



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

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

**PERÔNY DA SILVA NOGUEIRA**

**ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE COMPONENTES DAS JUNÇÕES *TIGHT* NA  
PROGRESSÃO DO CÂNCER COLORRETAL**

**Orientadores: Prof<sup>o</sup>. Dr. Jose Andres Morgado Diaz  
Prof<sup>o</sup>. Dr. Waldemir Fernandes de Souza**

**RIO DE JANEIRO  
2019**



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

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

Pós-Graduação em Oncologia

**PERÔNÝ DA SILVA NOGUEIRA**

**ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE COMPONENTES DAS JUNÇÕES *TIGHT* NA  
PROGRESSÃO DO CÂNCER COLORRETAL**

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Oncologia.

Orientadores: Prof<sup>o</sup>. Dr. Jose Andres Morgado Diaz  
Prof<sup>o</sup>. Dr. Waldemir F. de Souza

RIO DE JANEIRO

2019

N778e Nogueira, Perony da Silva.

Estudo das interações entre componentes das junções tight na progressão do câncer colorretal / Perony da Silva Nogueira. – Rio de Janeiro, 2019.  
82 f. : il. color.

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

Orientadores: José Andres Morgado Diaz; Waldemir Fernandes de Souza.

1. Neoplasias Colorretais. 2. Junção Tight. 3. Claudina-3. 4. Ocludina.  
I. Diaz, José Andres Morgado (Orient.). II. Souza, Waldemir Fernandes de (Orient.) III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.  
IV. Título.

CDD 616.99435



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

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

**AUTOR: PERÔNY DA SILVA NOGUEIRA**

**ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE COMPONENTES DAS JUNÇÕES *TIGHT* NA  
PROGRESSÃO DO CÂNCER COLORRETAL**

Orientadores: Prof<sup>o</sup>. Dr. Jose Andres Morgado Diaz  
Prof<sup>o</sup>. Dr. Waldemir Fernandes de Souza

**Aprovada em: 28/02/2019**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Renata Binato Gomes**  
**Prof. Dra. Mariana Lima Boroni Martins**  
**Prof. Dr. Rafael Soares Lindoso**  
**Prof. Dr. João Alfredo de Moraes Gomes Silva (Suplente)**  
**Prof. Dra. Gabriela Nestal de Moraes (Suplente)**

RIO DE JANEIRO  
2019

Dedico esta dissertação à minha mãe. Meu grande exemplo de mulher, que não mediu esforços para criar seus filhos com muita dignidade e amor, apesar de todas as dificuldades.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à minha mãe e irmãos, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e permanecendo comigo em todas as minhas decisões, não importando elas quais fossem. Sem a ajuda e o apoio de vocês eu jamais teria chegado aonde cheguei e jamais teria conquistado tudo o que conquistei até hoje. O homem que me tornei dependeu exclusivamente da excelente educação que recebi. Sempre os tive como espelho em minha vida e pretendo jamais decepcioná-los. Muito obrigado por serem quem são, exatamente da maneira como são. Amo vocês com todas as minhas forças e farei de tudo para protegê-los, ainda que esta seja a última coisa que eu faça em minha vida.

Em segundo lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador Dr. José Morgado, que me recebeu em seu grupo e confiou em meu trabalho, me dando todo o suporte necessário para que eu pudesse me desenvolver cientificamente. Agradeço pelos momentos de descontração e por me ouvir, sempre que eu precisava esclarecer minhas incontáveis dúvidas.

Ao meu companheiro, amigo e confidente Edmarlon, por ter me acompanhado e estado ao meu lado durante este árduo percurso chamado Mestrado. Somado ao apoio da minha família, o seu carinho foi fundamental para que eu conseguisse chegar até o final dessa jornada com saúde mental. Obrigado pelas conversas madrugada à fora, pelo ombro amigo e seus ouvidos quando eu sempre precisava desabafar dos – muitos (risos) – experimentos que davam errado. Por ter me dado suporte quando eu pensei em desistir de tudo, quando eu cogitei que a área da pesquisa não seria para mim. Você me mostrou, de forma muito singela, que o meu lugar seria onde eu quisesse, que dependeria de mim superar os obstáculos e permanecer firme. Aqui estou eu e jamais poderia mensurar o quanto sou grato pelo seu apoio até aqui. Muito obrigado. Te amo!

Ao meu coorientador, Dr. Waldemir de Souza. Obrigado por ter acreditado inicialmente em mim, me dando a oportunidade de iniciar minha pesquisa em câncer, em 2016. Obrigado por ter estado ao meu lado, acompanhando de perto os meus passos desde o aperfeiçoamento I. Obrigado por ter sido compreensivo nos momentos mais difíceis dessa trajetória, principalmente quando os experimentos davam errado ou quando eu fazia alguma besteira (risos). Não teria como ser mais grato pela confiança que depositou em mim desde o primeiro dia que visitei o INCA.

Não poderia deixar de agradecer meus amigos do laboratório: Annie, Murilo e Josiane. Vocês foram muito importantes durante o desenvolvimento do meu projeto, ajudando a sanar minhas dúvidas e discutindo meus resultados sempre que eu precisei. Ao Cássio, Pedro, Wallace, Renatinha, Júlio, Jéssica, Érika, Clara, Luciana e Paula, pelos maravilhosos momentos que me proporcionaram, tornando meus dias mais leves enquanto trabalhávamos. Muito obrigado por tudo. Agradeço também a Andréia Deiró, por ter sido uma pessoa tão carismática e tornado meu mestrado mais engraçado. Amo vocês de graça.

Aos meus amigos: Edu, Bianquinha, Natalia e Elielson, pelos momentos de descontração, pelas bebedeiras e festas, pelas confraternizações e risos frouxos, sempre que precisei. Obrigado por tudo.

Agradeço ao Matheus Rajão, pelo conhecimento e paciência para me auxiliar a fazer as imagens de fluorescência e ao Dr. Leonardo Andrade, da UFRJ, por ter nos ajudado com a técnica de microscopia eletrônica.

Não menos importante, eu gostaria de agradecer aos pacientes do INCA, que se propuseram a auxiliar no desenvolvimento das pesquisas. Sem eles, não obteríamos os nossos resultados e a pesquisa estaria mais limitada.

Aos órgãos de fomento CNPq e FAPERJ, ao Ministério da Saúde-INCA por ter me proporcionado recursos financeiros para realizar meu trabalho.

*“Nós não devemos nos esquecer de que quando o elemento químico rádio foi descoberto, ninguém sabia que ele seria útil em hospitais. O trabalho foi de pura ciência. Isso é a prova de que o trabalho científico não deve ser considerado do ponto de vista da sua utilidade direta. Deve ser feito por si, pela beleza da ciência, e então sempre há a chance de que uma descoberta científica pode se tornar um benefício para a humanidade, como o rádio se tornou”.*

*(Marie Curie)*





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

**ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE COMPONENTES DAS JUNÇÕES *TIGHT* NA  
PROGRESSÃO DO CÂNCER COLORRETAL**

**RESUMO**

PERÔNY DA SILVA NOGUEIRA

O câncer colorretal é a segunda causa principal de mortes relacionadas ao câncer no mundo. De acordo com os dados do Ministério da Saúde/INCA sobre o Câncer, o Brasil pertence ao grupo de países onde o câncer é a segunda principal causa de morte antes dos 70 anos de idade, sendo o segundo mais incidente entre mulheres e o terceiro mais incidente entre homens. Durante a progressão do carcinoma ocorre uma desestabilização na adesão célula-célula, que está intimamente relacionada com a transição epitélio-mesenquimal e o aumento de malignidade deste tipo de câncer. As junções *tight*, componente do sistema de adesão célula-célula, participa da manutenção da homeostase do epitélio, regulando eventos como o transporte paracelular, polaridade ápico-basolateral e sinalização celular. Nesse sentido, alterações da expressão entre proteínas constituintes das junções *tight*, como a claudina-3, ocludina e ZO-1, afetam a funcionalidade do sistema de adesão intercelular; contribuindo para a progressão de diversos tipos de tumores epiteliais. Neste estudo, avaliamos a interação entre as proteínas das junções *tight* e sua importância durante a progressão do câncer colorretal. Nossos resultados em amostras de tecido de pacientes com câncer de cólon revelaram que os pacientes podem ser segregados em dois grupos: um que apresenta diminuição nos níveis de claudina-3 e outro grupo que apresenta um aumento dos níveis desta proteína. Além disso, observamos que amostras que apresentaram aumento nos níveis proteicos de claudina-3 no tumor, possuíam um menor nível da proteína ocludina. Mostramos ainda que nos tumores ocorre uma diminuição da interação entre a claudina-3 e ocludina. Ensaios *in vitro* utilizando células de câncer colorretal HT-29, que superexpressavam claudina-3, confirmaram que há uma redução dos níveis proteicos de outros componentes das junções *tight*, como a ocludina e ZO-1. Observamos ainda que o aumento da expressão da claudina-3 causou uma redistribuição não só desta proteína, como também da ocludina e ZO-1, nos contatos célula-célula. Além disso, verificamos um aumento do fluxo paracelular de macromoléculas em células que superexpressavam claudina-3. Nossos dados nos permitem concluir que a desregulação nos níveis de expressão da claudina-3 pode alterar sua interação com as proteínas ocludina e ZO-1, levando à desregulação da função das junções *tight*. A segregação dos pacientes entre aqueles que apresentam aumento ou diminuição dos níveis de claudina-3 pode contribuir no desenho de estratégias para o tratamento de grupos específicos de pacientes acometidos pela doença. Além disso, esses dados podem ajudar a melhor entender os mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese colorretal e apontar a claudina-3 como um potencial biomarcador molecular do desenvolvimento desta doença.

Palavras chave: Câncer colorretal, junção *tight*, claudina-3, ocludina, ZO-1



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

**STUDY OF THE INTERACTIONS BETWEEN TIGHT JUNCTION COMPONENTS  
DURING COLORECTAL CANCER PROGRESSION**

**ABSTRACT**

**PERÔNÝ DA SILVA NOGUEIRA**

Colorectal cancer is the second leading cause of cancer-related deaths in the world. According to data from the Ministry of Health/INCA, Brazil belongs to the group of countries where cancer is the second cause of death before 70 years old, the second most frequent among women and the third in incidence among men. During the progression from adenoma to carcinoma occurs cell-cell adhesion destabilization, which is closely related to the epithelial-mesenchymal transition and increased malignancy of this type of cancer. The tight junctions, a component of the cell-cell adhesion system, are involved in the maintenance of epithelial homeostasis, regulating events such as paracellular transport, apico-basolateral polarity and cellular signaling. In this sense, alterations in the expression of tight junction proteins, such as claudin-3, occludin and ZO-1, affect the functionality of the intercellular adhesion system, contributing to the progression of various types of epithelial tumors. In this study, we evaluated the interaction between tight junction proteins and their importance during the progression of colorectal cancer. Our results using tissue samples from colon cancer patients revealed that patients can be segregated into two groups: one where there is a decrease in levels of claudin-3 and another group where there is an increased level of this protein. In addition, we observed that tumor tissue samples with increased claudin-3 protein levels had a lower level of occludin protein. Also, we show that in tumors occur a decreased interaction between claudin-3 and occludin. In vitro assays using HT-29 colorectal cancer cells that overexpress claudin-3 confirmed that exist a reduction of the protein levels of other tight junction components, such as occludin and ZO-1. Furthermore, observed that the increased expression of claudin-3 caused redistribution not only of this protein, but also of occludin and ZO-1, at the cell-cell contacts. Finally, it was showed that cells that overexpress claudin-3 displayed an increase in the paracellular flux of macromolecules. Our findings allow us to conclude that dysregulation in the claudin-3 expression levels may alter its interaction with occludin and ZO-1 proteins, leading to the dysregulation of tight junction function. Patients who were segregated among those with increased or decreased levels of claudin-3 may contribute to the design of strategies for the treatment of specific groups of patients affected by the disease. In addition, these data may help to better understand the molecular mechanisms involved in colorectal tumorigenesis and point out claudin-3 as a potential molecular biomarker during the progression of this disease.

**Key words:** Colorectal cancer, tight junction, claudin-3, occludin, ZO-1

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1. Sequência clássica Adenoma-Carcinoma durante a progressão do Câncer Colorretal .....	17
Figura 1.2. Figura esquemática representando a cripta no intestino grosso .....	19
Figura 1.3. Figura esquemática do complexo juncional apical .....	20
Figura 1.4. Figura esquemática da formação das Junções Aderentes.....	21
Figura 1.5. Imagem esquemática da composição molecular das Junções <i>Tight</i> .....	27
Figura 5.1 Análise dos níveis proteicos de ocludina por <i>immunoblotting</i> em amostras de pacientes com câncer de cólon .....	43
Figura 5.2 Análise dos níveis proteicos de claudina-3 por <i>immunoblotting</i> em amostras de pacientes com câncer de cólon .....	45
Figura 5.3 Correlação da expressão dos níveis proteicos de claudina-3 e ocludina .	46
Figura 5.4 Curva de sobrevida dos pacientes de acordo com a baixa ou alta expressão de claudina-3 .....	48
Figura 5.5 Co-imunoprecipitação entre as proteínas ocludina e claudina-3.....	49
Figura 5.6 Microscopia eletrônica de transmissão do epitélio do cólon.....	50
Figura 5.7 Expressão de proteínas da junção <i>tight</i> em células que superexpressam claudina-3.....	52
Figura 5.8 Imagem de imunofluorescência das proteínas claudina-3 e ocludina em células HT-29 transduzidas. ....	54
Figura 5.9 Imagem de imunofluorescência das proteínas claudina-3 e ZO-1 em células HT-29 transduzidas .....	55
Figura 5.10 Análise da permeabilidade paracelular em células HT-29 que superexpressam claudina-3 .....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Distribuição dos dez principais tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, não incluindo câncer de pele não melanoma .....	15
--	----

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1. Quadro com a classificação TNM de estadiamento de tumores.....	30
Quadro 1.2. Quadro com o grupamento por estádios do CCR.....	30
Quadro 5.1. Quadro com análise clinicopatológica de pacientes com baixa e alta expressão de claudina-3.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC – do inglês *American joint committee on cancer*  
ANOVA - do inglês *analysis of variance*  
APC - do inglês *adenomatous polyposis coli*  
BRAF - do inglês *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*  
BVES - do inglês *blood vessel epicardial substance*  
CBC – do inglês *crypt base columnar cells*  
CCR – Câncer Colorretal  
CIMP - do inglês *CpG Island methylator phenotype*  
CJA - complexo juncional apical  
CLDN-3 – Claudina-3  
CMS - do inglês *consensus molecular subtype*  
CRCSC - do inglês *Colorectal Cancer Subtyping Consortium*  
ECL – do inglês *extracellular loop*  
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético  
EGF - do inglês *epidermal growth factor*  
EGFR - do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*  
EGTA - Ácido tetracético etileno-glicol  
ERK - do inglês *extracellular signal-regulated kinase*  
FAP - do inglês *familial adenomatous polyposis*  
GUK – do inglês *guanylate kinase domain*  
HNPCC - do inglês *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*  
IARC - do inglês *International Agency for Research on Cancer*  
JMD – do inglês *juxtamembrane core domain*  
JT – Junção *tight*  
KRAS - do inglês *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*  
MAGUK - do inglês *Membrane Associated Guanylate Kinase*  
MAPK - do inglês *mitogen-activated protein kinase*  
MEK - do inglês *raf-mitogen-activated protein kinase*  
MSI - do inglês *microsatellite instability*  
NGS – do inglês *Normal Goat Serum*  
OCLD - Ocludina  
PAR3 - do inglês *partitioning defective 3*  
PDZ - do inglês *postsynaptic density protein*  
SFB - Soro fetal bovino  
TCT/LEF - do inglês *T-cell factor/lymphoid enhancer factor family*  
TEM – Transição Epitélio Mesenquimal  
TP53 - do inglês *tumor protein p53*  
UICC – do inglês *union for international cancer control*  
WNT - do inglês *wingless*  
ZO-1 - do inglês *zonula occludens*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1	Câncer Colorretal .....	15
1.2	Epitélio Intestinal .....	18
1.3	Complexo Juncional-Apical (CJA).....	20
1.3.1	Junções <i>Tight</i> .....	23
1.4	Junção <i>tight</i> e Câncer .....	27
1.5	Estadiamento e Tratamento do Câncer Colorretal .....	29
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
3.1	Objetivo Geral .....	34
3.1.1	Objetivos específicos.....	34
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
4.1	Anticorpos .....	35
4.2	Reagentes e outros materiais .....	35
4.3	Coleta das amostras de pacientes .....	36
4.4	Cultura de células .....	36
4.5	Extração proteica total e <i>Western Blot</i> .....	37
4.6	Co-Imunoprecipitação .....	38
4.7	Imunofluorescência .....	39
4.8	Imunohistoquímica e análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	39
4.9	Ensaio de permeabilidade paracelular com Dextran Red .....	40
4.10	Análises estatísticas .....	41
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	42
5.1	Análise da expressão e interação entre proteínas das junções tight em amostras de pacientes com câncer colorretal.....	42

5.2	Análise clinicopatológica de pacientes com baixos e altos níveis proteicos de claudina-3 no tumor .....	46
5.3	As proteínas ocludina e claudina-3 apresentam menor interação em tumores .....	48
5.4	Análise <i>in vitro</i> revela que a superexpressão de claudina-3 pode induzir uma regulação negativa dos níveis proteicos de ocludina e ZO-1.....	51
5.5	A superexpressão da claudina-3 altera a distribuição e associação entre proteínas das junções <i>tight</i> .....	52
5.6	Superexpressão de claudina-3 promove o aumento da permeabilidade paracelular de macromoléculas .....	56
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>66</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>67</b>

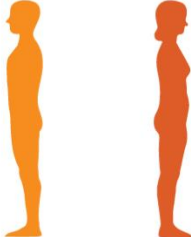


# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer Colorretal

O Câncer Colorretal (CCR) é o terceiro mais incidente e o segundo mais mortal dentre os tipos de câncer, em escala mundial (BRAY et al., 2018). No Brasil, o câncer é a segunda principal causa de morte antes dos 70 anos de idade, sendo o segundo mais incidente entre mulheres (18.980 casos) e o terceiro entre homens (17.380 casos), segundo estimativas para o ano de 2018 (Tabela 1.1) (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA, 2018; World Health Organization – WHO, 2018). A idade e pré-disposição genética, bem como histórico de doença inflamatória intestinal, como a colite ulcerativa e doença de *Crohn*, podem ser importantes fatores de risco para o CCR, contudo, estes não podem ser evitados. Dentre os fatores de risco que podem ser evitados pela população, estão: obesidade, sedentarismo, certos tipos de dieta, como por exemplo, o consumo excessivo de carnes vermelhas ou produtos embutidos, uso abusivo de álcool e o hábito de fumar (EDWARDS et al., 2010; NORAT et al., 2015; WORLD CANCER RESEARCH, 2017). Dessa forma, países em desenvolvimento podem apresentar um aumento expressivo da incidência de CCR, uma vez que o estilo de vida da população é alterado, com a inserção de hábitos alimentares de má qualidade, pelo aumento da ingestão de produtos industrializados devido a mudanças exacerbadas na rotina das pessoas na sociedade (BISHEHSARI et al., 2014).

**Tabela 1.1 Distribuição dos dez principais tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, não incluindo câncer de pele não melanoma.**

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%	
Próstata	68.220	31,7%		<b>Homens</b>	Mama Feminina	59.700	29,5%	
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Mulheres	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	4.860	2,4%	

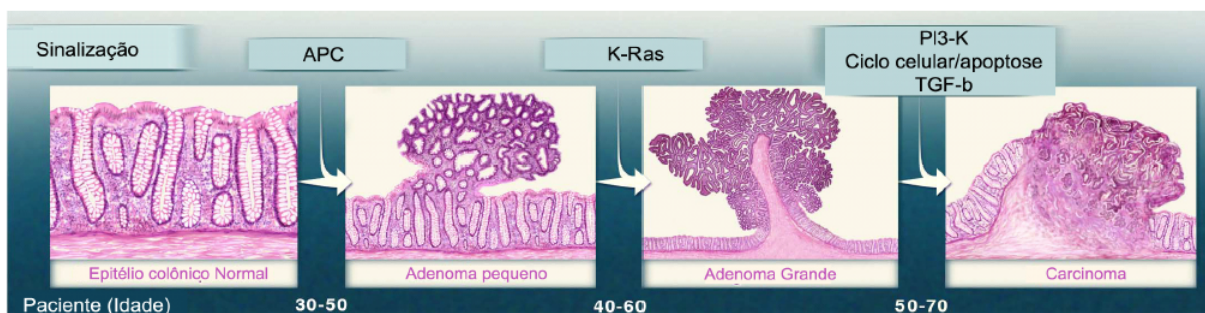
\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2018

Há dois principais tipos de câncer colorretal bem representados. O primeiro e mais comum é o CCR esporádico, envolvendo aproximadamente 75% dos casos de CCR relatados, podendo afetar qualquer pessoa, sem que haja predisposição genética ou histórico de CCR na família (YAMAGISHI et al., 2016). Estima-se, dessa forma, que cerca de 20-30% dos casos restantes, têm-se origem hereditária, dentre os quais de 3-4% estão associados à síndrome de *Lynch* ou Câncer Colorretal Não Poliposo Hereditário (HNPCC, do inglês *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*) e 1% relacionado à polipose adenomatosa familiar (FAP, do inglês *Familial Adenomatous Polyposis*) (RUSTGI, 2007).

