



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

CASSIO DEJAIR FLEMING DE MORAES

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA VIA WNT/B-CATENINA E DA SINALIZAÇÃO
DE IGF1 NA PROGRESSÃO DO CÂNCER COLORRETAL**

Orientador: Prof. Dr. José Andrés Morgado Diaz

RIO DE JANEIRO
2020



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

CASSIO DEJAIR FLEMING DE MORAES

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA VIA WNT/B-CATENINA E DA SINALIZAÇÃO
DE IGF1 NA PROGRESSÃO DO CÂNCER COLORRETAL**

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de
Câncer como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Oncologia

Orientador: Prof. Dr. José Andrés Morgado Diaz

RIO DE JANEIRO
2020

M827a Moraes, Cassio Dejair Fleming de.

Avaliação da interação da via WNT/B-Catenina e da sinalização de IGF1 na progressão do câncer colorretal. / Cassio Dejair Fleming de Moraes. – Rio de Janeiro, 2020. 80f.: il.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2020.

Orientador: Prof. Dr. José Andrés Morgado Diaz

1. Neoplasias Colorretais. 2. Proteínas Wnt . 3. beta Catenina. 4. Receptor IGF Tipo 1. I. Diaz,

Catálogo na fonte
Kátia Simões CRB7/5952



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

CASSIO DEJAIR FLEMING DE MORAES

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA VIA WNT/B-CATENINA E DA SINALIZAÇÃO
DE IGF1 NA PROGRESSÃO DO CÂNCER COLORRETAL**

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Andrés Morgado Diaz

Aprovada em: 03 / 03 / 2020

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Miguel Angelo Moreira - Presidente
Prof. Dr. Mariana Boroni
Prof. Dr. Helena Lobo Borges
Prof. Dr. Marcela Braga Mansur
Prof. Dr. João Alfredo de Moraes Gomes da Silva

RIO DE JANEIRO
2020

AGRADECIMENTOS

Termina mais uma jornada de minha vida, pela qual não passei sozinho. Que, se não fosse pelas pessoas ao meu lado, nada teria sentido. Amigos, família, até pessoas que pareciam não ter nenhum significado. Todas influenciaram de alguma maneira nessa jornada.

Agradeço a toda minha família. Agradeço a meu pai que me ensinou sobre a vida. Se sou o que sou, foi por causa dele. Além de pai, é um amigo e uma mãe. À minha madrinha pelos conselhos e sempre disposta nas horas que mais precisava. À minha irmã que, apesar de mais nova, foi indispensável para conseguir passar por essa fase de minha vida, sempre sorridente e animadora. Agradeço ao meu companheiro de vida, Douglas, pela paciência comigo nesse período tão estressante. Por sempre estar ao meu lado e me incentivar em todas as minhas escolhas.

Agradeço a todos os professores do INCA pela dedicação ao ensino e fazer parte de minha formação. Agradeço a todos os membros do laboratório de Biologia Estrutural. Primeiramente a Dr. Jose Morgado por ter aberto as portas de seu laboratório, dando-me a oportunidade de crescer na pesquisa e ensinado muito do que sei hoje. Ao Wallace, por ter me guiado no início dessa trajetória. A todos os colegas do grupo: Josiane, Renata Ivo, Renatinha, Deiró, Murillo, Jessica, Júlio, Annie, Michele. As meninas do grupo da Etel. A todos os ex-integrantes do laboratório que compartilharam de momentos memoráveis dentro e fora do laboratório. Agradeço a Erika pela parceria dentro e fora do laboratório, pelas idas e faltas (muito mais, por sinal) na academia. E pela ajuda imensa nesses últimos dias antes da defesa

*“Se consegui enxergar longe é porque procurei olhar
acima dos ombros dos gigantes”*

Isaac Newton



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA VIA WNT/B-CATENINA E DA SINALIZAÇÃO
DE IGF1 NA PROGRESSÃO DO CÂNCER COLORRETAL**

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cassio Dejair Fleming de Moraes

O câncer colorretal (CCR) é um dos principais problemas de saúde pública no mundo inteiro. Esse câncer resulta de mutações em oncogenes e genes supressores tumorais, culminando na desregulação de diferentes vias de sinalização responsáveis por eventos como diferenciação, proliferação, migração e sobrevivência. Nesse contexto, a via Wnt/ β -catenina está cronicamente ativa neste tipo de câncer contribuindo para aquisição de um fenótipo maligno. Fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1) também tem um papel proeminente no desenvolvimento desse câncer. A ligação do IGF pode ativar vias intrínsecas de cascatas de sinalização de PI3K. Vários estudos têm investigado de maneira separada ambas vias, no entanto, existem poucos dados mostrando uma interação entre elas, na progressão do CCR. Nesta perspectiva, neste estudo avaliamos se há uma interação da sinalização de IGF1 com a via Wnt/ β -catenina e como essa interação pode contribuir com eventos da progressão tumoral. Para isso, linhagens de CCR (HT-29 e HCT-116) foram cultivadas e tratadas com IGF1 e/ou Wnt3a. Nossos resultados mostram que o tratamento com IGF1, estimulou ativação das vias PI3K e Wnt/ β -catenina. O tratamento com Wnt3a também induziu a ativação de Wnt/ β -catenina e de PI3K, indicando um possível *crosstalk* entre essas vias celulares. Além disso, quando ambas eram ativadas simultaneamente (tratamento combinado de IGF-1 e Wnt3a), foi visto um efeito potencializador na ativação das vias e na migração e proliferação celular. Efeitos que foram revertidos após inibição de LY294002, um inibidor específico de PI3K, sugerindo uma contribuição dessas duas cascatas de sinalização para esses eventos. Esses efeitos foram vistos somente em linhagens que já possuem mutações ativadoras de ambas as vias celulares. Finalmente, as análises de sobrevida indicam que mutações na via Wnt/ β -catenina combinada com alterações em PI3K resultam em um pior prognóstico comparado com mutações em Wnt individualmente, sugerindo que ambas vias agem de maneira conjunta contribuindo para a progressão do CCR. Assim, nossos resultados sugerem possíveis novas combinações de quimioterápicos em cânceres com essas mutações.



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

**EVALUATION OF THE INTERACTION BETWEEN THE WNT/ β -CATENIN
PATHWAY AND IGF1 SIGNALING IN THE PROGRESSION OF COLORECTAL
CANCER**

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION

Cassio Dejair Fleming de Moraes

Colorectal cancer (CRC) is one of the main public health problems worldwide. This cancer results from mutations in oncogenes and tumor suppressor genes, resulting in the dysregulation of different signaling pathways responsible for events such as differentiation, proliferation, migration and survival. In this context, the Wnt/ β -catenin pathway is chronically active in this type of cancer, contributing to the acquisition of a malignant phenotype. Growth factors, such as type 1 insulin-like growth factor (IGF-1), also play a prominent role in the development of this cancer. IGF binding can activate intrinsic pathways of PI3K signaling cascades. Several studies have investigated both ways separately, however, there are few data showing an interaction between them, in the progression of the CCR. In this perspective, in this study we evaluated whether there is an interaction between IGF1 signaling and the Wnt/ β -catenin pathway and how this interaction can contribute to tumor progression events. For this, CRC cell lineages (HT-29 and HCT-116) were cultured and treated with IGF1 and / or Wnt3a. Our results show that treatment with IGF1 stimulated activation of the PI3K and Wnt/ β -catenin pathways. Treatment with Wnt3a also induced the activation of Wnt/ β -catenin and PI3K, indicating a possible crosstalk between these cell pathways. In addition, when both pathways were activated simultaneously (combined treatment of IGF-1 and Wnt3a), a more potent effect was seen in the activation of the pathways and in cell migration and proliferation. Effects that were reversed after inhibition of LY294002, a specific PI3K inhibitor, suggesting a dependence on these two signaling cascades. Surprisingly, these effects were seen only in lineages that already have activating mutations in both cell pathways. Finally, the survival analysis indicates that mutations in Wnt/ β -catenin and Pi3K result in a word prognosis compared to mutations in Wnt alone. Therefore, our findings suggest possible new combinations of chemotherapy drugs in cancers with these mutations.

LISTRA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes	16
Figura 1.2: Modelo da sequência adenoma-carcinoma para CRC.....	19
Figura 1.3: Mecanismos e eventos moleculares que caracterizam a progressão do CCR.	21
Figura 1.4: Subtipos moleculares de CCR.	23
Figura 1.5: Representação Esquemática da via Wnt/ β -catenina.....	26
Figura 5.1 Ativação da via PI3K/AKT/GSK após tratamento com IGF1 em células de CCR	43
Figura 5.2 Ativação da via Wnt/ β -catenina após tratamento com Wnt3a em células de CCR	45
Figura 5.3 Análise da localização subcelular de β -catenina em células de CCR.	46
Figura 5.4 Ativação da via PI3K/AKT após tratamento com Wnt3a e/ou IGF1 em células de CCR.	48
Figura 5.5 Ativação e localização de β -catenina após tratamento conjunto.....	50
Figura 5.6 Ativação da via PI3K/AKT/GSK após tratamento com Wnt3a e/ou IGF1 em células de CCR.	52
Figura 5.7 Ativação da via Wnt/ β -catenina após tratamento com Wnt3a e/ou IGF1 em células de CCR.	53
Figura 5.8 Proliferação celular após tratamento simultâneo de Wnt3a e IGF.	54
Figura 5.9 Quantificação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo.	55
Figura 5.10 Análise do potencial migratório das células HCT-116 e HT-29.	56
Figura 5.11 Efeito da inibição da via PI3K/AKT com LY 294002 na presença de Wnt3a e/ou IGF1 em células HCT-116.....	57
Figura 5.12 Ativação e localização de β -catenina após inibição de PI3K.....	58
Figura 5.13 Análise da capacidade proliferativa e migratória após inibição de PI3K.....	59
Figura 5.14 – Curvas Kaplan-Meier estratificado por mutações.....	61
Figura 6.1 Representação esquemática da proteína APC em diferentes linhagens celulares de CCR.	64
Figura 6.2 Representação esquemática dos resultados encontrados.....	68

LISTRA DE TABELAS

Tabela 4.1: Principais mutações encontradas nas linhagens celulares estudadas. ...	36
Tabela 4.2: Dados clínicos dos pacientes incluídos no estudo.	42
Tabela 5.1: Parâmetros do modelo de risco proporcionais de cox.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AKT – do inglês, *ak strain transforming*
- APC – do inglês, *adenomatous polyposis coli*
- BRAF – do inglês, *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*
- BSA – Albumina sérica bovina
- CK1 – Caseína quinase 1
- Dvl – do inglês, *dishevelled*
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ERK – Quinase regulada por sinal extracelular
- Evi – do inglês, *evenness interrupted*
- GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- Grb2 – do inglês, *growth factor receptor-bound protein 2*
- GSK3 – Glicogênio sintase quinase 3
- IGF – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
- IGFBP – do inglês, *insulin-like growth factor binding protein*
- IRS1 – do inglês, *insulin receptor substrate 1*
- KRAS – do inglês, *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
- LRP – Proteína relacionada com o receptor de lipoproteína de baixa densidade
- MAPK – Proteína-quinases ativadas por mitógenos
- MEK – Quinase ativadora da MAP quinase
- MLH1 – do inglês, *mutL homolog 1*
- MLH6 – do inglês, *mutL homolog 6*
- MSH2 – do inglês, *mutS protein homolog 2*
- mTOR – Alvo da rapamicina nos mamíferos
- NRAS – do inglês, *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*
- PBS – Tampão fosfato-salino
- PDK1 – do inglês, *phosphoinositide-dependent kinase-1*
- PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase
- PIP2 – Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
- PIP3 – Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
- PAF – Polipose adenomatosa familiar
- PTEN – Fosfatase e tensina homóloga

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SH2 – do inglês, *src Homology 2*

SUMO – do inglês, *small Ubiquitin-like modifier*

TCF – do inglês, t-cell factor

TP53 – do inglês, *tumor protein 53*

USP7 – do inglês, *ubiquitin-specific-processing protease 7*

Wnt – do inglês, *wingless*

β -TrCP – do inglês, *beta-transducin repeats-containing proteins*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Epidemiologia do Câncer Colorretal.....	15
1.2. Tipos de CCR.....	17
1.3. Progressão do CCR	18
1.4. Novos subtipos moleculares do CCR.....	22
1.5. Via Wnt/ β -Catenina	23
1.6. Sinalização de IGF1	27
1.7. Crosstalk entre as vias Wnt/ β -catenina e PI3K.....	28
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVO	33
3.1. Objetivo Geral	33
3.2. Objetivos específicos	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. Anticorpos e Reagentes	34
4.2. Cultura de Células.....	34
4.3. Produção de meio condicionado	36
4.4. Tratamento com Wnt3a e IGF1	37
4.5. Extração Proteica e Western Blotting.....	37
4.6. Ensaio de Luciferase.....	38
4.7. Imunofluorescência	39
4.8. Proliferação Celular.....	39
4.9. Ensaio de Migração por Wound Healing	40
4.10. Ciclo Celular.....	40
4.11. Análise Estatística.....	41
5. RESULTADOS.....	43
5.1. Indução da via PI3K/AKT em células de CCR	43
5.2. Indução da via Wnt/ β -catenina em células de CCR.....	44
5.3. Tratamento simultâneo de IGF1 e Wnt3a	47
5.4. Avaliação do tratamento simultâneo com IGF1 e Wnt3a em outras linhagens celulares.....	51
5.5. A ativação simultânea das vias contribui para aumento na migração e proliferação.....	53
5.6. Inibição da via PI3K com LY294002	56

5.7. Curvas de Sobrevivência	60
6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÃO	69
8. REFERÊNCIAS.....	70


1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia do Câncer Colorretal

Representando um problema global de saúde pública, o câncer é uma das causas de morte mais comum do mundo. Em 2018, foram estimados cerca de 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes (BRAY et al., 2018). Dados da GLOBOCAN preveem 29,5 milhões de novos casos para 2040 (FERLAY et al., 2018). Dentre os tipos de cânceres, o câncer colorretal (CCR), é o terceiro mais comum no mundo com 1,8 milhões de casos, e o segundo com mais mortalidade cerca de 881 mil mortes foram estimadas para o ano de 2018 (BRAY et al., 2018).

O CCR pode ser considerado uma doença da modernidade e um marcador de desenvolvimento socioeconômico. Países com os maiores índice de desenvolvimento humano possuem as maiores taxas de incidência, como Estados Unidos, Canadá, Austrália e países da Europa (BRAY et al., 2018). A incidência de CCR dos Estados Unidos nos anos 1900 era baixa, mas aumentou drasticamente com o desenvolvimento econômico do país (CHAN; GIOVANNUCCI, 2010). Nações que atualmente estão passando por desenvolvimento econômico mostram um crescimento na incidência desse tipo de câncer, principalmente por adotarem um estilo de vida ocidental (BRAY et al., 2012).

A nível nacional, o CCR também representa um problema de saúde pública. De acordo com as estimativas do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) no Brasil, esse tipo de câncer é o segundo mais comum entre os homens e as mulheres, com 20.520 e 20470 novos casos estimados para o 2020 , respectivamente (**Figura 1.1**) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e Reto	20.520	9,1%			Cólon e Reto	20.470	9,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%
Cavidade Oral	11.180	5,0%			Glândula Tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema Nervoso Central	5.220	2,3%

* Números arredondados para múltiplos de 10

Figura 1.1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes. Estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma, considerando todas as regiões do Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Cerca de 90% dos casos de CCR acontecem em pessoas com 50 anos ou mais, pois o risco de se ter este tipo de câncer é diretamente proporcional à idade (KEUM; GIOVANNUCCI, 2019). Fatores de riscos que não podem ser prevenidos contribuem para maiores taxas de incidências dessa doença, como histórico de CCR na família ou doenças inflamatórias do intestino que incluem a retocolite ulcerativa e doença de Crohn (KIM; CHANG, 2014). Há também fatores de risco associados ao estilo de vida como ingestão de álcool, obesidade, tabaco e consumo de carnes vermelhas e processadas. A adoção de um estilo de vida mais saudável com aumento na atividade física e consumo de frutas e vegetais estão associados a menores taxas de incidência da doença (JOHNSON et al., 2013).

O diagnóstico do CCR em estágios iniciais contribui significativamente para o prognóstico. A taxa de sobrevivência para esse tipo de câncer quando detectado em estágio inicial é de 90% (MILLER et al., 2016). O método de detecção referência para CCR é colonoscopia preventiva de 10 em 10 anos em pacientes acima de 50 anos (SIMON, 2016). Países subdesenvolvidos apresentam crescimento na taxa de mortalidade deste tipo de câncer, justamente devido à falta de detecção precoce e tratamentos adequados (BRAY et al., 2018). O tamanho, localização e extensão do tumor influenciam na abordagem terapêutica para CCR. A recomendação comum é a retirada de parte do intestino acometido pelo tumor e os gânglios linfáticos, por

cirurgia associada ou não com radioterapia e/ou quimioterapia para evitar a recidiva do tumor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

1.2. Tipos de CCR

O CCR se desenvolve a partir de mutações em oncogenes e genes supressores tumorais que desregulam vias de sinalização relacionadas a processos como proliferação, diferenciação celular, apoptose, angiogênese e invasão. Baseado na origem da mutação, o CCR pode ser classificado em três tipos distintos: **hereditário, familiar e esporádico.**

Cerca de 5% deste tipo de câncer é classificado como **hereditário**. Pacientes com esse tipo de classificação herdam mutações em um alelo de genes importantes para a progressão tumoral. Ao decorrer da vida, mutações pontuais no outro alelo geram uma célula tumoral e conseqüentemente, o carcinoma (MARMOL et al., 2017). A forma hereditária é ainda classificada em duas distintas síndromes: síndromes poliposas e não poliposas (MARMOL et al., 2017). Uma síndrome poliposa bastante comum é a Polipose adenomatosa familiar (PAF), caracterizada pela mutação germinativa na proteína APC resultando numa forma truncada dessa proteína e desregulação da via Wnt/ β -catenina. Pacientes com essa síndrome desenvolvem de centenas a milhares de pólipos intestinais que se não removidos, progridem para o desenvolvimento de um tumor (HALF; BERCOVICH; ROZEN, 2009). Dentre das síndromes não poliposas, a síndrome de Lynch é a mais comum. Ela é causada por mutações germinativas em genes responsáveis pelo reparo de DNA como *MSH2*, *MLH1*, *MLH6* *PMS1* and *PMS2*. Pacientes com síndrome de Lynch possuem predisposição a vários tipos de cânceres, especialmente colón e endométrio (LYNCH et al., 2015).

Cerca de 25% de todos os casos de CCR são classificados como **familiar**. Fatores herdados contribuem para esta classificação, mas o tipo familiar não é classificado como hereditário pois os mecanismos moleculares ainda não foram estabelecidos (MARMOL et al., 2017). Parentes de primeiro grau de pacientes que tiveram CCR possuem de 2 a 4 vezes mais chances de desenvolver este tipo de câncer em comparação com a população geral. Além disso, há evidências de que

este câncer se desenvolve 10 anos mais cedo nesses indivíduos (ARMELAO; DE PRETIS, 2014).

O tipo mais comum em CCR, sendo encontrado em 70% dos pacientes é o tipo **esporádico**. Mutações pontuais, que se acumulam ao decorrer da vida, em oncogenes e genes supressores tumorais contribuem para a iniciação e progressão tumoral. O tipo esporádico se desenvolve a partir distintas vias genéticas que incluem instabilidades cromossômicas (CIN), instabilidade de microsatélite (MSI) e alta metilação de ilhas CpG (CIMP) (YAMAGISHI et al., 2016).

