography assay

Equal amounts of HT-29 cells were seeded in six-well plates with or without TGF- $\beta$ /siRNA in DMEM + 1% FBS. The conditioned culture medium was collected, and equivalent protein amounts were subjected to SDS-PAGE with 10% (v/v) gels containing 0.2% gelatin (porcine skin, type A, Sigma-Aldrich). After electrophoresis, the gels were washed twice (30 min each time at room temperature) in 10 mM Tris/HCl, pH 8.8 containing 2.5% Triton X-100 and then incubated in activation buffer (5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, and 50 mM Tris/HCl, pH 8.0) at 37 °C for 16 h. Then, the gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 and destained in 10% (v/v) acetic acid and 40% (v/v) methanol. The gelatinolytic activity of the matrix metalloproteinase was detected as transparent bands on the blue background. The gels were quantified by optical density with ImageJ software.

## 2.11. Immunofluorescence microscopy

Immunofluorescence assay was performed as previously described [17]. Briefly, cell monolayers were grown on glass coverslips until 70% confluence and treated with or without TGF- $\beta$ /SB431542/siRNA. The monolayers were washed in PBS containing 100 mM CaCl<sub>2</sub> and 100 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.0 (PBS-CM) and fixed in methanol for 10 min. Additionally, the monolayers were washed with PBS and permeabilized and blocked with 0.1% Triton X-100 + 0.2% BSA in PBS for 1 h. The cells were incubated overnight at 4 °C in a humid environment with specific primary antibodies: anti-E-cadherin (1:300) and anti-claudin-3 (1:30). Then, the cells were incubated in blocking solution with appropriate Alexa Fluor 488 anti-mouse or Alexa Fluor 546 anti-rabbit secondary antibodies (1:200) for 1 h. Afterward, the coverslips were incubated with DAPI (1:1000) for 1 min, washed, and mounted using propyl gallate (Sigma-Aldrich).

To visualize the subcellular distributions of F-actin, vimentin, cofilin-1, and vinculin, the cell monolayers were fixed in 4% paraformaldehyde, incubated in 20 mM NH<sub>4</sub>Cl for 15 min, and permeabilized and blocked with 0.2% BSA + 0.1% Triton X-100 in PBS for 30 min. Then, the monolayers were incubated in TRITC-phalloidin (500 ng/mL), Atto 655-phalloidin (0.4  $\mu$ M), and anti-vimentin Cy3 (1:300) for 30 min at room temperature or with anti-vinculin (1:200), anti-cofilin-1 (1:200), and anti-p-cofilin-1 (1:100) primary antibodies for 16 h followed by appropriate Alexa Fluor secondary antibodies.

The cells on glass coverslips were visualized with a confocal laser scanning microscope (FV10i-O), and the images were analyzed using the FV10-ASW software (Olympus) or ICY Bioimage Analysis software. Images through the cell volume were collected, and optical sections near the apical, medial, and basal planes of monolayers (X–Y plane) and their perpendicular planes (X–Z plane) were obtained.

For detailed analysis of the spatial distribution of cofilin-1 and actin, we employed super-resolution microscopy. All images were acquired using an LSM 710 microscope (Carl Zeiss) equipped with a PCO Edge sCMOS camera, Plan-Apochromat 63 $\times$ /1.4 Oil DIC M27 lens, and 488- and 561-nm laser lines. Image acquisition, reconstruction, and alignment for structured illumination microscopy and maximum intensity projection were performed using the Zeiss ZEN 2012 SP1 software (black edition, version 8.1.5.484). Contrast and colors were adjusted using ICY Bioimage Analysis software. Intensity-based line profile measurement was performed, which showed the intensity distribution on a defined line. This analysis was conducted with super-resolution images using ICY Bioimage Analysis software.

## 2.12. Morphometric analysis

### 2.12.1. Analysis of the circularity and cell spread area

Cells were fixed and stained using TRITC-phalloidin and subsequently used for analysis. Images obtained were converted to 8-bit; the color images were changed to grayscale and thresholded, and cell perimeters were identified. The circularity was calculated using the formula  $4\pi \times [\text{Area}] / [\text{Perimeter}]^2$ . A circularity value of 1 indicates a perfect circle. At least 200 highly distinct cells were averaged for each condition [20]. The cell area and circularity were measured using ImageJ software.

### 2.12.2. Analysis of length of actin filaments and size of focal adhesions

For quantitative analysis of the average length of cellular actin filaments, cells were fixed and stained using TRITC-phalloidin. The microscopic images were processed in FV10-ASW software and ICY Bioimage analysis software. Twenty representative cells per condition in five photos of three independent experiments were analyzed.

For focal adhesion quantification, cells were fixed and stained using vinculin antibody. Images obtained were converted to 8-bit, and the color images were transformed to grayscale. Cells were thresholded to avoid artificial over- or under-filling of areas [21]. The size of focal

adhesions was quantified using ImageJ software.

### 2.13. Statistical analysis

For quantitative analysis of experiments, the values were calculated from at least three independent experiments using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software), and representative images were shown. The normality test (Shapiro–Wilk test) was used to determine whether sample data had normal distribution using SPSS software version 25 (IBM Corporation). For parametric analysis, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post-test was used for comparisons between groups. For non-parametric analysis, the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's test was used for comparisons between groups. Differences were considered statistically significant when  $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ; and  $***P < 0.001$ .

## 3. Results

### 3.1. TGF- $\beta$ induces activation of the RhoA-LIMK2-cofilin-1 pathway, causing differential subcellular distribution of total cofilin-1 and p-cofilin-1 and increased rate of actin polymerization

TGF- $\beta$  signaling has been shown to induce EMT in vitro in epithelial cells [22]. Indeed, our model HT-29 intestinal cell line treated with TGF- $\beta$  exhibited characteristics of mesenchymal cells, including altered gene and protein expression. Cells treated with TGF- $\beta$  (10 ng/mL) showed decreased E-cadherin and claudin-3 and increased vimentin at the protein and mRNA levels when compared with control cells. In fact, we observed increased EMT-associated expression of transcription factor Slug in cells exposed to TGF- $\beta$  when compared with that in control cells. Additionally, treatment with 15  $\mu$ g/mL of inhibitor of TGF- $\beta$  type I receptor (SB431542) reverted the TGF- $\beta$  effects at the protein level and recovered the subcellular localization of E-cadherin and claudin-3 in cell junctions (Supplementary Fig. 1A–C). It is known that non-Smad signaling of TGF- $\beta$  induces changes in actin dynamics via rapid activation of RhoA, followed by phosphorylation and activation of LIMK2 with concomitant phosphorylation and inactivation of cofilin-1 [23]. In our model, we initially analyzed whether this occurred by pull-down assay, which showed that RhoA activity was increased in cells exposed to TGF- $\beta$  (Fig. 1A). Furthermore, the downstream signaling effector of RhoA, LIMK2, exhibited significantly increased phosphorylation with subsequent inhibition of cofilin-1, as indicated by increased phosphorylation at 24 h and 48 h after treatment with TGF- $\beta$  when compared with that in control cells (Fig. 1B). Next, we confirmed the activation of this via by culturing the cells in the presence of the SB43154 inhibitor. Significantly decreased LIMK2 and cofilin-1 phosphorylation compared with that in control cells was observed, indicating high dependence on TGF- $\beta$  signaling (Fig. 1C). Then, in order to verify the total actin polymerization status, we performed fractionation of total cellular actin in cells exposed to TGF- $\beta$ . In fact, we found increased assembly of F-actin as a result of alteration of the F/G-actin ratio when compared with that of the control group, possibly due to cofilin-1 phosphorylation. As a technical control, we treated cells with 20 nM of cytochalasin D to induce disruption of the actin cytoskeleton and consequently increase the pool of cellular G-actin (Fig. 1D). These results showed that TGF- $\beta$  induced activation of the RhoA-LIMK2-cofilin-1 pathway, modulating the actin cytoskeleton by increasing actin polymerization.

We also evaluated subcellular localization of total cofilin-1 and p-cofilin-1 simultaneously with the pattern of actin cytoskeleton organization in cells treated with TGF- $\beta$ . With confocal laser scanning microscopy, we observed that total cofilin-1 and p-cofilin-1 were located along cell–cell contacts and colocalized in the cytoplasm with F-actin in control cells. Cells treated with TGF- $\beta$  displayed stress fibers and lamellipodia formation with total cofilin-1 and p-cofilin-1 close to the actin fiber region (Supplementary Fig. 2). To further verify this result,