Dentre as alterações moleculares mais bem caracterizadas durante a progressão do CCR, estão a instabilidade cromossômica, instabilidade em microssatélites e alterações no fenótipo metilador de ilhas CpGs (PINO; CHUNG, 2010). Em meio às diversas possíveis mutações que ocorrem durante a transição adenoma-carcinoma, as mutações nos genes *APC* (do inglês, *adenomatous polyposis coli*), *KRAS* (do inglês, *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) e *TP53* são as mais conhecidas (SIEBER; HEINIMANN; TOMLINSON, 2003). As mutações no gene supressor tumoral *APC*, estão diretamente relacionadas à FAP, uma vez que nestes pacientes há mutações germinativas neste gene, causando esta importante síndrome hereditária que promove o surgimento de pequenos pólipos intestinais. Estes são considerados eventos iniciais durante o processo de transformação das células cancerígenas, que desencadeiam alterações moleculares e morfológicas do tecido normal, levando à sua transformação em adenomas iniciais. Contudo, a FAP permanece não sendo o maior motivo para a incidência de CCR nos pacientes, deixando esta posição para o CCR esporádico, como dito anteriormente (POWELL et al., 1992; DE FILIPPO et al., 2002; NIH, 2018). Mutações no oncogene *KRAS* representam uma das mais prevalentes alterações genéticas no CCR (KNICKELBEIN; ZHANG, 2015) e estão principalmente relacionadas com a ativação das vias de sinalização mediadas pelo receptor EGFR (do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*), ativando as vias de sinalização das MAPK (do inglês *Mitogen Activated Protein Kinase*), mediando assim o crescimento e a diferenciação celular (PORRU et al., 2018). Finalmente, alterações no gene supressor tumoral *TP53*, estão presentes em estágios iniciais de CCR de origem hereditária e em fases tardias de desenvolvimento em CCR de origem esporádica, estando esta mutação relacionada com a progressão da displasia em células epiteliais intestinais.

Considerando que este gene é capaz de promover a parada do ciclo celular e, conseqüente apoptose em resposta a algum dano ao DNA, torna-se importante para a célula a manutenção deste gene em casos de mutações genéticas, uma vez que a célula mutada, precisa ser encaminhada à degradação (LI et al., 2015; DU et al., 2017) (Fig. 1.1). Com a mutação neste importante gene, as células perdem a capacidade de controlar a proliferação, contribuindo assim para a progressão do câncer.



**Figura 1.1. Sequência clássica Adenoma-Carcinoma durante a progressão do Câncer Colorretal.** Imagem representativa do modelo de transformação do epitélio normal ao adenocarcinoma colorretal, mostrando as principais alterações moleculares presentes durante o processo. Percebe-se a presença de mutações em genes importantes em diferentes etapas da progressão e a idade como um dos fatores de risco. Fonte: Adaptado de VOGELSTEIN et al., 2013.

Recentemente, grupos de cientistas e pesquisadores presentes em mais de quinze instituições formaram um Consórcio Molecular de Subtipos de CCR (CRCSC, do inglês, *Colorectal Cancer Subtyping Consortium*), tornando possível a análise, a nível molecular, de diferentes alterações na expressão de genes e a classificação dos diferentes subtipos de CCR, definindo suas características clínicas e moleculares. Esta classificação, promoveu a separação dos diferentes subtipos moleculares consensuais (CMS, do inglês, *consensus molecular subtype*) em: I) Instabilidade em Microssatélite Imune (CMS1), II) Canônico, primariamente com mutação em WNT/MYC e características epiteliais (CMS2), III) Metabólico, incluindo tumores com mutação em KRAS (CMS3) e IV) Mesenquimal, com ativação das vias de TGF- $\beta$  e VEGFR (CMS4), sendo este último o segundo subtipo mais frequente dentre os subtipos analisados, participando do processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês, *Epithelial-Mesenchymal Transition*). O processo de EMT classifica-se como de extrema importância para a progressão do CCR, uma vez que este evento está diretamente relacionado com o processo de metástase e, conseqüentemente, apresenta um pior prognóstico para os pacientes, uma vez que células tumorais presentes no epitélio intestinal perdem suas características

moleculares e morfológicas, podendo migrar e invadir tecidos distantes (GUINNEY et al., 2015; YEUNG; YANG, 2017; LINNEKAMP et al., 2018).

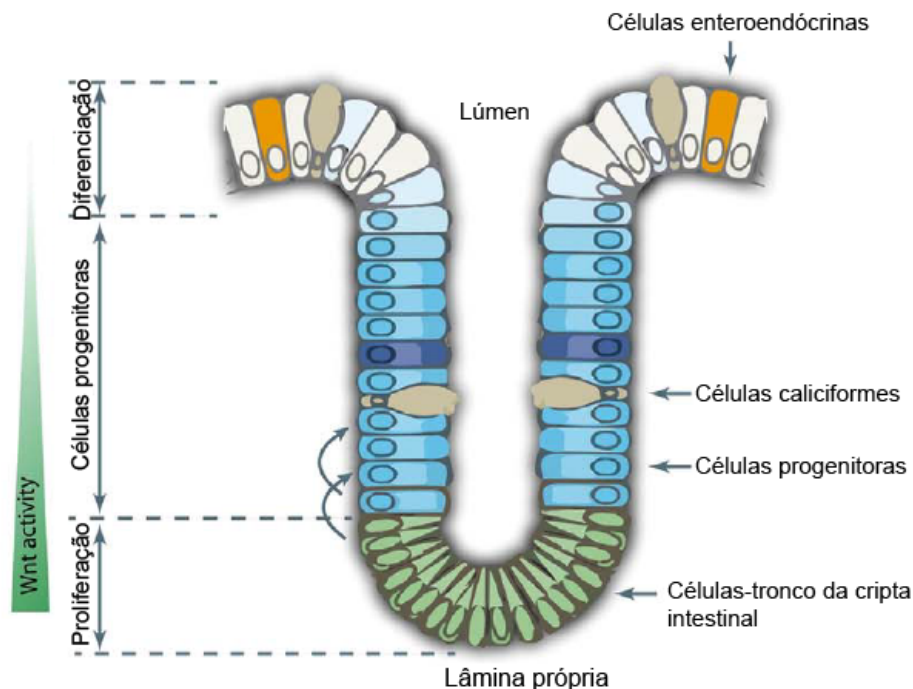
## 1.2 Epitélio Intestinal

O epitélio intestinal é composto pelo intestino delgado e o intestino grosso. Por ser motivo de estudo do nosso grupo, nesta parte abarcaremos apenas as características deste último. O intestino grosso é composto pelo ceco, cólon, reto e ânus, sendo o cólon dividido em quatro principais regiões: cólon ascendente, transverso, descendente e sigmóide. Análises moleculares têm demonstrado que o câncer de colón e o câncer de reto apresentam grande similaridade genética, incluindo as mesmas mutações em seus genes, principalmente no gene *APC* (The Cancer Genome Atlas Network, 2012) e, por este motivo, estudos têm sido desenvolvidos utilizando a nomenclatura colorretal.

Por ser um órgão de extrema complexidade, o intestino apresenta diversas funções essenciais para a homeostase nos indivíduos, sendo também fundamental para a imunidade do hospedeiro, uma vez que a luz do intestino está em constante contato com microrganismos comensais ou patogênicos (CHIN et al., 2017). Durante a transformação do intestino grosso, as criptas são formadas, auxiliando no processo de absorção de nutrientes, uma vez que promovem o aumento da superfície de contato entre o tecido e o alimento. Encontramos também, na base da cripta, células colunares absorptivas (CBC, do inglês *crypt base columnar cells*) que irão auxiliar no processo de absorção na porção basal da cripta (PÉREZ et al., 2017). É importante frisar que o epitélio intestinal encontra-se em constante renovação, sendo considerado um dos tecidos de mamíferos adultos que mais se renovam. Isso se deve a alta capacidade proliferativa encontrada em células localizadas na base da cripta, chamadas células-tronco (RADTKE; CLEVERS, 2005; BARKER; VAN DE WETERING; CLEVERS, 2008). Além das CBC encontradas na cripta, outras células que desempenham importantes funções para a homeostase do tecido epitelial intestinal são os enterócitos, que formam o corpo e a região apical das criptas e as células caliciformes, responsáveis pela produção de mucinas, importantes proteínas que auxiliam no processo de barreira contra agentes

patogênicos no intestino (BLACHE et al., 2004; JOHANSSON; LARSSON; HANSSON, 2011) (Fig. 1.2).

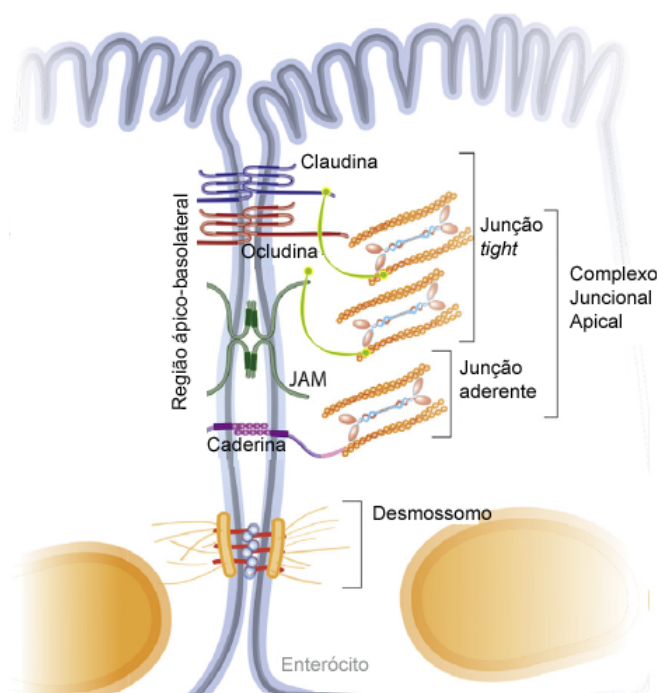
O processo de desenvolvimento e renovação das células epiteliais intestinais depende da ativação de vias de sinalização. Algumas das quais são claramente descritas na literatura, como a via Wnt, possuindo como protagonista uma glicoproteína rica em resíduos cisteína que são secretadas pelas células, a proteína Wnt (CHEN et al., 2018). A via canônica de Wnt é composta principalmente pela participação de outra proteína, conhecida como  $\beta$ -catenina, que atua na transdução de sinais intracelulares, a partir da ativação dos receptores *Frizzled* e LRP. Dessa forma, a  $\beta$ -catenina pode ativar fatores de transcrição responsáveis pela proliferação, invasividade e por manter as características de célula-tronco. Torna-se importante frisar que a  $\beta$ -catenina participa também da formação e manutenção do complexo juncional apical (CJA), um importante agregado proteico que participa da manutenção da arquitetura epitelial intestinal, bem como alterações em suas expressões, podem estar relacionadas com o desenvolvimento do câncer (KRETZSCHMAR; CLEVERS, 2017; TAFRIHI; SISTANI, 2017; BASU; CHERIYAMUNDATH; BEN-ZE'EV, 2018).



**Figura 1.2. Figura esquemática representando a cripta no intestino grosso.** As células-tronco da base da cripta, (verde), darão origem às células progenitoras (azul), um grupo de células transitórias, em meio às quais localizamos as células caliciformes (cinza) produtoras de muco e, posteriormente, na região mais apical da cripta, os enterócitos, ou as células enteroendócrinas (laranja). Ao passo em que se dirige à base da cripta, a atividade de Wnt encontra-se aumentada, enquanto que quanto mais próximo da região apical, a via de Wnt encontra-se menos ativa. Fonte: Adaptado de PÉREZ et al., 2017

### 1.3 Complexo Juncional-Apical (CJA)

A manutenção da polaridade apico-basolateral e da estrutura epitelial com uma forte adesão entre as células se faz necessário no epitélio gastrointestinal, considerando que esta região encontra-se em constante contato com microrganismos que podem ser nocivos. Dessa maneira, estruturas proteicas são formadas, para auxiliar no contato entre as células adjacentes ao longo do intestino, impedindo que estes microrganismos possam atravessar a camada epitelial, alcançando os vasos sanguíneos do tecido conjuntivo abaixo do epitélio intestinal (GEHREN et al., 2015; YANO et al., 2017). Dentre as estruturas que participam da formação do CJA, encontra-se as junções aderentes (JAs) e as junções *tight* (JTs). Duas principais junções responsáveis não apenas pela manutenção da estrutura epitelial, como também da ativação de vias de sinalização responsáveis por diversos eventos intracelulares (Fig. 1.3).

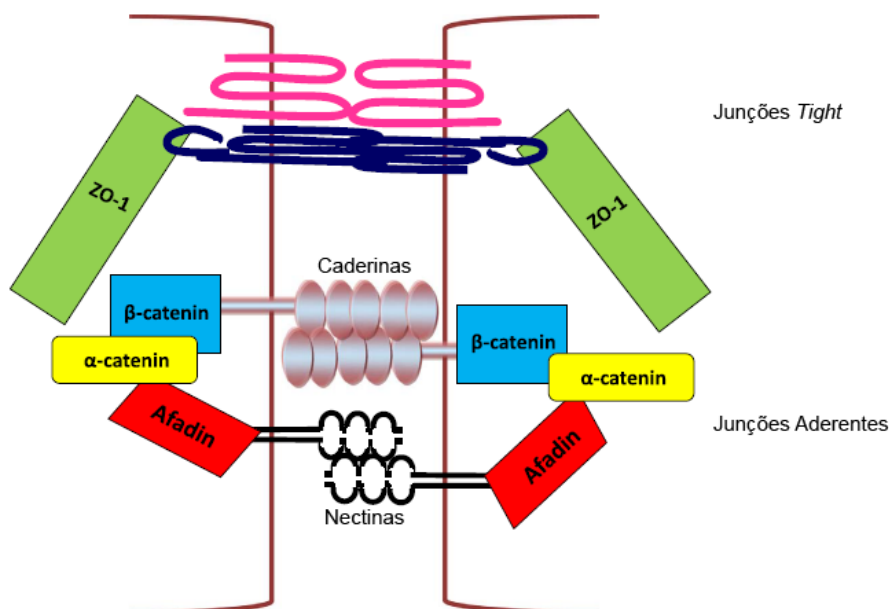


**Figura 1.3. Figura esquemática do complexo juncional apical.** Esquema apresenta o complexo juncional apical, composto pelas junções *tight* e aderentes, na região apico-basolateral. Fonte: Adaptado de STEWART; PRATT-PHILLIPS; GONZALEZ, 2017

As JAs são consideradas as junções pioneiras das células epiteliais, tendo como algumas das principais funções, a manutenção da organização celular, coordenando a formação do citoesqueleto e, conseqüentemente, a forma e a função



epitelial das células. Contudo, alguns estudos também mostram sua importante participação durante o processo de migração e divisão celular. Estas junções são formadas principalmente por complexos multiprotéicos transmembranares que incluem as proteínas caderinas e nectinas. Na região extracelular, estas proteínas interagem entre si, promovendo a união das células adjacentes, enquanto que na região citoplasmática, a interação proteica se dá através das proteínas da família das cateninas (p120-,  $\alpha$ - e  $\beta$ -catenina) e também as afadinas, que se ligam preferencialmente às nectinas. (RODRIGUEZ-BOULAN; MACARA, 2014; CAMPBELL; MAIERS; DEMALI, 2017; PINHEIRO; BELLAÏCHE, 2018; RÜBSAM et al., 2018) (Fig. 1.4).



**Figura 1.4. Figura esquemática da formação das Junções Aderentes.** As caderinas formam dímeros entre si, recrutando as proteínas  $\beta$ -catenina para ligarem-se em sua região citoplasmática. As nectinas, também dimerizadas, possuem as afadinas ligadas em sua porção citoplasmática. Ambas as proteínas transmembranares, são interligadas através da proteína  $\alpha$ -catenina. As proteínas ZO-1, pertencentes às Junções *Tight*, podem realizar a interação de ambas as junções, através de sua ligação com a  $\alpha$ -catenina ou a afadina, através dos domínios GUK e SH3, respectivamente. Fonte: Adaptado de NOMME et al., 2015; CAMPBELL; MAIERS; DEMALI, 2017

As proteínas da superfamília das caderinas compreendem um número aproximado de 20 proteínas, contudo, as principais proteínas encontradas nesta família são as caderinas epiteliais ou E-caderina, N-caderina (do inglês, *neural cadherin*) e VE-caderina (do inglês, *vascular endothelial cadherin*), todas formando as principais proteínas adesivas dependente de cálcio (RÜBSAM et al., 2018), considerando que o cálcio auxilia no processo de enrijecimento das ligações entre as caderinas (TIAN et al., 2011). Estas proteínas possuem cinco domínios de

repetição extracelulares do tipo imunoglobulina que medeiam a ligação entre as caderinas das células adjacentes. Entretanto, antes que os domínios extracelulares interajam entre si, é sugerido que estas formem dímeros *cis* entre as caderinas da mesma célula, para que então se liguem às proteínas das células vizinhas (WU et al., 2010; CAMPBELL; MAIERS; DEMALI, 2017). Um dos principais eventos relatados na literatura durante o processo de EMT é a perda da expressão de E-caderina e o consequente aumento na expressão de N-caderina, estando este evento diretamente relacionado com o aumento do comportamento migratório e invasivo da célula (MROZIK et al., 2018).

Na região citoplasmática, as proteínas caderinas se ligam às demais proteínas que compõem as JA. Primeiramente, a proteína p-120- se liga ao domínio JMD (do inglês, *juxtamembrane core domain*) das E-caderinas para posteriormente a  $\beta$ -catenina se ligar às caderinas, estabilizando a junção para posteriormente, as  $\alpha$ -cateninas se unirem ao complexo, permitindo assim, que as JA interajam com o citoesqueleto de actina e as demais proteínas juncionais, promovendo então, a formação do complexo juncional apical (RÜBSAM et al., 2018).

Em condições normais, a proteína  $\beta$ -catenina é recrutada e permanece retida na membrana plasmática, ligadas às caderinas, sendo impedidas de se translocarem ao núcleo e, conseqüentemente, ligarem-se ao fator de transcrição TCF (do inglês, *T-cell factor*)/LEF (do inglês, *lymphoid enhancement factor*). A sua translocação ao núcleo poderia levar à transcrição de genes relacionados a diversos processos biológicos na célula, incluindo: proliferação, diferenciação, migração, apoptose, entre outros (PAI et al., 2017; WONG et al., 2018). Contudo, ainda que haja diminuição da expressão das proteínas E-caderinas nas células epiteliais, estudos clássicos já demonstravam a participação da proteína supressora tumoral APC regulando negativamente a  $\beta$ -catenina, através da sua ubiquitinação e consequente degradação proteica através do complexo de proteassoma (MUNEMITSU et al., 1995). No entanto, no contexto do câncer, onde possivelmente se encontram mutações nos genes *APC* ou *Wnt* – e ainda –, a diminuição da expressão de E-caderina, faz com que a  $\beta$ -catenina que estaria aderida à membrana, seja liberada no citoplasma, livre para se translocar para o núcleo, visto que as proteínas que regulariam a sua degradação ou retenção à membrana encontram-se alteradas (EMERICK; SCHLEINIGER; BOMAN, 2017; SHANG; HUA; HU, 2017).



As nectinas são proteínas da família do tipo imunoglobulinas, transmembranares e com apenas uma passagem pela membrana plasmática das células. São classicamente reconhecidos quatro tipos de nectinas: nectina-1, -2, -3 e -4. Estas proteínas possuem três alças na região extracelular, onde as permitem realizar as ligações com as nectinas das células vizinhas e também as nectinas da mesma célula, auxiliando assim no processo de formação das JAs. Na região citoplasmática, há a região C-terminal, onde ocorre a ligação da nectina com a afadina (CAMPBELL; MAIERS; DEMALI, 2017; OKUMURA et al., 2018) (Fig. 1.4). Assim como as demais proteínas que participam da formação das JAs, as nectinas também são responsáveis pela manutenção da polaridade baso-lateral. Contudo, diferentemente das caderinas, as nectinas não conseguem formar junções com uma forte ligação entre elas. Na região C-terminal das nectinas, as afadinas se ligam através do domínio PDZ encontrado em ambas as proteínas e estas são responsáveis por ancorarem a actina e manterem a sua ligação com as nectina. Além disso, as afadinas também são responsáveis por intermediarem a ligação das nectinas com a  $\beta$ -catenina, através da  $\alpha$ -catenina. Esta ligação permite que a  $\alpha$ -catenina se ligue a proteínas da família ZO (do inglês, *zonula occludens*), importantes proteínas da JT, permitindo a interação entre ambos os complexos proteicos. (CAMPBELL; MAIERS; DEMALI, 2017).