1.3. Progressão do CCR

Avanços em tecnologias de sequenciamento de nova geração permitiu o sequenciamento genômico de diversos cânceres e descobriu-se uma heterogeneidade molecular que contribui para diferentes níveis de sensibilidade à quimioterápicos (DAGOGO-JACK; SHAW, 2018). O conceito de heterogeneidade tumoral pode ser subdividido em heterogeneidade intertumoral e intratumoral. A heterogeneidade intertumoral refere-se a pacientes com o mesmo tipo histológico de um câncer, mas com mutações diferentes. Acredita-se que isto é resultado de fatores específicos de cada paciente como variações genéticas germinativas, diferenças no perfil de mutações somáticas e fatores ambientais (DAGOGO-JACK; SHAW, 2018). Já heterogeneidade intratumoral refere-se a diferenças moleculares em uma mesma massa tumoral, a partir de subpopulações distintas, contribuindo para progressão da doença e resistência terapêutica (HINOHARA; POLYAK, 2019).

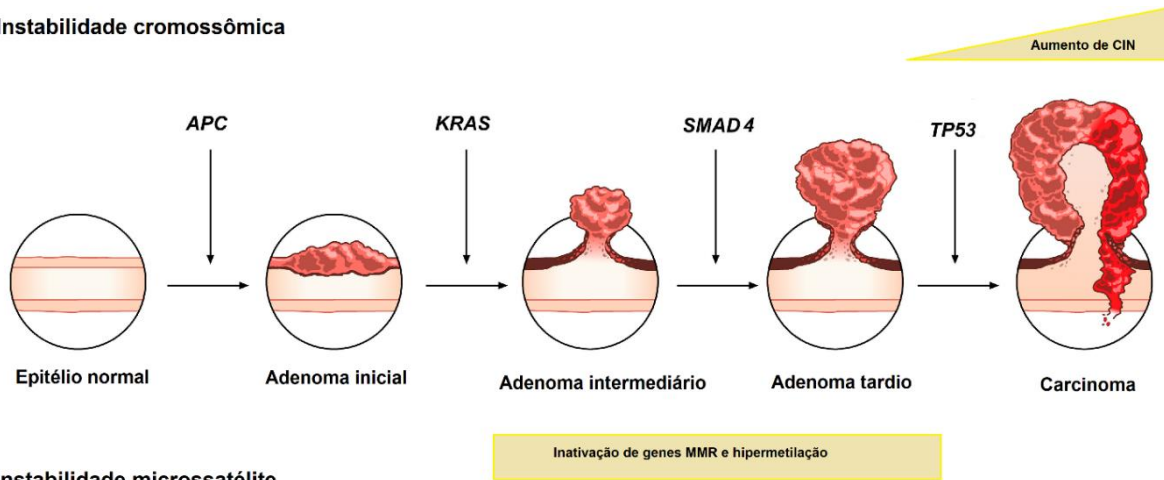
Estudos com sequenciamento de nova geração mostraram que o número de mutações no genoma de CCR é bastante alta, com cerca de 75 mutações. Além disso, esse tipo de câncer é altamente heterogêneo fazendo com que intervenções terapêuticas, tendo alvo em uma aberração molecular, afete poucas subpopulações dentro da massa tumoral (PUNT; KOOPMAN; VERMEULEN, 2017).

Contudo, cerca de 50% dos CCRs segue um modelo clássico de desenvolvimento tumoral, proposto por Vogelstein, que é caracterizado pelo acúmulo de mudanças genéticas e epigenéticas (**Figura 1.2**) (FEARON; VOGELSTEIN, 1990; PUNT; KOOPMAN; VERMEULEN, 2017). A carcinogênese

do CCR apresenta três tipos de alterações genéticas e epigenéticas distintas, mas não mutuamente exclusivas: (i) Instabilidade cromossomal (CIN), com alterações no número e na estrutura dos cromossomos. (ii) Hipermetilação de ilhas CpG, caracterizado por modificações epigenéticas de di-nucleotídeos CG repetitivos (ilhas CpG) em regiões promotoras de genes supressores tumorais, resultando em seu silenciamento. E (iii) instabilidade de microsatélite (MSI) decorrente da perda de genes de reparo de DNA (MMR) e alterações no tamanho dos microsatélites (KEUM; GIOVANNUCCI, 2019).

A transformação do epitélio normal para adenocarcinoma pode levar décadas (GRADY; MARKOWITZ, 2015) e é iniciado pela mutação na proteína APC ou em outros componentes da via *Wnt*/ β -catenina resultando na ativação constitutiva dessa via. Isto leva a transcrição de *c-myc* e *cylin-D1* que gera a manutenção de um fenótipo tronco com alta capacidade clonogênica, fornecendo uma vantagem de sobrevivência (RIEMER et al., 2017).

Instabilidade cromossômica



Instabilidade microsatélite

Figura 1.2: Modelo da sequência adenoma-carcinoma para CRC. Este modelo representa simplificada as alterações clínico-patológicas e anormalidade genéticas frequentemente encontradas durante a progressão do CRC. Adaptada de (DE PALMA et al., 2019).

A progressão é seguida por acúmulo de mutações em outros genes como *KRAS*, *PIK3CA*, *TGF/ β* e *TP53*. Mutações em *KRAS* são vistas em 30-50% dos casos de CCR (CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012) e estão envolvidas na desregulação de MEK e ERK, contribuindo para a proliferação celular. É

importante ressaltar que mutações somente em KRAS não são suficientes para levar a transformação maligna (PAN et al., 2011). Mutações com ganho de função de *PIK3CA* regulam a via AKT/mTOR e promovem proliferação, crescimento e sobrevivência celular (HAMADA; NOWAK; OGINO, 2017). Essas mutações são vistas em cerca de 10-20% dos CCR (CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012) (**Figura 1.3**).

Além de alteração genéticas, eventos celulares e morfológicos também ocorrem. Do ponto de vista morfológico, a progressão do CCR é caracterizada por alterações histopatológicas, onde o epitélio normal se transforma em criptas hiperplásicas, displásicas, adenoma e finalmente adenocarcinoma com posterior formação de metástase (PAN et al., 2011).

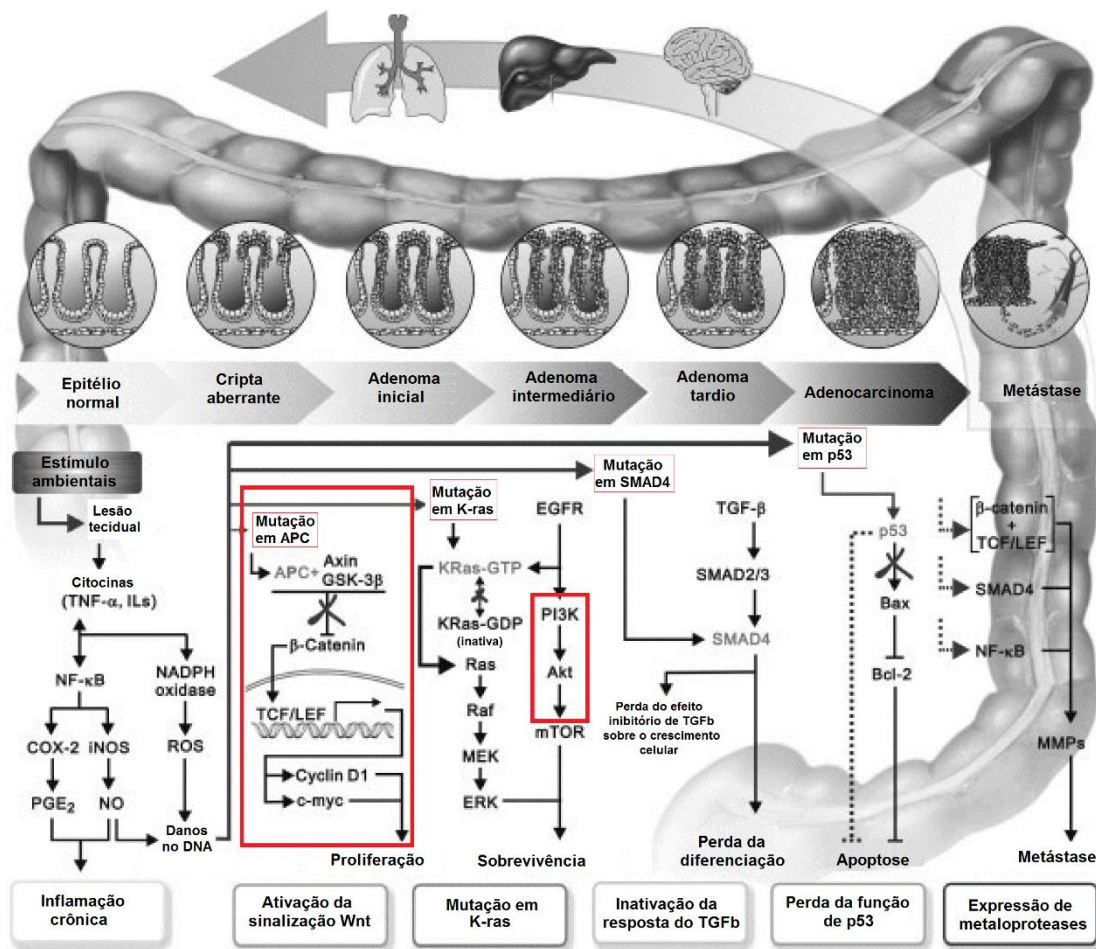


Figura 1.3: Mecanismos e eventos moleculares que caracterizam a progressão do CCR. Danos nos tecidos causados por bactérias, agentes cancerígenos e insulto ambiental resultam em inflamação. Durante a inflamação crônica, as células inflamatórias são recrutadas para os tecidos lesionados e induzem instabilidade cromossômica e danos ao DNA contribuindo para a transformação maligna. O passo inicial na tumorigênese é o a formação de criptas aberrantes, associado à mutação em APC. Acúmulos de mutações em oncogenes adicionais ou genes supressores de tumores, como K-ras, p53 e Smad4, e TGFβ contribuem para progressão. Na figura ressaltamos as que vias de sinalização Wnt/β-catenina e PI3K/Akt desempenham um papel central no desenvolvimento inicial. Adaptado de (PAN et al., 2011).

1.4. Novos subtipos moleculares do CCR

Devido a sua heterogeneidade, e na tentativa de integrar as classificações do CCR, um consórcio internacional, a partir de dados em larga escala e mais de 3000 amostras, identificou similaridades moleculares em subtipos de CCR. Tal consórcio classificou o CCR em 4 subtipos (**Figura 1.4**), aqui denominados como CMS (do inglês, *Consensus Molecular Subtypes*) (GUINNEY et al., 2015).

O CMS1, ou tipo imune, representa 14% dos casos e é caracterizado por mutações em *BRAF V600E*, com infiltrado imune bem presente e alto fenótipo metilador de ilha CpG (CIMP) contribuindo para deficiência no sistema de reparo de DNA com consequente instabilidade de microsatélite (MSI). Apesar de possuir o melhor prognóstico dentre os subtipos, se torna o mais agressivo após recidiva (FESSLER; MEDEMA, 2016). O CMS2 ou subtipo canônico é o mais comum, com cerca de 37% dos casos. Acredita-se que esse subtipo se desenvolve seguindo o modelo clássico de adenoma-carcinoma, pois possui altos níveis de instabilidade cromossomal (CIN) e é iniciado por mutações na via Wnt/ β -catenina (FESSLER; MEDEMA, 2016). O subtipo 3 ou metabólico representa 13% dos casos e é caracterizado por desregulações metabólicas e por possuir um forte componente epitelial. Cerca de 68% das mutações em CCR são encontradas neste subtipo (AGUILERA; SERNA-BLASCO, 2018). O subtipo 4 ou mesenquimal representa 23% dos casos e é o de pior prognóstico. É caracterizado por CIN e alta densidade de células estromais, particularmente os fibroblastos associados ao câncer, contribuindo para eventos de transição epitélio mesenquimal, angiogêneses e remodelamento de matriz (FESSLER; MEDEMA, 2016).

Os subtipos moleculares de CCR também podem ser classificados em cultura celular de CCR e xenoinxertos derivados de pacientes (LINNEKAMP et al., 2018). Além disso, um estudo retrospectivo mostrou que essa classificação pode ser usada como biomarcador de eficácia à quimioterápicos para CCR metastático (OKITA et al., 2018).

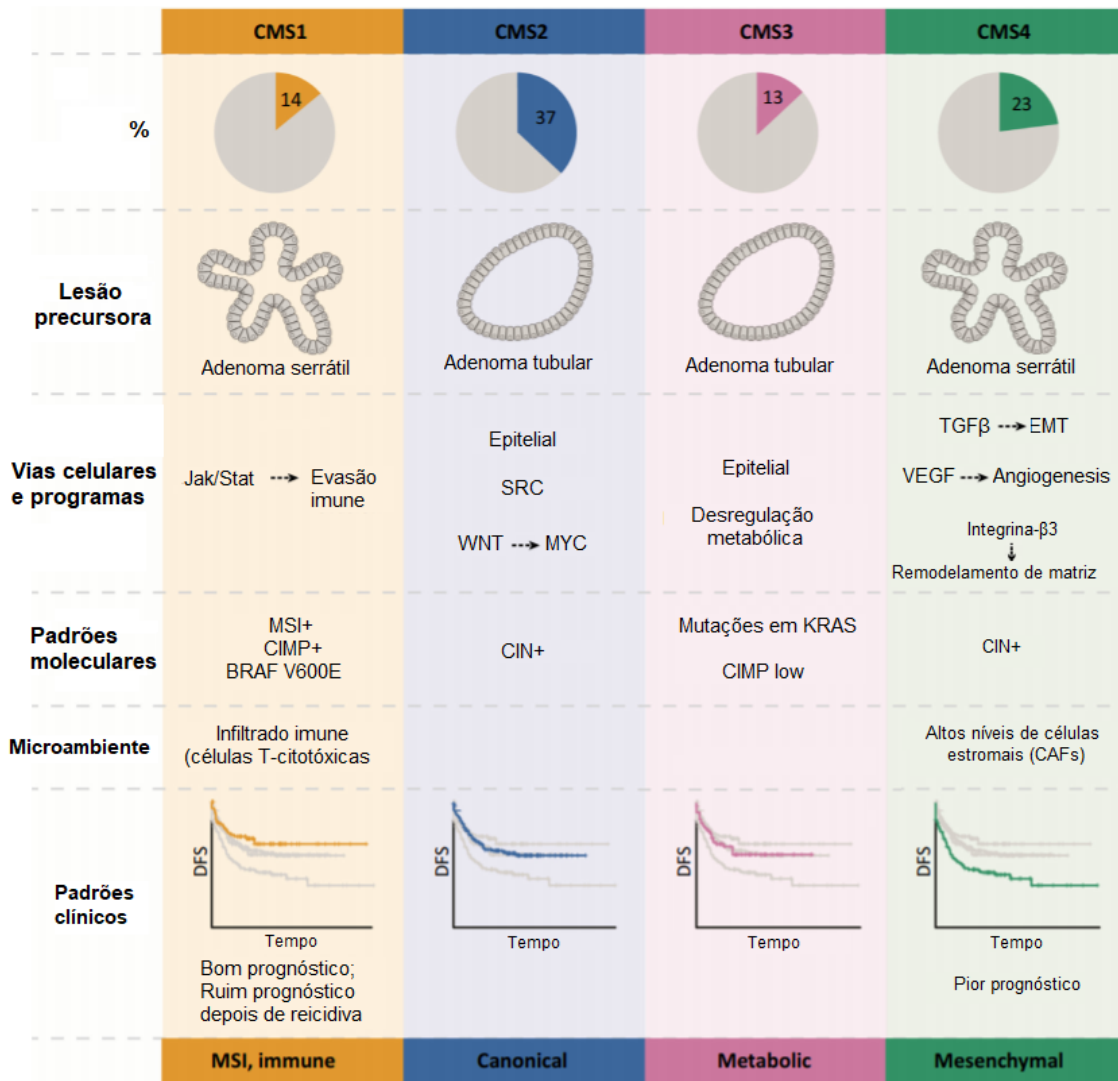


Figura 1.4: Subtipos moleculares de CCR. Cada subtipo molecular constitui um diferente padrão molecular e clínico. Lesões precursoras são associadas ao subtipo baseado na expressão gênica. Vias celulares estão ligadas por setas aos seus eventos celulares relacionados. CAFs, do inglês *cancer-associated fibroblasts*; CIMP, do inglês *CpG island methylator phenotype*; CIN, do inglês *chromosomal instability*; EMT, do inglês *epithelial-mesenchymal transition*; JAK/STAT, do inglês *Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*; MSI, do inglês *microsatellite instability*; TGF, do inglês *Transforming growth factor*; VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*. Adaptado de (FESSLER; MEDEMA, 2016).

1.5. Via Wnt/β-Catenina

A via Wnt/β-catenina é uma das vias importantes para o desenvolvimento e manutenção do fenótipo tronco, e sua desregulação está associada a diversos

canceres, principalmente o câncer colorretal. Cerca de 90% dos pacientes com CCR possuem mutações desreguladoras da via Wnt/ β -catenina (CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012).

O principal componente dessa via é o complexo destrutivo de β -catenina, formado pelas proteínas APC, Axin, CK1 e GSK3. Quando a via não está ativa, o complexo destrutivo rapidamente se liga a β -catenina permitindo que CK1 fosforile a serina-45 dessa proteína, que serve como *primer* para a fosforilação de GSK3 na treonina-41, serina-37 e serina-33 (LIU et al., 2002). Esses resíduos de fosforilação servem como sítio de ancoragem para a proteína E3 ubiquitina ligase β -TrCP, que induz a ubiquitinação e subsequente degradação, via proteassoma, de β -catenina. Nesse caso, TCF se encontra reprimido por Groucho e não há transcrição de genes alvos da via. (NUSSE; CLEVERS, 2017). Por outro lado, após ativação dos receptores Frizzled e LRP5/6 mediado por ligação de proteínas da família Wnt, o complexo destrutivo é sequestrado para a membrana com participação da proteína Dishevelled (Dvl). O complexo na membrana ainda consegue se ligar a β -catenina e fosforilá-la (LI et al., 2012). No entanto, β TrCP não é mais recrutada, resultando no acúmulo de β -catenina fosforilada no complexo destrutivo, saturando-o e inativando-o (LI et al., 2012). β -catenina recém-sintetizada se torna livre no citoplasma, é translocada para o núcleo onde se liga ao fator de transcrição TCF induzindo a transcrição de genes alvos da via (**Figura 1.5**).

Mutações em componentes da via Wnt/ β -catenina também resultam na estabilização de β -catenina e ativação da via. A mutação mais comum, encontrada em cerca de 80% dos pacientes, é a expressão de uma forma truncada de APC (CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012). Essa forma truncada facilita a ligação da de-ubiquitinase USP7 que compete com a E3 ligase β -TrCP. USP7 retira a ubiquitinação de β -catenina e impede que a mesma seja degradada, resultando na ativação da via (NOVELLASDEMUNT et al., 2017). O grau de truncamento de APC influencia no grau de ativação da via. Células com tamanho diferente em APC possuem diferentes, sendo uma forma menor relacionada a menor atividade. (NOVELLASDEMUNT et al., 2017). No entanto, células mutadas em APC ou na própria β -catenina ainda expressam ligantes da via, principalmente Wnt3 e Wnt10b

que são secretadas dependentemente de Evi/Wls. Esses ligantes induzem ativação de Wnt/ β -catenina mesmo na presença de APC ou β -catenina mutados (VOLOSHANENKO et al., 2013). Estudos em organoides de CCR derivados de pacientes mostraram que ativação da via Wnt/ β -catenina a partir de mutação em APC (estimulação oncogênica) ou via ligante (estimulação fisiológica) resultam em repostas transcricionais completamente distintas com prognósticos diferentes (MICHELS et al., 2019).