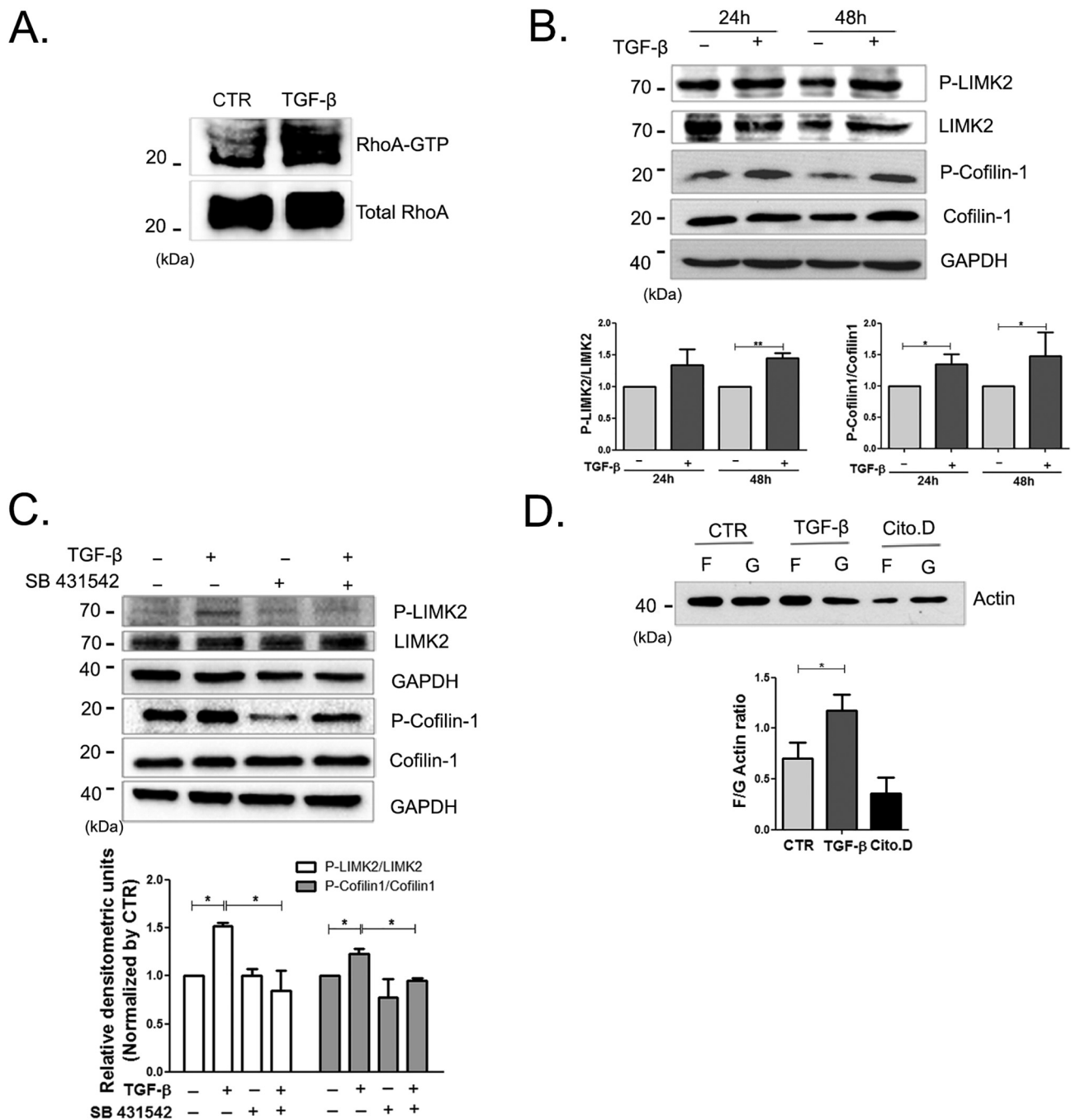
we used super-resolution structured illumination microscopy with maximum intensity profiles obtained from Z-stack analysis; this technique allows superior resolution when compared with conventional confocal microscopy. We observed that total cofilin-1 was located at the front of the cells treated with TGF- $\beta$ , specifically in lamellipodia, indicating its role in rapid actin cytoskeleton turnover by severing/depolymerizing filaments (Fig. 2A). On the other hand, intensity analysis of fluorescence signals of p-cofilin-1 revealed a distinct pattern: the peaks of the leading edge were slightly lower in contrast with the higher peaks in the rear of cells, suggesting spatial regulation of cofilin-1/p-cofilin-1 activity (Fig. 2B). Interestingly, p-cofilin-1 was found within close proximity of F-actin, possibly in relation to high turnover of actin (Fig. 2C). These data suggested that subcellular distribution of cofilin-1 and p-cofilin-1 is controlled in cells exposed to TGF- $\beta$ , possibly indicating distinct roles in different areas of cells.

### 3.2. Cofilin-1 depletion rescues partial epithelial morphology of cells in EMT through cytoskeletal rearrangements

Actin organization is a key factor in the generation and maintenance of cell morphology and polarity [24]. To investigate whether cofilin-1 is required to switch from epithelial to fibroblast-like morphology, we inhibited cofilin-1 expression in HT-29 cells with siRNA. Cofilin-1 protein expression was inhibited by approximately 70% after 48 h of treatment with siRNA (Fig. 3A). Next, we measured the changes in cell morphology through circularity and cell body area analysis. Fluorescence images were utilized for measuring the actin area, which delineates the area of the cell. In this experiment, control cells showed a cuboid shape similar to a perfect circle (equal to 1), but cells with values distant from 1 were more fibroblast-like. The circularity of the TGF- $\beta$ -treated cells ( $0.49 \pm 0.16$ ) was lower than that of control cells ( $0.76 \pm 0.10$ ), and the cell body area analysis demonstrated increased cell size, reflecting the membrane projection as lamellipodia as well increased nuclear and cytoplasmic volume in these cells. Silenced cofilin-1 cells treated with TGF- $\beta$  (siCofilin-1/TGF- $\beta$ ) showed partial restoration of cuboid cell morphology ( $0.66 \pm 0.15$ ) as well as partial restoration of cell size (Fig. 3B). These findings suggested that cofilin-1 is required to establish the fibroblast-like morphology during EMT through cytoskeletal rearrangements. Therefore, we next hypothesized that cells exposed to TGF- $\beta$  could have increased actin polymerization through cofilin-1, consequently leading to the formation of stress fibers. However, siCofilin-1/TGF- $\beta$  cells did not show inhibition of actin polymerization, since the actin filament length analysis revealed increased F-actin packaging (Fig. 3C), suggesting actin filament instability. Indeed, biochemical fractionation of TGF- $\beta$ -stimulated cells demonstrated equal portions of F-actin in cofilin-1-depleted and control cells, although decreased G-actin pool was observed in cells depleted of cofilin-1, indicating impaired depolymerization (Fig. 3D). Taken together, these data suggested that cofilin-1 has a significant role in driving actin dynamics, reflected by the actin stability and regulation of cell morphology during EMT.

### 3.3. Cofilin-1 is required for switching between epithelial and mesenchymal states and junctional disassembly during EMT

The cortical F-actin belt of intestinal cells anchors at TJs and AJs, driving their assembly and function [5]. To evaluate if cofilin-1 could regulate the disassembly of the cell–cell adhesion system during EMT, we analyzed the expression and subcellular localization of epithelial and mesenchymal proteins in siCofilin-1/TGF- $\beta$  cells. As expected, in cells treated with TGF- $\beta$ , the E-cadherin and claudin-3 protein levels were decreased relative to those in control cells; however, cells treated with siCofilin-1/TGF- $\beta$  exhibited restoration of E-cadherin and claudin-3 at cell–cell contact. In addition, the claudin-3 protein levels but not of E-cadherin were restored in these cells. Consistently, the TGF- $\beta$  group showed increased vimentin. Nevertheless, with concomitant depletion



**Fig. 1.** TGF- $\beta$  activates RhoA/p-LIMK2/p-cofilin-1 signaling and increases F/G-actin ratio in HT-29 cell line.

(A) Representative RhoA pull-down assay for detection of RhoA-GTP with Rhotekin RBD. HT-29 cells were grown and treated with TGF- $\beta$  (10 ng/mL) for 48 h. The precipitate and lysate were used to determine RhoA-GTP and total RhoA levels by western blot using anti-RhoA antibody following a pull-down assay.

(B) Cells were grown and untreated or treated with TGF- $\beta$  (10 ng/mL) for 24 and 48 h. Western blotting and densitometric analysis of p-LIMK2 (Thr505) and p-cofilin-1 (Ser3) in HT-29 were performed.

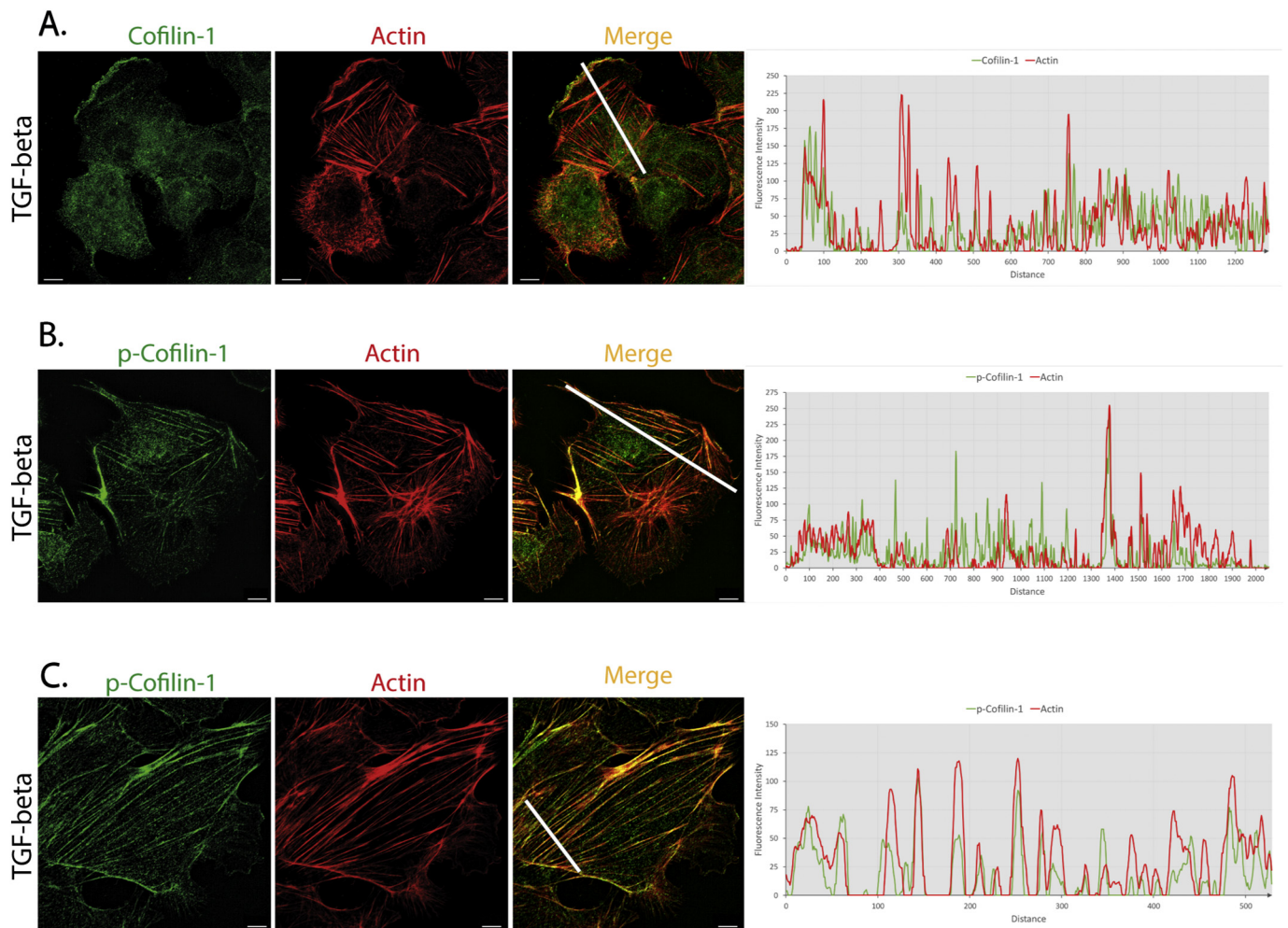
(C) HT-29 cells were pre-treated with 15  $\mu$ g/mL SB431542 for 1 h and stimulated with 10 ng/mL TGF- $\beta$ . After 48 h, cells were lysed and analyzed by western blotting using p-LIMK2 (T505) and p-cofilin-1 (Ser3) antibodies.