### 1.3.1 Junções *Tight*

As junções *tight* (JTs) são formadas por um conjunto de proteínas transmembranares e citosólicas que estão localizadas na região ápico-basolateral das membranas celulares de vertebrados, interconectando as células epiteliais e endoteliais adjacentes, contudo, apesar de ser um tipo de junção específica de vertebrados, muitos de seus componentes são estruturas evolutivamente conservadas. Em invertebrados, as estruturas homólogas às JTs, se localizam abaixo das junções aderentes, diferentemente dos vertebrados. Dentre as funções das JTs, podemos citar a função de: I) barreira paracelular, responsável pela regulação do transporte de íons e pequenas moléculas não carregadas através do espaço intercelular, selecionando moléculas de  $\sim 4 - 8 \text{ \AA}$  e permite também a difusão

de grandes solutos e macromoléculas com tamanho limite de ~30 – 60 Å; II) a função de barreira na própria membrana plasmática (também conhecido como função de “cerca”), controlando a movimentação e troca de componentes da região apical e da região baso-lateral da membrana plasmática e, III) atividade de sinalização celular, uma vez que internalizadas, as proteínas na região citoplasmática podem desencadear respostas celulares, levando a célula a ativar vias de sinalização, através de seus domínios intracelulares. (GÜNZEL; YU, 2013; ZIHNI; BALDA; MATTER, 2014; ZIHNI et al., 2016; STAMATOVIC et al., 2017; ZEISEL; DHAWAN; BAUMERT, 2018). Dessa maneira, torna-se importante se manter a estabilidade destas proteínas para que as células mantenham a homeostase e o seu funcionamento normal.

Neste contexto, as JTs têm sido descritas como alvo de vírus e bactérias patogênicas, as quais degradam as proteínas das junções, na tentativa de atravessar e infectar as células, podendo facilitar o processo inflamatório e, conseqüentemente, levar ao surgimento de tipos de câncer que tem como um dos fatores de risco, a inflamação (ZIHNI et al., 2016; SINGH; UPPADA; DHAWAN, 2017b). As proteínas transmembranares encontradas nas JTs são: claudinas, ocludinas, tricelulinas e as moléculas de adesão juncional (JAM, do inglês *Junctional Adhesion Molecules*). Além das proteínas transmembranares, responsáveis pela interação entre as células adjacentes, as JTs ainda possuem proteínas citosólicas que formam a placa juncional eletrodensa, promovendo a interação entre a membrana juncional e o citoesqueleto de actina (ZIHNI et al., 2016). Dentre as proteínas que constituem a placa juncional eletrodensa das JTs no lado citoplasmático das células epiteliais, estão as proteínas da família ZO. A figura 1.4 ilustra a composição molecular dessas junções.

As proteínas da família ZO (ZO -1, -2, -3) são consideradas proteínas adaptadoras, que promovem suporte para as demais proteínas transmembranares presentes nas JTs das células epiteliais. Essa proteína também auxilia na formação do complexo juncional apical, uma vez que promove a ligação de proteínas presentes nas JAs com a JT. As proteínas ZO pertencem à família das proteínas guanilato quinase associadas à membrana (MAGUK, do inglês *Membrane Associated Guanylate Kinase*) e são fundamentais para a manutenção das demais proteínas na membrana plasmática, auxiliando no controle do fluxo paracelular, na passagem de moléculas das regiões apicais e baso-laterais da membrana e também

na transdução de sinais intracelulares, através da ativação de vias de sinalização, pela ativação de seus domínios PDZ. O domínio PDZ é formado por uma sequência de aproximadamente noventa aminoácidos, que juntos, formam uma estrutura tridimensional capaz de ativar outras proteínas através de sua ligação e consequente modificação conformacional, como também através de atividade quinase e GTPase (ROMERO; VON ZASTROW; FRIEDMAN, 2011; HERVÉ et al., 2014; SPADARO et al., 2014). Dessa maneira, essas proteínas desempenham uma importante função celular, sendo capazes de regular eventos fundamentais como a proliferação celular e apoptose (GONZALEZ-MARISCAL et al., 2012).

As JAM são proteínas da superfamília das imunoglobulinas com apenas uma passagem pela membrana plasmática. Estas proteínas possuem um domínio extracelular N-terminal como peptídeo sinal e uma curta cauda citoplasmática com a região C-terminal, onde se localiza o domínio PDZ, responsável pela sua ligação com proteínas acessórias, como as proteínas ZO-1 (MANDELL; PARKOS, 2005). Dentro da família de proteínas JAM, encontramos a JAM-A, -B, -C, JAM-4 E JAML. Estas proteínas, assim como as demais proteínas das JT, desempenham um papel fundamental durante a formação das junções, assim como também estudos recentes têm demonstrado que a formação de dímeros por JAMs podem aumentar a capacidade migratória e metástase em carcinoma de pulmão de células escamosas (GARRIDO-URBANI et al., 2018). Essas proteínas, além de possuírem atividades distintas, participando do processo de proliferação, diferenciação, morfogênese e ainda participar da ativação de vias de sinalização através da fosforilação do seu domínio PDZ intracelular, são capazes de se ligar não apenas à ZO-1, como também a mais oito tipos de proteínas acessórias citoplasmáticas (STEINBACHER; KUMMER; EBNET, 2018).

A proteína tricelulina faz parte da família das proteínas com domínio MARVEL e, diferentemente das ocludinas, as tricelulinas são majoritariamente encontradas em regiões onde há o contato entre três células adjacentes. Contudo, não se descarta a sua localização em regiões bicelulares das JTs (KRUG et al., 2009). Assim como as demais proteínas presentes nas JTs, as tricelulinas também desempenham um papel fundamental na manutenção da barreira epitelial, não apenas nas regiões de contato bicelulares, como também em regiões de contato entre três células, parecendo haver uma desorganização das JT, quando esta

proteína é suprimida dos contatos celulares (KRUG et al., 2009; MORAMPUDI et al., 2017).

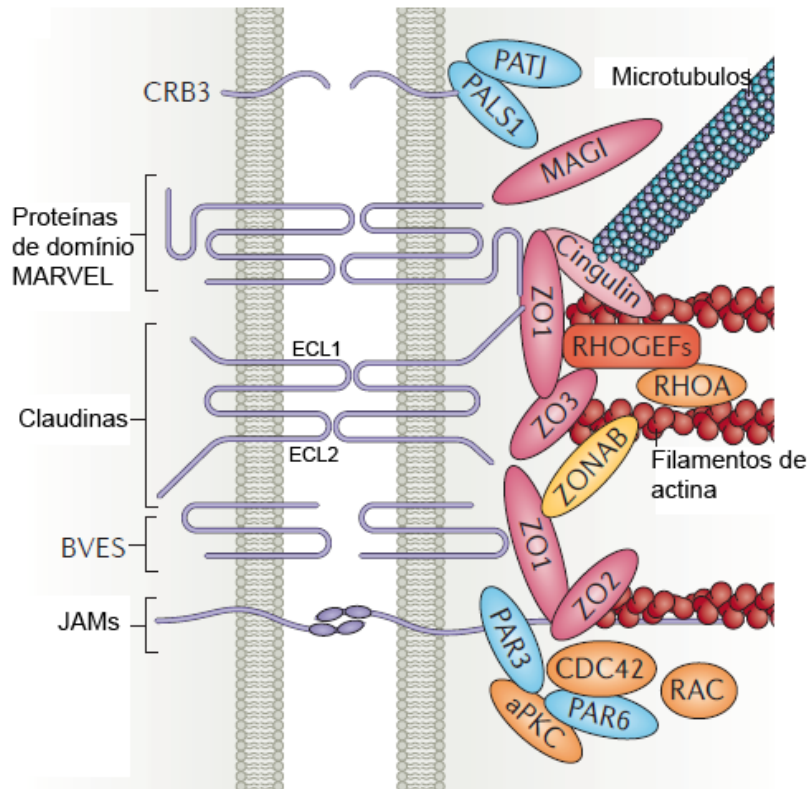
Outra importante proteína que participa da formação das JTs são as ocludinas. Estas foram as primeiras proteínas transmembranares descobertas como pertencentes a essas junções (FURUSE et al., 1993). Com aproximadamente 65kDa, essas proteínas possuem quatro passagens pela membrana celular, formando também duas alças extracelulares que permitem a sua ligação com as proteínas das células adjacentes. Na região intracelular, estas proteínas também interagem com as proteínas da família das ZO-1, através do domínio GUK (Do inglês, *guanylate kinase domain*), intermediando a ligação entre a ocludina e as claudinas (CUMMINS, 2012) e conseqüentemente, permitindo sua interação com as proteínas que compõem o citoesqueleto de actina e os microtúbulos.

Estudos recentes têm demonstrado a importância das proteínas ocludinas durante o processo de infecção viral, por exemplo, confirmando a importância dessas proteínas juncionais durante o processo de passagem de patógenos através da região paracelular (SHIMIZU et al., 2018). Além disso, as proteínas ocludinas têm sido demonstradas como importantes durante o processo de cicatrização de feridas (VOLKSDORF et al., 2017b), adesão celular, apoptose, diferenciação e homeostase de  $Ca^{2+}$  em queratinócitos humanos (RACHOW et al., 2013), além de permitirem a passagem de macromoléculas através da região paracelular das células, pela via do escoamento (AXIS et al., 2018).

As claudinas compreendem uma família de 27 proteínas, de aproximadamente 23kDa, que possuem quatro domínios transmembranares. Apesar da grande similaridade genética e estrutural, as claudinas se encontram distribuídas de maneira diferente nos diferentes tipos celulares (SINGH; SHARMA; DHAWAN, 2010; SINGH; UPPADA; DHAWAN, 2017a). Os quatro domínios transmembranares formam duas alças extracelulares (ECL1 e ECL2, do inglês *extracellular loop*) (Fig. 1.5), que são importantes por selecionarem íons através do fluxo paracelular, uma vez que essas alças possuem resíduos carregados. Ainda, os ECL estão relacionados com a ligação das claudinas das células adjacentes, pois a estrutura beta-pregueada dos loops medeiam a interação entre essas proteínas (ZIHNI et al., 2016; ZHAO et al., 2018).

Além dos ECL e das regiões citoplasmáticas, as claudinas possuem duas regiões terminais no citoplasma da célula. São elas: a porção amino e carboxi-

terminal, também conhecidas como N e C-terminal, respectivamente. A região C-terminal (mais longa) das claudinas possui um domínio chamado PDZ, que permite que as proteínas claudinas se liguem às demais proteínas juncionais encontradas no citoplasma das células, como as proteínas acessórias da família ZO (Do inglês, *zonula occludens*). Esta ligação ocorre entre a região C-terminal da claudina com a região N-terminal das proteínas ZO (NOMME et al., 2015) (Fig. 1.4).



**Figura 1.5. Imagem esquemática da composição molecular das Junções Tight.** As duas alças extracelulares da claudina (ECL1 e ECL2), interagem entre si, formando a ligação entre as proteínas claudinas de células adjacentes. Na região intracelular (à direita) a proteína ZO-1 liga-se à proteína claudina através de seu maior domínio (C-terminal), interagindo com proteínas que participam da formação do citoesqueleto de actina e microtúbulos. Fonte: Adaptado de ZIHNI et al., 2016

#### 1.4 Junção *tight* e Câncer

A manutenção da arquitetura epitelial em células intestinais se torna fundamental para o bom funcionamento do intestino, prevenindo que agentes patogênicos possam atravessar a barreira de células formada. Contudo, no câncer, muitas vias de sinalização encontram-se ativas ou inativas, auxiliando as células

tumorais em seus processos de sobrevivência, proliferação, evasão do sistema imune, bem como da apoptose (LANDY et al., 2016).

Dados do nosso grupo demonstraram que o fator de crescimento epidermal (EGF, do inglês *epidermal growth factor*) é capaz de promover o aumento da expressão de claudina-3 através da ativação das vias de sinalização ERK1/2 e PI3K/Akt e ainda que a superexpressão exógena da claudina-3 promove o aumento da malignidade de células de CCR, *in vitro*. Foi demonstrado ainda que o aumento ou a diminuição da expressão de claudina-3 são eventos essenciais para desencadear essa característica maligna das células, devendo haver a homeostase entre as proteínas da JT, para que as células desempenhem sua função de barreira, uma vez que foi observado a desregulação dessa função, quando houve a perturbação na expressão de claudina-3 (DE SOUZA et al., 2013). Além disso, a inibição de enzimas responsáveis pelo controle do transporte de íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> levou a alterações funcionais do CJA e conseqüente perda de adesão célula-célula, aumentando a viabilidade e a proliferação das células de CCR, mediadas pela ativação das vias ERK1/2 (DE SOUZA et al., 2014).

Outros estudos têm demonstrado a importância das JT durante a progressão do CCR, pela sua implicação na regulação de eventos fundamentais para o tecido tumoral. A célula depende de diferentes estímulos para ativar eventos que regulem seu crescimento, motilidade, diferenciação e morte. Em se tratando do câncer, uma vez alteradas as vias de sinalização envolvidas nestes eventos, cascatas de sinalização são ativadas ou inibidas, levando a célula ao aumento da motilidade e invasividade, contribuindo para a metástase (MARTIN, 2014). Dados da literatura demonstram que proteínas da família das claudinas encontram-se alteradas em diferentes tipos de câncer (SINGH; SHARMA; DHAWAN, 2010), inclusive dados do nosso grupo revelaram um aumento na expressão de claudinas em amostras de pacientes que passaram por colectomia no Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (DE OLIVEIRA et al., 2005). Contudo, em outros tipos de câncer, diferentes tipos de claudina podem ser encontradas aumentada ou diminuída (TABARIÈS; SIEGEL, 2017).

Dessa maneira, as claudinas podem ser consideradas importantes marcadores moleculares, pois sua expressão pode se encontrar alterada em diferentes tipos de câncer. A claudina-1 foi recentemente descrita durante o processo de detecção de câncer de cólo de útero, onde esta proteína encontra-se

aumentada (BENCZIK et al., 2016). Além disso, outro trabalho demonstrou a importância de proteínas de adesão juncional na detecção de células de câncer de próstata dormentes, comparadas com células de câncer metastáticas, uma vez que a claudina-7 e  $\alpha$ -catenina encontravam-se com baixa expressão, ou mesmo indetectáveis neste tipo de câncer (MORGAN et al., 2013). Uma recente revisão do nosso grupo evidenciou a importância das proteínas juncionais em eventos relacionados com o desenvolvimento do câncer colorretal (GEHREN et al., 2015). Assim, torna-se importante avaliar como alterações na expressão das proteínas das junções *tight* podem influenciar o desenvolvimento e progressão do câncer, particularmente do câncer colorretal.

### 1.5 Estadiamento e Tratamento do Câncer Colorretal

De acordo com o Comitê Conjunto Americano de Câncer (AJCC, do inglês, *American Joint Committee on Cancer*) e a União Internacional de Controle do Câncer (UICC, do inglês, *Union for International Cancer Control*), o câncer pode ser classificado em diferentes estadiamentos, de acordo com: a localização do tumor primário e o seu tamanho (T), o acometimento de linfonodos próximos ao local de surgimento (N) e, ainda, a ocorrência de metástases em órgãos distantes (M) (Quadro 1.1), configurando assim, o sistema TNM de estadiamento de tumores. Essa classificação se baseia, principalmente, em exames físicos, testes de imagem, laboratoriais e laudo de patologistas e cirurgiões. A classificação dos tumores auxilia na descrição do quão severo é o câncer, além de padronizar uma maneira universal como o câncer é diagnosticado e entendido em todo o mundo. Desta forma, auxilia também no prognóstico dos pacientes ao se desenhar estratégias de tratamento para cada indivíduo (AJCC, 2018; UICC, 2018). Considerando que neste trabalho será utilizada a classificação por estadiamento, torna-se importante frisar de que maneira se dá esta classificação (EDGE; COMPTON, 2010) (Quadro 1.2).

**Quadro 1.1. Quadro com a classificação TNM de estadiamento de tumores.**

<b>Categoria T - Tumor primário</b>	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidências de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1-T4	Tamanho ou extensão do tumor primário
<b>Categoria N - Acometimento de linfonodos</b>	
NX	Linfonodo não pode ser avaliado
N0	Sem acometimento de linfonodos
N1-N3	Com acometimento de linfonodos (Tamanho/extensão)
<b>Categoria M - Existência de metástase distante</b>	
M0	Sem metástase distante
M1	Com metástase distante

Fonte: Adaptado de AJCC, 2018; UICC, 2018.

**Quadro 1.2. Quadro com o grupamento por estádios do CCR.**

<b>Grupamento por Estádios</b>			
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1, T2	N0	M0
Estádio IIA	T3	N0	M0
Estádio IIB	T4	N0	M0
Estádio IIIA	T1, T2	N1	M0
Estádio IIIB	T3, T4	N1	M0
Estádio IIIC	Qualquer T	N2	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Adaptado de EDGE; COMPTON, 2010



De acordo com o Ministério da Saúde, são adotadas medidas de ressecção cirúrgica do cólon e do reto para pacientes acometidos com CCR para a remoção da lesão, bem como de possíveis linfonodos regionais, quando necessário. A cirurgia deve se propor a manter a margem distal livre de infiltração neoplásica, quando houver um limite mínimo de ressecção possível. Nos casos de acometimento do reto, há exceção para os casos em que a doença esteja no estágio I, pois pode ser orientada a ser feita apenas a excisão local e não total do mesorreto. Além da ressecção cirúrgica, outras terapias utilizadas são a quimioterapia e a radioterapia, como tratamentos que podem ser adjuvantes (após cirurgia) ou mesmo neoadjuvantes (antes da cirurgia), como terapia complementar. A radioterapia apenas é recomendada para pacientes com câncer de reto em estádios II e III, onde se aplica irradiação pélvica hipofracionada (45Gy a 55Gy) associada à quimioterapia ou irradiação hiperfracionada (25Gy em cinco frações).

O esquema terapêutico para o câncer de cólon e para o câncer de reto apresentam diferenças, uma vez que as estruturas são anatomicamente distintas e encontram-se em locais diferentes, não permitindo assim, que determinados procedimentos sejam realizados. Considerando o câncer de cólon, o tratamento por radioterapia apenas é recomendado em casos de estadiamento IV, com finalidade analgésica e hemostática. Nos demais estádios, apenas a ressecção cirúrgica é recomendada. Para o câncer de reto, a radioterapia é sugerida em todos os estádios de desenvolvimento do câncer, contudo, nos estádios II e III, é recomendado a quimiorradioterapia prévia, seguida de cirurgia, para melhores resultados (CONITEC, 2014).

A radioterapia tem sido demonstrada como sendo um importante tratamento durante o desenvolvimento do câncer, por induzir a morte das células que compõe o tumor (HÄFNER; DEBUS, 2016). Contudo, alguns estudos têm demonstrado que algumas células são resistentes à radioterapia, principalmente em se tratando do tumor possuir um microambiente heterogêneo, com diversos tipos celulares e com mutações específicas (BURRELL et al., 2013). Essa resistência à radioterapia e quimioterapia tem sido relacionada com a recorrência tumoral, uma vez que as células que sobrevivem, têm a capacidade de repopular a região afetada, ou até mesmo constituírem sítios metastáticos (MEACHAM; MORRISON, 2013). Dessa maneira, alguns estudos recentes têm proposto que a ressecção cirúrgica do tumor primário em pacientes em estágio IV de câncer colorretal apresentou melhor

sobrevida, quando comparados com pacientes que foram previamente submetidos à quimioterapia ou radioterapia (GULACK et al., 2016). Assim sendo, torna-se importante avaliar o real efeito da radiação em células tumorais para o estabelecimento de terapias específicas para os pacientes.

## 2 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que o CJA desempenha um importante papel durante a manutenção da polaridade ápico-basolateral das células epiteliais, auxiliando no transporte de íons e moléculas através da região paracelular e ainda pelo transporte de proteínas e lipídeos pela própria membrana plasmática, controlando a movimentação destas moléculas entre as regiões apical e basal da célula (GEHREN et al., 2015; YANO et al., 2017). Estudos prévios do nosso grupo relataram um aumento na expressão das proteínas claudina-1, -3 e -4 em pacientes com CCR tratados no Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, o qual estava relacionado à desregulação da função de barreira das junções *tight*. Além disso, temos demonstrado que a claudina-3 pode atuar na promoção tumoral quando sua expressão está desregulada e que as vias de ERK1/2 e PI3K-Akt induzem o aumento da expressão da claudina-3 em câncer colorretal, aumentando assim seu potencial tumorigênico.