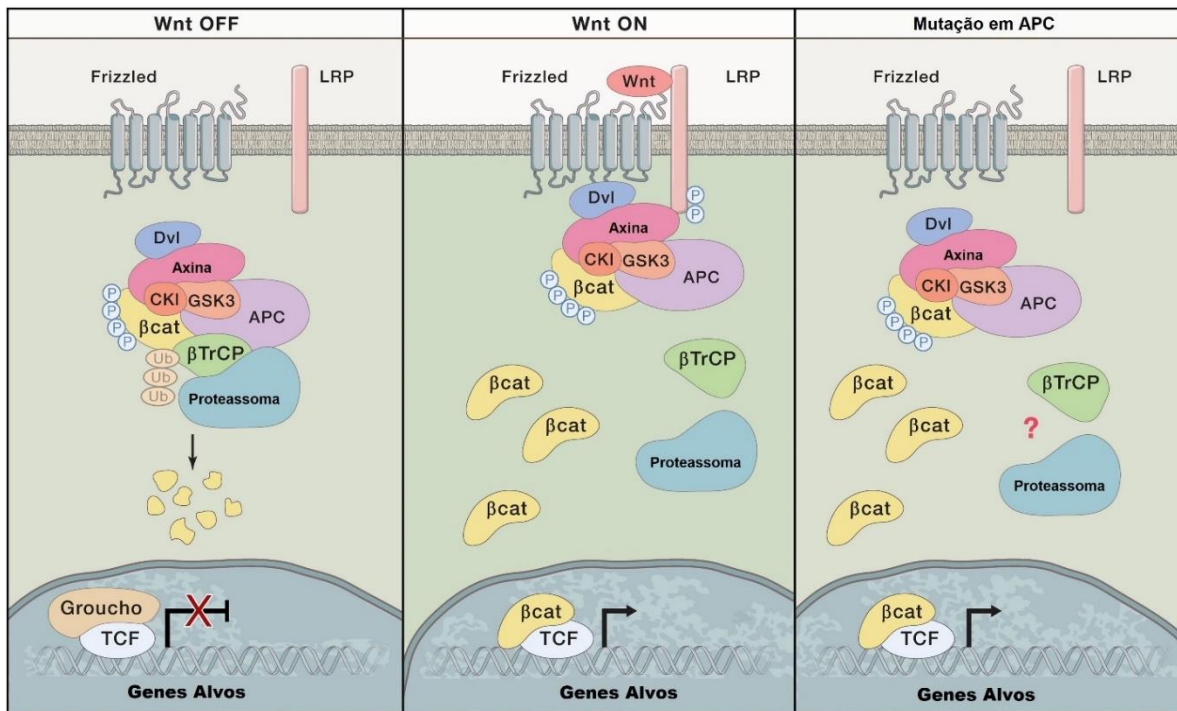


Figura 1.5: Representação Esquemática da via Wnt/ β-catenina. Esquerda – Na ausência de ativação da via, β-catenina é degradada por um complexo de proteínas que inclui Axina, APC e as quinases GSK3 e CK1. Esse complexo fosforila β-catenina em 4 resíduos específicos que servem como sítio de ancoragem para βTrCP que ubiquitina β-catenina e a leva para degradação. Centro – A ligação de Wnt a seus receptores Frizzled e LRP induz o sequestro do complexo para a membrana, evento mediado por Dvl. Na membrana, o complexo destrutivo é incapaz de recrutar βTrCP, levando a estabilização de β-catenina, acúmulo no citoplasma, translocação para o núcleo e ligação a TCF levando a transcrição de genes alvo. Direita – mutações em APC alteram a atividade do complexo destrutivo e levam a transcrição de genes alvo. Adaptado de (NUSSE; CLEVERS, 2017).

A ativação de β-catenina tem sido notada em tumores sem nenhuma mutação em componentes da via Wnt/ β-catenina ou aumento da sinalização de Wnt. Isto sugere que outros fatores podem ser capazes de induzir a ativação dessa via. O tratamento com IGF1, por exemplo, resulta na regulação da localização e estabilidade de β-catenina (PLAYFORD et al., 2000) e na transcrição de genes alvo (DESBOIS-MOUTHON et al., 2001). Além disso, Wnt também ativa outras vias de sinalização em diversos cânceres, resultado de um *crosstalk* entre vias celulares (THOMPSON; NEJAK-BOWEN; MONGA, 2011).

1.6. Sinalização de IGF1

A sinalização de IGF1 tem papel importante no crescimento e desenvolvimento de diversos tecidos, regulando eventos como proliferação, metabolismo, diferenciação e apoptose. Essa via também está implicada no desenvolvimento de diversas doenças, principalmente no câncer (WEROHA; HALUSKA, 2012).

O sistema IGF é composto pelos ligantes IGF1, IGF2, e pelos receptores IGF1R, IGF2R e receptores de insulina (IR). As funções biológicas dos ligantes são mediadas principalmente pelo IGF1R, ativando as vias PI3K e MAPK, e reguladas por pelo menos 6 proteínas de alta afinidade (IGFBP1-IGFBP6) que inibem ou estimulam as ações dos IGFs (ALLARD; DUAN, 2018). A sinalização de IGF1 se encontra desregulada em CCR. IGF2 é visto amplificado em 7% dos pacientes com CCR, culminando na ativação de PI3K. Além disso, cerca de 20% dos pacientes possuem mutações em genes da via de PI3K (*PIK3RI*, *PIK3CA* ou *PTEN*) e 55% em genes da via MAPK (*KRAS*, *NRAS* ou *BRAF*) (CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012).

A ligação de IGF1 no IGF1R resulta na ativação desse receptor que, por sua vez, fosforila substratos *downstream* específicos (**Figura 1.6**), que servem como sítios de ligação para proteínas que contém o domínio SH-2. Essas proteínas incluem Grb2 e a subunidade regulatória p85 de PI3K que então, ativam as proteínas Ras e PI3K, respectivamente. Ras ativado é capaz de fosforilar Raf que por sua vez, ativa MEK. MEK fosforila ERK que então vai para o núcleo, onde regula diversos ativadores transcricionais, induzindo a transcrição de genes envolvidos em processos como metabolismo, crescimento e sobrevivência (HAKUNO; TAKAHASHI, 2018). Em paralelo, após ativação de PI3K, é gerado PIP3 na membrana a partir da fosforilação de PIP2. Esse efeito é regulado pela fosfatase PTEN, que converte PIP3 de volta em PIP2. PIP3 serve como sítio de ligação para a proteína AKT, que é então fosforilada por PDK1 e mTORC2, resultando na ativação dessa proteína. AKT ativada fosforila diversas proteínas alvo que regulam eventos como crescimento celular, sobrevivência e proliferação. Um desses alvos

é a proteína GSK3, que também faz parte da via Wnt/ β -catenina, indicando uma convergência entre essas vias. (FAES; DORMOND, 2015).

Apesar de não possuir sinal de localização nuclear, IGF1R é capaz de translocar ao núcleo e regular sua própria expressão ao se ligar na sua região promotora. A localização nuclear de IGF1R é vista em muitos tumores e está associada à um aumento da atividade da via Wnt/ β -catenina (JAMWAL et al., 2018). Essa translocação é mediada por IGF1 que, após ligação ao receptor, estimula a adição de SUMO-1 na porção citoplasmática do receptor (SEHAT et al., 2010).

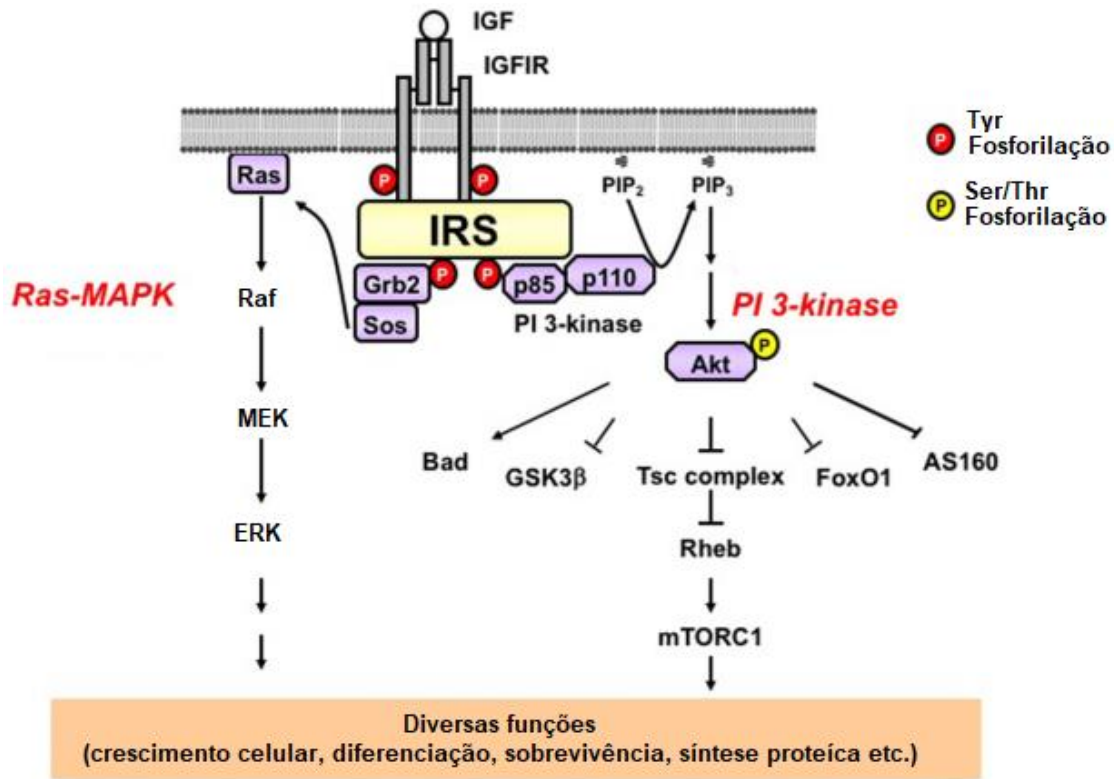


Figura 1.6: Representação esquemática da sinalização de IGF. A ligação de IGF em IGFR resulta na ativação desse receptor e fosforilação de proteínas que contém o domínio SH-2, p85 e Grb2, resultando na ativação das vias *downstream* PI3K/AKT e MAPK, que regulam eventos como crescimento celular, metabolismo e Crosstalk entre as vias Wnt/ β -catenina e PI3K

A participação individual das vias Wnt/ β -catenina e PI3K na progressão do CCR já é bem estabelecida (HAKUNO; TAKAHASHI, 2018; QI et al., 2014). No entanto, alguns estudos mostram que essas vias não agem de forma independente, mas sim interagindo umas com outras contribuindo com a progressão de diversos

tipos de cânceres. Em tumores de células granulosas de ovário, por exemplo, há um efeito sinérgico de PI3K e Wnt/ β -catenina contribuindo para o desenvolvimento e progressão desse tipo de câncer (LAGUË et al., 2008). Além disso, Wnt3a regula a proliferação e apoptose de células pancreáticas envolvendo um *crosstalk* com PI3K (GUI et al., 2013). A interação entre PI3K e β -catenina contribui sinergicamente para o crescimento tumoral e metástase em CCR (DEMING et al., 2014; HARE et al., 2014; ORMANN et al., 2014). Um recente estudo atribuiu esse efeito sinérgico à proteína Deptor, um inibidor de mTOR e alvo direto da via Wnt/ β -catenina (WANG et al., 2018).

A atividade de β -catenina também aumenta a expressão de componentes da sinalização de IGF1, IRS1 por exemplo, tornando células sensíveis a inibidores de IGF1R (BOMMER et al., 2010; LEE et al., 2018a). Por outro lado, o silenciamento de IGF1R, em linhagens de CCR, além de induzir uma redução na atividade da via PI3K, também a reduz a atividade de Wnt/ β -catenina (ZHANG et al., 2015). Alguns estudos mostram que essa interação é mediada por GSK3. Essa proteína é inibida por AKT por mecanismos que envolvem Dvl, resultando na estabilização de β -catenina no complexo destrutivo e consequente ativação da via (FUKUMOTO et al., 2001). No entanto, foi visto em algumas células de câncer de mama e próstata, que GSK3 presente no complexo destrutivo de β -catenina se encontra protegido da fosforilação inibidora mediada por AKT. Portanto, sugere-se que há distintos *pools* de GSK entre as vias PI3K e Wnt/ β -catenina (NG et al., 2009).

Ainda mais, outros autores sugerem que receptores de tirosina quinase contribuem com a via Wnt/ β -catenina por mecanismos independentes de PI3K, mas dependentes da via MAPK (SEHAT et al., 2018). Em células epiteliais intestinais de camundongos, por exemplo, mutações em *KRAS*, *BRAF* ou *MEK1* estão associadas com uma maior atividade transcricional de β -catenina, resultado da fosforilação de LRP6 por ERK1/2 (LEMIEUX et al., 2015). Além disso, GSK3 é capaz de fosforilar as proteínas Ras nos resíduos T144 e T148, resultando no recrutamento de β -TrCP e a degradação de Ras (JEONG et al., 2012). β -catenina se liga diretamente a proteína Ras cobrindo fisicamente esses resíduos e impedindo a degradação dessa proteína (LEE et al., 2018b). Estudos em fibroblastos também mostraram que Wnt3a

pode ativar a via ERK por mecanismos dependentes e independentes de β -catenina (YUN et al., 2005). Apesar de todos esses estudos, os mecanismos por trás da interação ou não dessas vias ainda não é bem estabelecido.

2. JUSTIFICATIVA

O CCR é o terceiro mais incidente na população mundial, apresentando a segunda maior taxa de mortalidade dentre os tipos de câncer (BRAY et al., 2018). Durante o desenvolvimento do CCR, diversas alterações ocorrem nas células tumorais, como a perda de contatos celulares, reorganização do citoesqueleto de actina, aquisição de um fenótipo migratório, aumento da proliferação e a perda da diferenciação celular. Esses eventos estão associados com a ativação crônica de diversas vias de sinalização como a Wnt/ β -catenina e PI3K/AKT (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A via de sinalização de Wnt tem um papel crucial no desenvolvimento embrionário e na manutenção da homeostasia em tecidos maduros, em particular na regeneração do epitélio intestinal. Sua desregulação é vista em cerca de 90% dos pacientes com CCR resultando na ativação constitutiva da via e transcrição de genes associados ao desenvolvimento deste tipo de câncer (SCHATOFF; LEACH; DOW, 2017). Por outro lado, a cascata de sinalização da via PI3K também tem um papel importante na regulação de vários processos celulares necessários para tumorigênese, incluindo sobrevivência, proliferação, e migração celular (FAES; DORMOND, 2015).

Diversas terapias já foram desenvolvidas cujos alvos são componentes das vias Wnt/ β -catenina ou PI3K. Essas vias de sinalização possuem muitas etapas de regulação e muitas vezes interagem entre si, apesar de mostrarem bons resultados em *clinical trials*, a resistência a essas terapias é frequentemente observada (KRISHNAMURTHY; KURZROCK, 2018). Por exemplo, há evidências de que β -catenina nuclear está associada a resistência a inibidores de PI3K e AKT, se fazendo necessário a combinação de tratamentos focando ambas as vias (ARQUES et al., 2016).

Atualmente, sabe-se muito a respeito da participação individual das vias de sinalização PI3K/AKT e Wnt/ β -catenina na progressão do câncer colorretal (FRUMAN; ROMMEL, 2014; QI et al., 2014), e estudos mais recentes vem demonstrando a interação dessas duas vias celulares. Em amostras de pacientes

com CCR, foi relatado um aumento da metástase na presença de β -catenina nuclear e PI3K ativa, indicando um *crosstalk* entre essas duas vias (ORMANNS et al., 2014). Pouco se sabe como essas vias interagem para contribuir na tumorigênese do CCR. Nesta perspectiva, pretendemos investigar a interação entre a sinalização do IGF-1, culminando na ativação da via PI3K/AKT e sua associação na ativação de Wnt/ β -catenina e progressão do câncer colorretal. Além disso, pretendemos esclarecer a mecânica por trás dessa interação para propormos possíveis alvos terapêuticos.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a interação da sinalização de IGF-1 e da via Wnt/ β -catenina em eventos celulares relacionados com a progressão do câncer colorretal.

3.2. Objetivos específicos

- 1- Verificar se o IGF1 estimula a via PI3K nas linhagens celulares estudadas;
- 2- Avaliar o tratamento com Wnt3a sobre a estimulação da via Wnt/ β -catenina nas linhagens celulares estudadas;
- 3- Verificar se as vias celulares PI3K e Wnt/ β -catenina podem interagir na tentativa de identificar componentes das vias que possam estabelecer um *crosstalk* entre elas;
- 4- Determinar se a ativação simultânea das vias resulta em respostas celulares diferentes, tais como na proliferação e migração celular;
- 5- Confirmar as respostas celulares após inibição farmacológica de PI3K com LY294002;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Anticorpos e Reagentes

Os anticorpos monoclonais de coelho anti-pAKT S473, anti-AKT, anti-pGSK S9, anti-GSK, anti-IGF1R e anti-pIGF1R Y1135 foram obtidos da Cell Signaling (Danvers, MA, EUA). O anticorpo monoclonal de camundongo anti-GAPDH foi obtido da Ambion (Carlsbad, CA, EUA). O anticorpo secundário Alexa Fluor® 488 IgG-goat-anti-camundongo foi obtido da Molecular Probes (Eugene, Oregon, EUA). Anti-camundongo e anti-coelho IgG conjugado a HRP foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). O anticorpo de camundongo anti- β -catenina foi obtido da ThermoFisher (Waltham, MA, EUA). O Fator de Crescimento Insulina-*like* do tipo 1 (IGF1) foi obtido da Cell Signaling, reconstituído em 20 mM citrato, pH 3.0 mantido na concentração estoque de 100 μ g/mL e utilizado a concentração final de 100 ng/mL. O ligante Wnt3a recombinante foi obtido da R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA), reconstituído em PBS contendo 0,1% de BSA na concentração estoque de 200 μ g/mL e utilizado na concentração final de 50 ng/mL. O inibidor de PI3K, LY294002, foi obtido da Cell Signaling e diluído em DMSO (dimetilsulfóxido) na concentração estoque de 3 mg/mL sendo utilizado na concentração final de 15 μ g/mL.

4.2. Cultura de Células

Linhagens derivadas de CCR humano foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, EUA). As células HT-29 (ATCC: HTB-28) possuem capacidade invasiva e diferenciação intermediárias e mutações em P53, APC, PI3KCA e BRAF. A linhagem HCT-116 (ATCC: CCL-247) são indiferenciadas, com alto potencial invasivo e metastático, além de crescerem em multicamadas e possuem mutações em KRAS, PI3KCA e no gene CTNNB1, que transcreve a proteína β -catenina (BERG et al., 2017). Também se utilizou as linhagem SW480 (ATCC: CCL-228), Caco-2 (ATCC: HTB-37) e LoVo (ATCC: CCL-229). A **tabela 4.1** mostra as principais mutações encontradas nessas linhagens. As linhagens HT-29, HCT-116 e Caco2 foram cultivadas em meio DMEM *high glucose* (do inglês,

Dulbecco's Modified Eagle Medium - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). A linhagem LoVo foi cultivada em meio F-12 e a linhagem SW480 em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640. Todos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), 60 mg/L de estreptomicina, 100 mg/L de penicilina G (Invitrogen). As linhagens foram mantidas a 37°C em um ambiente com 5% de CO₂. Para a realização dos experimentos, as células foram mantidas em semi-confluência (60-70%) em garrafas T25, lavadas com PBS, tripsinizadas (com 0,05% de tripsina / 0,02% de EDTA - diluídos em PBS); contadas e plaqueadas em baixa densidade em placas de 6, 12, 24 e/ou 96 poços.

Tabela 4.1: Principais mutações encontradas nas linhagens celulares estudadas.