(D) Cells were treated with TGF- $\beta$  (10 ng/mL) for 48 h, and then total fractionation of F-actin and G-actin was performed and quantified as described in [Materials and methods](#). As a control, treatment with 20 nM of cytochalasin D was used. Representative images are shown. GAPDH was used as a loading control in (B) and (C). Bar graphs represent relative quantification of p-LIMK2/LIMK2 and p-cofilin1/cofilin1 ratio (where non-treated cells = 1). Data are presented as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Significance was determined using ANOVA followed by the Bonferroni post-test (\* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001).

of cofilin-1, the vimentin protein levels were decreased, and the vimentin filament network was reorganized (Fig. 4A and B). Additionally, actin aggregates in close proximity to cytoplasmic E-cadherin deposits in the TGF- $\beta$  group were observed, suggesting that the arrangement and/or dynamics of cortical actin filaments contributed to the

disassembly of junctions, whereas SB43154 inhibitor restored the actin and E-cadherin organization at AJCs (Supplementary Fig. 3). These data suggested that cofilin-1 signaling is required for switching between epithelial and mesenchymal states and for junctional disassembly by regulating the dynamics of the actin cytoskeleton.

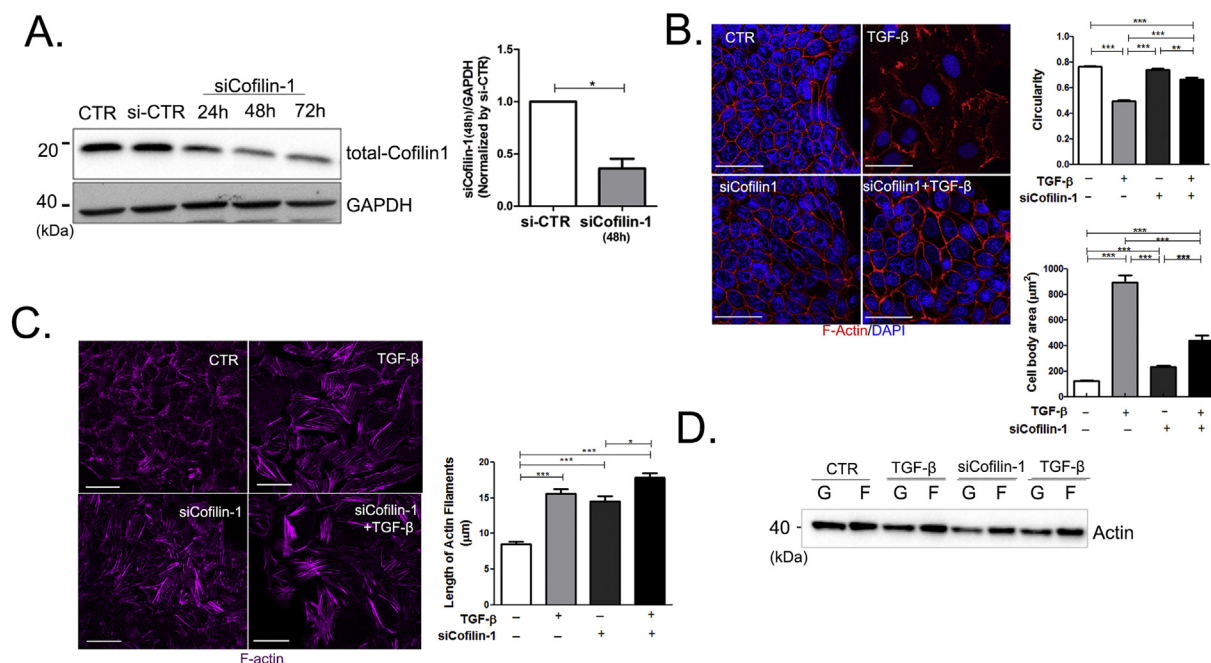




**Fig. 2.** Subcellular localization and organizational pattern of p-cofilin1, cofilin-1, and actin cytoskeleton in TGF- $\beta$ -treated cells. HT-29 cells were grown on glass coverslips, treated with TGF- $\beta$  for 48 h, and subjected to double labeling. (A) Total cofilin-1/TRITC-phalloidin labeling; a white line (from the lamellipodia area to inside the cell is shown. (B) p-cofilin-1 (Ser3)/TRITC-phalloidin labeling; a white line from the rear to the inside of the cell is shown. (C) The same labeling as in (B), with a white line between actin filaments shown. Analysis was performed using super-resolution microscopy though structured illumination microscopy. The fluorescence signal intensity measurement was determined with fluorescence intensity profiles taken along the colored lines indicated in each image. Actin filaments were labeled with TRITC-phalloidin. Scale bar: 10  $\mu$ m.

To further validate the role of the RhoA-p-LIMK2-p-cofilin-1 pathway in the junctional disassembly during EMT we used cofilin-1 mutants to mimic TGF- $\beta$  effect. We generated transient and stable mutant HT-29 cells with the following constructs: RFP-tag WT cofilin-1, RFP-tag cofilin-1 S3A, and RFP-tag cofilin-1 S3E. The latter two constructs were used to mimic dephosphorylated cofilin-1 (active form), in which serine 3 is replaced with alanine (S3A), and phosphorylated cofilin-1 (inactive form), in which serine 3 is replaced by glutamic acid (S3E). Firstly, we evaluated F-actin formation in RFP-positive and RFP-negative cells obtained by transient transfection and treatment with TGF- $\beta$ . As expected, cells exposed to TGF- $\beta$  showed membrane projections and increased F-actin similarly to WT-RFP-positive and RFP-negative cells. However, S3A-RFP and S3E-RFP mutants did not show changed cofilin-1 phosphorylation status after treatment with TGF- $\beta$  because of the inserted mutations. Thus, S3A-RFP-positive cells (active cofilin-1) exhibited actin aggregates and decreased F-actin formation in contrast to RFP-negative cells responsive to TGF- $\beta$  treatment, which showed F-actin structures typical of EMT cells. Therefore, we confirmed that active S3A-cofilin-1 was effective in intensifying the severing of F-actin and promoting distinct patterns of actin structures in EMT cells. Interestingly, we found that S3E-RFP-positive cells (inactive cofilin-1) and RFP-negative cells displayed the same pattern of F-actin, including

stress fibers, after TGF- $\beta$  treatment, indicating the essential role of inactive S3E-cofilin-1 in the induced stress fiber formation during EMT (Supplementary Fig. 4). Subsequently, we evaluated the subcellular localization of protein expression of E-cadherin and claudin-3 in stable cells expressing mutant cofilin-1. We observed that active cofilin-1 (S3A-RFP) cells exhibited E-cadherin and claudin 3 at cell-cell junctions in a similar fashion to control (WT-RFP) cells. Inactive cofilin-1 S3E-RFP cells displayed decreased E-cadherin and claudin-3 in cell-cell junctions. Additionally, stable cells with phosphorylated cofilin-1 (S3E) exhibited a similar morphology to WT-RFP cells, demonstrating the importance of the two cofilin-1 forms (phosphorylated/non-phosphorylated) to switching between epithelial and mesenchymal states (Fig. 5A). In fact, increased E-cadherin and claudin-3 protein levels in S3A-RFP cells were observed compared with those in WT-RFP cells, whereas S3E-RFP exhibited decreased E-cadherin and claudin-3 protein levels and increased vimentin level similarly to EMT cells (Fig. 5B). Together, these results confirmed that cofilin-1 phosphorylation induced by TGF- $\beta$  is important for decreasing epithelial markers and junctional disassembly during EMT.



**Fig. 3.** Effects of cofilin-1 silencing on cell morphology and actin cytoskeletal rearrangements in TGF- $\beta$ -treated cells.

(A) HT-29 cells were transfected with si-CTR or siCofilin-1 at the indicated times. GAPDH was used as a loading control. Bar graph represents relative quantification of protein expression at 48 h (where si-CTR = 1). A representative western blot is shown. CTR = MOCK and si-CTR = scramble. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM.

(B) Cell circularity and cell body area were determined from immunofluorescence images in the middle Z-stack using ImageJ software. In each case, a minimum of 90 cells were quantified ( $\sim$ 20 cells per field) in at least three independent experiments. Actin filaments and nuclei were labeled with TRITC-phalloidin and DAPI, respectively. Significance was determined using the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post-test ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ). Scale bar: 30  $\mu$ m.

(C) Length of actin filament bundles was detected using maximum intensity projections by confocal microscopy and quantified using ImageJ software. In each case, a minimum of 90 cells were quantified ( $\sim$ 20 cells per field) in at least three independent experiments. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. Actin filaments were labeled with TRITC-phalloidin. Significance was determined using ANOVA followed by the Bonferroni post-test ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ). Scale bar: 30  $\mu$ m.

(D) Quantification of G- and F-actin cellular fractions obtained by Triton X-100 fractionation. A representative western blot is shown.