Tem sido proposto que o fluxo paracelular de pequenas moléculas e íons é regulado pelas claudinas, através da via de poro e o fluxo de macromoléculas é regulado pela ocludina e tricelulina, através da via de escoamento (LINGARAJU et al., 2015). Porém, estudos mais recentes têm relatado uma intermodulação dessas duas vias. Foi verificado que a perda da fosforilação do resíduo S408 da ocludina permite uma maior interação desta proteína com a claudina-2, mediada pela ZO-1. Este evento foi acompanhado pelo aumento da resistência elétrica transepitelial (TER) e redução do fluxo de cátions (RALEIGH et al., 2011). Dessa forma, torna-se importante compreender melhor as interações entre as proteínas componentes do CJA e como alterações dessas interações podem contribuir com a progressão do CCR. Finalmente, um melhor entendimento da participação das proteínas de junções *tight* nesses processos pode contribuir para a caracterização de biomarcadores que auxiliem tanto na predição do desenvolvimento da doença, quanto na resposta ao tratamento, possibilitando ainda a postulação de novos alvos terapêuticos desta doença.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a expressão e a interação entre as proteínas das junções tight e sua importância durante a progressão do câncer colorretal.

##### **3.1.1 Objetivos específicos**

Avaliar os níveis proteicos das proteínas ocludina e claudina-3 em amostras de pacientes com câncer colorretal comparando com o tecido normal adjacente;

Analisar os níveis proteicos das proteínas anteriormente citadas em diferentes estadiamentos do câncer colorretal;

Determinar a interação entre as proteínas ocludina e claudina-3 em pacientes com câncer colorretal;

Avaliar as características clinicopatológicas dos pacientes durante o estudo;

Avaliar os níveis proteicos das proteínas ocludina e ZO-1 e sua distribuição subcelular em células de adenocarcinoma de cólon que superexpressam claudina-3;

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Anticorpos

#### a) Anticorpos primários

Classificação	Fonte de produção	Proteína-alvo	Empresa
Monoclonal	Camundongo	GAPDH	ThermoFisher (Waltham, MA, EUA)
		Ocludina	Zymed (San Francisco, CA, EUA)
Policlonal	Coelho	Ocludina	Fisher Scientific Co (Pittsburgh, PA, EUA)
		ZO-1	Invitrogen Co. (Carlsbad, CA, EUA)
		Claudina-3	

#### b) Anticorpos secundários

Animal-alvo	Conjugação	Empresa
Camundongo	Alexa 546	Molecular Probes (Eugene, OR, EUA)
Coelho	Alexa 488	
Camundongo	Peroxidase	GE Healthcare (Chalfont, St. Giles, UK)
Coelho		
Camundongo	Ouro coloidal (10nm)	Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, EUA)
Coelho	Ouro coloidal (5 nm)	

### 4.2 Reagentes e outros materiais

O soro fetal bovino (SFB) foi obtido a partir da Life Technologies (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A puromicina, utilizada para selecionar as células HT-29 transduzidas, foi obtida da Sigma-Aldrich (MO, EUA). Dentre os reagentes utilizados para a imunohistoquímica, o soro normal de cabra (NGS, do inglês *Normal Goat Serum*) e o borohidrato de sódio foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (MO, EUA). Os insertos Transwell foram obtidos da Corning Life Sciences (MA, EUA). O Dextran, utilizado para o ensaio de permeabilidade paracelular foi obtido da ThermoFisher (MA, EUA).

### 4.3 Coleta das amostras de pacientes

Amostras de pacientes submetidos à colectomia ou retossigmoidectomia no Hospital do Câncer I (HCI, INCA – Rio de Janeiro, Brasil) foram utilizadas para posteriores análises. Nosso estudo foi realizado sob aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do INCA (Protocolo 84/4, renovado em 02/06/2017). O estágio dos pacientes foi obtido através da classificação TNM de tumores obtidos através do Comitê Conjunto Americano sobre Câncer. A relação histopatológica dos pacientes foi obtida a partir de amostras: bem diferenciadas, moderadamente diferenciadas, pouco diferenciadas e indiferenciadas. A gradação histopatológica foi realizada por patologistas da Divisão de Patologia do INCA – DIPAT. As amostras utilizadas compreendiam o tecido tumoral e tecido da região normal adjacente, distando de 5 – 10 cm da lesão. A coleta das amostras foi realizada em colaboração com o Banco Nacional de Tumores (BNT), após assinatura dos Termos de Esclarecimento Livre e Esclarecidos (TCLE) pelos pacientes antes da cirurgia. O armazenamento das amostras fora realizado em *freezer* -80°C para posteriores análises dos níveis proteicos.

### 4.4 Cultura de células

Linhagens celulares de célula de adenocarcinoma de cólon humano HT-29 (HTB-38 TM) foram obtidas a partir da *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, VA, EUA). Estas células são moderadamente diferenciadas, com mutações em *BRAF*, *PIK3CA*, *TP53*, *SMAD4* E *APC* (CHOI et al., 2008; HAO et al., 2016; NAKAMURA et al., 2017; AGARWAL et al., 2018). Essas células foram transduzidas com os vetores retrovirais pBABE (vetor vazio) (HT<sup>pBABE</sup>) e pBABE-Cldn-3 (contendo cDNA para claudina-3) (HT<sup>Cldn-3</sup>) (DE SOUZA et al., 2013), sendo selecionadas pelo antibiótico puromicina (7,5 µg/mL para HT<sup>Cldn-3</sup> e 5 µg/mL para HT<sup>pBABE</sup>), Sigma-Aldrich (MO, EUA), até o momento do experimento. As células

foram cultivadas em meio DMEM (do inglês, *Dulbeco's Modified Eagle Medium*), GIBCO - Life Technologies - Invitrogen (CA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina G (100mg/L) e estreptomicina (60mg/L), obtidos da Invitrogen Co (CA, EUA). As células foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%. Em todos os experimentos, as células foram mantidas sob semi-confluência (70%) em garrafas de 25cm<sup>3</sup>, lavadas com PBS e desprendidas da garrafa com 0,25% tripsina diluída em PBS. Posteriormente, as células foram transferidas para placas de 12 e 24 poços. Para avaliação da permeabilidade paracelular de macromoléculas, as células foram transferidas para insertos *Transwell* da empresa Corning Inc. (NY, EUA) contendo poros de 0,4 µm e área de 0,33 cm<sup>2</sup>.

#### 4.5 Extração proteica total e *Western Blot*

O lisado proteico foi obtido através de amostras de tecido humano ou de células HT-29. As amostras de tecido foram homogeneizadas em um homogeneizador do tipo Potter, com tampão RIPA (1% de NP-40, 0,5% de deoxicolato de sódio, 0,2% de SDS, 150 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl pH 7.4) contendo 20 mM de NaF e o inibidor de fosfatase, ortovanadato de sódio (1mM), Sigma Aldrich (MO, EUA) e um coquetel de inibidores de protease (1:100) durante 30 min a 4°C. Em seguida o lisado foi homogeneizado por 30 min a 4°C e então centrifugado a 10.000 g por 10 min a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C para análises futuras. A concentração proteica total foi estabelecida a partir da dosagem de proteínas, utilizando o kit comercial de BCA da BioAgency (SP, Brasil), segundo instruções do fabricante e em seguida realizada leitura por espectrofotometria à 562nm. Após dosagem das proteínas totais, as amostras foram separadas e aplicadas a uma quantidade de 30 µg por poço para separação de proteínas pela metodologia de SDS-PAGE (Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sódio dodecil sulfato) usando géis de 6,5% e 13%. Posteriormente as proteínas presentes nos géis foram transferidas para membrana de nitrocelulose, usando o equipamento *trans-blot semidry transfer cell*, BioRad Laboratories (CA, EUA), logo as membranas foram bloqueadas em 5% de leite desnatado (Molico) diluído em tampão TBS-T (*Tris Buffered Saline*, acrescido de

*Tween* 20 a 0,1%) por 1h para evitar marcações inespecíficas e incubados com os anticorpos primários anti-claudina-3 (1:3000), anti-occludina (1:1000) e anti-ZO-1 (1:1000) durante a noite ou GAPDH (1:50.000) por 1h. Após a lavagem das membranas, as mesmas foram incubadas com anticorpos secundários anti-coelho ou anti-camundongo conjugados à peroxidase na diluição de 1:50.000, diluídos em TBS-T 0,1% para posterior detecção da imunomarcação através da reação de quimiluminescência utilizando um kit ECL obtido da BioRad (Hercules, CA, USA). As bandas foram detectadas utilizando o aparelho Chemidoc e posteriormente quantificadas utilizando o software *LabWorks* 4.6, ambos da empresa BioRad (CA, EUA).

#### 4.6 Co-Imunoprecipitação

Para a imunoprecipitação, o lisado proteico foi diluído para obter 700µg de proteína. O extrato foi incubado com 50 µL de *beads* (proteína *G-sepharose*), da Sigma Aldrich (MO, EUA) por 30 min em gelo e então centrifugado a 10.000 g por 10 min a 4°C para a sedimentação das proteínas presentes no extrato. Logo, as *beads* foram incubadas com anticorpo primário anti-occludina e anti-claudina-3 (5 µg) por 16 h em agitador. Após incubação, 50µL de *beads* foram adicionados ao extrato, incubado por 2h a 4°C em agitador e posteriormente centrifugado à mesma velocidade anterior por 30 segundos. Para a liberação dos complexos proteicos imunoprecipitados, as amostras foram lavadas três vezes em PBS e aquecidas a 100°C por 5 min em tampão Laemmli e novamente centrifugadas antes da sua separação eletroforética por SDS-PAGE, para posterior transferência em membranas de nitrocelulose e *Western blot*.



#### 4.7 Imunofluorescência

Células HT-29 HT<sup>pBABE</sup> e HT<sup>cid-3</sup> foram crescidas sobre lamínulas, até atingirem semi-confluência. Em seguida, as células foram fixadas em metanol (100%) -20°C, por 20 min e em seguida lavados em PBS/CM (PBS com 100 mM de CaCl<sub>2</sub> e 100 mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 8,0). Posteriormente, as células foram bloqueadas com 0,2% BSA e permeabilizadas com 0,1% Triton X-100 por 1h. Após várias lavagens, as lamínulas foram incubadas com os anticorpos anti-claudina-3 (1:20), anti-occludina (10µg/mL) e anti-ZO-1 (5µg/mL) diluídos em solução de bloqueio, durante a noite. Após sucessivas lavagens, as células foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários: anti-coelho ou anti-camundongo, conjugados a Alexa 488 ou 546 a uma diluição de 1:250 por 1h. Finalmente, as lâminas foram montadas utilizando 5 µl do reagente *Antifade Gold proLong (Invitrogen)* e analisadas utilizando um microscópio confocal a laser *Fluoview Overview Olympus* (PA, EUA) equipado com um programa de processamento de imagens FV10i. Para tratamento das imagens, utilizamos o software *ICY bioimage analysis software* (Institut Pasteur, Paris, FR).

#### 4.8 Imunohistoquímica e análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Amostras de tecido dos pacientes foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 0,5 cm e imediatamente fixadas em tampão de fixação (glutaraldeído 0,2%, paraformaldeído 4%, hepes 50 mM, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM e MgCl<sub>2</sub> 2 mM) por 2 h à temperatura ambiente, com armazenamento posterior a 4°C por 24 h. Após a fixação, as amostras foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (hepes 50 mM, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM e MgCl<sub>2</sub> 2 mM). Após a lavagem, foi realizada a crioproteção das amostras em banhos graduais com 10%, 20% e 30% de glicerol diluído em tampão de lavagem (por 24 h cada à 4°C). Posteriormente, o congelamento ultra-rápido das amostras foi realizado com submersão das mesmas em Freon 22 líquido, sendo armazenadas em nitrogênio líquido. Em seguida, foi realizada a criossubstituição com 1,5% de acetato de uranila obtido da empresa Ted Pella (CA, EUA) em metanol por 24h a -90°C, utilizando o

aparelho da Leica AFS *machine* (Wetzlar, Alemanha). Posteriormente, as amostras foram lavadas com metanol 100% a -45°C e gradativamente aquecidas e embebidas em resina LR White, da empresa Ted Pella (CA, EUA) à temperatura ambiente e polimerizadas a 60°C. Os blocos de resina foram seccionados em ultramicrotomo Leica (Wetzlar, Alemanha) com faca de diamante em cortes de aproximadamente 70 nm de espessura.

Os cortes foram coletados em grades de níquel de 400-mesh, obtidas da EMS (PA, EUA). Em seguida, as grades foram mergulhadas em solução de lavagem (glicina 50 mM, borohidrato de sódio 0,1% e TBS 100mM) por 5 min, à temperatura ambiente. Posteriormente, as grades com os espécimes foram bloqueadas com 10% de soro de cabra (NGS, do inglês, *normal goat serum*), Sigma-Aldrich (MO, EUA), por 1h e em seguida incubados com os respectivos anticorpos primários anti-occludina (1:100), anti-claudina-3 (1:25) por 16h à 4°C. Em seguida, as grades com os espécimes foram lavados 3 vezes NGS diluído em TBS e incubados com os anticorpos secundários anti-camundongo (1:50) e anti-coelho (1:100) conjugados à ouro coloidal de 10nm e 5nm de diâmetro, respectivamente, por 1h à temperatura ambiente. Posteriormente, as grades foram lavadas por 3 vezes em TBS e finalmente mais 3 vezes com água destilada. A contrastação das amostras foi realizada com solução aquosa de acetato de uranila 1% por 15 min e observadas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1010 (MA, EUA), operado a 80kV.

#### 4.9 Ensaio de permeabilidade paracelular com Dextran Red

Com a finalidade de analisar a permeabilidade paracelular de macromoléculas, as células HT<sup>pBABE</sup> e HT<sup>Cld-3</sup> foram crescidas até atingir confluência em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB usando membranas *Transwell*. Posteriormente, as células foram lavadas com tampão HBSS (do inglês, Hank's Buffer Salt Solution) contendo glicose. Em seguida, a este mesmo tampão foi adicionado o polissacarídeo inerte Dextran (com peso molecular de 10 KDa), conjugado ao fluoróforo Texas-Red, à uma concentração de 500 µg/mL. A solução contendo Dextran Texas-Red foi colocada no *Transwell*, sobre a monocamada celular, incubando-se por 3 h em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%. Posteriormente, uma amostra de 100 µL foi coletada do poço (região externa ao *Transwell*), transferida para uma

placa de 96 poços, sendo realizada a quantificação por fluorimetria em um aparelho SpectraMax Gemini XS, da empresa Molecular Devices (CA, EUA). Para calibração do aparelho, foi utilizado o tampão HBSS contendo glicose.

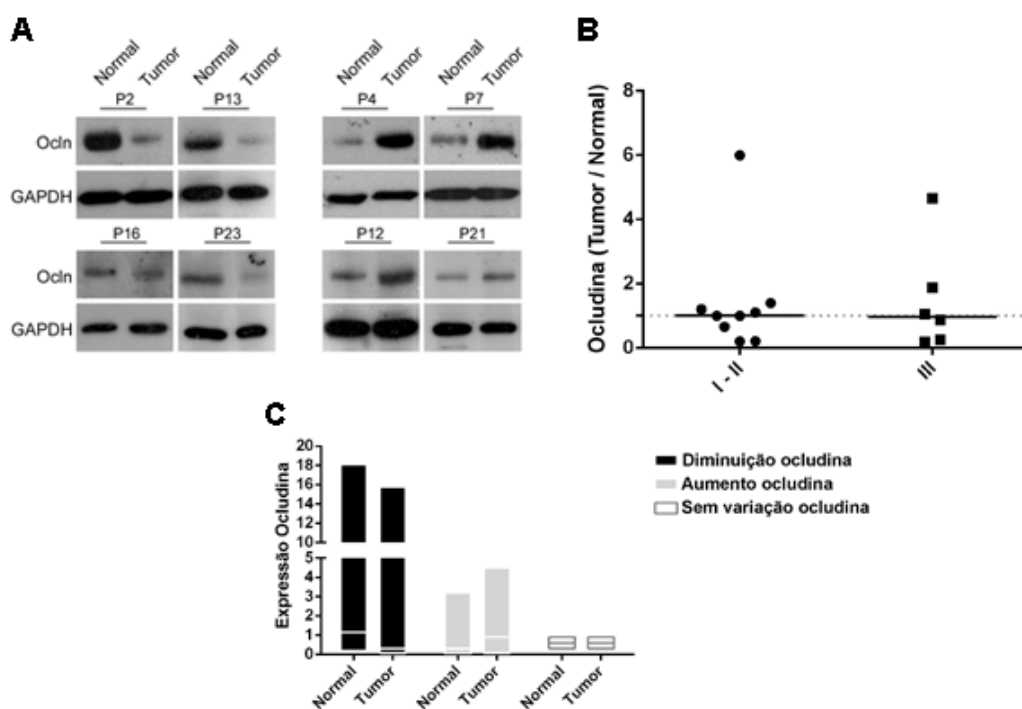
#### 4.10 Análises estatísticas

A análise estatística do estudo foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5.0, da empresa GraphPad Software (CA, EUA). Foram considerados estatisticamente significativos os resultados com  $p < 0,05$  pelo teste t de *Student*, *one-way* ANOVA, Fisher's e Log-rank. Foram utilizados pós-teste de Bonferroni.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise da expressão e interação entre proteínas das junções *tight* em amostras de pacientes com câncer colorretal

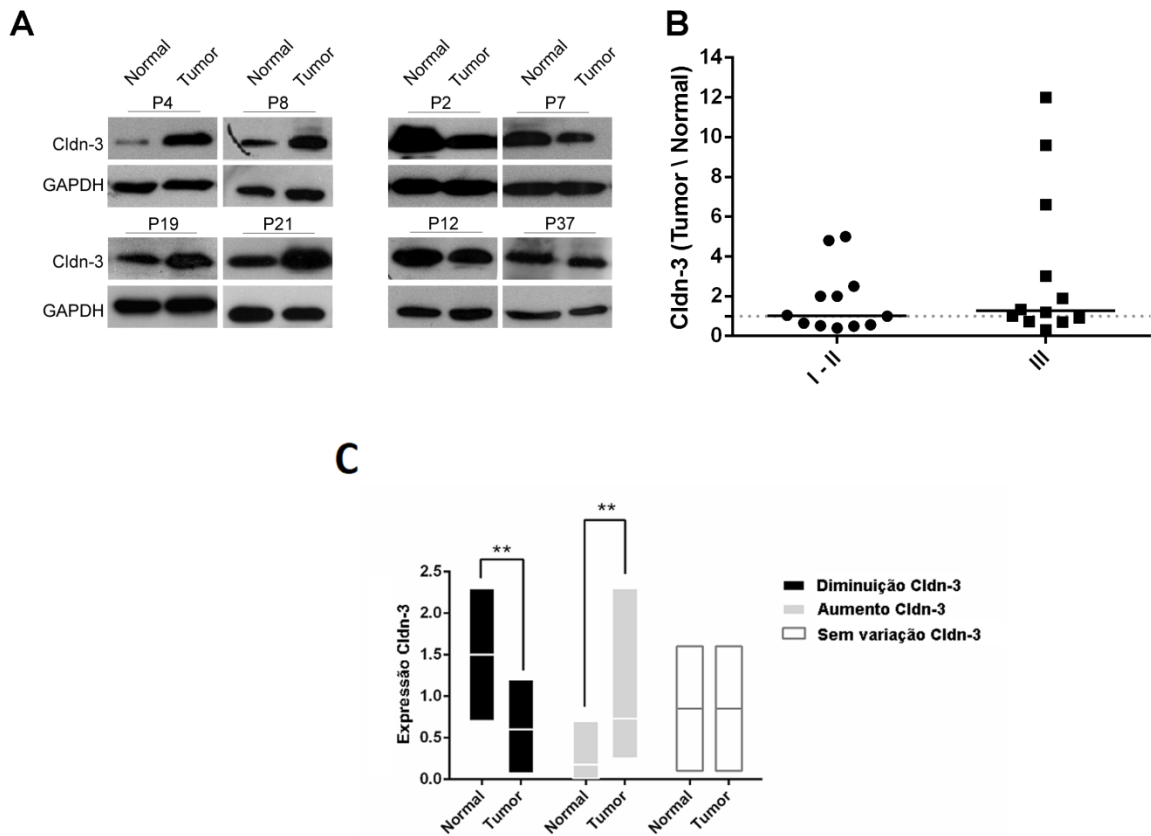
A proteína ocludina, assim como a proteína claudina-3, também representa um importante marcador para diferentes tipos de doenças, incluindo o câncer. Por exemplo, alguns estudos têm relatado que alterações na expressão da ocludina pode estar relacionado com processos inflamatórios, carcinoma hepatocelular e colite ulcerativa em pacientes (YAMAMOTO-FURUSHO; MENDIVIL-RANGEL; FONSECA-CAMARILLO, 2012; BOUCHAGIER et al., 2014; LEE; LEE, 2014). Considerada uma proteína de extrema importância para a manutenção da polaridade apico-basolateral, por interagir com a Cldn-3, e sua relevante função no controle do fluxo paracelular de macromoléculas, decidimos avaliar os níveis de expressão da ocludina (reguladora da via de escoamento), utilizando amostras de pacientes em diferentes estádios do câncer. Análise por imunoblotting, mostrado nas figuras 5.1A e 5.1B, indicam alterações na expressão proteica desta proteína, no entanto, não identificamos variação significativa ao compararmos os níveis proteicos totais da ocludina no tecido tumoral, comparado com o tecido normal adjacente, nem ao comparar os níveis proteicos nos diferentes estádios de desenvolvimento do tumor. Uma vez observado que alguns pacientes apresentavam aumento e outros diminuição da ocludina, decidimos segregar estes pacientes dentro do grupo em que a ocludina encontrava-se aumentada e um grupo onde a ocludina encontrava-se diminuída. Como observado na figura 5.1C, novamente não encontramos variações significativas ainda dentro dos mesmos grupos de pacientes analisados, aqueles que possuíam a ocludina aumentada e aqueles que apresentavam a ocludina diminuída. É importante mencionar que apesar dos dados não terem sido significativos, 62% dos pacientes utilizados no estudo apresentavam diminuição do nível proteico de ocludina, quando comparados aos que apresentavam aumento (30%) da proteína.