HT-29							
Gene	APC	APC	BRAF	BRAF	PIK3CA	SMAD4	TP53
Tipo de Mutação	Frameshift	Nonsense	Missense	Missense	Missense	Missense	Missense
Troca de aminoácido	p.E1554fs	p.E853	p.V600E	p.T119S	p.P449T	p.Q311	p.R273H
HCT-116							
Gene	CTNNB1		KRAS		PIK3CA		
Tipo de Mutação	Inframe		Missense		Missense		
Troca de aminoácido	p.S45del		p.G13D		p.H1047R		
LoVo							
Gene	APC	APC	APC	KRAS	SMAD2	SMAD6	
Tipo de Mutação	Nonsense	Missense	Frameshift	Missense	Missense	Frameshift	
Troca de aminoácido	p.R1114*	p.R2816Q	p.T1430fs	p.G13D	p.A292V	p.P68fs	
Caco2							
Gene	APC		TP53		SMAD4		
Tipo de Mutação	Nonsense		Nonsense		Missense		
Troca de aminoácido	p.Q1367		p.E204		p.D351H		
SW480							
Gene	KRAS		TP53		APC		
Tipo de Mutação	Missense		Missense		Nonsense		
Troca de aminoácido	p.G12V		p.R273H		p.Q1338		

4.3. Produção de meio condicionado

Para a produção de meio condicionado de Wnt3a, utilizou as linhagens L-Wnt3a (ATCC: CRL-2647) e a linhagem parental L-cells (ATCC: CRL-2648) cedidas gentilmente pelo Dr. José Garcia Abreu do Instituto de Ciências Biomédicas,

Departamento de Anatomia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Essas células foram cultivadas em meio DMEM, e mantidas a 37°C com 5% de CO₂. O meio foi coletado de acordo com instruções do fornecedor. Células em 80% de confluência foram divididas 1:10 em garrafas T75 com 10 mL DMEM e cultivadas por 4 dias. O meio foi coletado, centrifugado por 1000 g por 10 min e filtrado (0,22 µm). Adicionou-se mais 10 mL de meio e cultivou-se as células por mais 3 dias. O meio foi novamente coletado, centrifugado por 1000 g por 10 min e filtrado (0,22 µm). Misturou-se o primeiro e o segundo meio 1:1 e congelou-se para posterior uso. A concentração utilizada nos tratamentos foi de 50% meio condicionado e 50% DMEM.

4.4. Tratamento com Wnt3a e IGF1

Para os tratamentos, as células foram cultivadas com DMEM a 1% SFB *overnight*, um dia antes dos tratamentos. Subsequentemente as células foram tratadas ou com 100 ng/mL de Wnt3a, ou 50% de meio condicionado de Wnt3a, ou ainda 100 ng/mL de IGF1 por 24 horas. Para o tratamento com o inibidor de PI3K, as células foram pré-tratadas com 15 µg/mL LY294002 por 1 hora, antes dos tratamentos respectivos.

4.5. Extração Proteica e Western Blotting

A fim de analisar os níveis proteicos dos componentes das vias de sinalização frente aos tratamentos, utilizou-se a técnica de *Western Blotting*. Para obtenção dos lisados de proteínas totais, as células foram homogeneizadas em tampão de extração RIPA (do inglês, *Radioimmunoprecipitation assay*) contendo: Triton X-100 1% (Sigma); deoxicolato de sódio 0,5% (Reagen – Quimibrás Ind., Brasil); SDS 0,2% (dodecil sulfato de sódio - Invitrogen); Cloreto de sódio 150 mM (Sigma), pH 7,4; fluoreto de sódio 20 mM; ortovanadato de sódio 1 mM (Sigma); e um coquetel de inibidores de proteases (PMSF 1 mM, aprotinina 1 µg/mL, fenantrolina 2,5 µM, leupeptina 10 µM e pepstatina 5 µg/mL - Sigma) durante 30 min a 4°C. O extrato foi centrifugado a 7840 g, a 4 °C durante 10 minutos. Coletou-se o sobrenadante que foi armazenado a – 80 °C. A dosagem do extrato proteico foi feita

utilizando o kit comercial BCA (Bioagency Biotecnologia Ltda, São Paulo, Brasil) e a proteína BSA (Sigma) como padrão. A leitura colorimétrica foi realizada em um comprimento de onda de 562 nm. Lisados proteicos contendo 20 ou 30 µg de proteínas totais de cada amostra foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) empregando o equipamento Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Subsequentemente, foi realizado bloqueio das membranas com BSA 5% diluído em TBS-Tween 0,1% durante 1 hora. Posteriormente as membranas foram incubadas *overnight* com os seguintes anticorpos primários: anti-GSK3β (1:1000), anti-pGSK3β S9 (1:1000), anti-AKT, anti-pAKT S473 (1:1000), anti-IGF1R (1:1000) e anti-pIGF1R Y1135 (1:1000). Somente o anti-GAPDH (1:50.000) foi utilizado pelo período de 1 h. Após sucessivas lavagens, as membranas foram incubadas por 1 h com anticorpos secundários correspondentes, anti-camundongo ou anti-coelho conjugados à peroxidase, na diluição de 1:40000 em TBS-T 0,1%, por 60 min. As membranas foram lavadas com TBS-T 0,1% e o sinal foi detectado por quimiluminescência utilizando o kit ECL (Amersham Biosciences GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, Reino Unido).

4.6. Ensaio de Luciferase

Para detectar a atividade transcricional de β-catenina, utilizou-se ensaio de luciferase, onde 2×10^4 células foram plaqueadas em placa de 12 poços e transfectadas, após 24 horas, com o plasmídeo M50 Super8x TOPflash (Addgene, Watertown, MA, EUA) ou o plasmídeo mutado M51 Super8x FOPflash (Addgene), o qual serve como controle negativo para a atividade. As células foram co-transfectadas transientemente com 2 µg de PRL-TK Renilla luciferase (Promega, Madison WI, EUA). Para a realização da transfecção, foi utilizado o *FuGENE Transfection Reagent* (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) ou Lipofectamine 3000 (ThermoFisher) de acordo com as instruções dos fornecedores. Após um intervalo de 24 horas de transfecção, as células foram lavadas 2 vezes

com PBS, e em seguida submetidas aos tratamentos. No dia seguinte, as células foram lisadas e as atividades renila e luciferase foram ensaiadas usando o *Kit Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega). Utilizou-se o Luminômetro de placas Verita (Tuner Biosystems, Sunnyvale, CA, EUA) para realizar a leitura. A atividade da luciferase foi normalizada pela atividade da Renila luciferase.

4.7. Imunofluorescência

Com o objetivo de avaliar a localização celular de β -catenina, utilizou-se o ensaio de imunofluorescência. Para isso, as células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro na concentração final de 3×10^4 em placa de 12 poços, e após os respectivos tratamentos, lavadas 2 x com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% em PBS/CM (PBS contendo CaCl_2 100 mM e MgCl_2 100 mM, pH 8,0) durante 10 min em temperatura ambiente. As lamínulas foram lavadas em PBS/CM por 15 min, permeabilizadas com 0,2% BSA + 0,1% Triton X-100 em PBS-CM por 30 min em temperatura ambiente e então bloqueadas com 0,2 BSA em PBS por 60 min. Após 2 lavagens de 5 min cada com PBS, incubou-se as lamínulas com anticorpo primário de β -catenina diluído 1:500 em 0,2% BSA em PBS, *overnight* à 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e o anticorpo secundário conjugadas a Alexa fluor 488 (diluição 1:200) foi adicionado por 1 h. As lamínulas foram novamente lavadas (4x) com PBS e incubadas com DAPI por 1 min, lavando em seguida por 4 vezes com PBS. Por fim, as lâminas foram montadas em solução contendo reagente *Antifade Gold ProLong* (Invitrogen). Todas as imagens foram capturadas em microscópio confocal a laser (Fluoview FV10i Overview, Olympus, EUA) e analisadas com o ICY bioimage analysis software. A quantificação nuclear foi realizada utilizando o núcleo das células como seleção, e então quantificando o campo de β -catenina nesta área.

4.8. Proliferação Celular

A proliferação celular foi avaliada de modo indireto pelo crescimento celular e mensurado usando a técnica do corante cristal violeta. As células foram

plaqueadas na concentração final de 2×10^4 em quadruplicatas, em placas de 96 poços e mantidas em 200 uL meio DMEM 10% SFB. No dia seguinte, trocou-se o meio para DMEM 1% SFB *overnight*. As células foram então tratadas com Wnt3a ou IGF1 em meio DMEM 1% SFB por 24h. Após, a monocamada foi lavada 2x com PBS (pH 7,0) e fixada com etanol por 10 min. Em seguida, o corante cristal violeta (20% de etanol + 0,05% de cristal violeta) foi adicionado aos poços contendo as células, durante 10 min. O excesso do corante foi eliminado pela lavagem com água Milli-Q e a eluição do cristal violeta restante foi realizada com metanol por 5 min. A quantificação do crescimento celular foi realizada por espectrofotometria no comprimento de onda de 595 nm, utilizando o leitor de Elisa Spectra Max 190 (Sunnyvale, CA, USA).

4.9. Ensaio de Migração por Wound Healing

As células foram cultivadas em placas de 12 poços em DMEM 10% SFB até atingirem a confluência. 1 hora antes do risco as células foram pré-tratadas com 10 µg/uL de Mitomicina C para inibir a proliferação celular. Posteriormente a monocamada foi submetida a um risco com ponteira estéril. Para cada poço, cinco campos ao longo da extensão do risco foram selecionados, marcados e analisados em microscópio Axio Observer. Z1 equipado com uma Axio Cam HRc e Axio Vision Release 8.2 Image Analyzer (Carl Zeiss, Inc., Jena, Alemanha). Em seguida, as células foram tratadas e incubadas durante 24 h para permitir que as células migrassem pela abertura na monocamada formada pelo risco. As micrografias dos poços foram captadas imediatamente após o risco (0h) e no final do experimento (24 h). A quantificação da migração foi realizada através de medições da área da lesão utilizando o programa ImageJ com o Macro Wound Healing Tool. Os valores de migração celular foram representados como a percentagem de migração (que correspondem ao fechamento da lesão produzida na monocamada).

4.10. Ciclo Celular

Para o analisar as fases do ciclo celular das células após tratamentos, utilizamos citometria de fluxo com Iodeto de Propídio (PI). As células, na quantidade

de 2×10^4 foram cultivadas em garrafas T25 por 24 h e tratadas por mais 24 h. As células foram, então, lavadas em PBS, e centrifugadas por 2 min a 1000 g. O *pellet* foi fixado em 70% etanol frio, gota-a-gota, enquanto era mantido no vortex. O pellet foi mantido em etanol 70% por 30 min a 4°C. As células foram lavadas 2x com PBS e centrifugadas a 850 g por 2min. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 200 uL de PI (50 µg/mL). As células foram então analisadas por citometria de fluxo, analisando os canais FSC e FL3.

4.11. Análise Estatística

Para análise quantitativa dos experimentos, os valores foram calculados a partir de pelo menos três experimentos independentes usando o GraphPad Prism 5.0 (GraphPad TM Software, San Diego, CA, EUA), e imagens representativas foram exibidas. Os testes de normalidade (teste de Shapiro-Wilk e de D'Agostino-Pearson) foram utilizados para determinar se os dados das amostras possuíam distribuição normal usando o software R Project for Statistical Computing versão 3.6.2 (The R Foundation). Para análise não paramétrica, o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn foram utilizados para comparações entre os grupos. Para análise paramétrica, a análise da variância (ANOVA) one-way com pós-teste de Bonferroni foram utilizados para comparações entre grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$. Para as curvas de sobrevivência, dados de pacientes com CCR foram obtidos do website cbioportal.org. Os seguintes estudos foram incluídos: TCGA - Firehose Legacy, MSKCC - Cancer Cell 2018 e CPTAC-2 Prospective - Cell 2019. Dados clínicos e mutações nos genes APC, CTNNB1 e PIK3CA foram incluídos. A **tabela 4.2** mostra alguns dados dos pacientes incluídos no estudo. Casos classificados como alta instabilidade de microssatélite (MSI) foram removidos, pois pacientes com esse fenótipo apresentam sobrevida melhor do que aqueles com MSS, o que poderia influenciar nos resultados (KANG et al., 2018). Apenas mutações drivers foram consideradas pois são as que possuem efeitos biológicos já descritos. As curvas *Kaplan-Meier* foram realizadas no software *R Project for Statistical Computing* versão 3.6.2, com os pacotes *survminer* e *survival*, e aplicadas o teste estatístico

log-rank. O estudo foi ajustado pelo modelo de Cox, estratificado por Wnt *wild-type* ou mutado, com as variáveis idade, localização do tumor e mutação ou não em MAPK (*BRAF* ou *KRAS*)

Tabela 4.2: Dados clínicos dos pacientes incluídos no estudo.

Mutações	Wnt	PI3K	Wnt+PI3K	MAPK
	1030 (60%)	212 (12%)	176 (10%)	713 (41%)
Idade	< 50 anos		> 50 anos	
	1266 (72%)		499 (28%)	
Estágio	I	II	III	IV
	153 (9%)	351 (21%)	451 (27%)	742 (44%)
Localização do tumor	Esquerda	Reto	Direita	
	598 (36%)	526 (32%)	521 (32%)	
Média de Sobrevida	Meses			
	33			

5. RESULTADOS

5.1. Indução da via PI3K/AKT em células de CCR

Para validar nosso modelo de estudo, foi verificado se as células de adenocarcinoma de cólon, HCT-116 e HT-29, responderiam aos tratamentos e ativariam as vias celulares PI3K/AKT e Wnt/ β -catenina. Inicialmente foi confirmado a ativação da via PI3K/AKT a partir da análise da fosforilação de AKT e GSK. A linhagem HCT-116 (**Figura 5.1A**) respondeu ao tratamento com IGF1 aumentando significativamente a fosforilação de AKT em tempos iniciais de 15, 30 e 60 minutos. Esse efeito permaneceu até tempos maiores de 24 e 48 horas. Para os níveis de pGSK – alvo *downstream* de pAKT (HERMIDA; DINESH KUMAR; LESLIE, 2017), foi visto um aumento significativo dessa proteína em 60 minutos apenas. Na linhagem HT-29 (**Figura 5.1B**), observou-se aumento significativo de fosforilação tanto em AKT quanto em GSK em tempos iniciais, se estendendo até 24 e 48 horas, embora com menos intensidade.

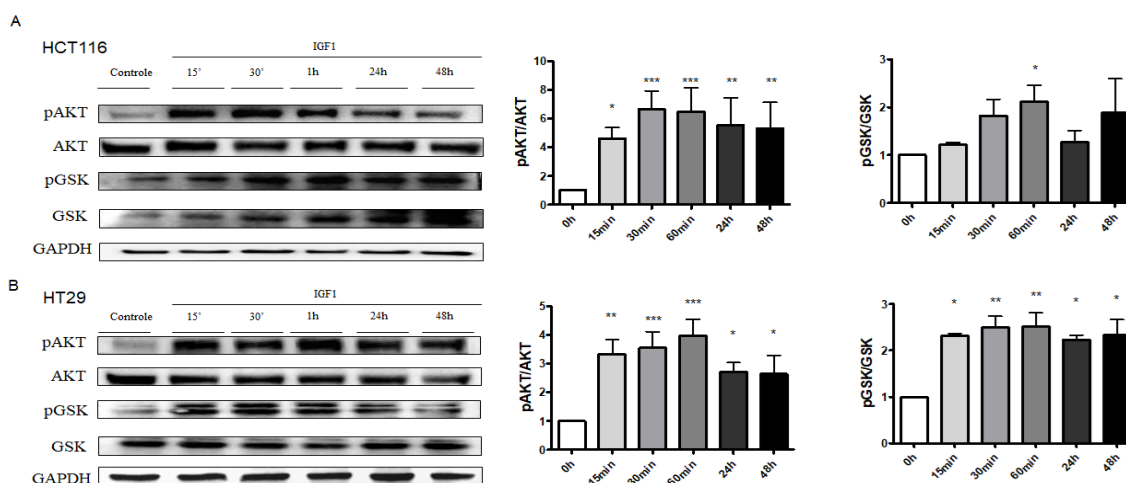


Figura 5.1 Ativação da via PI3K/AKT/GSK após tratamento com IGF1 em células de CCR. Análise dos níveis proteicos por Western Blotting de pAKT, AKT total, pGSK e GSK total, nas linhagens de câncer colorretal (A) HCT-116 e (B) HT-29. GAPDH foi utilizado como controle de proteína constitutiva. Os gráficos representam a densitometria da razão entre a proteína fosforilada e sua forma total, normalizados em relação ao tempo 0 h (controle). Dados representativos da média \pm SEM de três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA e pós-teste Bonferroni. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

5.2. Indução da via Wnt/ β -catenina em células de CCR

A maioria das linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon possui mutações em componentes da via Wnt/ β -catenina tornando essa via constitutivamente ativa. Nesse contexto, avaliou-se também se as linhagens celulares estudadas são responsivas ao tratamento com Wnt3a. O tratamento com meio condicionado rico em Wnt3a ou Wnt3a recombinante induziu um aumento da atividade transcricional de β -catenina, tanto para linhagem HCT-116 (**Figura 5.2A**) como para linhagem HT-29 (**Figura 5.2B**). A ativação da via foi confirmada por imunofluorescência (**Figura 5.3**), onde nota-se que, nas células sem tratamento, β -catenina se encontra majoritariamente presente nos contatos celulares com pequenos focos no citoplasma e núcleo. O ligante Wnt3a estimula a localização de β -catenina no citoplasma e no núcleo, e de fato, as células tratadas com Wnt3a exibiram aumento de focos nucleares e acúmulo citoplasmático quando comparados aos dados relativos ao controle (**Figura 5.3**). Esses resultados indicam que Wnt3a é capaz de ativar a via Wnt/ β -catenina, induzindo o acúmulo de β -catenina no citoplasma e núcleo, mesmo nas linhagens que já possuem mutações ativadores dessa via.

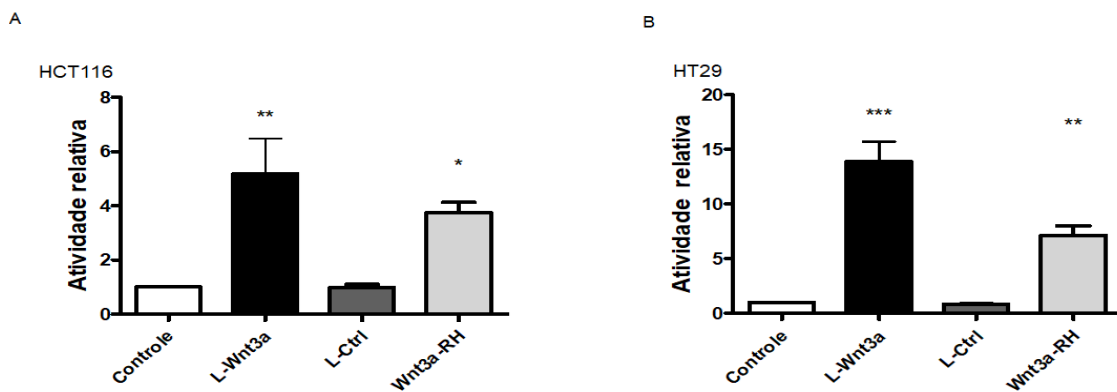


Figura 5.2 Ativação da via Wnt/ β -catenina após tratamento com Wnt3a em células de CCR. Avaliação da atividade transcricional de β -catenina, em linhagens de câncer colorretal (A) HCT116 e (B) HT29. As células foram tratadas com meio condicionado de células L que superexpressam Wnt3a (L-Wnt3a), células L parentais normais (L-Ctrl) e Wnt3a recombinante (Wnt3a-RH) na concentração de 50 ng/uL por 24 horas. A atividade foi normalizada em relação a quantificação da renina e então relação ao controle. Dados representativos da média \pm SEM de três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA e pós-teste Bonferroni. *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001.