### 3.4. Cofilin-1 depletion suppresses cell migration, invasion, and matrix metalloproteinase activity and alters focal adhesion dynamics of colon cancer in EMT

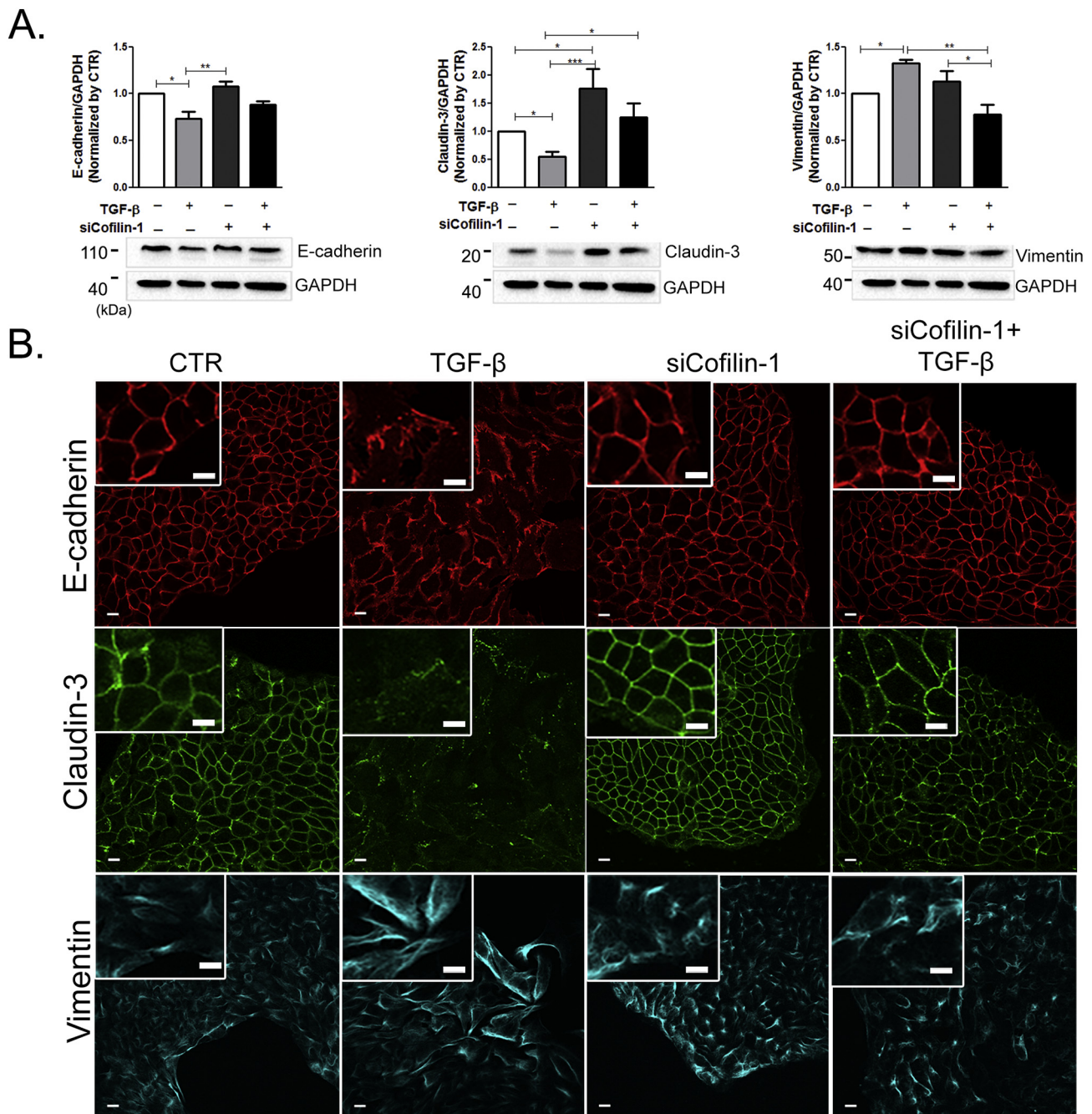
The role of cofilin-1 in tumor cell migration and invasion is well established [9,13]. Therefore, we sought to determine whether cofilin-1 activity is also required for these events during EMT in HT-29 cells. Thus, we measured the migration of individual cells and directional collective migration through phagokinetic track motility assay and wound healing assay, respectively. As expected, cells with cofilin-1 suppression exhibited compromised cell migration in both assays (Fig. 6A and B). We also analyzed the cell invasion behavior, which showed that the suppression of cofilin-1 compromises the invasive ability of TGF- $\beta$ -induced EMT cells (Fig. 6C). Consistent with this result, siCofilin-1/TGF- $\beta$  cells exhibited decreased activity of active forms of MMP-2 and MMP-9 compared with that in control cells (Fig. 6D). Taken together, these data indicated that cofilin-1 activity is necessary for cell migration and invasion during EMT, possibly through control of cytoskeletal organization. Finally, it is known that focal adhesions are structures formed by actin and proteins such as vinculin that connect the extracellular matrix to the cytoplasm, with a fundamental role in force sensing in cell migration [5]. Consequently, we assessed the effects of cofilin-1 on organization/formation and size of focal adhesions during EMT. We performed immunofluorescence, morphometric, and western blot analyses to examine the focal adhesion-associated protein vinculin. TGF- $\beta$ -induced cells exhibited F-actin reorganization and increased focal adhesion size relative to that of control cells. In addition, the suppression of cofilin-1 resulted in significant perturbation of focal adhesion dynamics, as well as increased vinculin protein expression,

indicating augmentation of adhesion of cells to matrix. The same effect was observed in TGF- $\beta$ /siCofilin-1 cells, with increased packing and size of focal adhesions compared with that of control cells (Fig. 7A–C).

## 4. Discussion

CRC is one of the most common malignant tumors worldwide; however, despite the benefits of early diagnosis and standardized surgical treatment, the overall survival of this cancer type remains unsatisfactory [2]. Malignant tumor cells acquire the ability to migrate and invade as a result of the EMT, in which cells can initially lose and/or disorganize the cell–cell adhesion system and reorganize their actin cytoskeleton [4]. In this context, cofilin-1, an actin-binding protein and dynamic actin cytoskeleton regulator, plays a key role in the maintenance of cellular activities, and various evidence has demonstrated its crucial role in cancer progression [7,9,15]. However, there is little knowledge regarding the molecular mechanisms underlying cofilin-1 during EMT in CRC.

To explore the involvement of cofilin-1 in the EMT development of CRC, we employed moderately differentiated human colon cancer cells, HT-29, which were treated with TGF- $\beta$ , a well-known EMT inducer. Initially, we verified the regulation of the cofilin-1 pathway during EMT in our model. Consistent with the finding that RhoA-LIMK2-cofilin-1 signaling activated by TGF- $\beta$  is involved in actin cytoskeletal reorganization with stress fiber formation [13,23], our data showed that TGF- $\beta$  induces RhoA-p-LIMK2-p-cofilin-1 activation in our study model after 48 h of treatment. Moreover, we verified that the inhibitor SB431542 significantly reverted RhoA signaling, decreasing LIMK2 and cofilin-1 phosphorylation, which was in agreement with previous



**Fig. 4.** Effects of cofilin-1 silencing on switch between epithelial and mesenchymal states in TGF- $\beta$ -treated cells.

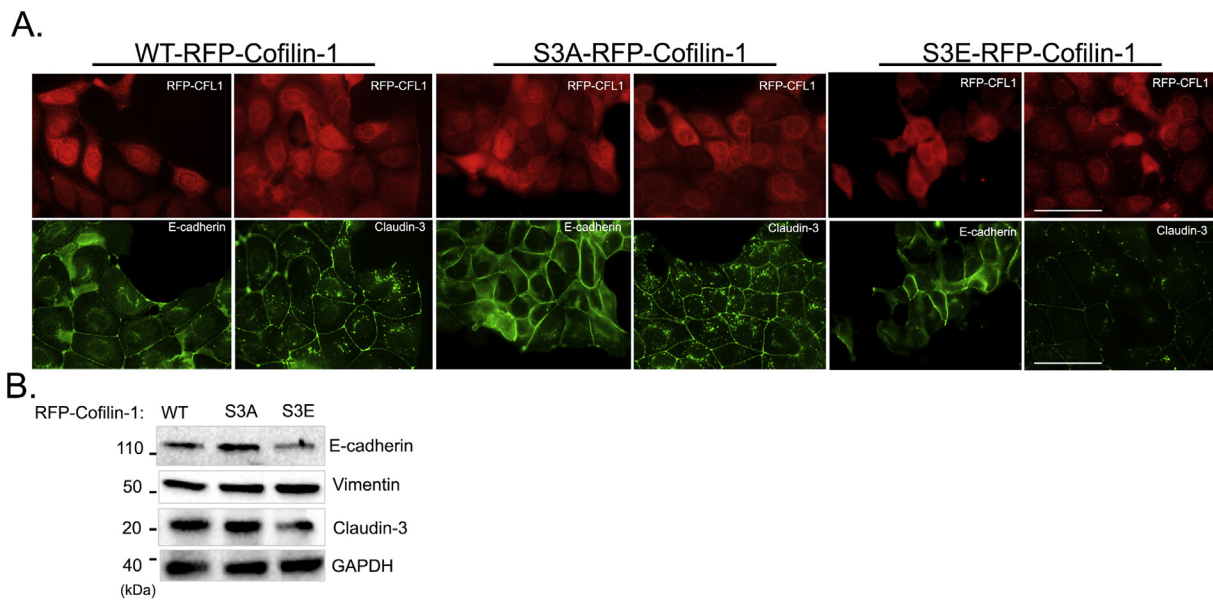
(A) HT-29 cells were transfected with si-CTR or siCofilin-1 and untreated or treated with TGF- $\beta$  for 48 h. Western blotting and densitometric analysis of E-cadherin, claudin-3, and vimentin are shown. GAPDH was used as a loading control. Bar graphs represent relative quantification of protein expression. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Significance was determined using ANOVA followed by the Bonferroni post-test (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

(B) Representative immunofluorescence images of E-cadherin and claudin-3 obtained by confocal microscopy of HT-29 cells transfected with si-CTR or siCofilin-1 and treated with TGF- $\beta$  for 48 h. Fluorescence images of Cy3-vimentin localization are also shown. Scale bar: 10  $\mu$ m.