**Figura 5.1 Análise dos níveis proteicos de ocludina por *imunoblotting* em amostras de pacientes com câncer de cólon.** Lisado proteico total foi obtido através de amostras de pacientes com câncer de cólon submetidos à cirurgia. **(A)** Imagem representativa de imunoblotting para ocludina. O GAPDH foi utilizado como proteína constitutiva, sendo o controle de carregamento da quantidade de proteína em cada condição analisada. **(B)** Representação gráfica da razão da expressão de ocludina em tecidos tumorais comparados ao tecido normal adjacente correlacionado com o estágio de progressão do câncer de cólon: estágio inicial, estádios TNM I-II; e estágio tardio, estágio TNM III. Amostras utilizadas: estádios I-II (n=9), estágio III (n=6). **(C)** Segregação de grupos de pacientes de acordo com as alterações nos níveis de expressão de ocludina nos tumores comparados com tecido normal adjacente. Ocln: ocludina. Amostras utilizadas: diminuição ocludina (n=8), aumento ocludina (n=4), sem variação ocludina (n=1). Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Bonferroni, os dados não apresentaram diferença estatística.

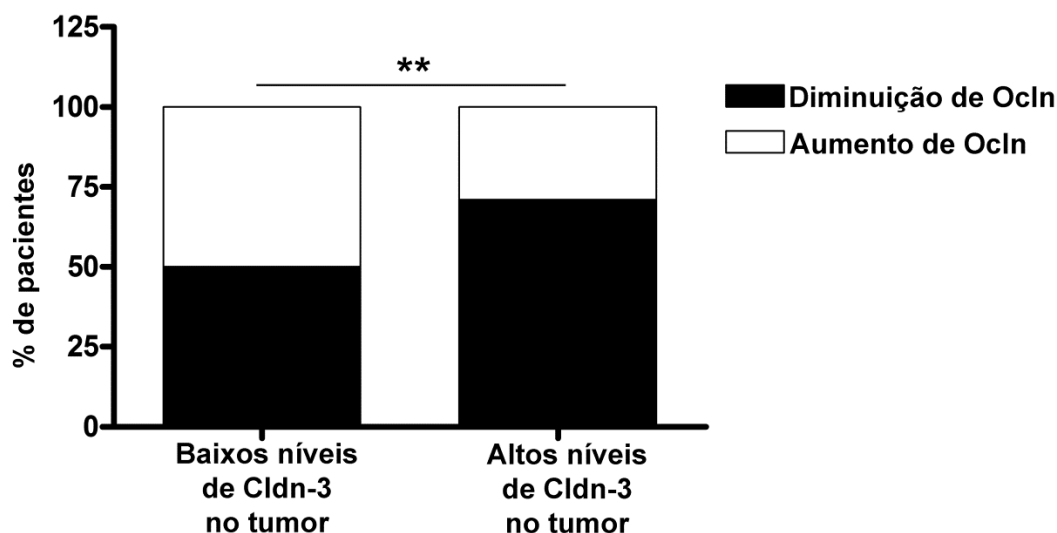
Estudos recentes têm demonstrado que o aumento ou diminuição do nível proteico da Claudina-3 (Cldn-3), em diferentes tipos tumorais, têm levado ao desenvolvimento da transição epitélio-mesenquimal (TEM) ou mesmo a um pior prognóstico, em pacientes com adenocarcinoma de pulmão e cólon, este último tendo sido demonstrado pelo nosso grupo (DE SOUZA et al., 2013; CHE et al., 2015; ZHANG et al., 2017). Assim, fomos avaliar também o padrão de expressão dos níveis da claudina-3 (reguladora da via do poro), durante os diferentes estádios do câncer colorretal, utilizando amostras de pacientes submetidos à colectomia no INCA. Análises por *imunoblotting* mostradas nas figuras 5.2A e 5.2B, mostram que

apesar de serem notadas alterações na expressão em diferentes pacientes, não houve variação significativa quando comparado os níveis proteicos totais da claudina-3 no tumor em relação ao tecido normal adjacente, nem quando analisados nos estágios iniciais (estádios I e II) como no estágio tardio da doença (estádio III). Como foi observado, na análise por *imunoblotting*, que nas amostras analisadas havia pacientes que aumentavam e outros que diminuían os níveis de expressão da claudina-3 na amostra tumoral, resolvemos separar esses pacientes e avaliar se dentro de cada um desses grupos havia alguma diferença de expressão entre as amostras normais e tumorais. Como notado na figura 5.2C, os grupos de amostras que aumentavam ou que diminuían o nível de claudina-3 no tumor apresentaram alterações significativas, indicando que há a possibilidade de segregação dos pacientes nesses grupos. Estes dados sugerem que os níveis proteicos da claudina-3 podem variar muito durante a progressão da doença. Contudo, indicam que podemos realizar uma análise global, independente do estágio da doença, tomando como base a expressão aumentada ou diminuída de claudina-3 nos tumores.



**Figura 5.2 Análise dos níveis proteicos de claudina-3 por imunoblotting em amostras de pacientes com câncer de cólon.** Lisado proteico total foi obtido através de amostras de pacientes com câncer de cólon submetidos à cirurgia. **(A)** Imagem representativa de imunoblotting para claudina-3. O GAPDH foi utilizado como proteína constitutiva, sendo o controle de carregamento da quantidade de proteína em cada condição analisada. **(B)** Representação gráfica da razão da expressão de claudina-3 em tecidos tumorais comparados ao tecido normal adjacente correlacionado com o estágio de progressão do câncer de cólon: estágio inicial, estádios TNM I-II; e estágio tardio, estágio TNM III. Amostras utilizadas: estádios I-II (n=12), estágio III (n=12). **(C)** Segregação de grupos de pacientes de acordo com as alterações nos níveis de expressão de claudina-3 nos tumores comparados com tecido normal adjacente. Cldn-3: claudina-3. Amostras utilizadas: diminuição Cldn-3 (n=9), aumento Cldn-3 (n=12), sem variação Cldn-3 (n=2). (\*\*p<0,01). Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

Tendo como base os grupos que apresentavam aumento e diminuição dos níveis de claudina-3 no tumor, mostrados no resultado anterior, resolvemos associar os níveis da proteína ocludina dentro dos mesmos. Como mostrado na figura 5.3, aproximadamente 75% dos pacientes que apresentavam níveis de claudina-3 aumentados, apresentavam os níveis de ocludina diminuída no tumor. Esses dados apontam que pacientes que apresentam níveis elevados de claudina-3 no tumor podem apresentar uma diminuição dos níveis da proteína ocludina localizados nesta mesma região das junções *tight*, o que poderia acarretar na desregulação dessas junções.



**Figura 5.3 Associação da expressão dos níveis proteicos de claudina-3 e ocludina.** Lisado proteico total foi obtido através de amostras de pacientes com câncer colorretal. As amostras que apresentam alta e baixa expressão de claudina-3 em tumores foram separadas em dois grupos e associadas com a alta e baixa expressão de ocludina. Amostras usadas: baixos níveis de claudina-3 (n=8), altos níveis de claudina-3 (n=12) (\*\*p<0,01, Teste de Fisher).

## 5.2 Análise clinicopatológica de pacientes com baixos e altos níveis proteicos de claudina-3 no tumor

Com o intuito de analisar as características clinicopatológicas dos pacientes durante o presente estudo, estes foram separados de acordo com: gênero, idade, localização do tumor, histologia e a classificação TNM de estadiamento de tumores colorretais. Apesar de não terem sido observadas alterações significativas nos dados analisados, algumas informações nos chamaram a atenção, como por exemplo, a localização do tumor nos pacientes, estando em sua maioria no cólon ascendente, bem como a histologia do tumor, onde a maior parte foi considerada como moderadamente diferenciado, de acordo com a análise de médicos patologistas do INCA. Outro aspecto importante durante a análise dos resultados é a presença, em sua maioria, de pacientes nos estádios II e III, quando comparados com os demais estádios de desenvolvimento do tumor (Quadro 5.1).

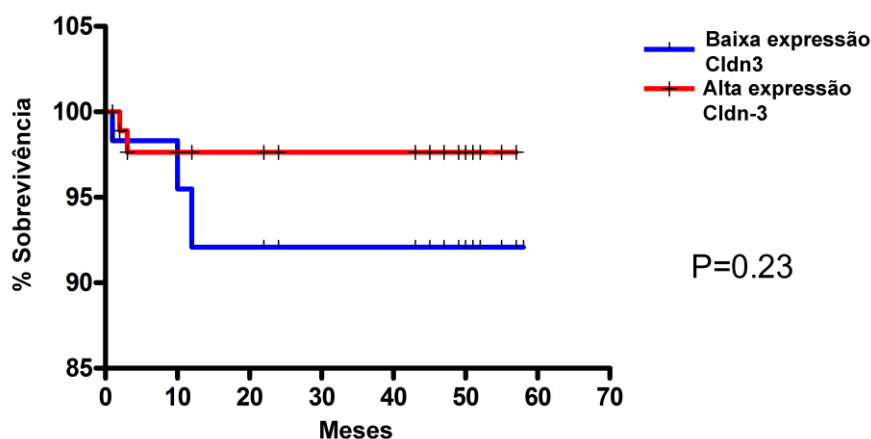


**Quadro 5.1. Quadro com análise clinicopatológica de pacientes com baixa e alta expressão de claudina-3.**

<b>Características clinicopatológicas</b>	<b>↓Cldn-3</b>	<b>↑Cldn-3</b>	<b>P-valor</b>
<b>Gênero</b>			
Homem	5	4	0.3085
Mulher	4	8	
<b>Idade</b>			
≤ 60 anos	3	6	0.445
> 60 anos	6	6	
<b>Localização do tumor</b>			
Cólon ascendente	4	5	0.9041
Cólon transverso	1	2	
Cólon descendente	2	1	
Sigmóide	1	2	
Reto sigmóide	1	2	
<b>Histologia</b>			
Bem diferenciado	1	1	0.674
Moderadamente diferenciado	6	9	
Pobrememente diferenciado	1	0	
Mucinoso	1	2	
<b>Classificação TNM</b>			
0	1	0	0.5287
I	1	1	
II	4	4	
III	3	7	
IV	0	0	

Pacientes foram segregados de acordo com: gênero, idade, localização do tumor, histologia e classificação TNM de estadiamento de tumores. Amostras usadas: baixos níveis de claudina-3 (n=9), altos níveis de claudina-3 (n=12). Análise estatística: Teste de Fisher.

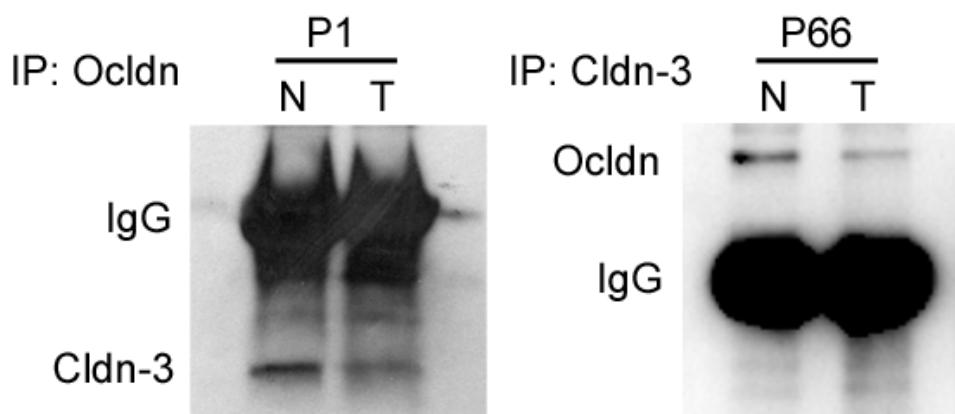
Com o intuito de avaliar o desfecho clínico, foi realizada uma análise da sobrevida global dos pacientes que participaram do estudo. Apesar do tamanho limitado da amostra, que impacta no quão significativos são os dados analisados, podemos observar uma tendência de uma menor sobrevida global em pacientes que apresentam níveis diminuídos de claudina-3 no tumor (Fig. 5.4).



**Figura 5.4 Curva de sobrevida dos pacientes de acordo com a baixa ou alta expressão de claudina-3.** Análise da curva de sobrevida dos pacientes que foram submetidos à colectomia no Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, através da curva de Kaplan-Meier. Amostras usadas: baixa expressão de Cldn-3 (n=9), alta expressão de Cldn-3 (n=12). Análise estatística: Teste de Log-rank.

### 5.3 As proteínas ocludina e claudina-3 apresentam menor interação em tumores

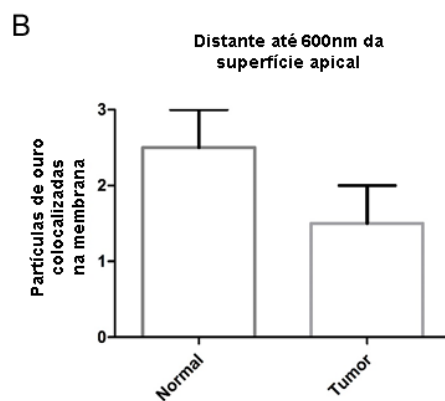
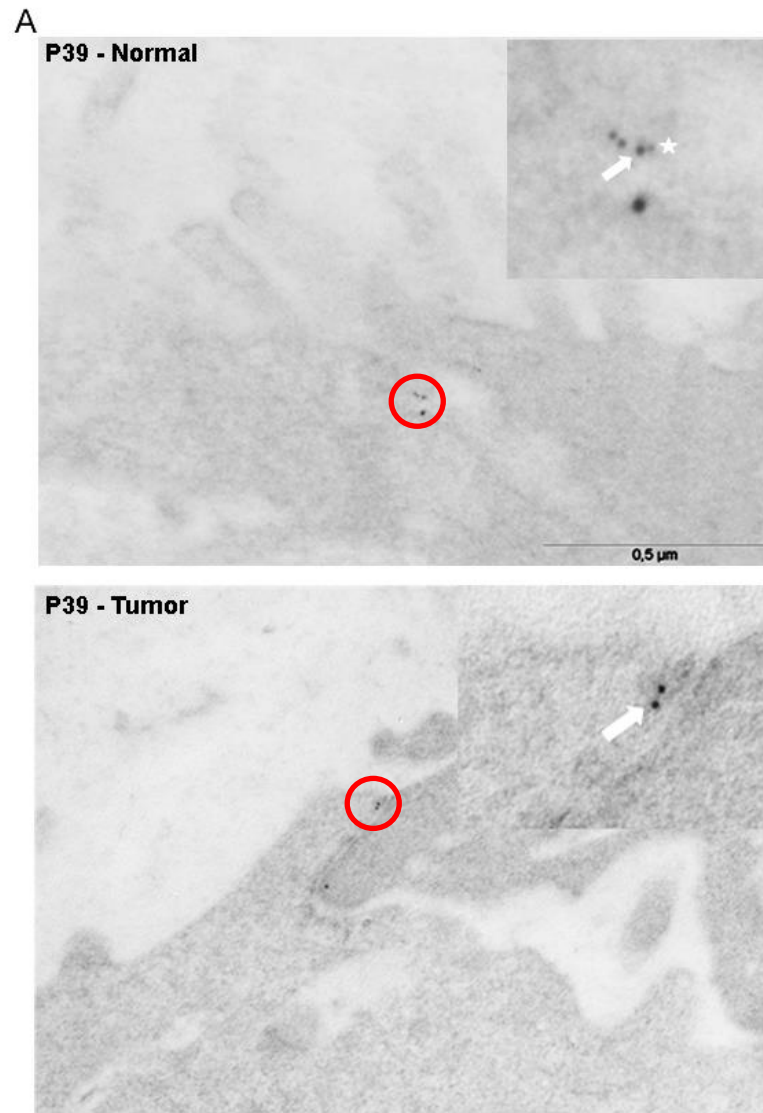
Como citado anteriormente, as proteínas que compõem as JTs, claudina-3 e ocludina, interagem entre si, sendo este evento de extrema importância para a manutenção das funções fisiológicas e estruturais das células epiteliais (VOLKSDORF et al., 2017a). Dessa maneira, nos propusemos a avaliar a interação entre estas duas proteínas nos pacientes utilizados neste estudo, através da técnica de co-immunoprecipitação, seguida por imunoblotting. Para esta análise, avaliamos amostras de um paciente que apresentava níveis proteicos elevados (P1) e outro com diminuição (P66) de claudina-3 no tumor. Como mostrado na figura 5.5, amostras de ambos pacientes apresentaram diminuição dos níveis de interação entre claudina-3 e ocludina no tumor.



**Figura 5.5 Co-imunoprecipitação entre as proteínas ocludina e claudina-3.** Lisado proteico total com aumento (P1) e diminuição (P66) dos níveis de expressão para claudina-3 foi utilizado para avaliar a interação entre as proteínas da junção *tight*. P1: paciente com nível elevado de claudina-3; P66: paciente com diminuição na expressão de claudina-3. Ocldn: ocludina; Cldn-3: claudina-3

Dados da literatura demonstraram a técnica de microscopia eletrônica como uma importante ferramenta para se quantificar a associação entre proteínas (SATO; AOYAMA; KITAJIMA, 2000). Dessa maneira, com o intuito de quantificar a interação das proteínas claudina-3 e ocludina em cortes histológicos provenientes de amostras de pacientes submetidos à cirurgia no INCA, utilizamos a técnica de imunohistoquímica, com a utilização de anticorpos secundários conjugados a ouro coloidal de diferentes tamanhos para a identificação das respectivas proteínas. As análises foram realizadas na região da superfície apical, 600nm, onde a junção tight pode exercer seu papel na regulação do fluxo paracelular.

Como demonstrado nas micrografias analisadas, o tecido normal adjacente apresenta as microvilosidades bem preservadas. Já no tecido tumoral as microvilosidades são ausentes ou aberrantes, como mostrado na figura 5.6A. Além disso, observamos uma tendência de maior interação entre a claudina-3 e ocludina no tecido normal adjacente quando comparado ao tecido tumoral (Fig. 5.6B). Em conjunto, esses dados sugerem que em tumores há uma menor interação entre as proteínas claudina-3 e ocludina.