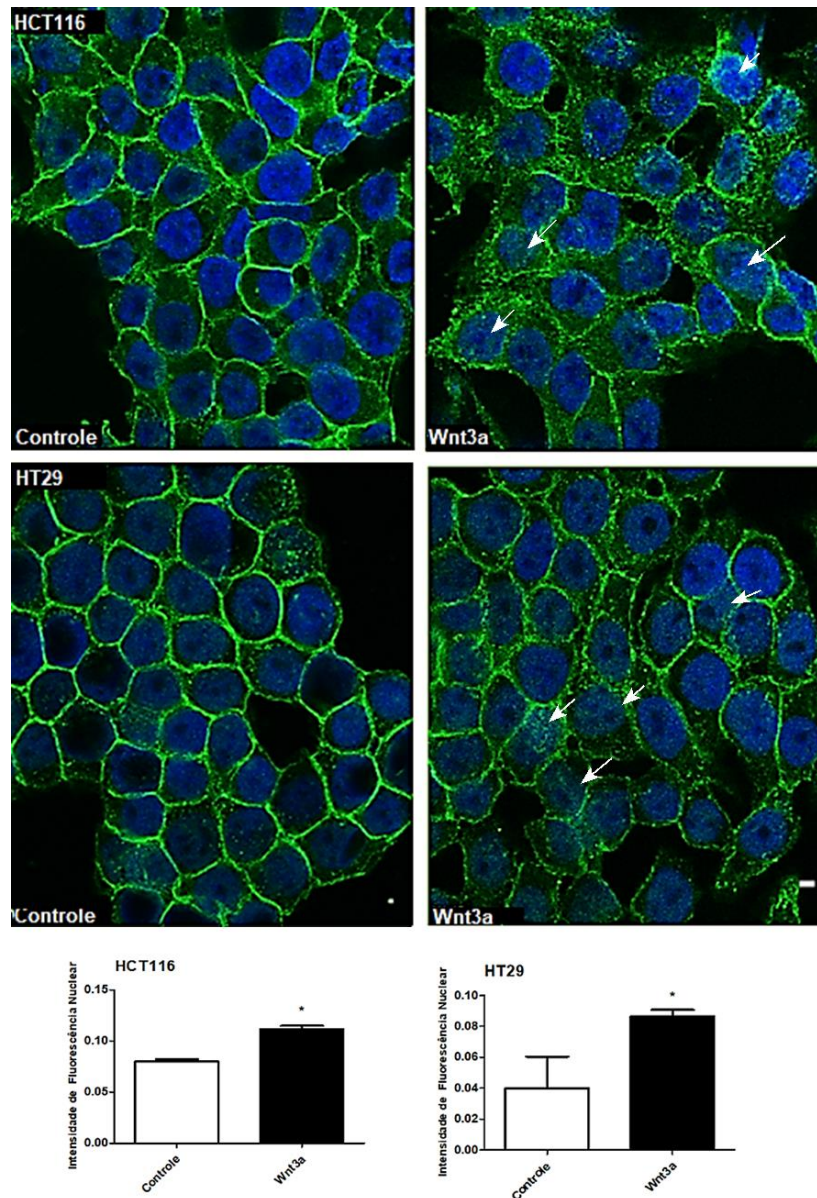


Figura 5.3 Análise da localização subcelular de β -catenina em células de CCR. As linhagens celulares de adenocarcinoma de colón HCT-116 e HT-29 foram cultivadas em lamínulas de vidro até confluência de 70%, tratadas por 24 h, incubadas *overnight* com anticorpo primário de β -catenina (verde) e analisadas por microscopia confocal. A quantificação da intensidade de fluorescência nuclear foi mensurada no *software Icy*. As setas representam locais com alta marcação nuclear. Dados representativos da média \pm SEM de três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA e pós-teste Bonferroni. * $P < 0,05$.

5.3. Tratamento simultâneo de IGF1 e Wnt3a

Após validar nosso modelo de estudo, o próximo passo foi verificar se a ativação simultânea dessas vias resultaria em efeitos diferentes. Alguns estudos já mostram um sinergismo na progressão tumoral quando a via PI3K/AKT e a via Wnt/ β -catenina se encontram ativadas concomitantemente (LAGUË et al., 2008; ORMANNS et al., 2014). Para isto, as linhagens celulares foram tratadas com Wnt3a, IGF1 ou ambos os tratamentos simultaneamente. Foi observado em ambas as linhagens (**Figura 5.4A**) que, IGF1 foi capaz de estimular a fosforilação de AKT e GSK, como visto anteriormente. Além disso, foi observado que Wnt3a também estimulou a fosforilação de AKT e GSK, individualmente. A ativação simultânea das vias resultou em uma fosforilação ainda mais exacerbada de AKT na linhagem HT-29. Vale destacar que a ativação do receptor IGFR foi notado apenas no tratamento com IGF1, indicando que Wnt3a age aumentando a fosforilação de AKT via outro receptor.

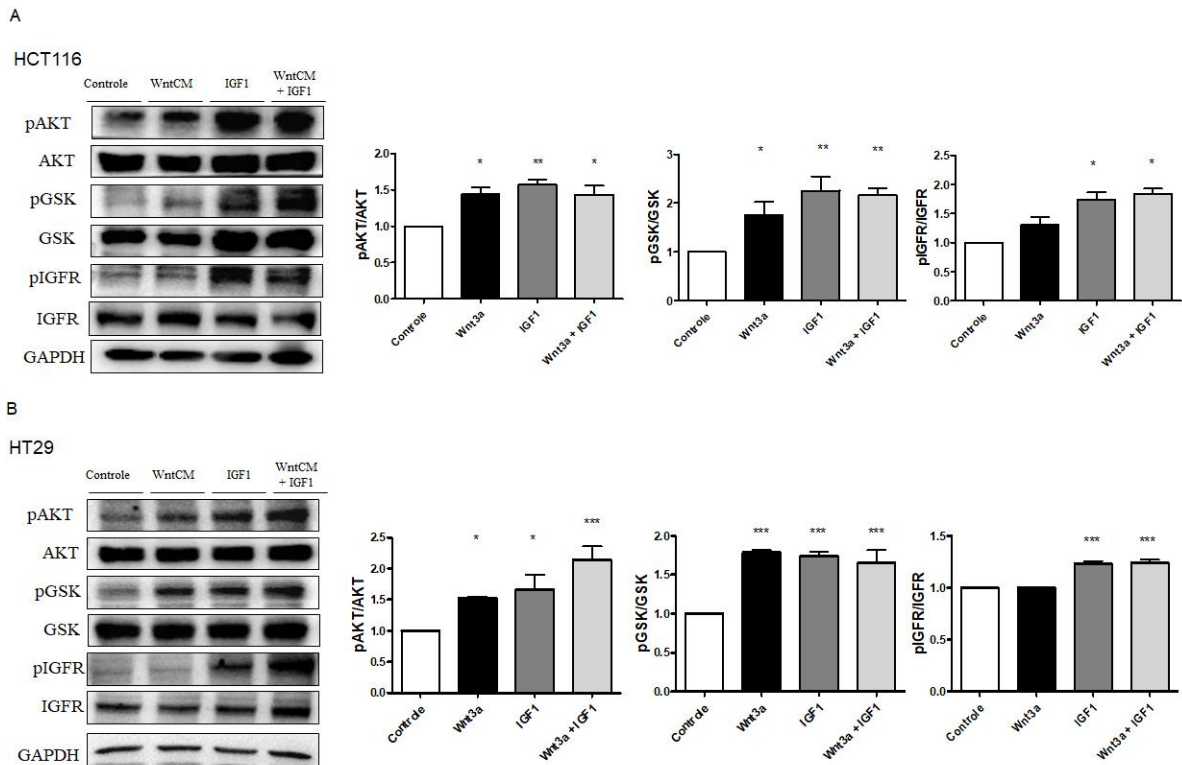


Figura 5.4 Ativação da via PI3K/AKT após tratamento com Wnt3a e/ou IGF1 em células de CCR. Análise dos níveis proteicos por Western Blotting de pAKT, AKT total, pGSK, GSK total, pIGFR e IGFR total nas linhagens de câncer colorretal (a) HCT-116 e (b) HT-29. GAPDH foi utilizado como proteína constitutiva. Os gráficos representam a densitometria da razão entre a proteína fosforilada e sua forma total, normalizados em relação ao controle. Dados representativos da média \pm SEM de três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA e pós-teste Bonferroni. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

Subsequentemente, decidimos avaliar se o tratamento em conjunto alterava a via Wnt/ β -catenina. Como esperado, Wnt3a foi capaz de estimular a ativação da via tanto na linhagem HCT-116 como na linhagem HT-29 (**Figura 5.5A**). Surpreendentemente, foi notado um aumento na atividade transcricional de β -catenina após tratamento individual de IGF1 em relação ao controle. Além disso, o tratamento em conjunto potencializou a ativação da atividade luciferase, quando comparado com os tratamentos individuais. Esses resultados foram confirmados por imunofluorescência (**Figura 5.5B**). Nota-se que o tratamento com Wnt3a leva à translocação de β -catenina das membranas celulares para o núcleo e o citoplasma. Essas conclusões também foram vistas na condição com IGF1, porém menos

evidentes. A ativação simultânea de PI3K/AKT e Wnt/ β -catenina atua de maneira mais acentuada na translocação subcelular de β -catenina.

Todos esses resultados mostram que IGF1 é capaz de ativar, não somente PI3K/AKT, mas também em algum caminho, a via Wnt/ β -catenina. Esse efeito também é visto para Wnt3a, onde este ligante é capaz de ativar tanto Wnt/ β -catenina como PI3K, indicando um *crosstalk* entre as vias Wnt/ β -catenina e PI3K/AKT. Além disso, foi visto que quando ambas vias celulares estão ativadas simultaneamente, há um efeito potencializador, contribuindo para uma ativação ainda maior das vias de sinalização.

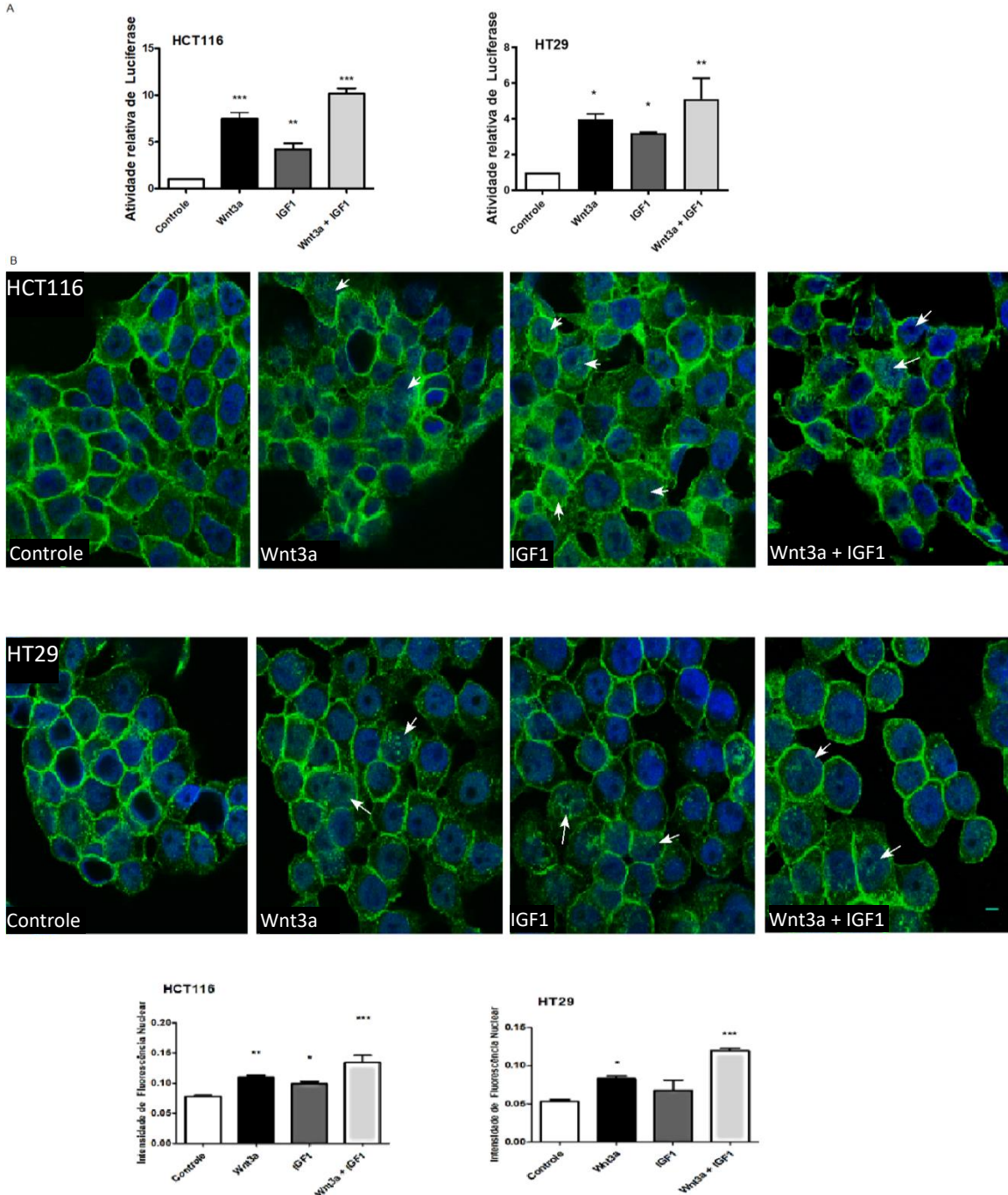


Figura 5.5 Ativação e localização de β -catenina após tratamento conjunto. (A) Avaliação da atividade transcional de β -catenina, pelo ensaio de Luciferase. A atividade foi normalizada em relação ao controle. Dados representativos da média \pm SEM de três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA e pós-teste Bonferroni. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$. **(B)** Imunofluorescência de β -catenina (em verde) das linhagens celulares HCT-116 e HT-29 após tratamento com Wnt3a, IGF1 ou o tratamento em conjunto. DAPI foi utilizado para marcação nuclear (em azul).

5.4. Avaliação do tratamento simultâneo com IGF1 e Wnt3a em outras linhagens celulares

Foi observado, nos resultados anteriores, uma certa variação de resposta entre HT-29 e HCT-116. Para verificar em mais detalhes se este esse efeito poderia ser célula específico, outras linhagens celulares de CCR (LoVo, Caco2 e SW480) foram utilizadas.

Com relação a via de sinalização PI3K/AKT, foi visto que a ativação dessa via varia entre as células (**Figura 5.6**). Por exemplo, na Caco-2, todos os tratamentos induziram fosforilação de AKT, mas não de GSK. Nas células LoVo houve fosforilação de AKT apenas com o tratamento com Wnt3a. Com relação a pGSK, foi visto aumento de fosforilação quando essa linhagem era tratada ou com Wnt3a individualmente, ou em combinação com IGF1. Já para a linhagem SW480, a fosforilação de AKT foi observada aumentada somente no tratamento combinado, enquanto para pGSK, houve aumento de fosforilação após o tratamento combinado ou IGF1 individualmente.

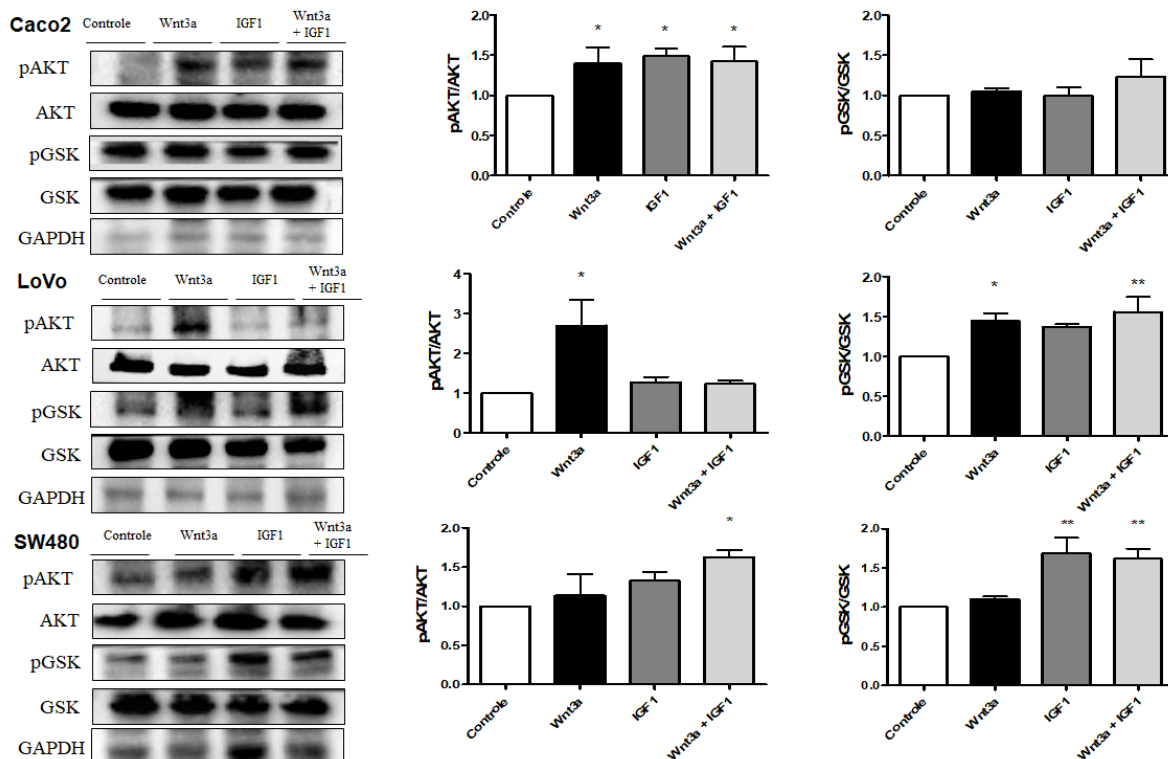


Figura 5.6 Ativação da via PI3K/AKT/GSK após tratamento com Wnt3a e/ou IGF1 em células de CCR. Análise dos níveis proteicos por *Western Blotting* de pAKT, AKT total, pGSK e GSK total nas linhagens de câncer colorretal Caco2, LoVo e SW480. GAPDH foi utilizado como proteína constitutiva. Os gráficos representam a densitometria da razão entre a proteína fosforilada e sua forma total, normalizados em relação ao controle. Dados representativos da média \pm SEM de três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA e pós-teste Bonferroni. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

Houve também variação de atividade para a via de sinalização Wnt/ β -catenina frente a esses tratamentos. Como visto na **figura 5.7**, na linhagem Caco2, apenas o tratamento com Wnt3a foi capaz de aumentar a atividade transcricional de β -catenina. Para SW480 e LoVo, esse efeito foi visto em todos os tratamentos, sem diferença estatística entre o individual ou em conjunto. Nota-se ainda que as linhagens HT-29 e HCT-116 foram as mais sensíveis aos ligantes e resultaram numa ativação ainda maior da via.