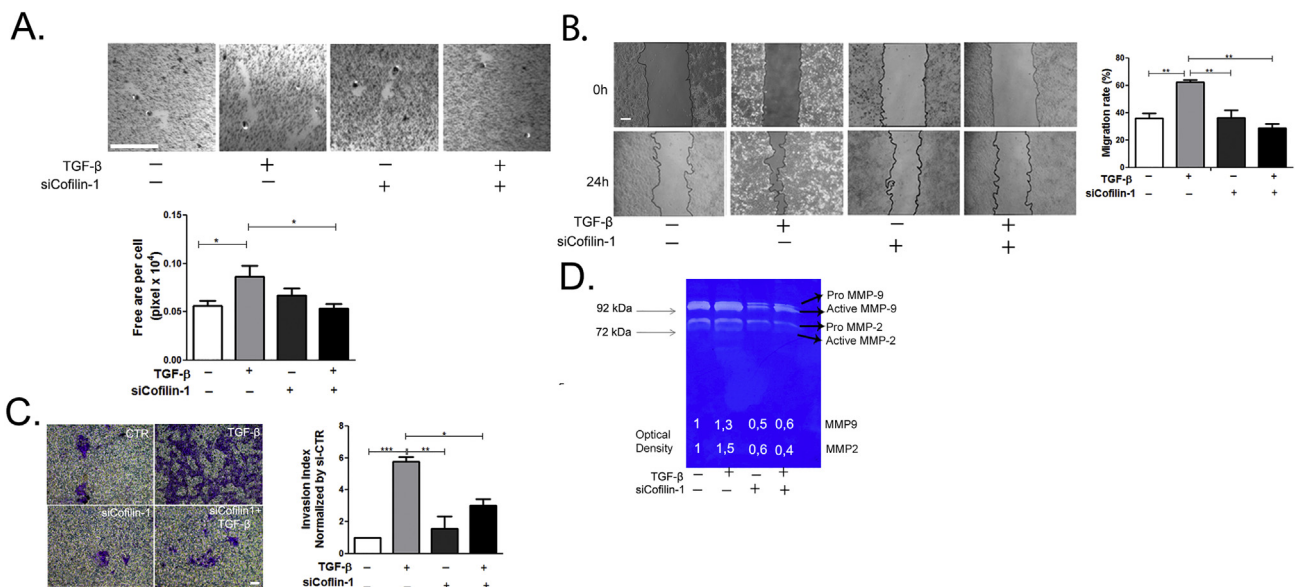
observations [25,26]. Furthermore, TGF- $\beta$  signaling induced phosphorylation of cofilin-1, consequently increasing actin polymerization as demonstrated by the augmented F/G-actin ratio, generating an accumulation of filaments and therefore decreasing the G-actin pool. It is important to note that F-actin is responsible for creating and driving the motor force for cellular movement as well as contraction and retraction of the rear of the cell [24].

Subcellular localization analysis by immunofluorescence of total and p-cofilin-1 and the organizational pattern of actin in TGF- $\beta$ -treated cells showed distinct subcellular distribution in our EMT model as

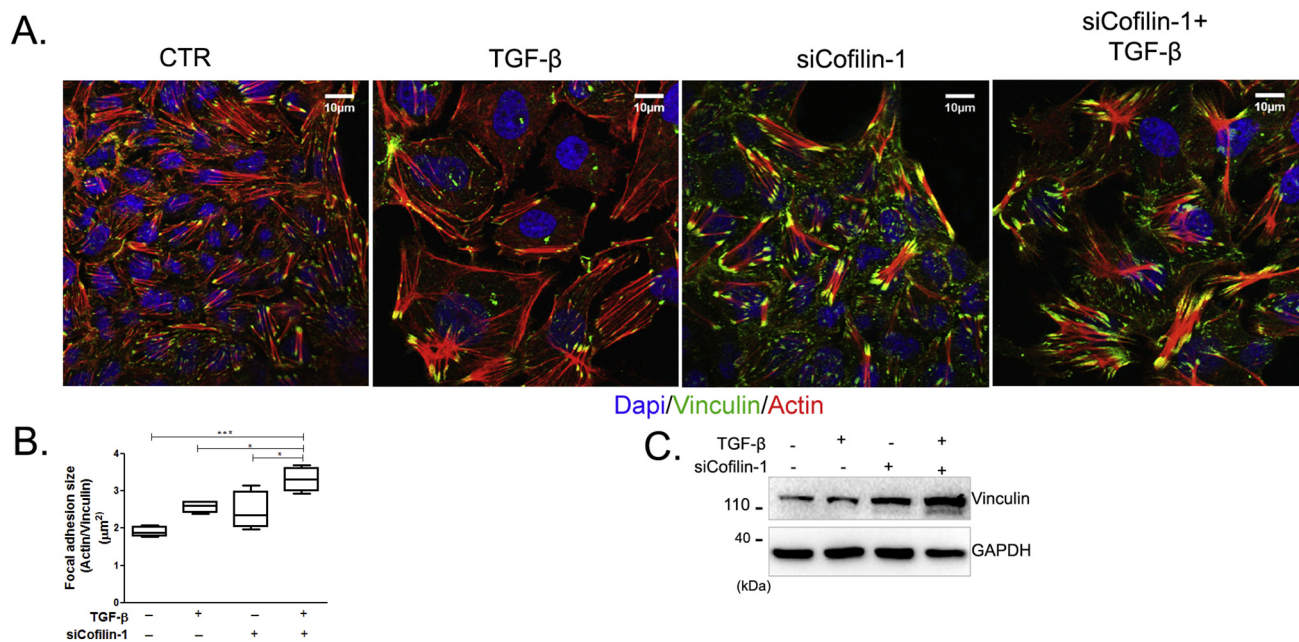
compared with untreated cells. We further confirmed this result using super-resolution images. Total cofilin-1 was located in the leading edge of the membrane where rapid actin turnover is required for lamellipodium growth, while p-cofilin-1 was increased throughout the cell in close proximity to stress fibers, indicating the need of spatial control of cofilin-1 activity in EMT cells. Cofilin-1 is a terminal effector of Rho GTPase signaling, and it is widely known that RhoA and Rac have antagonistic activities spatiotemporally separated. While RhoA is involved in the initial formation of leading edge protrusion/retraction dynamics, Rac1 and Cdc42 are responsible for activation of pathways involved in



**Fig. 5.** Role of cofilin-1 mutants in junctional disassembly. (A) HT-29 cells were transfected with wild-type (WT) RFP-tag cofilin-1, RFP-tag cofilin-1 S3A (active form), and phosphorylated mimetic RFP-tag cofilin-1 S3E (inactive form) and selected by Geneticin® treatment. Stable cells were generated by clone selection. HT-29 cofilin-1 mutant cells were grown on glass coverslips and subjected to immunofluorescence analysis of E-cadherin and claudin-3 localization. Scale bar: 50 µm. (B) HT-29 cofilin-1 mutant cells were analyzed by western blot analysis using E-cadherin, claudin-3, and vimentin antibodies. GAPDH was used as a loading control. Western blot is representative of one experiment.



**Fig. 6.** Role of cofilin-1 silencing in cell migration and invasion and matrix metalloproteinase activity. HT-29 cells were transfected with si-CTR or siCofilin-1 and untreated or treated with TGF-β for 48 h. (A) Cells were seeded on gold sol-coated wells and incubated for 20 h. The motility of individual cells was determined by analysis of the trajectory. The measurement of remaining area, as a result of phagocytosis of colloidal gold, was determined by ImageJ software. The values represented in the graphs refer to the free area left by cells in pixels × 10<sup>4</sup>. Bar graphs represent free area per cell. Data are presented as the mean ± SEM of three independent experiments. Scale bar: 50 µm. (B) Cell migration was analyzed by wound healing assay. Bar graphs represent percentages of cell migration. Data are presented as the mean ± SEM of three independent experiments. Scale bar: 5 µm. (C) Cells were plated in Transwell chambers coated with Matrigel and subjected to invasion assay. Bar graphs represent relative quantification of cell invasion (where untreated cells = 1). Data are presented as the mean ± SEM of three independent experiments. Scale bar: 2 µm. (D) Conditioned culture media of HT-29 cells transfected with si-CTR or siCofilin-1 and untreated or treated with TGF-β for 48 h were collected and subjected to zymography assay. The gel was scanned, and quantification of the gel bands was performed using ImageJ software. Numbers inside the figure represent the relative quantification of optical density of the active metalloprotease bands (where untreated cells = 1). Significance was determined using ANOVA followed by the Bonferroni post-test (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001).



**Fig. 7.** Role of cofilin-1 depletion in organizational pattern of focal adhesions. HT-29 cells were transfected with si-CTR or siCofilin-1 and untreated or treated with TGF-β (10 ng/mL) for 48 h.

(A) Cells were grown on glass coverslips and subjected to immunofluorescence analysis of vinculin and actin localization. Actin filaments and nuclei were labeled with TRITC-phalloidin and DAPI, respectively. Cells were analyzed by confocal microscopy.

(B) Focal adhesion size was calculated using ImageJ software through colocalization of vinculin and actin labeling. A minimum of 100 cells were quantified (~20 cells per field) in at least three independent experiments.

(C) HT-29 cells were lysed and analyzed by western blot analysis using vinculin antibody. GAPDH was used as a loading control. Only one experiment was performed for western blot.

robustness and stabilization of newly expanded protrusions [27,28].

Cells in EMT can activate morphological differentiation as a consequence of actin reorganization; therefore, we determine if cofilin-1 was involved in this event. TGF-β-treated cells exhibited increased size and became more elongated, while this morphologic pattern was partially abolished in TGF-β/siCofilin-1 cells. This result provided direct evidence that cofilin-1 is required for changes in the morphology of EMT cells. Consistent with this observation, previous studies demonstrated that TGF-β could activate the mTOR signaling pathway through PI3K and AKT, and that this activation is responsible for increasing cell size and protein synthesis in EMT cells, suggesting possible regulation of cofilin-1 activity through this signaling pathway [29]. Moreover, reinforcing the requirement of cofilin-1 in actin dynamic regulation in EMT cells, we observed a prominent accumulation of F-actin, similar to stress fibers in TGF-β/siCofilin-1 cells. In fact, it has been proposed that cofilin-1 depletion could promote a robust instability of packaging of F-actin stimulated by decoration with phosphorylated Myosin Light-Chain, generating contractile actin fibers [30].