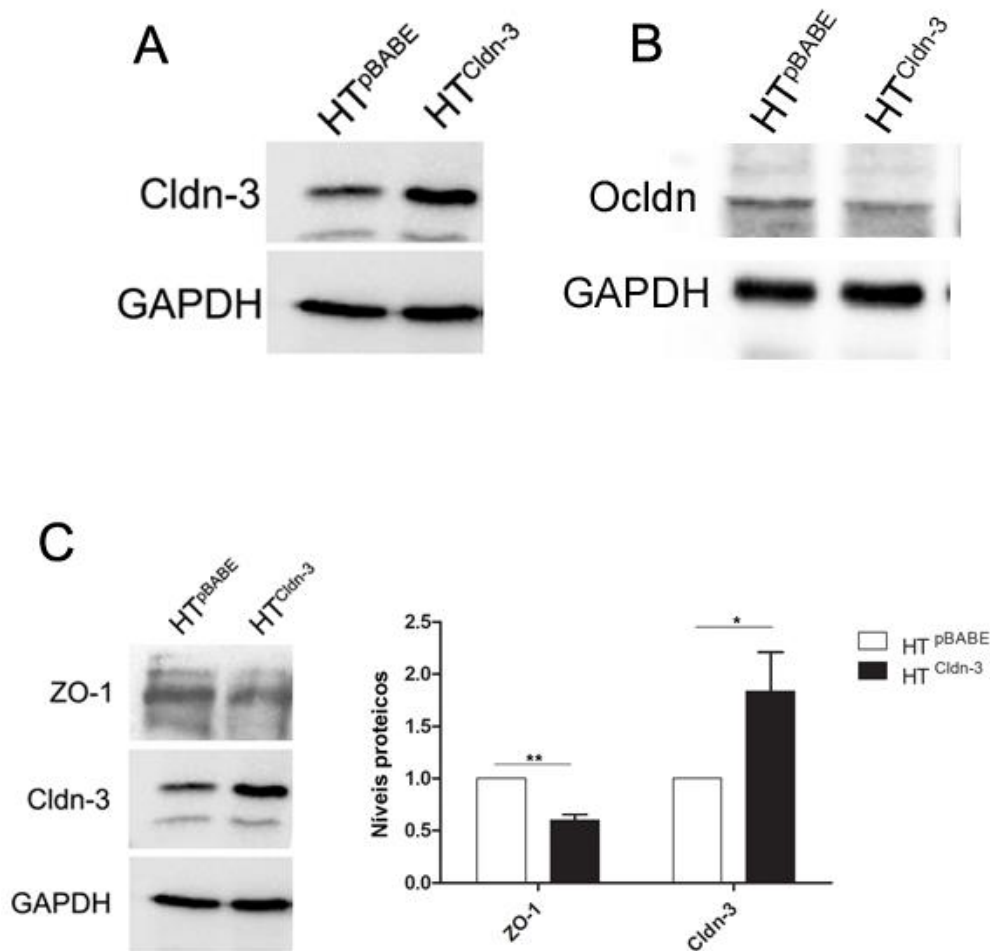


**Figura 5.6 Microscopia eletrônica de transmissão do epitélio do cólon. (A)** Amostras de tecido normal adjacente e tecido tumoral provenientes de amostras de pacientes submetidos à colectomia no INCA. Micrografia representativa da amostra utilizada. **(B)** Gráfico com a quantificação da contagem de partículas de ouro associadas às proteínas. Seta: Ocludina (10 nm), asterisco: claudina-3 (5 nm). Barra: 0,5μm.

#### 5.4 Análise *in vitro* revela que a superexpressão de claudina-3 pode induzir uma regulação negativa dos níveis proteicos de ocludina e ZO-1

Como observado em nossos resultados prévios, em tumores de pacientes que apresentavam altos níveis proteicos de claudina-3 verificamos um número maior de amostras que apresentavam também uma redução dos níveis da ocludina (Fig. 5.3). Tendo em vista estes dados, avaliamos o nível proteico de ocludina por *immunoblotting* em um modelo *in vitro* de células de adenocarcinoma de cólon humano, HT-29, que superexpressam claudina-3 (HT<sup>Cldn-3</sup>). Como esperado, células HT<sup>Cldn-3</sup> apresentaram um maior nível de claudina-3 que células HT-29 transduzidas com vetor vazio (HT<sup>pBABE</sup>) (Fig. 5.7A). Além disso, como mostrado na figura 5.7B, a expressão forçada da claudina-3 (HT<sup>Cldn-3</sup>) induziu uma redução nos níveis proteicos da ocludina quando comparados com células HT<sup>pBABE</sup>.

Assim como a ocludina, a proteína adaptadora ZO-1 também desempenha um importante papel durante a regulação da manutenção da polaridade apico-basolateral e conseqüentemente, da fisiologia das células epiteliais, auxiliando na estabilização das JTs por promover a ligação entre as proteínas perijuncionais com as proteínas do citoesqueleto das células (VAN ITALLIE et al., 2009; BÄSLER; BRANDNER, 2017). Desta forma, avaliamos também os níveis da proteína ZO-1 em células HT-29 que superexpressam Cldn-3. Como mostrado na figura 5.7C, células HT<sup>Cldn-3</sup> apresentaram menores níveis proteicos de ZO-1 do que células HT<sup>pBABE</sup>. Juntos, esses dados sugerem que um aumento exacerbado nos níveis proteicos da claudina-3 pode levar a uma regulação negativa de outras proteínas das junções *tight*, como mostrado para ocludina e ZO-1.

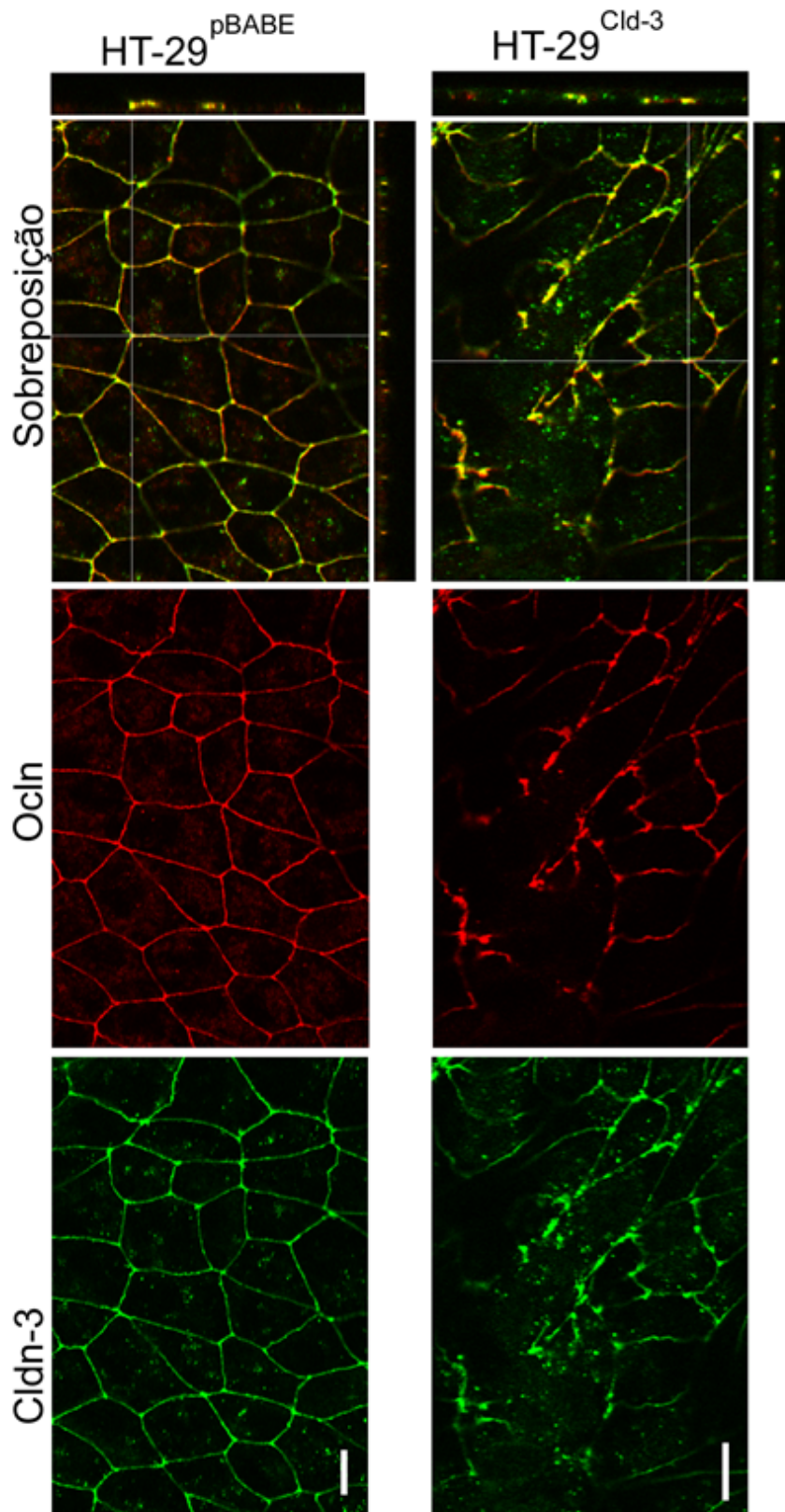


**Figura 5.7 Expressão de proteínas da junção *tight* em células que superexpressam claudina-3.** Análise por imunoblotting da expressão de claudina-3 (A), ocludina (B) e ZO-1 (C) em células HT-29 transduzidas com vetor retroviral contendo cDNA de claudina-3 (HT<sup>Cldn-3</sup>) e vetor vazio (HT<sup>pBABE</sup>). Resultados são representativos de três experimentos independentes. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ ). Ocludina é representativo de dois experimentos independentes. Análise estatística: Teste t de *Student*.

### 5.5 A superexpressão da claudina-3 altera a distribuição e associação entre proteínas das junções *tight*

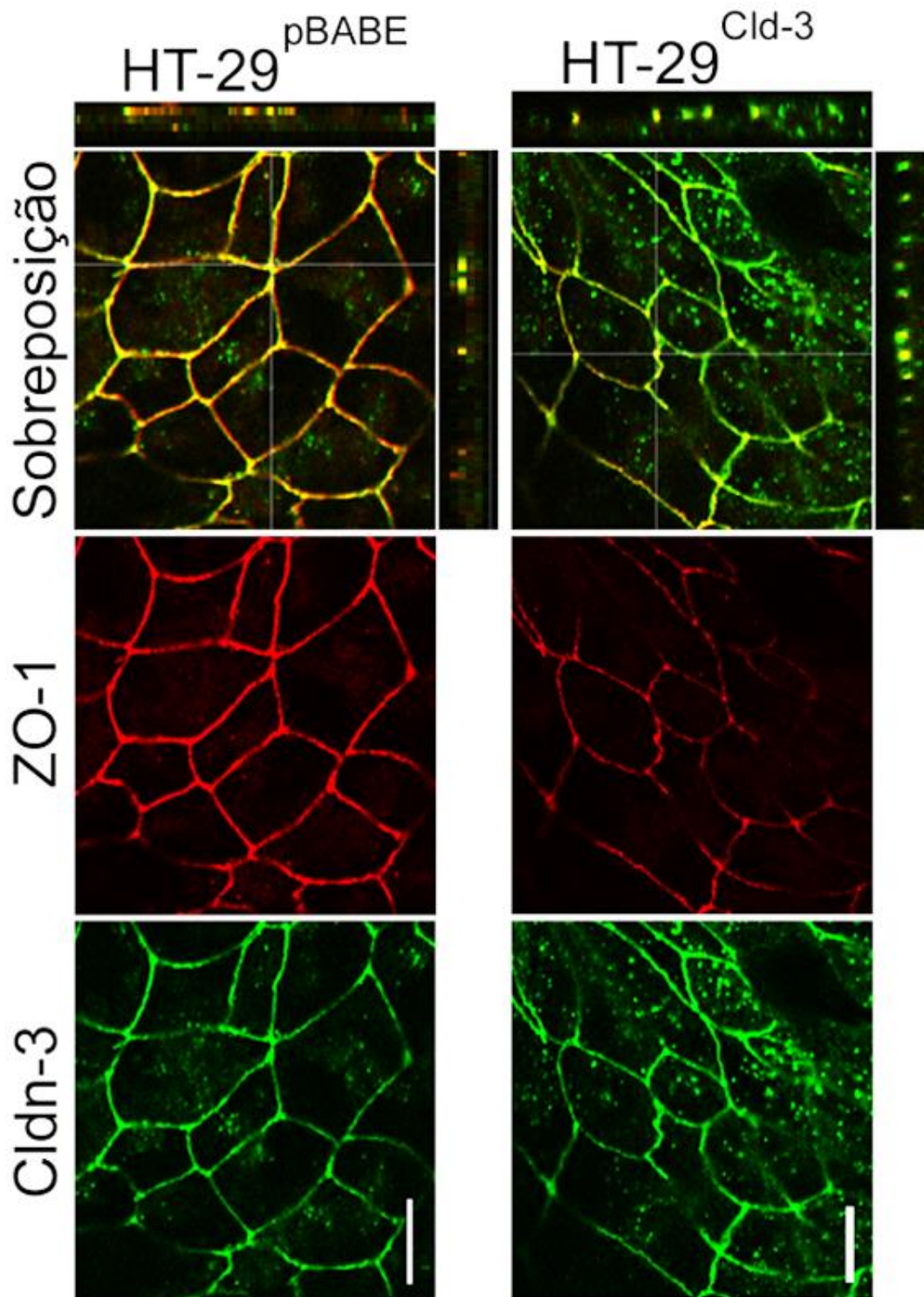
Estudos recentes têm demonstrado a participação das proteínas ocludina, ZO-1 e claudinas na manutenção da polaridade celular, bem como do fluxo paracelular de íons e moléculas (FREDRIKSSON et al., 2015; SCHLINGMANN et al., 2016). Com o intuito de avaliar a localização subcelular e a associação das proteínas em estudo, realizamos um ensaio de imunofluorescência em células HT-29 transduzidas (HT<sup>Cldn-3</sup> e HT<sup>pBABE</sup>). Como demonstrado na figura 5.8A, tanto a

claudina-3 quanto a ocludina apresentaram um padrão intermitente de marcação ao longo dos contatos célula-célula, com um maior acúmulo nas regiões de contato entre três células (contato tricelular) em células HT<sup>Cldn-3</sup>. Já as células HT<sup>BABE</sup> apresentaram um padrão normal de marcação para as duas proteínas nos contatos célula-célula. Concomitantemente com esses dados, a sobreposição das imagens, revela uma maior interação entre estas proteínas nessas regiões de contato tricelular (Fig. 5.8). Posteriormente, avaliamos a localização subcelular da proteína ZO-1 nas células transduzidas ou não com cDNA da claudina-3. Verificamos que nas células que superexpressam claudina-3, houve uma menor marcação para ZO-1, sendo ainda observada uma menor sobreposição das duas proteínas, sugerindo uma fraca interação entre claudina-3 e ZO-1 nessas células (Fig. 5.9). Esses dados corroboram os ensaios de *imunoblotting*, onde identificamos uma redução na expressão da ZO-1 em células que superexpressam Cldn-3 (Fig. 5.7). Juntos, estes dados mostram que o aumento da expressão da claudina-3 pode levar a redistribuição e diminuição de associação entre as proteínas da junção *tight*, podendo ocasionar uma desregulação das funções das JTs.



**Figura 5.8 Imagem de imunofluorescência das proteínas claudina-3 e ocludina em células HT-29 transduzidas.** Análise da distribuição subcelular das proteínas claudina-3 (verde) e ocludina (vermelho) em células de adenocarcinoma colorretal HT-29. Setas indicam região de contato tricelular com maior interação entre as proteínas. Escala da barra: 10 $\mu$ m.

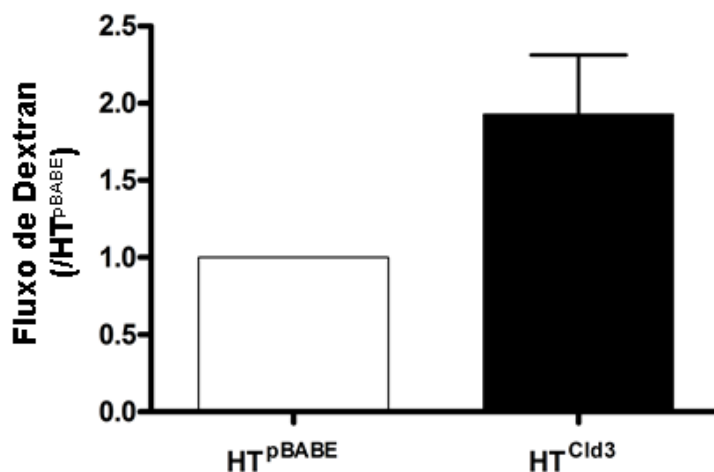




**Figura 5.9 Imagem de imunofluorescência das proteínas claudina-3 e ZO-1 em células HT-29 transduzidas.** Análise da distribuição subcelular das proteínas claudina-3 (verde) e da proteína ZO-1 (vermelho) em células de adenocarcinoma colorretal HT-29 transduzidas com vetor vazio (HT<sup>pBABE</sup>) ou para superexpressar claudina-3 (HT<sup>Cldn-3</sup>). Escala da barra: 10 $\mu$ m.

## 5.6 Superexpressão de claudina-3 promove o aumento da permeabilidade paracelular de macromoléculas

Estudos anteriores têm demonstrado a importância da homeostase dos componentes das junções *tight* durante o processo do controle do fluxo de moléculas e íons pela região paracelular nos contatos célula-célula (DE SOUZA et al., 2013, 2014). Com o intuito de avaliar mais a fundo como o aumento de expressão da claudina-3 e como isso pode alterar as interações com outras proteínas das junções *tight*, impactando na regulação da via de escoamento, realizamos um ensaio de permeabilidade paracelular de macromoléculas utilizando Dextran conjugado à um fluoróforo (Dextran Texas Red). Como mostrado na figura 5.10, as células HT<sup>Cldn-3</sup> apresentam um aumento do fluxo de macromoléculas. Esses dados reforçam os indícios que apontam a participação da claudina-3 regulando também o fluxo paracelular de macromoléculas, além de regular o transporte de íons.



**Figura 5.10 Análise da permeabilidade paracelular em células HT-29 que superexpressam claudina-3.** Células de adenocarcinoma colorretal HT-29 transduzidas (HT<sup>Cldn-3</sup>) ou não (HT<sup>pBABE</sup>), foram plaqueadas sob confluência total em insertos *transwell* de 0.4 $\mu$ m e em seguida medida a intensidade de fluorescência. Células que superexpressam claudina-3 apresentam maior permeabilidade paracelular, comparada com as células transduzidas com vetor vazio.

## 6 DISCUSSÃO

A manutenção da homeostase das células epiteliais torna-se importante, uma vez que a regulação de eventos fisiológicos como a proliferação, migração, sobrevivência e apoptose são fundamentais durante o desenvolvimento não apenas do intestino, como também de outros órgãos essenciais. Nesse contexto, o complexo juncional apical (CJA), cumpre uma função fundamental na manutenção dessa homeostase celular e várias evidências experimentais têm relatado que a sua desestruturação, leva a eventos patológicos importantes, incluindo o câncer (WITTEKINDT, 2017; FUKUOKA; YOSHIMOTO, 2018). É importante frisar que as junções *tight*, componentes do complexo juncional apical, participam da manutenção da polaridade ápico-basolateral, do fluxo paracelular e ainda da ativação de vias de sinalização importantes para a fisiologia e morfologia da célula (GARCIA-HERNANDEZ; QUIROS; NUSRAT, 2017). Vale lembrar ainda, que a perda das características morfológicas epiteliais, bem como alterações moleculares nas células, pode indicar o início do processo de transição epitélio-mesenquimal (TEM) e, conseqüentemente, metástase (GONZALEZ; MEDICI, 2014; LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014). Dessa maneira, torna-se fundamental analisar a organização e função das proteínas que compõem as JTs para que possamos melhor entender os mecanismos moleculares que medeiam a perda da adesão célula-célula com conseqüente desenvolvimento da TEM e a metástase.

Sendo a claudina-3 uma importante proteína das JTs, inicialmente avaliamos seus níveis proteicos nas amostras de tecido normal adjacente e tumoral de pacientes em diferentes estágios da progressão do câncer de cólon. Um estudo prévio do nosso grupo mostrou que nestes pacientes, a expressão das claudinas -1, -3 e -4 encontravam-se aumentadas no tecido tumoral quando comparadas ao tecido normal adjacente, em amostras de pacientes com adenocarcinoma de cólon caracterizados como bem diferenciados e moderadamente diferenciados (DE OLIVEIRA et al., 2005). No presente estudo, apesar de termos detectado alterações nos níveis proteicos da claudina-3, não encontramos alterações significativas quando comparamos os diferentes estágios de progressão do CCR. Contudo, foi possível separar as amostras em grupos que apresentavam aumento e grupos que

apresentavam diminuição nos níveis proteicos da claudina-3 no tumor. A heterogeneidade tumoral continua sendo uma limitação para o tratamento de diferentes tipos de câncer e este pode ser um dos motivos para alguns pacientes apresentarem aumento enquanto outros apresentam diminuição nos níveis de claudina-3 no tecido tumoral, quando comparados com o tecido normal adjacente. Dentro do microambiente tumoral, encontramos células tumorais com diferentes tipos de mutação, alterando conseqüentemente características morfológicas e fisiológicas, como a expressão de genes e proteínas importantes para a manutenção da polaridade ápico-basolateral e conseqüentemente a proteção das células epiteliais contra a passagem de moléculas pela região paracelular, podendo alterar a sua fisiologia, dificultando possíveis tratamentos individualizados (MARUSYK; POLYAK, 2010; RYBINSKI; YUN, 2016; WAHL; SPIKE, 2017). Dessa maneira, torna-se importante esta segregação dos pacientes, com o intuito de melhor direcionar tratamentos específicos para grupos de pacientes. Nosso grupo e outros relataram recentemente a redução da expressão de claudina-3 em células de adenocarcinoma colorretal quando tratadas com TGF- $\beta$ , um reconhecido fator de transformação do crescimento que possui efeito paradoxal, uma vez que pode promover o reparo e cicatrização de células normais, enquanto que em fases iniciais do tumor, pode levar a célula ao aumento dos processos relacionados com a TEM. Este último evento está associado com o aumento do potencial maligno, com conseqüente aumento da migração, invasão e produção de metaloproteases pelas células tumorais (VILLALBA et al., 2017; SOUSA-SQUIAVINATO et al., 2019).