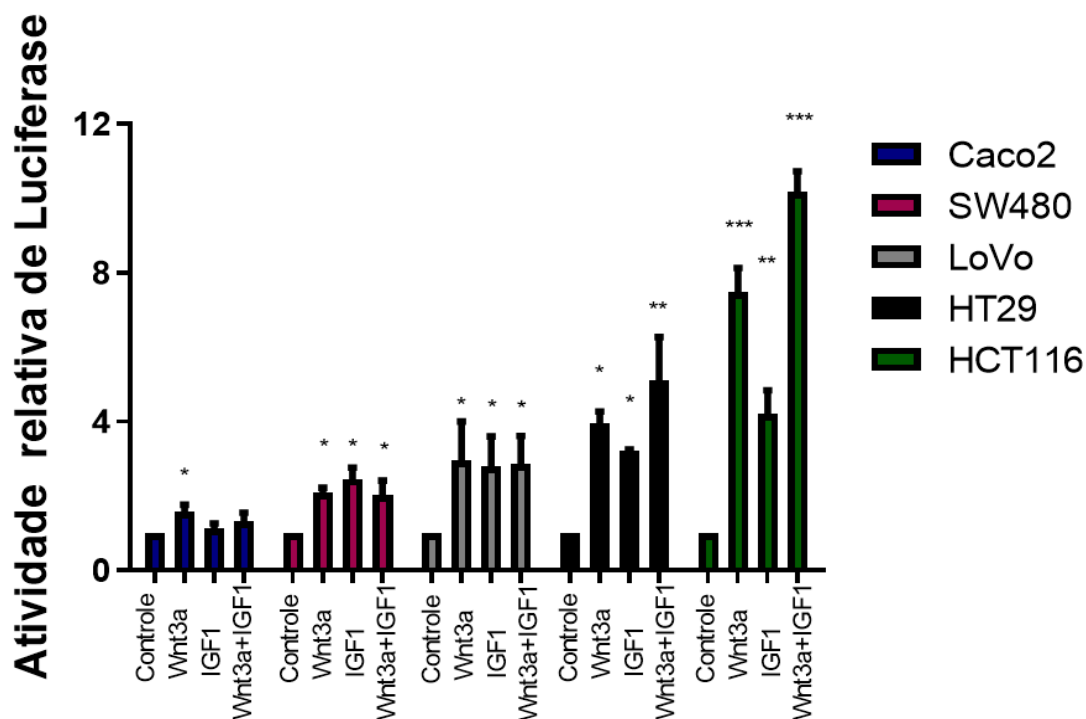


Figura 5.7 Ativação da via Wnt/ β -catenina após tratamento com Wnt3a e/ou IGF1 em células de CCR. Avaliação da atividade transcricional de β -catenina, pelo ensaio de Luciferase nas linhagens de câncer colorretal Caco2, SW480, LoVo, HT-29 e HCT-116. A atividade foi normalizada em relação ao controle. Dados representativos da média \pm SEM de três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA e pós-teste Bonferroni. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

5.5. A ativação simultânea das vias contribui para aumento na migração e proliferação

Em seguida, foi determinado como a ativação simultânea das vias estudadas impactariam no fenótipo maligno das linhagens celulares. Inicialmente foi analisado a proliferação celular (**Figura 5.8**). A ativação das vias individualmente levou a um aumento na proliferação celular. Wnt3a se mostrou mais efetivo na linhagem HCT-116, e IGF1 na linhagem HT-29. Isto mostra uma diferente contribuição das vias de sinalização em relação as linhagens celulares analisadas. A combinação de tratamentos levou a uma proliferação maior quando comparada com os tratamentos individuais, indicando um efeito potencializador dessas vias celulares.

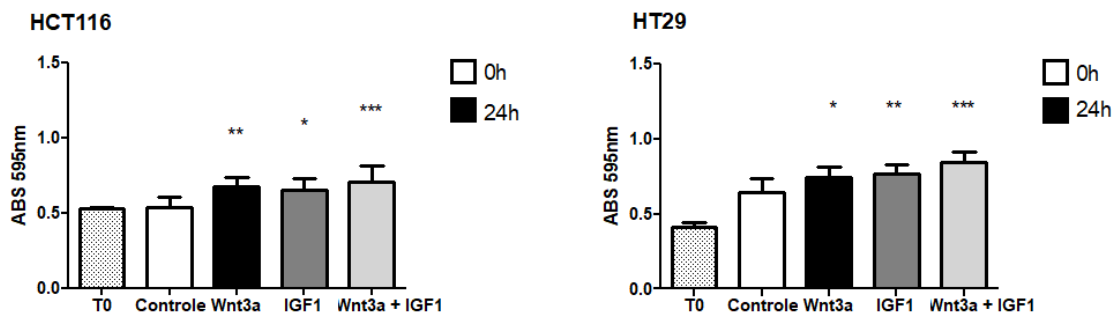


Figura 5.8 Proliferação celular após tratamento simultâneo de Wnt3a e IGF. Análise da capacidade proliferativa das linhagens HCT-116 e HT-29 realizada pelo ensaio de Cristal Violeta. A proliferação foi normalizada em relação ao controle. T0 representa as células sem tratamento no tempo 0. Dados representativos da média \pm SEM de três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA e pós-teste Bonferroni. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

Como foi observado alteração na proliferação celular, o próximo passo foi determinar se existia alguma alteração do ciclo celular. Como a linhagem HCT-116 se mostrou a mais sensível aos tratamentos nos experimentos anteriores, analisou-se por citometria de fluxo a alteração do ciclo celular dessa linhagem. Verificamos que todos os tratamentos induziram uma redução de células em fase G1 com consequente aumento para fase S e G2 (**Figura 5.9**).

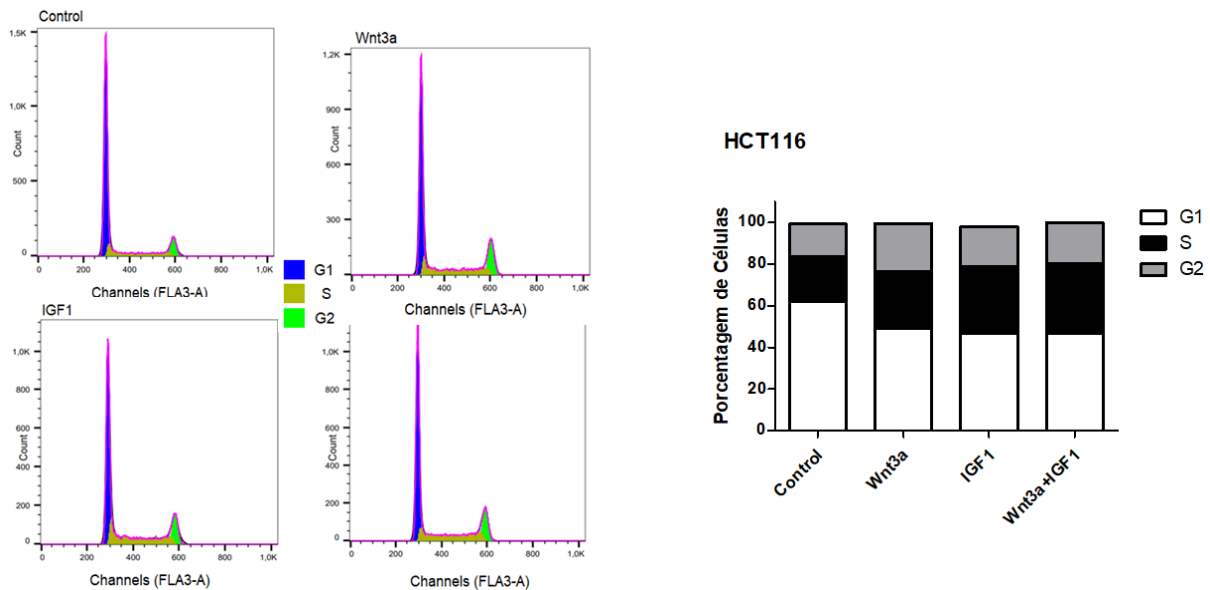


Figura 5.9 Quantificação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo. Determinação quantitativa de fases do ciclo celular nas células HCT-116 após os tratamentos com Wnt3a, IGF1 ou ambos. Dados representativos de dois experimentos independentes.

Em continuidade, foi observado o efeito dos tratamentos na migração celular (**Figura 5.10**). A ativação conjunta estimula um maior potencial migratório dessas células. Esses efeitos foram vistos tanto na linhagem HCT-116, como na linhagem HT-29. Juntos, esses dados demonstram que há um possível efeito potencializador entre as vias PI3K e Wnt/ β -catenina, contribuindo para um aumento na proliferação e migração celular.

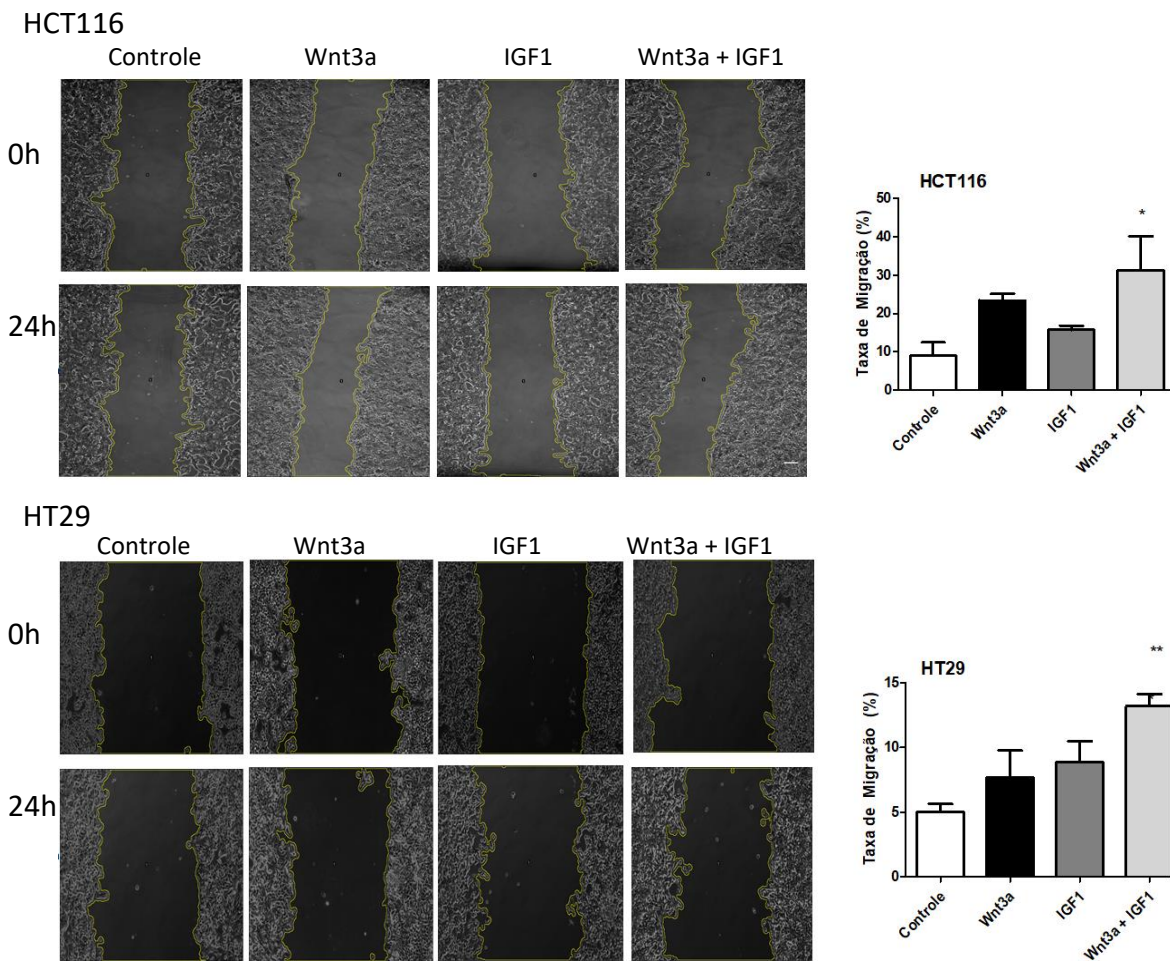


Figura 5.10 Análise do potencial migratório das células HCT-116 e HT-29. As linhagens celulares foram cultivadas até atingirem a confluência. Um risco com ponteira estéril de 10 uL foi feito e então, aplicou-se o tratamento por 24 h. As células foram pré-tratadas com Mitomicina-C por 1h. Dados representativos da média \pm SEM de três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA e pós-teste Bonferroni. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

5.6. Inibição da via PI3K com LY294002

Para desmembrar o mecanismo por trás deste efeito potenciador quando ambas as vias estavam ativadas, foi utilizado um inibidor potente e específico para PI3K – LY294002 (LIU et al., 2019). A **figura 5.11** mostra que o LY294002 foi capaz de reverter o aumento da fosforilação de AKT e GSK após tratamento com IGF1 assim como no tratamento combinado de IGF1 com Wnt3a, como visto na **figura 5.4A**. No entanto, nota-se que LY294002, não possui efeito na atividade induzida por Wnt3a, indicando que esse ligante induz a fosforilação de AKT e GSK por mecanismos independentes de PI3K.

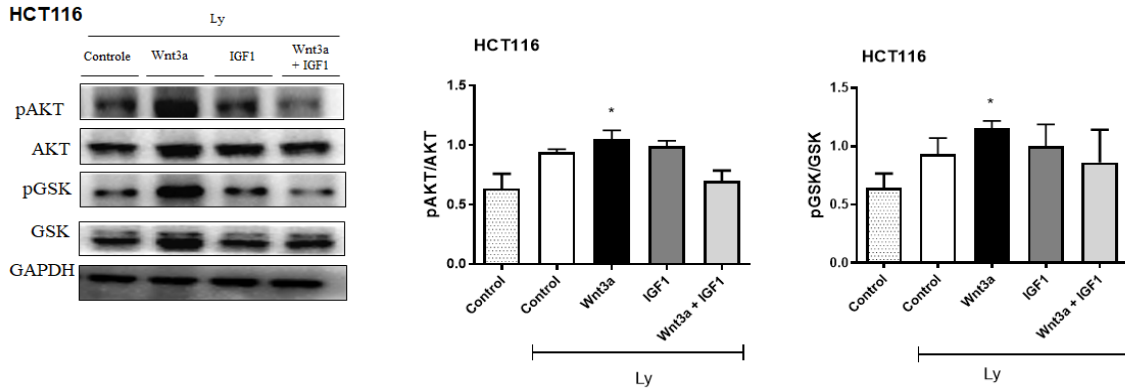


Figura 5.11 Efeito da inibição da via PI3K/AKT com LY 294002 na presença de Wnt3a e/ou IGF1 em células HCT-116. Análise dos níveis proteicos por *Western Blotting* de pAKT, AKT total, pGSK e GSK total na linhagem HCT-116. As células foram pré-tratadas com LY294002. GAPDH foi utilizado como proteína constitutiva. Os gráficos representam a densitometria da razão entre a proteína fosforilada e sua forma total, normalizados em relação ao controle. Dados representativos da média \pm SEM de três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA e pós-teste Bonferroni. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

Em continuidade, avaliamos como estaria a atividade da via Wnt/ β -catenina após inibição de PI3K (**Figura 5.12A**). Nossos resultados mostram que o LY294002 foi capaz de inibir a ativação transcricional de β -catenina vista anteriormente nos tratamentos com Wnt3a e IGF1 (Ver **Figura 5.5**). É importante notar que esta inibição foi mais potente no tratamento com Wnt3a. Curiosamente, o uso do inibidor no tratamento simultâneo de Wnt3a e IGF aumentou mais ainda a atividade de β -catenina.

Para corroborar a atividade luciferase, a localização subcelular de β -catenina foi analisada por imunofluorescência (**Figura 5.12B**). De fato, o uso de LY inibiu a translocação de β -catenina para o citoplasma e núcleo no tratamento com Wnt3a, e menos evidente, com IGF1. No entanto, o tratamento em conjunto mais o inibidor de PI3K induziu um aumento da localização de β -catenina no citoplasma e núcleo.

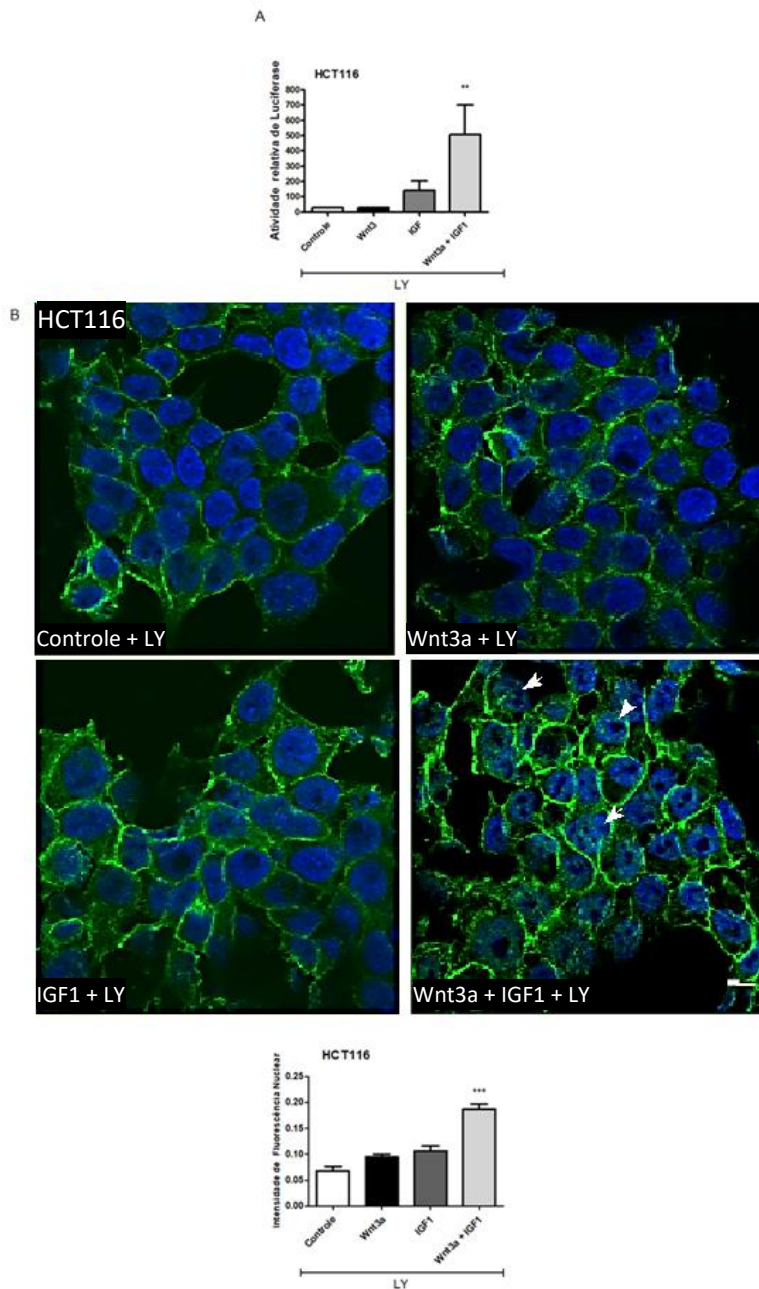
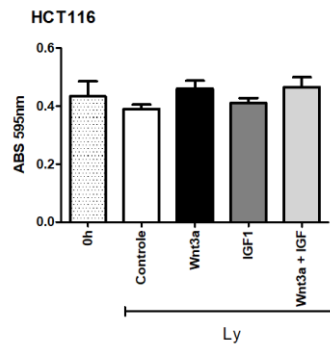


Figura 5.12 Ativação e localização de β -catenina após inibição de PI3K. (A) Avaliação da atividade de β -catenina. A atividade foi normalizada em relação a renina e ao controle. Dados representativos da média \pm SEM de três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA e p normalizado pelo pós-teste Bonferroni. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$. **(B)** Imunofluorescência de β -catenina (em verde) das linhagens celulares HCT-116 após pré-tratamento com LY294002 e tratamento com Wnt3a, IGF1 ou o tratamento em conjunto. DAPI foi utilizado para marcação nuclear (em azul).

Em continuidade, foi analisado como o inibidor atuaria na potencialização encontrada anteriormente em relação a proliferação e migração celular (ver figuras 5.8 e 5.10, respectivamente). Interessantemente, como visto na **Figura 5.13A-B**, o LY294002 foi capaz de inibir a capacidade proliferativa e migratória em todos os tratamentos. Em conjunto, esses resultados indicam um possível *crosstalk* entre as vias Wnt/ β -catenina e PI3K e um efeito potencializador em eventos como migração e proliferação quando ambas as vias se encontram ativadas simultaneamente.