The tight regulation between cell junctions and migration is fundamental during homeostasis and in diseases including metastatic cancers [31]. Regulator mechanisms linking cell junctions to cell migration are not yet completely understood, but it is known that during EMT, the junctional complex is ruptured followed by changes in actin-based membrane dynamics, resulting in increased cell motility [4]. Consistently, we demonstrated that cofilin-1 regulation of actin dynamics can control malignant behaviors, modulating junctional complex organization during EMT in colon cancer cells. Although instability of F-actin was observed in TGF-β/siCofilin-1 cells, E-cadherin and claudin-3 returned to cell–cell adhesions, and the protein levels of claudin-3 was restored but not of the E-cadherin. Moreover, EMT progression is related as a nonlinear process involved cell plasticity and transitional states where cells may oscillate between a spectrum of intermediary phases, a partial EMT program [4]. In fact, siCofilin-1/TGF-β cells exhibited wide spectra of epithelial/mesenchymal phases with

some cells displaying a partial restoration of E-cadherin and claudin-3 at cell–cell contact, but still with increased cell size indicating a partial reversion of TGF-β effects, while other cells exhibited restoration of the junctional proteins at cell–cell contact and decreased cell size, reflecting a total reversion of TGF-β effects.

Furthermore, phosphorylation of cofilin-1 could be a critical event during EMT, since our results with S3E-cofilin-1 mutants showed a similar pattern to TGF-β-treated cells, displaying loss of E-cadherin and claudin-3 at cell–cell junctions. Although the phosphorylation of cofilin-1 is required for EMT behavior, it is important to consider that the non-phosphorylated cofilin-1 has also a crucial role. The fine balance between expression and subcellular localization of cofilin-1 (phosphorylated or non-phosphorylated) and its regulator LIMKs is pivotal for small changes in the dynamics of the actin cytoskeleton [9]. Moreover, LIMK2 may have indirect participation but significant in junctional disassembly during EMT by increasing an active cofilin-1 at cell–cell contact enabling increasing depolymerization/severing of the cortical actin. LIMKs e cofilin-1 plays critical roles in the deceleration and acceleration of actin retrograde flow, respectively, in the regulation of actin dynamics during lamellipodium growth. Thus, cofilin-1 activity could play as a cycle between states of phosphorylation and dephosphorylation in different subcellular regions [32]. Our findings are in agreement with studies that demonstrated that RhoA-ROCK signaling plays a key role in the rupture of junctional complexes by remodeling cortical actin, leading to E-cadherin redistribution [33,34]. Besides the regulation of epithelial proteins, cofilin-1 might directly or indirectly regulate mesenchymal proteins like vimentin. In a gastric cancer model, cofilin-1 suppression increased E-cadherin protein level and decreased mesenchymal biomarkers vimentin and N-cadherin, in accordance with our findings [10]. In intestinal cell line we have shown results involving the phosphorylated form of cofilin-1 and its phosphomimetic mutant S3E as well as effect of inhibitor SB431542 and siCofilin-1 cells that reversed the EMT-like effects. In line with these observations, some studies have correlated the cofilin-1 pathway with EMT features. For

instance, in a cohort of CRC patient tumors, expression of non-phosphorylated cofilin-1 and its regulators, LIMK1, LIMK2, and SSH1, was correlated with decreased E-cadherin expression [35]. Interestingly, analysis of bladder carcinoma in situ samples revealed an association between nuclear localization of cofilin-1 and progression to high-grade, invasive disease, and patients who had higher nuclear cofilin-1 exhibited lower and higher E-cadherin and N-cadherin, respectively [11]. Taken together, this evidence suggests a tight association between the EMT program and the actin cytoskeleton dynamics through cofilin-1 activity, but further investigation is required in future studies.

The activity of cofilin-1 in actin cytoskeleton remodeling is important for regulation of actin-based membrane protrusion and cell locomotion [36]. Previous reports have shown that cofilin-1 regulation determines cell migration behavior in many types of cancers including breast, prostate, and gastric cancer [10,13,37]. This is in accordance with our observation that TGF- $\beta$ /siCofilin-1 cells showed decreased individual cell migration and directional collective migration. In fact, cell migration depends on finely coordinated actin cytoskeleton rearrangement and the dynamic regulation of membrane protrusions such as lamellipodia and filopodia driving cellular motility [36]. In addition, MMP-2 and MMP-9 activity were decreased in TGF- $\beta$ /siCofilin-1 cells, in accordance with other studies that demonstrated cofilin-1 suppression could diminish MMP activity [10,12,13]. Cofilin-1 has already been found in regions of invadopodia, dynamic actin-rich membrane structures associated with cortactin protein, regulating the stability and dynamics of these three-dimensional membrane structures and probably reflecting the MMP recruitment and targeting to invadopodia [38,39].

Actin cytoskeletal and focal adhesion dynamicity is crucial for cell migration, regulating cell-matrix adhesion and spreading [40]. We observed a significant accumulation of F-actin associated with increased size of focal adhesions and increased vinculin protein expression in TGF- $\beta$ /siCofilin-1 cells. In accordance with our results, other studies have described enlarged size and increased number of focal adhesions in cofilin-1-depleted cells [30,37]. Consistent with this, localization of cofilin-1 close to the focal adhesions can regulate its activity, inducing the turnover of focal adhesions [41]. Additionally, it has been shown that cofilin-1 suppression could increase cell adhesion to extracellular matrix proteins such as collagen I and fibronectin [13,37], which can explain the reduction in cell migration observed here. Despite we provide evidence for the involvement of cofilin-1 in both, cell-cell adhesion and actin cytoskeleton disorganization, it remains still unclear which event occurs first during EMT.

## 5. Conclusion

In conclusion, we have demonstrated mechanisms by which cofilin-1 can augment features of aggressiveness such as cell–cell disassembly, migration, invasion, and adhesion focal organization during TGF- $\beta$ -induced EMT in CRC cells. Considering that CRC mesenchymal subtype has the worst global and disease-free survival, the stratification and early treatment of patients could represent a good strategy to enhance the efficacy of therapies. In this context, the development of approaches to interfere with RhoA-LIMK-cofilin1 signaling may result in interesting options for cancer therapy that could target multiple key networks of metastatic disease.

## Funding

This study was sponsored by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Grant 312570/2014-7), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Ministério da Saúde – Brasil, Fundação Carlos Fagundes Filho de Amparo à Pesquisa do Estado de Rio de Janeiro (FAPERJ) (Grant E-26/201.290/2014) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Câncer (Grant 573806/2008-0/170.026/2008).

## Author contributions

ACMSS and JAMD designed the experiments. ACMSS carried out most of the experiments. MRR and ACMSS performed super resolution experiment. PBS and MRR carried out assistance in EMT experiments. WFS and ACMSS performed pull-down assay. ACMSS and JAMD wrote the manuscript. All authors participated in discussions concerning the manuscript.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

## Acknowledgments

We are grateful to the Centro Nacional de Bioimagem (CENABIO) for the use of the super-resolution microscopy facility and to all members of the laboratory, particularly to Dr. Julio-de-Freitas Junior and Dr. Wallace Martins de Araujo, for assistance with assays and for the constant discussion concerning the manuscript. This text was revised by Editage from Rockefeller University Press.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.003>.

## References

- [1] M. Arnold, M.S. Sierra, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, et al., Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality, *Gut* 66 (2017) 683–691, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912>.
- [2] M. Frampton, R.S. Houlston, Modeling the prevention of colorectal cancer from the combined impact of host and behavioral risk factors, *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 19 (2017) 314–321, <https://doi.org/10.1038/gim.2016.101>.
- [3] A.T. Boutin, W.-T. Liao, M. Wang, S.S. Hwang, T.V. Karpins, H. Cheung, G.C. Chu, S. Jiang, J. Hu, K. Chang, E. Vilar, X. Song, J. Zhang, S. Kopetz, A. Futreal, Y.A. Wang, L.N. Kwong, R.A. Depinho, Oncogenic Kras drives invasion and maintains metastases in colorectal cancer, *Genes Dev.* 31 (2017) 370–382, <https://doi.org/10.1101/gad.293449.116>.
- [4] M.A. Nieto, R.Y.-J. Huang, R.A. Jackson, J.P. Thiery, EMT: 2016, *Cell* 166 (2016) 21–45, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>.
- [5] A.S. Gehren, M.R. Rocha, W.F. de Souza, J.A. Morgado-Díaz, Alterations of the apical junctional complex and actin cytoskeleton and their role in colorectal cancer progression, *Tissue Barriers* 3 (2015) e1017688, <https://doi.org/10.1080/21688370.2015.1017688>.
- [6] R.B. Haga, A.J. Ridley, Rho GTPases: regulation and roles in cancer cell biology, *Small GTPases* 7 (2016) 207–221, <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1232583>.
- [7] G. Kanellos, M.C. Frame, Cellular functions of the ADF/cofilin family at a glance, *J. Cell Sci.* 129 (2016) 3211–3218, <https://doi.org/10.1242/jcs.187849>.
- [8] K. Mizuno, Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation, *Cell. Signal.* 25 (2013) 457–469, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.11.001>.
- [9] W. Wang, G. Mouneimne, M. Sidani, J. Wyckoff, X. Chen, A. Makris, S. Goswami, A.R. Bresnick, J.S. Condeelis, The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors, *J. Cell Biol.* 173 (2006) 395–404, <https://doi.org/10.1083/jcb.200510115>.
- [10] H. Wang, L. Tao, F. Jin, H. Gu, X. Dai, T. Ni, J. Feng, Y. Ding, W. Xiao, Y. Qian, Y. Liu, Cofilin 1 induces the epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer cells by promoting cytoskeletal rearrangement, *Oncotarget* 8 (2017) 39131–39142, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16608>.
- [11] P.J. Hensley, D. Zetter, C.M. Horbinski, S.E. Strup, N. Kyprianou, Association of epithelial-mesenchymal transition and nuclear cofilin with advanced urothelial cancer, *Hum. Pathol.* 57 (2016) 68–77, <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.06.020>.
- [12] Q. Wu, Y. Jiang, S. Cui, Y. Wang, X. Wu, The role of cofilin-1 in vulvar squamous cell carcinoma: a marker of carcinogenesis, progression and targeted therapy, *Oncol. Rep.* 35 (2016) 2743–2754, <https://doi.org/10.3892/or.2016.4625>.
- [13] J. Collazo, B. Zhu, S. Larkin, S.K. Martin, H. Pu, C. Horbinski, S. Kochehpour,