Estudos recentes também demonstraram que a passagem de microrganismos através da barreira da mucosa das células epiteliais intestinais, pode levar à ativação a via de sinalização IL6/gp130/Stat3 e conseqüente redução na expressão da claudina-3 pelo aumento da ativação da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina. Essa redução na expressão da claudina-3 pode estar relacionada com a perda da  $\beta$ -catenina dos contatos celulares, uma vez que a translocação desta proteína para o núcleo é um evento fundamental para a sua atividade juntamente com o fator de transcrição TCF/LEF. A perda da  $\beta$ -catenina dos contatos celulares, seguida por sua translocação para o núcleo promove a desestabilização do CJA, levando a redução da expressão da claudina-3 (AHMAD et al., 2017). Contrariamente à redução da expressão da claudina-3 proposta pelo aumento da

atividade Wnt/  $\beta$ -catenina, outro estudo relatou o aumento significativo da expressão da claudina-3 através da ativação da via de sinalização AP-1/c-Jun, desencadeando o aumento da expressão da claudina-3 em células de adenocarcinoma colorretal (WANG et al., 2017).

Dados de um estudo realizado em 2015 mostram que para câncer de pulmão, 55% dos pacientes analisados possuíam redução da expressão de claudina-3 quando em estadio III da doença, comparados aos pacientes em estadio I, que apresentavam 45% da expressão desta proteína, enquanto que em um estudo mais recente, foi verificado que para o câncer de mama, o aumento da expressão de claudina-3 foi considerado um preditor de baixa sobrevivência (CHE et al., 2015; JÄÄSKELÄINEN et al., 2018) Estes dados da literatura, juntamente com os resultados obtidos em nosso estudo, mostram a importância em segregar pacientes acometidos com câncer em diferentes grupos, como feito durante nossa pesquisa, tendo em vista a variação na expressão de claudina-3 encontrada em diferentes tipos de tumores. Isso pode permitir desenhar estratégias experimentais padronizadas para diferentes grupos de pacientes, considerando a presença de diferentes clones de células tumorais que apresentam padrões moleculares distintos e, criar ferramentas que auxiliem na terapia antitumoral (MARUSYK; POLYAK, 2010; MIYAMOTO et al., 2016).

Ao analisar os níveis proteicos da ocludina, apesar de verificarmos variações durante os estágios da doença, não foi possível detectar alterações significativas, o que reforça nossa hipótese da heterogeneidade tumoral encontrada nesse tipo de câncer. Assim como a claudina-3, a ocludina possui papel fundamental na manutenção da morfologia das células epiteliais intestinais, bem como no controle do fluxo de macromoléculas, mas não de íons, através da região paracelular, como mostram estudos pioneiros desta proteína (SAITOU et al., 1998; YU et al., 2005; AL-SADI et al., 2011). Recentemente, um estudo mostrou a importância das proteínas claudina-2, ocludina e ZO-1 durante o processo de controle do fluxo paracelular de moléculas, uma vez que a claudina têm sido demonstrada como responsável pela passagem de íons e água através da região paracelular, pela chamada via do poro (ROSENTHAL et al., 2017), enquanto que a ocludina tem sido descrita como fundamental no transporte de moléculas maiores, permitindo a passagem de substâncias de até 70 kDa em epitélio renal tubular

proximal. Contudo, há uma controvérsia a respeito da função da ocludina, uma vez que em estudos anteriores, esta proteína havia sido demonstrada como sendo fundamental para a manutenção da TER que mede o transporte de íons pela região paracelular (VAN ITALLIE et al., 2010) e em estudos recentes, a sua inibição não apresentou uma redução, mas um aumento inesperado da TER (KIM; KIM, 2017). Dessa maneira, a ocludina tem sido demonstrada como uma importante proteína durante o controle da via de escoamento (RALEIGH et al., 2011), diferentemente da claudina, que foi identificada como responsável pela via do poro. Apesar de reconhecidamente importante para o controle da via de escoamento, este mesmo estudo recente demonstrou que a inibição da ocludina em células HK-2, apresentou alterações no transporte de íons por estas células. Assim, após a inibição da expressão da ocludina, foi identificado um aumento da TER. Esses dados corroboram com os nossos achados, onde identificamos que 75% dos pacientes que apresentavam aumento dos níveis de claudina-3, tinham os níveis de ocludina reduzidos. Dessa maneira, a expressão da ocludina pode estar inversamente relacionada com a expressão da claudina, podendo afetar o transporte de íons por entre a região paracelular, o que pode estar relacionado como o aumento do potencial maligno para as células de adenocarcinoma colorretal, como relatado pelo nosso grupo (DE SOUZA et al., 2014).

Os dados clinicopatológicos mostram uma similaridade no número de pacientes em estágios iniciais da doença (I e II) e pacientes em estágios avançados (III e IV) e ainda que em sua maioria, possuíam 60 anos ou mais, corroborando com os fatores de risco demonstrados por agências internacionais de pesquisa em câncer (GLOBAL CANCER OBSERVATORY, 2018). É importante frisar que apesar de sua progressão lenta e do seu bom prognóstico quando as lesões são detectadas precocemente, o CCR apresenta limitações problemáticas desde o início dos primeiros sintomas até o fechamento do diagnóstico, como conseguir se consultar com um especialista, realizar os exames necessários e aguardar os resultados destes exames (VEGA; VALENTÍN; CUBIELLA, 2015; ISSA; NOUREDDINE, 2017). Estes dados, juntamente com a recomendação do Ministério da Saúde, para a realização de cirurgia em pacientes em estadiamentos II e III do CCR podem influenciar no número de pacientes em estadios mais avançados em nosso trabalho, uma vez que quando em estágios mais iniciais da doença, o

paciente não realiza cirurgia, mas sim apenas uma incisão local (INCA, 2018). Observamos ainda uma tendência de pacientes com maior nível proteico de claudina-3 apresentarem uma maior taxa sobrevivência, comparados com os pacientes que apresentavam redução nesses níveis. Estes dados são interessantes, uma vez que já foi reportado anteriormente o potencial maligno em células de adenocarcinoma colorretal quando a claudina-3 encontrava-se superexpressa (DE SOUZA et al., 2013). Contudo, um estudo recente demonstrou a localização subcelular da claudina-3 como determinante para diferentes tipos histológicos de adenocarcinoma colorretal, estando a sua marcação nuclear relacionado ao adenocarcinoma colorretal mucinoso (TOKUHARA et al., 2018), sendo este tipo de adenocarcinoma considerado o mais agressivo e com uma pior sobrevida, quando comparado com os tipos de CCR não mucinosos (OTT et al., 2018). Dessa maneira, esses dados apontam que não apenas a expressão da claudina-3, como também a sua localização subcelular podem ser fatores cruciais para determinar o desfecho da doença. Contudo, análises adicionais quanto à localização subcelular das proteínas em estudo precisam ser concluídas para corroborar com esta hipótese.

A análise da interação entre as proteínas claudina-3 e ocludina torna-se importante, uma vez que estas proteínas pertencentes às JTs desempenham papéis fundamentais durante a regulação da manutenção da polaridade ápico-basolateral, bem como da passagem de íons e macromoléculas através da região paracelular. Através da técnica de co-imunoprecipitação, nossos dados revelaram que pacientes que apresentavam alteração na expressão proteica de claudina-3, demonstraram uma menor interação entre a claudina-3 e a ocludina. Os resultados da co-imunoprecipitação foram corroborados a partir da análise por imunohistoquímica, onde foi verificada uma tendência de menor interação entre estas proteínas no tumor. Dados da literatura demonstraram que a expressão de claudina-3 nas células pode regular a função da ocludina e demais proteínas da JTs, alterando suas funções, as propriedades da ligação, bem como a sua localização na membrana plasmática. Ainda, alterações na expressão das proteínas claudinas podem levar a um significativo comprometimento na expressão da proteína ZO-1, que tem-se discutido como sendo fundamental para mediar a interação entre a claudina e a ocludina não apenas em CCR como também em junções *tight* de células submandibulares (CORDING et al., 2013; HAMADA et al., 2013; DING et al., 2017).

A perda da expressão da ocludina pode estar relacionada à alteração da via de escoamento, desregulando o fluxo paracelular de macromoléculas.

Tendo em vista que encontramos um menor nível proteico de ocludina em amostras que apresentam maiores níveis de claudina-3, resolvemos utilizar células de adenocarcinoma de cólon *in vitro*, HT-29, transduzidas ou não com o vetor retroviral contendo cDNA para superexpressar Cldn-3 (HT<sup>Cldn-3</sup> e HT<sup>pBABE</sup>, respectivamente). As proteínas da família das ZO fazem parte da placa juncional eletrodensa e representam um papel fundamental durante o processo de interação entre as demais proteínas juncionais, principalmente mediando a interação entre as JTs e as JAs, formando o CJA. Além disso, as proteínas que compõem a placa juncional eletrodensa no citoplasma das células têm vital importância durante a interação entre as proteínas transmembranares com as proteínas que constituem o citoesqueleto de actina e os microtúbulos, participando ativamente da formação da arquitetura celular e da manutenção da polaridade ápico-basolateral da célula (ZIHNI et al., 2016). Um estudo recente demonstrou a importância da proteína ZO-1 durante a progressão do câncer de próstata, uma vez que o domínio PDZ desta proteína é capaz de interagir com o receptor de calcitonina, desestabilizando as ligações das JTs e aumentando a capacidade de invasão das células do câncer (ALJAMEELI; THAKKAR; SHAH, 2017). Além disso, tem sido relatado que a dissociação da claudina-5 e -18 da proteína ZO-1 em células HEK-293 foi importante para a perda da função de barreira celular de tamanhos menores que 500 nm<sup>2</sup> (BARTLE et al., 2018). De acordo com nossos achados, a superexpressão da claudina-3 foi capaz de regular negativamente a expressão de ZO-1 e de ocludina, podendo esta característica implicar em um desequilíbrio das JTs e, conseqüentemente, contribuir com o potencial metastático das células de CCR. A desregulação na expressão destas proteínas juncionais podem levar a perda das características epiteliais e, conseqüentemente, ao ganho de características mesenquimais (KYUNO et al., 2014).

Considerando os estudos recentes que demonstram a importância da regulação das proteínas juncionais durante o processo de manutenção da polaridade ápico-basolateral, bem como do controle do fluxo paracelular de íons e macromoléculas (KIRSCHNER et al., 2013), avaliamos de que maneira o fluxo paracelular de macromoléculas encontrava-se, após a superexpressão da claudina-



3. Identificamos que um maior número de macromoléculas foi capaz de atravessar a barreira paracelular, sugerindo assim que perturbações na expressão da Cldn-3 seja importante para a manutenção da função seletiva da passagem de macromoléculas por entre as células adjacentes. Vale ressaltar que, de acordo com estudos publicados recentemente, a ocludina possui a principal função de controlar o fluxo paracelular de macromoléculas, sendo as claudinas as principais responsáveis pelo fluxo de íons e pequenas moléculas (KIM; KIM, 2017; ROSENTHAL et al., 2017). Dessa maneira, podemos concluir que a desregulação da expressão da claudina-3 está, de fato, promovendo uma perturbação não apenas na expressão, como também na função da ocludina, uma vez que esta proteína regula o fluxo paracelular de macromoléculas. Esses dados corroboram nossa hipótese de que alterações na expressão da claudina-3 podem levar a uma desregulação da via de escoamento. Contudo, análises moleculares adicionais são necessárias para um maior detalhamento da regulação desse processo.

Tem sido demonstrado que a desregulação da localização subcelular das proteínas ocludina e ZO-1 é decisiva para a manutenção da função de barreira paracelular à bactérias no trato respiratório (PETER et al., 2017). Dessa maneira, torna-se fundamental avaliar a disposição espacial das proteínas da JTs em células que apresentam aumento da expressão da claudina-3, tendo em vista a desregulação observada nas funções da JTs. Constatamos uma importante alteração no padrão de marcação por fluorescência, notando a falta de linearidade para a marcação da ocludina nos contatos celulares em células HT<sup>Cldn3</sup>, quando comparado com as células HT<sup>pBABE</sup>, corroborando os nossos dados de que a superexpressão da claudina é fundamental tanto para a expressão quanto para a localização subcelular da ocludina. Estudos mostram a importância da localização subcelular da proteína ocludina nos contatos celulares, para a manutenção da polaridade celular, bem como para o recrutamento de demais proteínas que auxiliam no processo de migração polarizada, como a proteína PAR3 (DU et al., 2010). Ao avaliar a localização subcelular da proteína ZO-1, o padrão de marcação foi correspondente aos nossos achados relativos à expressão proteica por *Western blotting*, tendo havido uma redução na intensidade de fluorescência nas células transduzidas para superexpressarem claudina-3, quando comparadas com as células transduzidas com vetor vazio. Na sobreposição das imagens é possível

identificar com mais clareza a diminuição na interação entre as proteínas Cldn-3 e ZO-1. Dados da literatura demonstram a importância não apenas da expressão, como também da localização subcelular da ZO-1 para a manutenção da barreira celular em células do trato gastrointestinal, influenciando no desenvolvimento de doenças intestinais (OSHIMA; MIWA, 2016). Como discutido anteriormente, não apenas o nível de expressão proteica, como também a localização subcelular das proteínas é de fundamental importância para a sua função, uma vez que a perda de proteínas juncionais dos contatos celulares, por exemplo, é um evento importante durante o processo de TEM.

A partir dos nossos resultados foi verificada a possibilidade de segregação de pacientes acometidos com câncer de cólon em grupos que apresentam aumento ou diminuição da expressão de claudina-3 no tumor. O fato dos pacientes apresentarem essa heterogeneidade, ora apresentando aumento, ora diminuição dos níveis de claudina-3, pode impactar negativamente o tratamento recebido, uma vez que as células podem apresentar respostas diferentes aos tratamentos. É importante ressaltar também que a superexpressão da claudina-3 pode levar a alterações não apenas nos níveis proteicos como também na localização subcelular das proteínas ocludina e ZO-1, o que poderia estar relacionado a uma disfunção da interação entre as proteínas do complexo juncional apical, já que através do domínio PDZ, a ZO-1 cumpre um papel fundamental na interação entre as JTs e as JAs e a ocludina participa ativamente do transporte paracelular de macromoléculas. Com essa desregulação proteica, a célula seria capaz de perder sua polaridade ápico-basolateral e, conseqüentemente, sua função de cerca, o que poderia levar a passagem de receptores que se encontram na superfície apical de células normais para a região baso-lateral, como ocorre com o receptor EGFR. Com a desregulação do fluxo paracelular, moléculas ativadoras como o EGF, podem atravessar a região paracelular, aumentando assim a ativação dessa via de sinalização, levando a um conseqüente aumento da expressão de claudina-3 (DE SOUZA et al., 2013), bem como permitir que microrganismos patogênicos atravessassem a barreira celular, alcançando a corrente sanguínea. Uma vez que a desregulação dos componentes das JTs podem levar as células a adquirirem um potencial metastático e conseqüentemente mais maligno, torna-se importante aprimorar os estudos destas proteínas com o intuito de desenvolver estratégias alternativas de tratamento para

grupos específicos de pacientes que possuem desregulação nos níveis proteicos das proteínas das JTs. Desta maneira, nossos dados em conjunto com os demais dados da literatura, são promissores na busca de alvos que visem o diagnóstico precoce, além do desenvolvimento de estratégias de tratamento personalizadas e diferenciadas que visem alvos específicos que impeçam a progressão tumoral.

## 7 CONCLUSÕES

Nosso conjunto de dados nos permite concluir que alterações nos níveis de expressão da proteína claudina-3 pode alterar a sua interação com as proteínas ocludina e ZO-1, podendo levar à desregulação do fluxo paracelular de macromoléculas através da perda da polaridade ápico-basolateral, um evento inicial da transição epitélio-mesenquimal. Essa alteração do fluxo paracelular pode permitir o acesso de fatores de crescimento a seus receptores localizados na região basolateral da célula os quais, uma vez ativados, desencadeia cascatas de sinalização relacionadas com a progressão do CCR. É possível concluir também que a segregação dos pacientes com alterações no nível de expressão da claudina-3 no tumor pode permitir a utilização desta proteína como um possível biomarcador para o CCR ao detectar alterações em seus níveis em pacientes em estágios iniciais da doença, favorecendo um diagnóstico precoce.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A. et al. Curcumin induces apoptosis and cell cycle arrest via the activation of reactive oxygen species-independent mitochondrial apoptotic pathway in Smad4 and p53 mutated colon adenocarcinoma HT29 cells. **Nutrition Research (New York, N.Y.)**, v. 51, p. 67–81, mar. 2018.

AHMAD, R. et al. Loss of claudin-3 expression induces IL6/gp130/Stat3 signaling to promote colon cancer malignancy by hyperactivating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. **Oncogene**, v. 36, n. 47, p. 6592–6604, 23 2017.

AJCC. **AJCC - What is Cancer Staging?** Disponível em: <<https://cancerstaging.org/references-tools/pages/what-is-cancer-staging.aspx>>. Acesso em: 20 dez. 2018.

ALJAMEELI, A.; THAKKAR, A.; SHAH, G. Calcitonin receptor increases invasion of prostate cancer cells by recruiting zonula occludens-1 and promoting PKA-mediated TJ disassembly. **Cellular Signalling**, v. 36, p. 1–13, 2017.

AL-SADI, R. et al. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 300, n. 6, p. G1054–G1064, jun. 2011.

AXIS, J. et al. Correlation of occludin protein mobility with paracellular leak pathway permeability in renal epithelia. **bioRxiv**, p. 437996, 8 out. 2018.

BARKER, N.; VAN DE WETERING, M.; CLEVERS, H. The intestinal stem cell. **Genes & Development**, v. 22, n. 14, p. 1856–1864, 15 jul. 2008.

BARTLE, E. I. et al. Bridging the gap: Super-resolution microscopy of epithelial cell junctions. **Tissue Barriers**, v. 6, n. 1, p. e1404189, 2 jan. 2018.

BÄSLER, K.; BRANDNER, J. M. Tight junctions in skin inflammation. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 469, n. 1, p. 3–14, 2017.

BASU, S.; CHERIYAMUNDATH, S.; BEN-ZE'EV, A. Cell–cell adhesion: linking Wnt/ $\beta$ -catenin signaling with partial EMT and stemness traits in tumorigenesis. **F1000Research**, v. 7, p. 1488, 18 set. 2018.

BENCZIK, M. et al. Claudin-1 as a Biomarker of Cervical Cytology and Histology. **Pathology oncology research: POR**, v. 22, n. 1, p. 179–188, jan. 2016.

BISHEHSARI, F. et al. Epidemiological transition of colorectal cancer in developing countries: Environmental factors, molecular pathways, and opportunities for prevention. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 20, n. 20, p. 6055–6072, 28 maio 2014.

BLACHE, P. et al. SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. **J Cell Biol**, v. 166, n. 1, p. 37–47, 5 jul. 2004.

BOUCHAGIER, K. A. et al. Expression of Claudins-1, -4, -5, -7 and Occludin in Hepatocellular Carcinoma and their Relation with Classic Clinicopathological Features and Patients' Survival. **In Vivo**, v. 28, n. 3, p. 315–326, 1 maio 2014.

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**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 1 nov. 2018.

BURRELL, R. A. et al. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 338–345, set. 2013.

CAMPBELL, H. K.; MAIERS, J. L.; DEMALI, K. A. Interplay between tight junctions & adherens junctions. **Experimental Cell Research**, v. 358, n. 1, p. 39–44, 01 2017.

CHE, J. et al. Decreased expression of claudin-3 is associated with a poor prognosis and EMT in completely resected squamous cell lung carcinoma. **Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 36, n. 8, p. 6559–6568, ago. 2015.

CHEN, D. et al. Wnt signaling in bone, kidney, intestine, and adipose tissue and interorgan interaction in aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 0, n. 0, 2018.

CHIN, A. M. et al. Morphogenesis and maturation of the embryonic and postnatal intestine. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 66, p. 81–93, 2017.

CHOI, I. K. et al. PPAR-gamma ligand promotes the growth of APC-mutated HT-29 human colon cancer cells in vitro and in vivo. **Investigational New Drugs**, v. 26, n. 3, p. 283–288, jun. 2008.

CONITEC. **Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas em Oncologia**. Disponível em: <<http://conitec.gov.br/diretrizes-diagnosticas-e-terapeuticas-em-oncologia#ano2015>>. Acesso em: 21 dez. 2018.