A



B

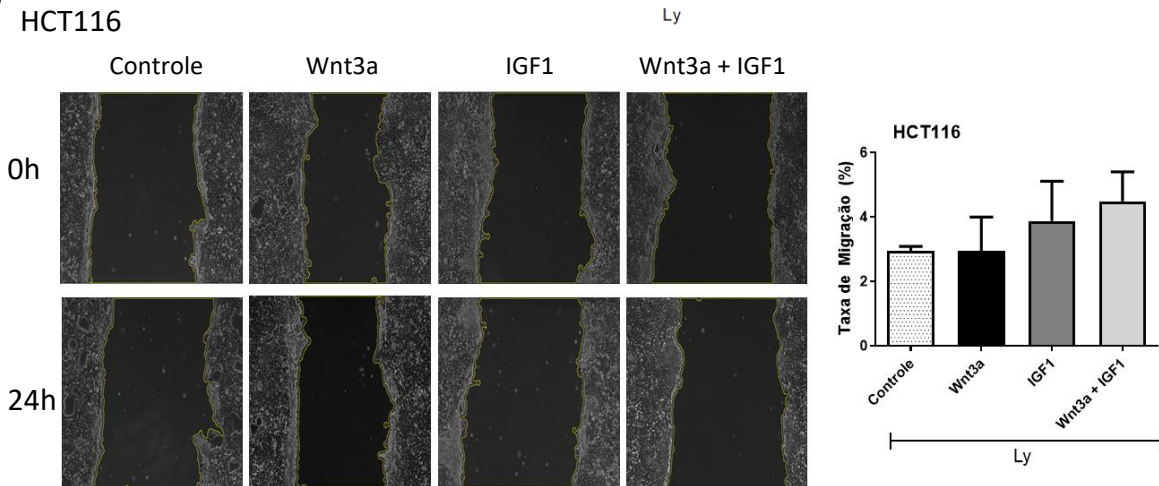


Figura 5.13 Análise da capacidade proliferativa e migratória após inibição de PI3K. Avaliação da proliferação celular de HCT-116 realizada pelo ensaio de Cristal Violeta. A proliferação foi normalizada em relação ao controle. **(B)** Investigação do potencial migratório de HCT-116 após inibição de PI3K. As células foram pré-tratadas com Mitomicina-C por 1h. Dados representativos da média \pm SEM de três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA e pós-teste Bonferroni. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

5.7. Curvas de Sobrevivência

Para analisar o perfil mutacional das vias Wnt/ β -catenina e PI3K, casos de pacientes de CCR disponíveis publicamente foram obtidos. Surpreendentemente, nossos dados sugerem que casos com mutações na via Wnt/ β -catenina, mas não em PI3K apresentam uma sobrevida melhor do que aqueles que não possuem mutações na via Wnt (**Figura 5.14**). Quando estratificados em relação ao status mutacional de PI3K e controlando para Wnt mutado, observa-se uma pior sobrevida em pacientes com ambas mutações simultaneamente. Esses resultados sugerem que pacientes com ambas vias desreguladas concomitantemente apresentam um pior prognóstico do que aqueles com apenas a via Wnt desregulada. Outras variáveis podem estar interferindo na sobrevida e mascarando os resultados. Para contornar isto, a análise de regressão pelo modelo cox foi utilizada. As covariáveis idade, estágio do câncer, localização do tumor, mutações em BRAF ou KRAS e se a amostra era proveniente de tumor primário ou metástase foram levadas em consideração. Ainda assim, nossos resultados sugerem uma maior taxa de risco para pacientes com ambas mutações simultaneamente.

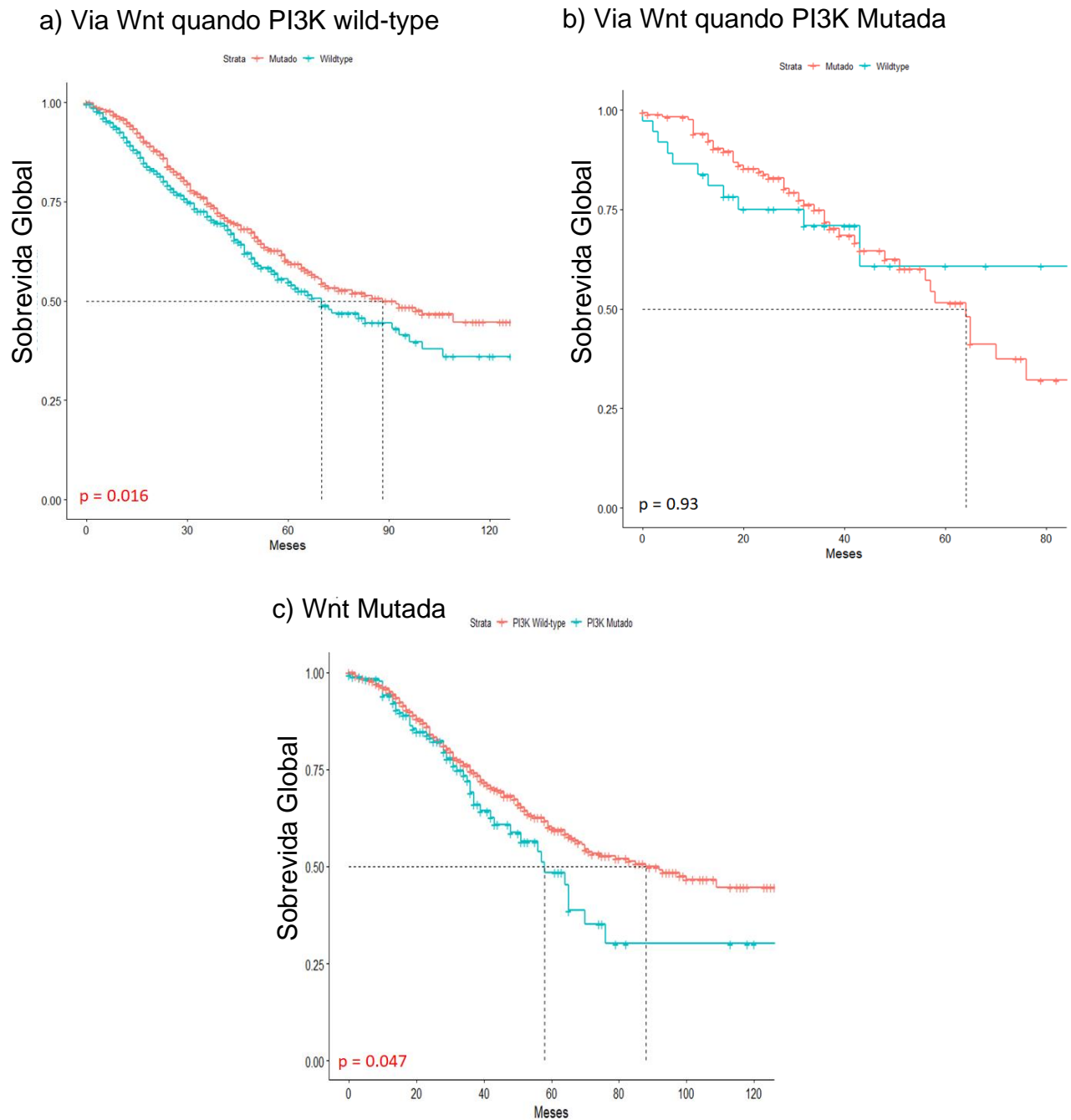


Figura 5.14 – Curvas Kaplan-Meier estratificado por mutações. Diferentes curvas de sobrevivência de acordo com o status mutacional da via Wnt- β -catenina (vermelho mutada e azul wild-type) quando a via *PI3K* se encontra (a) não mutada e (b) mutada. em pacientes com CCR. Os dados foram baixados do cbiportal.org e as curvas de sobrevida foram realizadas no software R Project for Statistical Computing versão 3.6.2, com os pacotes survminer e survival. Número de casos quando *PI3K* wild-type: 1030 para Wnt mutado e 695 para Wnt wild-type. Quando *PI3K* mutado: 176 para Wnt mutado e 36 para Wnt wild-type. A análise estatística foi realizada pelo teste log-rank.

Tabela 5.1: Parâmetros do modelo de risco proporcionais de cox.

Covariáveis		PI3K Wild-type		PI3K Mutado	
		RR (95% IC)	Valor <i>p</i>	RR (95% IC)	Valor <i>p</i>
Idade	-	1.0 (1.0 - 1.0)	0.0089	1.0 (0.9 - 1.0)	0.137
Estágio	II	1.2 (0.6 - 2.2)	0.6012	#	0.995
	III	2.5 (1.3 - 4.6)	0.0028	#	0.995
	IV	4.3 (2.4 - 7.9)	< 0.001	#	0.995
Localização	Reto	1.4 (1.1 - 1.8)	0.0130	1.1 (0.6 - 2.3)	0.687
	Direita	1.5 (1.2 - 2.0)	< 0.001	1.2 (0.6 - 1.8)	0.941
BRAF ou KRAS	Mutado	1.6 (1.3 - 2.0)	< 0.001	1.2 (0.6 - 2.2)	0.550
Valor <i>p</i>		< 0.001		0.18	
		n = 1410	384 eventos	n = 205	64 eventos

RR= Risco relativo; IC= intervalo de confiança; # RR não pode ser calculado pois não houve eventos para estágio de referência

6. DISCUSSÃO

O desenvolvimento do CCR envolve várias vias de sinalização que regulam eventos como proliferação, sobrevivência e diferenciação celular. Por causa da complexidade do sistema biológico, mais de uma via de sinalização participa da progressão da doença. Essas vias podem convergir à uma proteína comum, resultando em um *crossstalk* (WANG; SHI; LV, 2017). Neste contexto, as vias Wnt/ β -catenina e PI3K possuem papel fundamental na progressão do CCR, além de possuírem GSK3 β como proteína de convergência (PANDURANGAN et al., 2018). Pouco se sabe como essas vias interagem para contribuir com a tumorigênese do CCR. Nesse sentido, avaliar a interação entre a via PI3K/AKT e sua associação com a ativação de Wnt/ β -catenina na progressão do CCR se torna importante.

Inicialmente, buscou-se validar o modelo de estudo, verificando se as linhagens celulares estudadas responderiam aos tratamentos com Wnt e IGF1 e ativariam as respectivas vias Wnt/ β -catenina e PI3K/AKT. Com relação a via PI3K/AKT, é importante ressaltar que as linhagens celulares HT-29 e HCT-116 já possuem mutações em *PI3KCA*, nos resíduos P449T e H1047R, respectivamente (AHMED et al., 2013). Os resultados demonstraram que na ausência de IGF1, não há níveis detectáveis de fosforilação de AKT e GSK, mas após o tratamento, ocorre um aumento da fosforilação dessas proteínas. Isso sugere que as mutações em *PI3KCA* não levam a ativação constitutiva da via independente de ligante. De fato, esse efeito já foi visto para diferentes linhagens de CCR (MORROW; GRAY; DIVE, 2005). Sugere-se que PTEN possui papel dominante nesse efeito, pois reverte PIP3 em PIP2 e desloca a atividade de PI3KCA para mecanismos independentes de AKT (VASUDEVAN et al., 2009).

No epitélio intestinal normal a secreção dos ligantes da via Wnt/ β -catenina se dá pelas células que compõem o microambiente das criptas intestinais. Já nas células tumorais esses fatores são produzidos na própria célula e podem agir de maneira autócrina (VOLOSHANENKO et al., 2013). Mesmo na presença de mutações em β -catenina ou APC, visto na maioria das linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon, essas células ainda dependem da sinalização receptor-ligante para sua sobrevivência (VOLOSHANENKO et al., 2013). A linhagem HCT-

116 possui mutação em *CTNNB1*, gene que codifica a proteína β -catenina. Essa mutação é a alteração do aminoácido S33, impedindo assim a fosforilação desse aminoácido necessário para a degradação da proteína via. A linhagem HT-29, por sua vez, expressa uma forma truncada de APC formando um complexo destrutivo pouco funcional, impedindo também a degradação de β -catenina (**Figura 6.1**) (BERG et al., 2017). Nossos resultados mostram que, corroborando a literatura, após tratamento com meio condicionado de Wnt3a ou Wnt3a recombinante, as linhagens estudadas aumentaram a localização nuclear de β -catenina e sua atividade transcricional, ou seja, ainda permanecem dependentes do ligante.

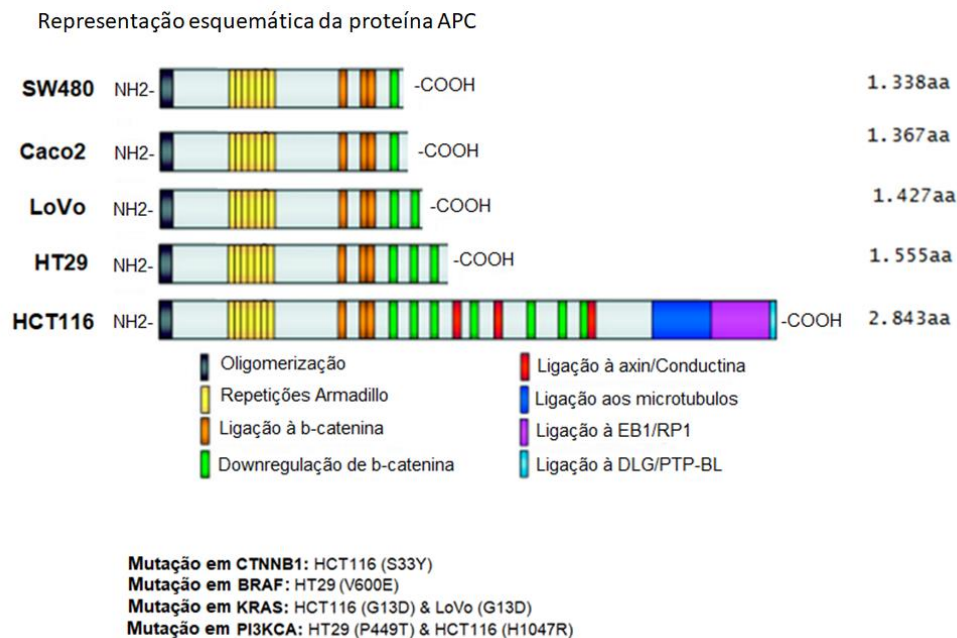


Figura 6.1 Representação esquemática da proteína APC em diferentes linhagens celulares de CCR. Mutações na proteína APC nas linhagens SW480, Caco2, LoVo, HT-29 e HCT-116. HCT-116 expressa uma forma *wild-type* da proteína, mas apresenta mutação no gene *CTNNB1* que codifica β -catenina. Além disso, é mostrado outras mutações de vias celulares importantes. Adaptado de (GASPAR; FODDE, 2004; VOLOSHANENKO et al., 2013).

Apesar de alguns autores sugerirem que a via PI3K/AKT não está envolvida com a via Wnt/ β -catenina (DING; CHEN; MCCORMICK, 2000; NG et al., 2009), nossos dados obtidos após os tratamentos individuais com IGF1 e Wnt3a demonstraram um *crossstalk* entre essas vias. Corroborando nossos dados, estudos

em células que superexpressam Wnt mostram um aumento na fosforilação e ativação de AKT (FUKUMOTO et al., 2001; KIM; LEE; CHOI, 2007). Nossos dados também evidenciam um efeito potencializador na ativação das vias após tratamento simultâneo de IGF1 e Wnt3a. De fato, estudos já mostram que quando ambas as vias estão ativadas concomitantemente, há um efeito potencializador na progressão tumoral, tanto em tumor de ovário (LAGUË et al., 2008) quanto em CCR (ORMANNS et al., 2014). Portanto, sugere-se que um *crosstalk* entre as vias pode contribuir no potencial tumorigênico destes tipos de canceres.

Após tratamento de IGF1 e/ou Wnt3a em outras linhagens de CCR, verificou-se que os efeitos variam entre as linhagens. As linhagens HT-29 e HCT-116 foram as mais sensíveis aos tratamentos e onde foi observado o efeito potencializador. Curiosamente, essas linhagens são as únicas que possuem mutações em ambas as vias estudadas. Nossos resultados demonstram de forma inédita que mutações em *PIK3CA* e *APC* ou *CTNNB1* devem estar presentes simultaneamente para que o efeito potencializador mediado por ligantes ocorra.

Um dos *hallmark* dos cânceres é a proliferação celular anormal e as moléculas IGF1 e Wnt possuem papel fundamental neste processo a partir da ativação de vias de transdução de sinais ou pela regulação de proteínas associadas ao ciclo celular (YU; ROHAN, 2000; ZHAN; RINDTORFF; BOUTROS, 2016). Nossos dados mostram um aumento da proliferação celular após tratamento individual de Wnt3a ou IGF1. Ainda mais, foi observado que Wnt3a se mostrou mais efetivo na linhagem HCT-116 e IGF1 na linhagem HT-29, sugerindo uma diferente dependência de vias de sinalização entre as linhagens. Essa variação pode ser explicada pela abundância de receptores específicos (NIEPEL et al., 2014). O ensaio de ciclo celular confirmou a taxa de proliferação aumentada. Há uma maior proporção de células na fase S e G2 após tratamento, em comparação com o controle.

A migração celular é um processo essencial na progressão tumoral. Estudos com silenciamento de PI3K ou inibição farmacológica dessa proteína mostram que PI3K regula a migração celular por ligação direta de proteínas a seus produtos lipídicos ou indiretamente por meio de um *crosstalk* com a via das Rho GTPases

(CAIN; RIDLEY, 2009). A via Wnt/ β -catenina também contribui para esse processo a partir da redistribuição de E-caderina, rearranjo do citoesqueleto de actina e elevação de proteínas da família Rho (IWAI et al., 2010). Desse modo, avaliamos como estava a migração das linhagens celulares após ativação dessas vias. Nossos resultados demonstraram que quando ambas vias eram ativadas simultaneamente, havia uma migração celular maior em comparação ao controle, indicando um efeito potencializador. Em concordância, dados na literatura mostram, de fato, o sinergismo entre mutações na via Wnt/ β -catenina e PI3K no desenvolvimento de cânceres intestinais (DEMING et al., 2014).

Para confirmar se o *crosstalk* e o efeito potencializador observados nos resultados eram dependentes da via PI3K, foi utilizado o LY294002, um potente inibidor específico de dessa proteína (LIU et al., 2019). Com relação a via Wnt/ β -catenina, nossos resultados mostraram que essa via é dependente de PI3K, pois uma vez inibida a atividade transcricional e localização subcelular de β -catenina é diminuída. Surpreendentemente, o uso do inibidor no tratamento simultâneo aumentou ainda mais a atividade dessa proteína. Estudos já mostram uma interação da via Wnt/ β -catenina com a via das MAPK (PEARSON; PHESSÉ; CLARKE, 2009). Uma provável hipótese para explicar este resultado seria que o LY esteja deslocando a ativação de IGF1 para a via das MAPK, que quando em combinação com Wnt3a esteja induzindo essa maior atividade. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese. Com relação a via Wnt/ β -catenina, nossos dados sugerem que Wnt3a estimula a fosforilação de AKT e GSK3 β por mecanismos independentes de PI3K. Um estudo em células RAW264.7 e HEK293 mostrou que Wnt3a estimula a ativação de ROCK e fosforila diretamente GSK3 β , dependente da via não-canônica de Wnt (KIM et al., 2017).