- N. Kyprianou, Cofilin drives cell-invasive and metastatic responses to TGF- $\beta$  in prostate cancer, *Cancer Res.* 74 (2014) 2362–2373, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3058>.
- [14] W. Wang, R. Eddy, J. Condeelis, The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis, *Nat. Rev. Cancer* 7 (2007) 429–440, <https://doi.org/10.1038/nrc2148>.
- [15] W. Wang, S. Goswami, K. Lapidus, A.L. Wells, J.B. Wyckoff, E. Sahai, R.H. Singer, J.E. Segall, J.S. Condeelis, Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors, *Cancer Res.* 64 (2004) 8585–8594, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1136>.
- [16] B.K. Garvalov, K.C. Flynn, D. Neukirchen, L. Meyn, N. Teusch, X. Wu, C. Brakebusch, J.R. Bamburg, F. Bradke, Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity, *J. Neurosci.* 27 (2007) 13117–13129, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3322-07.2007>.
- [17] L.G. dos R. Bastos, P.G. de Marcondes, J.C.M. de-Freitas-Junior, F. Leve, A.L. Mencialha, W.F. de Souza, W.M. de Araujo, M.N. Tanaka, E.S.F.W. Abdelhay, J.A. Morgado-Díaz, Progeny from irradiated colorectal cancer cells acquire an EMT-like phenotype and activate Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, *J. Cell. Biochem.* 115 (2014) 2175–2187, <https://doi.org/10.1002/jcb.24896>.
- [18] D. Wang, N.G. Naydenov, A. Feygin, S. Baranwal, J.F. Kuemmerle, A.I. Ivanov, Actin-depolymerizing factor and Cofilin-1 have unique and overlapping functions in regulating intestinal epithelial junctions and mucosal inflammation, *Am. J. Pathol.* 186 (2016) 844–858, <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.11.023>.
- [19] B.D.S. Mendonça, M. Agostini, I.G. Aquino, W.B. Dias, D.C. Bastos, F.D. Rumjanek, Suppression of MAGE-A10 alters the metastatic phenotype of tongue squamous cell carcinoma cells, *Biochem. Biophys. Rep.* 10 (2017) 267–275, <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.04.009>.
- [20] R.J. Cain, B. Vanhaesebroeck, A.J. Ridley, The PI3K p110 $\alpha$  isoform regulates endothelial adherens junctions via Pyk2 and Rac1, *J. Cell Biol.* 188 (2010) 863–876, <https://doi.org/10.1083/jcb.200907135>.
- [21] A. Steffen, M. Ladwein, G.A. Dimchev, A. Hein, L. Schwenkmezger, S. Arens, K.I. Ladwein, J. Margit Holleboom, F. Schur, J. Victor Small, J. Schwarz, R. Gerhard, J. Faix, T.E.B. Stradal, C. Brakebusch, K. Rottner, Rac function is crucial for cell migration but is not required for spreading and focal adhesion formation, *J. Cell Sci.* 126 (2013) 4572–4588, <https://doi.org/10.1242/jcs.118232>.
- [22] J. Xu, S. Lamouille, R. Derynck, TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition, *Cell Res.* 19 (2009) 156–172, <https://doi.org/10.1038/cr.2009.5>.
- [23] L. Vardouli, A. Moustakas, C. Stournaras, LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor- $\beta$ , *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 11448–11457, <https://doi.org/10.1074/jbc.M402651200>.
- [24] T.D. Pollard, J.A. Cooper, Actin, a central player in cell shape and movement, *Science* 326 (2009) 1208–1212, <https://doi.org/10.1126/science.1175862>.
- [25] S. Das, B.N. Becker, F.M. Hoffmann, J.E. Mertz, Complete reversal of epithelial to mesenchymal transition requires inhibition of both ZEB expression and the Rho pathway, *BMC Cell Biol.* 10 (2009) 94, <https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-94>.
- [26] Y.M. Fleming, G.J. Ferguson, L.C. Spender, J. Larsson, S. Karlsson, B.W. Ozanne, R. Grosse, G.J. Inman, TGF- $\beta$ -mediated activation of RhoA signalling is required for efficient (V12)HaRas and (V600E)BRAF transformation, *Oncogene* 28 (2009) 983–993, <https://doi.org/10.1038/onc.2008.449>.
- [27] K. Martin, A. Reimann, R.D. Fritz, H. Ryu, N.L. Jeon, O. Pertz, Spatio-temporal coordination of RhoA, Rac1 and Cdc42 activation during prototypical edge protrusion and retraction dynamics, *Sci. Rep.* 6 (2016) 21901, <https://doi.org/10.1038/srep21901>.
- [28] M. Machacek, L. Hodgson, C. Welch, H. Elliott, O. Pertz, P. Nalbant, A. Abell, G.L. Johnson, K.M. Hahn, G. Danuser, Coordination of rho GTPase activities during cell protrusion, *Nature* 461 (2009) 99–103, <https://doi.org/10.1038/nature08242>.
- [29] S. Lamouille, R. Derynck, Cell size and invasion in TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway, *J. Cell Biol.* 178 (2007) 437–451, <https://doi.org/10.1083/jcb.200611146>.
- [30] G. Kanellos, J. Zhou, H. Patel, R.A. Ridgway, D. Huels, C.B. Gurniak, E. Sandilands, N.O. Carragher, O.J. Sansom, W. Witke, V.G. Brunton, M.C. Frame, ADF and Cofilin1 control actin stress fibers, nuclear integrity, and cell survival, *Cell Rep.* 13 (2015) 1949–1964, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.056>.
- [31] S. Yamada, W.J. Nelson, Localized zones of rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion, *J. Cell Biol.* 178 (2007) 517–527.
- [32] K. Ohashi, S. Fujiwara, T. Watanabe, H. Kondo, T. Kiuchi, M. Sato, K. Mizuno, LIM kinase has a dual role in regulating lamellipodium extension by decelerating the rate of actin retrograde flow and the rate of actin polymerization, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 36340–36351, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.259135>.
- [33] J. Shankar, I.R. Nabi, Actin cytoskeleton regulation of epithelial mesenchymal transition in metastatic cancer cells, *PLoS One* 10 (2015) e0119954, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119954>.
- [34] H.J. Cho, J. Yoo, Rho activation is required for transforming growth factor- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition in lens epithelial cells, *Cell Biol. Int.* 31 (2007) 1225–1230, <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2007.04.006>.
- [35] H. Aggelou, P. Chadla, S. Nikou, S. Karteri, I. Maroulis, H.P. Kalofonos, H. Papadaki, V. Bravou, LIMK/cofilin pathway and slingshot are implicated in human colorectal cancer progression and chemoresistance, *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 472 (2018) 727–737, <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2298-0>.
- [36] J.J. Bravo-Cordero, M.A.O. Magalhaes, R.J. Eddy, L. Hodgson, J. Condeelis, Functions of cofilin in cell locomotion and invasion, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14 (2013) 405–415, <https://doi.org/10.1038/nrm3609>.
- [37] L.H. Tahtamouni, A.E. Shaw, M.H. Hasan, S.R. Yasin, J.R. Bamburg, Non-overlapping activities of ADF and cofilin-1 during the migration of metastatic breast tumor cells, *BMC Cell Biol.* 14 (2013) 45, <https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-45>.
- [38] E.J. Hagedorn, L.C. Kelley, K.M. Naegeli, Z. Wang, Q. Chi, D.R. Sherwood, ADF/cofilin promotes invadopodial membrane recycling during cell invasion in vivo, *J. Cell Biol.* 204 (2014) 1209–1218, <https://doi.org/10.1083/jcb.201312098>.
- [39] M. Oser, H. Yamaguchi, C.C. Mader, J.J. Bravo-Cordero, M. Arias, X. Chen, V. Desmarais, J. van Rheenen, A.J. Koleske, J. Condeelis, Cortactin regulates cofilin and N-WASP activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation, *J. Cell Biol.* 186 (2009) 571–587, <https://doi.org/10.1083/jcb.200812176>.
- [40] M.L. Gardel, I.C. Schneider, Y. Aratyn-Schaus, C.M. Waterman, Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26 (2010) 315–333, <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.011209.122036>.
- [41] T.W. Marshall, H.L. Aloor, J.E. Bear, Coronin 2A regulates a subset of focal-adhesion-turnover events through the cofilin pathway, *J. Cell Sci.* 122 (2009) 3061–3069, <https://doi.org/10.1242/jcs.051482>.

## Supplementary Data

### **Cofilin-1 signaling mediates epithelial–mesenchymal transition by promoting actin cytoskeleton reorganization and cell-cell adhesion regulation in colorectal cancer cells**

Annie Cristhine Moraes Sousa-Squiavinato, Murilo Ramos Rocha, Pedro Barcellos-de-Souza, Waldemir Fernandes Sousa, and Jose Andres Morgado-Diaz\*

Cellular and Molecular Oncobiology Program, Cellular Dynamic and Structure Group, Brazilian National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil.

\*Correspondence author: Jose Andres Morgado-Diaz, Cellular and Molecular Oncobiology Program, Brazilian National Cancer Institute (INCA), 37 André Cavalcanti Street, 5th Floor, Rio de Janeiro, RJ 20230-051, Brazil. Phone: +55 21 3207 6533. E-mail: [jmorgado@inca.gov.br](mailto:jmorgado@inca.gov.br).

**Figure S1.** TGF- $\beta$  treatment induces EMT phenotype in HT-29 cells.

(A) Cells were pre-treated with 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  SB431542 for 1 h and stimulated with 10 ng/mL TGF- $\beta$ . After 48 h, cells were lysed and analyzed by western blotting for E-cadherin, claudin-3, and vimentin. GAPDH was used as a loading control. A representative experiment is shown.