CORDING, J. et al. In tight junctions, claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. Pt 2, p. 554–564, 15 jan. 2013.

CUMMINS, P. M. Occludin: One Protein, Many Forms. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 2, p. 242–250, jan. 2012.

DE FILIPPO, C. et al. Mutations of the APC gene in human sporadic colorectal cancers. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 37, n. 9, p. 1048–1053, set. 2002.

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 SOUZA, W. F. et al. Claudin-3 Overexpression Increases the Malignant Potential of Colorectal Cancer Cells: Roles of ERK1/2 and PI3K-Akt as Modulators of EGFR signaling. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e74994, 19 set. 2013.

DE SOUZA, W. F. et al. Ouabain-Induced Alterations of the Apical Junctional Complex Involve  $\alpha 1$  and  $\beta 1$  Na,K-ATPase Downregulation and ERK1/2 Activation Independent of Caveolae in Colorectal Cancer Cells. **The Journal of Membrane Biology**, v. 247, n. 1, p. 23–33, jan. 2014.

DING, C. et al. Decreased interaction between ZO-1 and occludin is involved in alteration of tight junctions in transplanted epiphora submandibular glands. **Journal of Molecular Histology**, v. 48, n. 3, p. 225–234, jun. 2017.

DU, D. et al. The Tight Junction Protein, Occludin, Regulates the Directional Migration of Epithelial Cells. **Developmental Cell**, v. 18, n. 1, p. 52–63, jan. 2010.

DU, L. et al. KRAS and TP53 mutations in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer: a meta-analysis. **Oncotarget**, v. 8, n. 13, p. 22175–22186, 28 mar. 2017.

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, B. K. et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. **Cancer**, v. 116, n. 3, p. 544–573, 1 fev. 2010.

EMERICK, B.; SCHLEINIGER, G.; BOMAN, B. M. A kinetic model to study the regulation of  $\beta$ -catenin, APC, and Axin in the human colonic crypt. **Journal of Mathematical Biology**, v. 75, n. 5, p. 1171–1202, 2017.

FREDRIKSSON, K. et al. Proteomic Analysis of Proteins Surrounding Occludin and Claudin-4 Reveals Their Proximity to Signaling and Trafficking Networks. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, 19 mar. 2015.

FUKUOKA, A.; YOSHIMOTO, T. Barrier dysfunction in the nasal allergy. **Allergology International**, v. 67, n. 1, p. 18–23, jan. 2018.



FURUSE, M. et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. **The Journal of Cell Biology**, v. 123, n. 6 Pt 2, p. 1777–1788, dez. 1993.

GARCIA-HERNANDEZ, V.; QUIROS, M.; NUSRAT, A. Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation: Intestinal epithelial claudins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1397, n. 1, p. 66–79, jun. 2017.

GARRIDO-URBANI, S. et al. Junctional adhesion molecule C (JAM-C) dimerization aids cancer cell migration and metastasis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1865, n. 4, p. 638–649, 1 abr. 2018.

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, 3 jul. 2015.

GLOBAL CANCER OBSERVATORY. **Global Cancer Observatory**. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/>>. Acesso em: 30 jan. 2019.

GONZALEZ, D. M.; MEDICI, D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. **Science Signaling**, v. 7, n. 344, p. re8, 23 set. 2014.

GONZALEZ-MARISCAL, L. et al. ZO-2, a tight junction scaffold protein involved in the regulation of cell proliferation and apoptosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1257, p. 133–141, jun. 2012.

GUINNEY, J. et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. **Nature Medicine**, v. 21, n. 11, p. 1350–1356, nov. 2015.

GULACK, B. C. et al. Surgical Resection of the Primary Tumor in Stage IV Colorectal Cancer Without Metastasectomy Is Associated With Improved Overall Survival Compared With Chemotherapy/Radiation Therapy Alone: **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 59, n. 4, p. 299–305, abr. 2016.

GÜNZEL, D.; YU, A. S. L. Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 2, p. 525–569, 1 abr. 2013.

HÄFNER, M. F.; DEBUS, J. Radiotherapy for Colorectal Cancer: Current Standards and Future Perspectives. **Visceral Medicine**, v. 32, n. 3, p. 172–177, jun. 2016.

HAMADA, K. et al. Disruption of ZO-1/claudin-4 interaction in relation to inflammatory responses in methotrexate-induced intestinal mucositis. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 72, n. 4, p. 757–765, out. 2013.

HAO, Y. et al. Oncogenic PIK3CA mutations reprogram glutamine metabolism in colorectal cancer. **Nature Communications**, v. 7, p. 11971, 20 2016.

HERVÉ, J.-C. et al. Influence of the scaffolding protein Zonula Occludens (ZOs) on membrane channels. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, Reciprocal influences between cell cytoskeleton and membrane channels, receptors and transporters. v. 1838, n. 2, p. 595–604, 1 fev. 2014.

INCA. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2018-incidencia-de-cancer-no-brasil>>. Acesso em: 30 nov. 2018.

ISSA, I. A.; NOUREDDINE, M. Colorectal cancer screening: An updated review of the available options. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 28, p. 5086–5096, 28 jul. 2017.

JÄÄSKELÄINEN, A. et al. High-level cytoplasmic claudin 3 expression is an independent predictor of poor survival in triple-negative breast cancer. **BMC cancer**, v. 18, n. 1, p. 223, 27 2018.

JOHANSSON, M. E. V.; LARSSON, J. M. H.; HANSSON, G. C. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host–microbial interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. Supplement 1, p. 4659–4665, 15 mar. 2011.

KIM, S.; KIM, G.-H. Roles of claudin-2, ZO-1 and occludin in leaky HK-2 cells. p. 11, 2017.

KIRSCHNER, N. et al. Contribution of Tight Junction Proteins to Ion, Macromolecule, and Water Barrier in Keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 5, p. 1161–1169, maio 2013.

KNICKELBEIN, K.; ZHANG, L. Mutant KRAS as a critical determinant of the therapeutic response of colorectal cancer. **Genes & Diseases**, v. 2, n. 1, p. 4–12, 1 mar. 2015.

KRETZSCHMAR, K.; CLEVERS, H. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in adult mammalian epithelial stem cells. **Developmental Biology**, Hubrecht Institute centennial, from embryos to stem cells. v. 428, n. 2, p. 273–282, 15 ago. 2017.

KRUG, S. M. et al. Tricellulin Forms a Barrier to Macromolecules in Tricellular Tight Junctions without Affecting Ion Permeability. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, n. 16, p. 3713–3724, 15 ago. 2009.

KYUNO, D. et al. Targeting tight junctions during epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 31, p. 10813–10824, 21 ago. 2014.

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.

LANDY, J. et al. Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 11, p. 3117–3126, 21 mar. 2016.

LEE, J.-D.; LEE, M.-H. Decreased expression of zonula occludens-1 and occludin in the bladder urothelium of patients with interstitial cystitis/painful bladder syndrome. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 113, n. 1, p. 17–22, 1 jan. 2014.

LI, X.-L. et al. p53 mutations in colorectal cancer- molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 21, n. 1, p. 84–93, 7 jan. 2015.

LINGARAJU, A. et al. Conceptual barriers to understanding physical barriers. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 42, p. 13–21, jun. 2015.

LINNEKAMP, J. F. et al. Consensus molecular subtypes of colorectal cancer are recapitulated in in vitro and in vivo models. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 616, mar. 2018.

MANDELL, K. J.; PARKOS, C. A. The JAM family of proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 6, p. 857–867, 25 abr. 2005.

MARTIN, T. A. The role of tight junctions in cancer metastasis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 36, p. 224–231, dez. 2014.

MARUSYK, A.; POLYAK, K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1805, n. 1, p. 105, jan. 2010.

MEACHAM, C. E.; MORRISON, S. J. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 328–337, set. 2013.

MIYAMOTO, D. T. et al. Single-Cell Analysis of Circulating Tumor Cells as a Window into Tumor Heterogeneity. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 81, p. 269–274, 2016.

MORAMPUDI, V. et al. Tricellular Tight Junction Protein Tricellulin Is Targeted by the Enteropathogenic Escherichia coli Effector EspG1, Leading to Epithelial Barrier Disruption. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 1, p. e00700-16, 1 jan. 2017.

MORGAN, C. et al. The Role of Adhesion Molecules as Biomarkers for the Aggressive Prostate Cancer Phenotype. **PLOS ONE**, v. 8, n. 12, p. e81666, 16 dez. 2013.

MROZIK, K. M. et al. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. **BMC Cancer**, v. 18, 1 out. 2018.

MUNEMITSU, S. et al. Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 7, p. 3046–3050, 28 mar. 1995.

NAKAMURA, Y. et al. Targeting of super-enhancers and mutant BRAF can suppress growth of BRAF -mutant colon cancer cells via repression of MAPK signaling pathway. **Cancer Letters**, v. 402, p. 100–109, ago. 2017.

NIH. **Familial adenomatous polyposis**. Disponível em: <<https://ghr.nlm.nih.gov/condition/familial-adenomatous-polyposis>>. Acesso em: 3 dez. 2018.

NOMME, J. et al. Structural Basis of a Key Factor Regulating the Affinity between the Zonula Occludens First PDZ Domain and Claudins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 27, p. 16595–16606, 3 jul. 2015.

NORAT, T. et al. European Code against Cancer 4th Edition: Diet and cancer. **Cancer Epidemiology**, European Code against Cancer 4th Edition: 12 ways to reduce your Cancer risk (<http://cancer-code-europe.iarc.fr>). v. 39, p. S56–S66, 1 dez. 2015.

OKUMURA, N. et al. Involvement of Nectin-Afadin in the Adherens Junctions of the Corneal Endothelium. **Cornea**, v. 37, n. 5, p. 633–640, maio 2018.

OSHIMA, T.; MIWA, H. Gastrointestinal mucosal barrier function and diseases. **Journal of Gastroenterology**, v. 51, n. 8, p. 768–778, 1 ago. 2016.

OTT, C. et al. Advanced Mucinous Colorectal Cancer: Epidemiology, Prognosis and Efficacy of Chemotherapeutic Treatment. **Digestion**, v. 98, n. 3, p. 143–152, 2018.

PAI, S. G. et al. Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 10, n. 1, p. 101, 5 maio 2017.

PÉREZ, S. et al. Redox signaling in the gastrointestinal tract. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 104, p. 75–103, 1 mar. 2017.

PETER, A. et al. Localization and pneumococcal alteration of junction proteins in the human alveolar-capillary compartment. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 147, n. 6, p. 707–719, jun. 2017.

PINHEIRO, D.; BELLAÏCHE, Y. Mechanical Force-Driven Adherens Junction Remodeling and Epithelial Dynamics. **Developmental Cell**, v. 47, n. 1, p. 3–19, 08 2018.

PINO, M. S.; CHUNG, D. C. The chromosomal instability pathway in colon cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2059–2072, jun. 2010.

PORRU, M. et al. Targeting KRAS in metastatic colorectal cancer: current strategies and emerging opportunities. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR**, v. 37, 13 mar. 2018.

POWELL, S. M. et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. **Nature**, v. 359, n. 6392, p. 235–237, 17 set. 1992.

RACHOW, S. et al. Occludin Is Involved in Adhesion, Apoptosis, Differentiation and Ca<sup>2+</sup>-Homeostasis of Human Keratinocytes: Implications for Tumorigenesis. **PLOS ONE**, v. 8, n. 2, p. e55116, 4 fev. 2013.

RADTKE, F.; CLEVERS, H. Self-Renewal and Cancer of the Gut: Two Sides of a Coin. **Science**, v. 307, n. 5717, p. 1904–1909, 25 mar. 2005.

RALEIGH, D. R. et al. Occludin S408 phosphorylation regulates tight junction protein interactions and barrier function. **The Journal of Cell Biology**, v. 193, n. 3, p. 565–582, 2 maio 2011.

RODRIGUEZ-BOULAN, E.; MACARA, I. G. Organization and execution of the epithelial polarity programme. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 4, p. 225–242, abr. 2014.

ROMERO, G.; VON ZASTROW, M.; FRIEDMAN, P. A. Role of PDZ Proteins in Regulating Trafficking, Signaling, and Function of GPCRs: Means, Motif, and Opportunity. **Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)**, v. 62, p. 279–314, 2011.

ROSENTHAL, R. et al. Claudin-2-mediated cation and water transport share a common pore. **Acta Physiologica (Oxford, England)**, v. 219, n. 2, p. 521–536, 2017.

RÜBSAM, M. et al. Adherens Junctions and Desmosomes Coordinate Mechanics and Signaling to Orchestrate Tissue Morphogenesis and Function: An Evolutionary Perspective. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 11, 1 nov. 2018.

RUSTGI, A. K. The genetics of hereditary colon cancer. **Genes & Development**, v. 21, n. 20, p. 2525–2538, 15 out. 2007.

RYBINSKI, B.; YUN, K. Addressing intra-tumoral heterogeneity and therapy resistance. **Oncotarget**, v. 7, n. 44, p. 72322–72342, 1 nov. 2016.

SAITOU, M. et al. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. **The Journal of Cell Biology**, v. 141, n. 2, p. 397–408, 20 abr. 1998.

SATO, M.; AOYAMA, Y.; KITAJIMA, Y. Assembly pathway of desmoglein 3 to desmosomes and its perturbation by pemphigus vulgaris-IgG in cultured keratinocytes, as revealed by time-lapsed labeling immunoelectron microscopy. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 80, n. 10, p. 1583–1592, out. 2000.

SCHLINGMANN, B. et al. Regulation of claudin/zonula occludens-1 complexes by hetero-claudin interactions. **Nature Communications**, v. 7, p. 12276, 25 2016.

SHANG, S.; HUA, F.; HU, Z.-W. The regulation of  $\beta$ -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. **Oncotarget**, v. 8, n. 20, p. 33972–33989, 25 fev. 2017.

SHIMIZU, Y. et al. Monoclonal antibodies against occludin completely prevented hepatitis C virus infection in a mouse model. **Journal of Virology**, 7 fev. 2018.

SIEBER, O. M.; HEINIMANN, K.; TOMLINSON, I. P. M. Genomic instability--the engine of tumorigenesis? **Nature Reviews. Cancer**, v. 3, n. 9, p. 701–708, 2003.

SINGH, A. B.; SHARMA, A.; DHAWAN, P. Claudin Family of Proteins and Cancer: An Overview. **Journal of Oncology**, 2010.

SINGH, A. B.; UPPADA, S. B.; DHAWAN, P. Claudin proteins, outside-in signaling, and carcinogenesis. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 469, n. 1, p. 69–75, 2017a.

SINGH, A. B.; UPPADA, S. B.; DHAWAN, P. Claudin proteins, outside-in signaling, and carcinogenesis. **Pflugers Archiv : European journal of physiology**, v. 469, n. 1, p. 69–75, jan. 2017b.

SOUSA-SQUIAVINATO, A. C. M. 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, n. 3, p. 418–429, mar. 2019.

SPADARO, D. et al. ZO proteins redundantly regulate the transcription factor DbpA/ZONAB. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 32, p. 22500–22511, 8 ago. 2014.

STAMATOVIC, S. M. et al. Endocytosis of tight junction proteins and the regulation of degradation and recycling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1397, n. 1, p. 54–65, 2017.



STEINBACHER, T.; KUMMER, D.; EBNET, K. Junctional adhesion molecule-A: functional diversity through molecular promiscuity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 8, p. 1393–1409, 1 abr. 2018.

STEWART, A. S.; PRATT-PHILLIPS, S.; GONZALEZ, L. M. Alterations in Intestinal Permeability: The Role of the “Leaky Gut” in Health and Disease. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 52, p. 10–22, maio 2017.

TABARIÈS, S.; SIEGEL, P. M. The role of claudins in cancer metastasis. **Oncogene**, v. 36, n. 9, p. 1176–1190, mar. 2017.

TAFRIHI, M.; SISTANI, R. N. E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin Complex: A Target for Anticancer and Antimetastasis Plants/Plant-derived Compounds. **Nutrition and Cancer**, v. 69, n. 5, p. 702–722, 4 jul. 2017.

TIAN, X. et al. E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin Complex and the Epithelial Barrier. **BioMed Research International**, 2011.

TOKUHARA, Y. et al. Nuclear expression of claudin-3 in human colorectal adenocarcinoma cell lines and tissues. **Oncology Letters**, v. 15, n. 1, p. 99–108, jan. 2018.

UICC. **TNM | UICC**. Disponível em: <<https://www.uicc.org/resources/tnm>>. Acesso em: 20 dez. 2018.

VAN ITALLIE, C. M. et al. ZO-1 Stabilizes the Tight Junction Solute Barrier through Coupling to the Perijunctional Cytoskeleton. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, n. 17, p. 3930–3940, 1 set. 2009.

VAN ITALLIE, C. M. et al. Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. Pt 16, p. 2844–2852, 15 ago. 2010.

VEGA, P.; VALENTÍN, F.; CUBIELLA, J. Colorectal cancer diagnosis: Pitfalls and opportunities. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 7, n. 12, p. 422–433, 15 dez. 2015.

VILLALBA, M. et al. Role of TGF- $\beta$  in metastatic colon cancer: it is finally time for targeted therapy. **Cell and Tissue Research**, v. 370, n. 1, p. 29–39, 2017.

VOGELSTEIN, B. et al. Cancer Genome Landscapes. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1546–1558, 29 mar. 2013.

VOLKSDORF, T. et al. Tight Junction Proteins Claudin-1 and Occludin Are Important for Cutaneous Wound Healing. **The American Journal of Pathology**, v. 187, n. 6, p. 1301–1312, jun. 2017a.

VOLKSDORF, T. et al. Tight Junction Proteins Claudin-1 and Occludin Are Important for Cutaneous Wound Healing. **The American Journal of Pathology**, v. 187, n. 6, p. 1301–1312, 1 jun. 2017b.

WAHL, G. M.; SPIKE, B. T. Cell state plasticity, stem cells, EMT, and the generation of intra-tumoral heterogeneity. **NPJ Breast Cancer**, v. 3, 19 abr. 2017.

WANG, Y. et al. SCF/C-Kit/JNK/AP-1 Signaling Pathway Promotes Claudin-3 Expression in Colonic Epithelium and Colorectal Carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, 6 abr. 2017.

WHO. **WHO**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 30 nov. 2018.

WITTEKINDT, O. H. Tight junctions in pulmonary epithelia during lung inflammation. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 469, n. 1, p. 135–147, jan. 2017.

WONG, S. H. M. et al. E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 121, p. 11–22, 1 jan. 2018.

WORLD CANCER RESEARCH. **Diet, Nutrition, Physical Activity and Colorectal Cancer**. Disponível em: <[http://www.aicr.org/continuous-update-project/colorectal-cancer.html?\\_ga=2.263159877.83862244.1543606041-26985818.1543606041](http://www.aicr.org/continuous-update-project/colorectal-cancer.html?_ga=2.263159877.83862244.1543606041-26985818.1543606041)>. Acesso em: 30 nov. 2018.

WU, Y. et al. Cooperativity between trans and cis interactions in cadherin-mediated junction formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 41, p. 17592–17597, 12 out. 2010.

YAMAGISHI, H. et al. Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. **Chinese Journal of Cancer**, v. 35, 6 jan. 2016.

YAMAMOTO-FURUSHO, J. K.; MENDIVIL-RANGEL, E. J.; FONSECA-CAMARILLO, G. Differential Expression of Occludin in Patients with Ulcerative Colitis and Healthy Controls. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 18, n. 10, p. E1999–E1999, 1 out. 2012.

YANO, T. et al. Apical cytoskeletons and junctional complexes as a combined system in epithelial cell sheets: Apical cytoskeleton and tight junction association. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1405, n. 1, p. 32–43, out. 2017.

YEUNG, K. T.; YANG, J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. **Molecular Oncology**, v. 11, n. 1, p. 28–39, 2017.

YU, A. S. L. et al. Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 288, n. 6, p. C1231-1241, jun. 2005.

ZEISEL, M. B.; DHAWAN, P.; BAUMERT, T. F. Tight junction proteins in gastrointestinal and liver disease. **Gut**, p. gutjnl-2018-316906, 8 out. 2018.

ZHANG, L. et al. Claudin-3 expression increases the malignant potential of lung adenocarcinoma cells: role of epidermal growth factor receptor activation. **Oncotarget**, v. 8, n. 14, p. 23033–23047, 4 abr. 2017.

ZHAO, J. et al. Multiple claudin–claudin cis interfaces are required for tight junction strand formation and inherent flexibility. **Communications Biology**, v. 1, n. 1, p. 50, 17 maio 2018.

ZIHNI, C. et al. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 9, p. 564–580, set. 2016.

ZIHNI, C.; BALDA, M. S.; MATTER, K. Signalling at tight junctions during epithelial differentiation and microbial pathogenesis. **J Cell Sci**, v. 127, n. 16, p. 3401–3413, 15 ago. 2014.