(B) Cells were untreated or treated with TGF- $\beta$  (10 ng/mL) for 48 h, and then RT-qPCR was performed for gene expression analysis of epithelial and mesenchymal markers as well as of cofilin-1 and its regulator, LIMK2. Bar graphs represent relative quantification ( $-2^{\Delta\Delta\text{CT}}$ ) of control cell mRNA expression compared with TGF- $\beta$ -treated cell mRNA expression.

(C) Representative immunofluorescence images of the markers in cells subjected to the treatments in **a** are shown. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$

**Figure S2. Subcellular localization of total-cofilin-1/p-cofilin-1 and organizational pattern of actin cytoskeleton in TGF- $\beta$ -treated cells.** HT-29 cells were grown on glass coverslips, untreated or treated with TGF- $\beta$  (10 ng/mL) for 48 h, and subjected to immunofluorescence analysis of total cofilin-1, p-cofilin-1 (Ser3), and actin localization. Actin filaments were labeled with TRITC-phalloidin. Representative immunofluorescence images are shown. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$

**Figure S3. Subcellular localization of E-cadherin and F-actin in HT-29 cells treated with TGF- $\beta$  and SB431542.** HT-29 cells were grown on glass coverslips and then pre-treated with 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  SB431542 for 1 h before stimulation with 10 ng/mL TGF- $\beta$ . Cells were subjected to immunofluorescence analysis of E-cadherin and actin localization. Actin filaments were labeled with TRITC-phalloidin. Scale bar: 30  $\mu\text{m}$

**Figure S4. Analysis of actin cytoskeleton organizational pattern in cofilin-1 mutant cells.** HT-29 cells were transiently transfected with wild-type (WT) RFP-tag cofilin-1, RFP-tag cofilin-1 S3A (active form), and phosphorylated



mimetic RFP-tag cofilin-1 S3E (inactive form). Then, cells were grown on glass coverslips and stimulated with TGF- $\beta$  for 48 h. Subsequently, cells were subjected to immunofluorescence analysis of the actin organization pattern. The dashed line separates RFP-positive and RFP-negative cells in each image. Using maximum intensity projections by confocal microscopy, both cells in the same image of each group were analyzed. Actin filaments and nuclei were labeled with Atto 655-phalloidin and DAPI, respectively. Actin aggregates are indicated by asterisks, and F-actin is indicated by arrows. Scale bar: 30  $\mu$ m

Fig. S1- Sousa-Squiavinato et al.

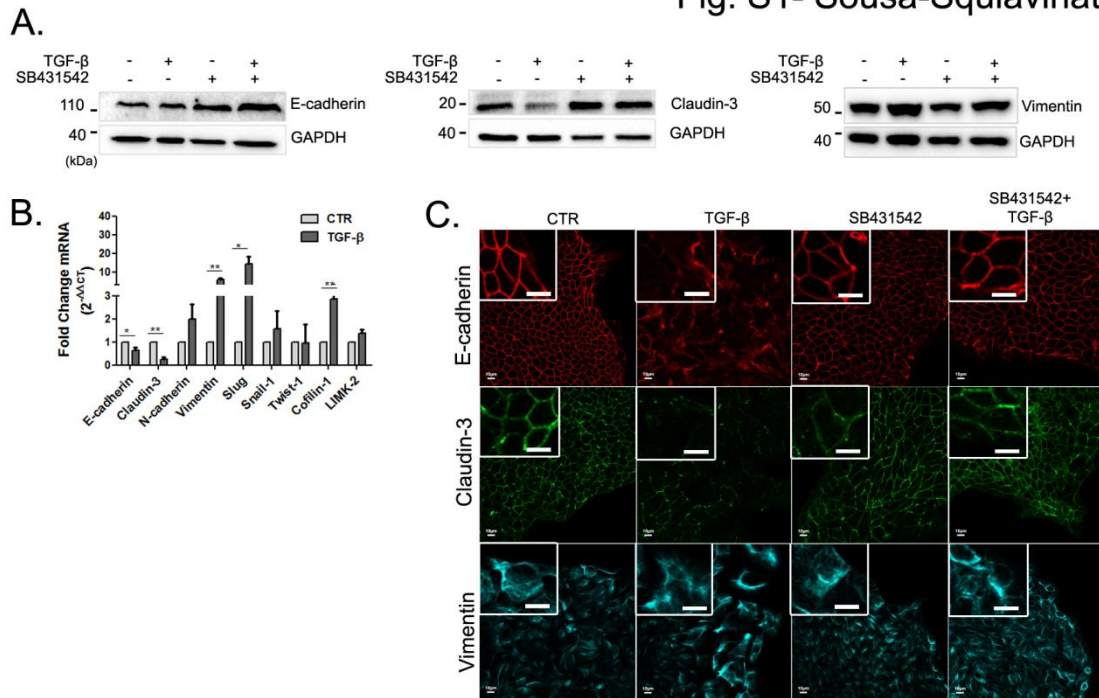


Fig. S2 - Sousa-Squiavinato et al.

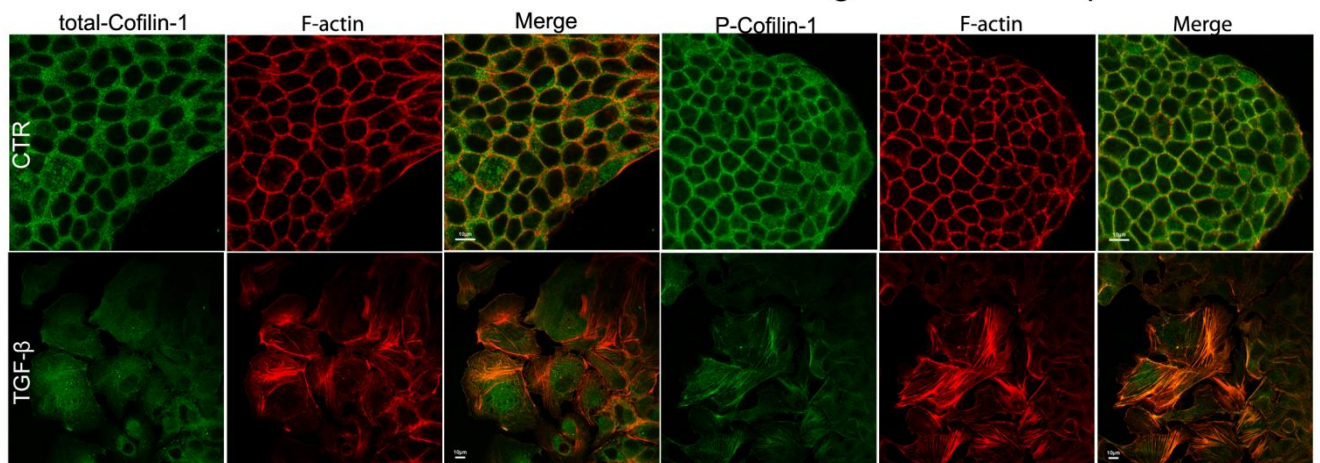


Fig. S3 - Sousa-Squiavinato et al.

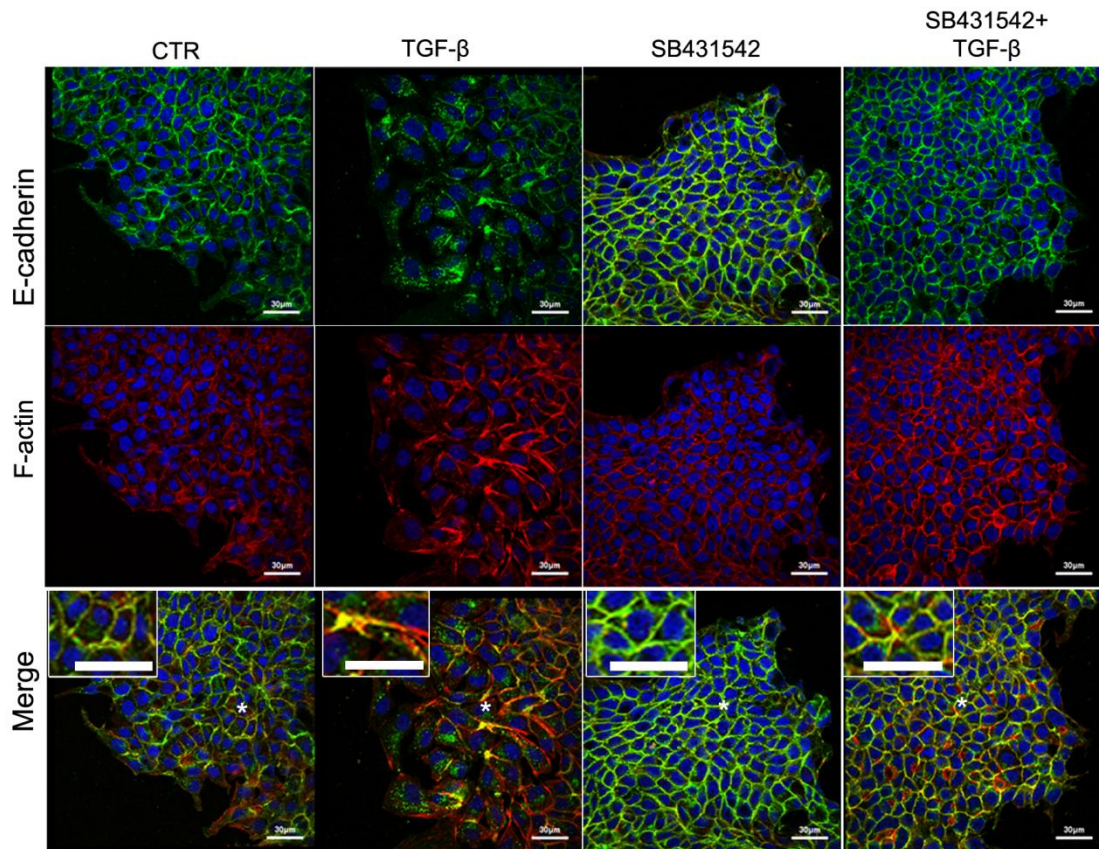


Fig. S4 - Sousa-Squiavinato et al.