O uso de LY reverteu a proliferação e migração aumentadas induzidas pelos tratamentos com Wnt3a e IGF-1, tanto no tratamento individual, como no tratamento em conjunto. Isso sugere que essas vias agem cooperando para a progressão tumoral de maneira conjunta, e não de forma individual. Nossos resultados estão de acordo com estudos na literatura. Em câncer de ovário foi visto um efeito sinérgico entre as vias Wnt/ β -catenina e PI3K/AKT na progressão e desenvolvimento desse

tipo de câncer (LAGUË et al., 2008). Estudos em CCR também demonstrou um sinergismo entre essas vias (DEMING et al., 2014).

De forma geral, nossos resultados indicam um *crosstalk* entre as vias PI3K e Wnt/ β -catenina (**Figura 6.2**). Wnt3a induz fosforilação de AKT e GSK de forma independente de PI3K. IGF1 também é capaz de estimular a via Wnt/ β -catenina. Quando ambas vias são ativadas simultaneamente, ocorre potencialização das vias, aumento de proliferação e migração celular. Esses efeitos são revertidos após inibição de PI3K. Mais estudos são necessários para verificar a participação de vias adicionais neste efeito potencializador, tais como a MAPK, nesses resultados. A combinação de inibidores de Wnt/ β -catenina e PI3K em CCR pode ser uma estratégia terapêutica, como já visto para tumores de mama (SOLZAK et al., 2017). No entanto, é necessário levar em consideração as mutações já presentes nos tipos de cânceres a serem analisados. Finalmente, nossos resultados demonstram que, embora as linhagens possuam mutações ativadores em Wnt/ β -catenina e PI3K, essas células ainda são dependentes dessas vias para proliferação e migração celular.

Nossos dados de sobrevida sugerem que tumores com mutações em Wnt/ β -catenina apresentam sobrevida melhor do que aqueles que não possuem mutações. Em concordância, dados na literatura já mostraram resultados similares (KOTHARI et al., 2015). De fato, tumores de CCR com alta atividade dessa via de sinalização são classificados no subtipo molecular CMS2 e são aqueles com melhor sobrevida (THANKI et al., 2017). Similares resultados também foram verificados após ajuste para outras variáveis pelo modelo cox. Já é descrito que mutações em BRAF podem influenciar na sobrevida de pacientes com CCR (CONLIN et al., 2005), além de outras covariáveis como estágio do tumor, metástases e localização do tumor (WANG et al., 2019).

Mutações na via Wnt/ β -catenina é vista em cerca de 90% dos pacientes (CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012) e é um processos iniciais para a formação do CCR. Nossos resultados sugerem que mutações na via Wnt/ β -catenina combinada como alterações em PI3K resultam em um pior prognóstico comparado com mutações em Wnt individualmente. Individualmente, mutações em *PIK3CA*

contribuem para a resistência a quimioterápicos (XU et al., 2017) mas não há descrição sobre sua contribuição com a via Wnt/ β -catenina na sobrevivência de pacientes. De forma inédita, todos nossos resultados sugerem a contribuição dessas duas vias celulares agindo de maneira conjunta para a progressão do CCR.

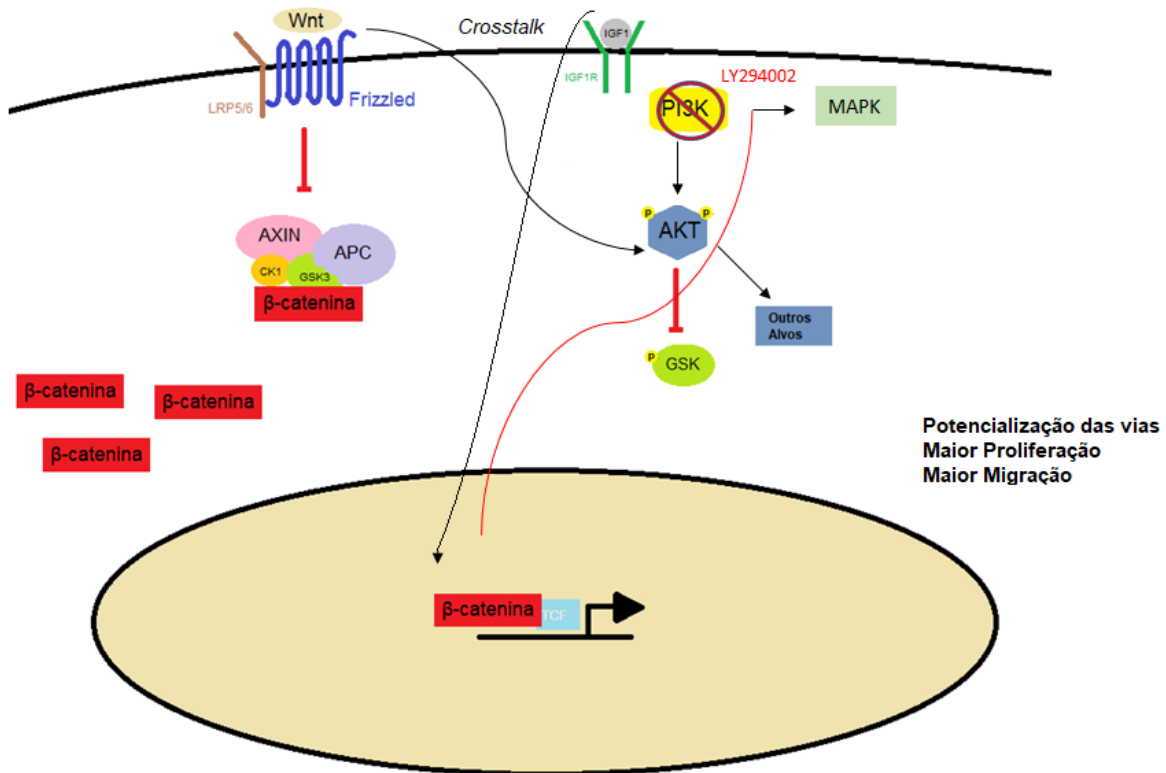


Figura 6.2 Representação esquemática dos resultados encontrados. O ligante Wnt3a é capaz estimular, não só a via Wnt/ β -catenina, mas também a via PI3K/AKT. Em paralelo, IGF1 estimula a via PI3K/AKT e a via Wnt/ β -catenina, indicando um *crosstalk* entre essas vias. Além disso, quando ambos ligantes são utilizados, há uma maior ativação das vias, maior proliferação e migração celular. Com o uso de LY294002, ocorre inibição da via PI3K mediada por IGF1, mas não por Wnt3a. Ocorre também a inibição da via Wnt/ β -catenina, sugerindo que essa via é dependente de PI3K. A migração e proliferação celular vistas aumentadas são revertidas com a inibição de PI3K.

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram o *crosstalk* e um efeito potencializador entre vias PI3K e Wnt/ β -catenina na proliferação e migração celular de linhagens de CCR. De maneira surpreendente, esses efeitos são vistos em linhagens que já possuem mutações ativadoras em ambas as vias celulares. A inibição de PI3K por LY294002 reverteu esses efeitos, sugerindo que as vias agem de maneira dependente uma da outra, e não de forma individual. A identificação de dependência de vias celulares no contexto tumoral é importante para que novos quimioterápicos sejam criados focando nessa vulnerabilidade. Ainda mais, a combinação de quimioterápicos já existentes, com alvos em diferentes vias celulares pode ser uma estratégia promissora no aumento da eficácia terapêutica no tratamento deste tipo de câncer.

8. REFERÊNCIAS

AGUILERA, O.; SERNA-BLASCO, R. Targeting KRAS Mutant CMS3 Subtype by Metabolic Inhibitors. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1110, p. 23–34, 2018.

AHMED, D. et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. **Oncogenesis**, v. 2, n. 0424, 2013.

ALLARD, J. B.; DUAN, C. IGF-Binding Proteins: Why Do They Exist and Why Are There So Many? **Frontiers in endocrinology**, v. 9, p. 117, 9 abr. 2018.

ARMELAO, F.; DE PRETIS, G. Familial colorectal cancer: a review. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 28, p. 9292–9298, 28 jul. 2014.

ARQUES, O. et al. Tankyrase Inhibition Blocks Wnt/beta-Catenin Pathway and Reverts Resistance to PI3K and AKT Inhibitors in the Treatment of Colorectal Cancer. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 22, n. 3, p. 644–656, fev. 2016.

BERG, K. C. G. et al. Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. **Molecular cancer**, v. 16, n. 1, p. 116, jul. 2017.

BOMMER, G. T. et al. IRS1 regulation by Wnt/ β -catenin signaling and varied contribution of IRS1 to the neoplastic phenotype. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 3, p. 1928–1938, 2010.

BRAY, F. et al. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. **The Lancet. Oncology**, v. 13, n. 8, p. 790–801, ago. 2012.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence

and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.

CAIN, R. J.; RIDLEY, A. J. Phosphoinositide 3-kinases in cell migration. **Biology of the cell**, v. 101, n. 1, p. 13–29, jan. 2009.

CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. **Nature**, v. 487, n. 7407, p. 330–337, jul. 2012.

CHAN, A. T.; GIOVANNUCCI, E. L. Primary prevention of colorectal cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2029–2043.e10, jun. 2010.

CONLIN, A. et al. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. **Gut**, v. 54, n. 9, p. 1283–1286, set. 2005.

DAGOGO-JACK, I.; SHAW, A. T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 15, n. 2, p. 81–94, fev. 2018.

DE PALMA, F. D. E. et al. The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer. **Cancers**, v. 11, n. 7, jul. 2019.

DEMING, D. A. et al. PIK3CA and APC mutations are synergistic in the development of intestinal cancers. **Oncogene**, v. 33, n. 17, p. 2245–2254, abr. 2014.

DESBOIS-MOUTHON, C. et al. Insulin and IGF-1 stimulate the beta-catenin pathway through two signalling cascades involving GSK-3beta inhibition and Ras activation. **Oncogene**, v. 20, n. 2, p. 252–259, 2001.

DING, V. W.; CHEN, R. H.; MCCORMICK, F. Differential regulation of glycogen synthase kinase 3 β by insulin and Wnt signaling. **Journal of Biological Chemistry**,

v. 275, n. 42, p. 32475–32481, 2000.

FAES, S.; DORMOND, O. PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 9, p. 21138–21152, set. 2015.

FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, n. 5, p. 759–767, 1 jun. 1990.

FERLAY, J. et al. **Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/tomorrow>>. Acesso em: 19 nov. 2019.

FESSLER, E.; MEDEMA, J. P. Colorectal Cancer Subtypes: Developmental Origin and Microenvironmental Regulation. **Trends in cancer**, v. 2, n. 9, p. 505–518, set. 2016.

FRUMAN, D. A.; ROMMEL, C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 13, n. 2, p. 140–156, fev. 2014.

FUKUMOTO, S. et al. Akt Participation in the Wnt Signaling Pathway through Dishevelled. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 20, p. 17479–17483, 2001.

GASPAR, C.; FODDE, R. APC dosage effects in tumorigenesis and stem cell differentiation. **The International journal of developmental biology**, v. 48, n. 5–6, p. 377–386, 2004.

GRADY, W. M.; MARKOWITZ, S. D. The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential application to colorectal cancer screening. **Digestive diseases and sciences**, v. 60, n. 3, p. 762–772, mar. 2015.

GUI, S. et al. Wnt3a regulates proliferation, apoptosis and function of pancreatic NIT-1 beta cells via activation of IRS2/PI3K signaling. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 7, p. 1488–1497, 2013.

GUINNEY, J. et al. The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer. **Nature medicine**, v. 21, n. 11, p. 1350–1356, 12 nov. 2015.

HAKUNO, F.; TAKAHASHI, S. IGF-I receptor signaling pathways. n. March, p. 1–47, 2018.

HALF, E.; BERCOVICH, D.; ROZEN, P. Familial adenomatous polyposis. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 4, p. 22, out. 2009.

HAMADA, T.; NOWAK, J. A.; OGINO, S. PIK3CA mutation and colorectal cancer precision medicine. **Oncotarget**, v. 8, n. 14, p. 22305–22306, 4 abr. 2017.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

HARE, L. M. et al. Physiological expression of the PI3K-activating mutation Pik3ca H1047R combines with Apc loss to promote development of invasive intestinal adenocarcinomas in mice . **Biochemical Journal**, v. 458, n. 2, p. 251–258, 2014.

HERMIDA, M. A.; DINESH KUMAR, J.; LESLIE, N. R. GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. **Advances in Biological Regulation**, v. 65, p. 5–15, 2017.

HINOHARA, K.; POLYAK, K. Intratumoral Heterogeneity: More Than Just Mutations. **Trends in cell biology**, v. 29, n. 7, p. 569–579, jul. 2019.

IWAI, S. et al. Involvement of the Wnt-beta-catenin pathway in invasion and migration of oral squamous carcinoma cells. **International journal of oncology**, v.

37, n. 5, p. 1095–1103, nov. 2010.

JAMWAL, G. et al. Identification of a unique loss-of-function mutation in IGF1R and a crosstalk between IGF1R and Wnt/ β -catenin signaling pathways. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1865, n. 6, p. 920–931, 2018.

JEONG, W. J. et al. Ras stabilization through aberrant activation of Wnt/ β -catenin signaling promotes intestinal tumorigenesis. **Science Signaling**, v. 5, n. 219, 2012.

JOHNSON, C. M. et al. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. **Cancer causes & control : CCC**, v. 24, n. 6, p. 1207–1222, jun. 2013.

KANG, S. et al. The significance of microsatellite instability in colorectal cancer after controlling for clinicopathological factors. **Medicine**, v. 97, n. 9, p. e0019–e0019, mar. 2018.

KEUM, N.; GIOVANNUCCI, E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 16, n. 12, p. 713–732, dez. 2019.

KIM, E. R.; CHANG, D. K. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 29, p. 9872–9881, ago. 2014.

KIM, J. G. et al. Wnt3A Induces GSK-3 β Phosphorylation and β -Catenin Accumulation Through RhoA/ROCK. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 5, p. 1104–1113, 2017.

KIM, S. E.; LEE, W. J.; CHOI, K. Y. The PI3 kinase-Akt pathway mediates Wnt3a-induced proliferation. **Cellular Signalling**, v. 19, n. 3, p. 511–518, 2007.

KOTHARI, N. et al. Prognostic and predictive values of APC and WNT pathway

mutations in MSS colorectal cancers. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 3_suppl, p. 652, 20 jan. 2015.

KRISHNAMURTHY, N.; KURZROCK, R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. **Cancer treatment reviews**, v. 62, p. 50–60, jan. 2018.

LAGUË, M. N. et al. Synergistic effects of Pten loss and WNT/CTNNB1 signaling pathway activation in ovarian granulosa cell tumor development and progression. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 11, p. 2062–2072, 2008.

LEE, H. et al. β -catenin/TCF activity regulates IGF-1R tyrosine kinase inhibitor sensitivity in colon cancer. **Oncogene**, v. 37, n. 40, p. 5466–5475, 2018a.

LEE, S. et al. β -Catenin-RAS interaction serves as a molecular switch for RAS degradation via GSK3 β . **EMBO reports**, v. 19, n. 12, p. e46060, 2018b.

LEMIEUX, E. et al. Oncogenic KRAS signalling promotes the Wnt/ β -catenin pathway through LRP6 in colorectal cancer. **Oncogene**, v. 34, n. 38, p. 4914–4927, 2015.

LI, V. S. W. et al. Wnt Signaling through Inhibition of β -Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex. **Cell**, v. 149, n. 6, p. 1245–1256, 2012.

LINNEKAMP, J. F. et al. Consensus molecular subtypes of colorectal cancer are recapitulated in in vitro and in vivo models. **Cell Death and Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 616–633, 2018.

LIU, C. et al. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. **Cell**, v. 108, n. 6, p. 837–847, mar. 2002.

LIU, J. J. et al. Inhibition of Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) Signaling

Synergistically Potentiates Antitumor Efficacy of Paclitaxel and Overcomes Paclitaxel-Mediated Resistance in Cervical Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, p. 3383, 2019.

LYNCH, H. T. et al. **Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015.** *Nature reviews. Cancer* England, mar. 2015.

MARMOL, I. et al. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 1, jan. 2017.

MICHELS, B. E. et al. Human colon organoids reveal distinct physiologic and oncogenic Wnt responses. **The Journal of experimental medicine**, v. 216, n. 3, p. 704–720, mar. 2019.

MILLER, K. D. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 66, n. 4, p. 271–289, jul. 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. ESTIMATIVA/2018 Incidência de Câncer no Brasil. **ESTIMATIVA/2020 Incidência de Câncer no Brasil**, v. Rio de Jan, p. Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2017.

MORROW, C. J.; GRAY, A.; DIVE, C. Comparison of phosphatidylinositol-3-kinase signalling within a panel of human colorectal cancer cell lines with mutant or wild-type PIK3CA. **FEBS Letters**, v. 579, n. 23, p. 5123–5128, 2005.

NG, S. S. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling does not activate the Wnt cascade. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 51, p. 35308–35313, 2009.

NIEPEL, M. et al. Analysis of growth factor signaling in genetically diverse breast cancer lines. **BMC biology**, v. 12, p. 20, 21 mar. 2014.

NOVELLASDEMUNT, L. et al. USP7 Is a Tumor-Specific WNT Activator for APC-Mutated Colorectal Cancer by Mediating β -Catenin Deubiquitination. **Cell Reports**, v. 21, n. 3, p. 612–627, 2017.

NUSSE, R.; CLEVERS, H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. **Cell**, v. 169, n. 6, p. 985–999, 2017.

OKITA, A. et al. Consensus molecular subtypes classification of colorectal cancer as a predictive factor for chemotherapeutic efficacy against metastatic colorectal cancer. **Oncotarget**, v. 9, n. 27, p. 18698–18711, abr. 2018.

ORMANNS, S. et al. WNT signaling and distant metastasis in colon cancer through transcriptional activity of nuclear β -Catenin depend on active PI3K signaling. **Oncotarget**, v. 5, n. 10, 2014.

PAN, M.-H. et al. Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. **Molecular nutrition & food research**, v. 55, n. 1, p. 32–45, jan. 2011.

PANDURANGAN, A. K. et al. Colorectal carcinogenesis: Insights into the cell death and signal transduction pathways: A review. **World journal of gastrointestinal oncology**, v. 10, n. 9, p. 244–259, set. 2018.

PEARSON, H. B.; PHESSSE, T. J.; CLARKE, A. R. K-ras and Wnt signaling synergize to accelerate prostate tumorigenesis in the mouse. **Cancer research**, v. 69, n. 1, p. 94–101, jan. 2009.

PLAYFORD, M. P. et al. Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of beta-catenin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 22, p. 12103–12108, out. 2000.

PUNT, C. J. A.; KOOPMAN, M.; VERMEULEN, L. From tumour heterogeneity to advances in precision treatment of colorectal cancer. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 14, n. 4, p. 235–246, abr. 2017.

QI, L. et al. Wnt3a expression is associated with epithelial-mesenchymal transition and promotes colon cancer progression. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**, v. 33, n. 1, p. 107, 11 dez. 2014.

RIEMER, P. et al. Oncogenic β -catenin and PIK3CA instruct network states and cancer phenotypes in intestinal organoids. **Journal of Cell Biology**, v. 216, n. 6, p. 1567–1577, 2017.

SCHATOFF, E. M.; LEACH, B. I.; DOW, L. E. WNT Signaling and Colorectal Cancer. **Current Colorectal Cancer Reports**, v. 13, n. 2, p. 101–110, 2017.

SEHAT, B. et al. SUMOylation mediates the nuclear translocation and signaling of the IGF-1 receptor. **Science Signaling**, v. 3, n. 108, p. 1–12, 2010.

SEHAT, B. et al. Receptor tyrosine kinases activate canonical WNT/ β -catenin signaling via MAP kinase/LRP6 pathway and direct β -catenin phosphorylation. **Oncogene**, v. 37, n. 3, p. 511–518, 12 dez. 2018.

SIMON, K. Colorectal cancer development and advances in screening. **Clinical interventions in aging**, v. 11, p. 967–976, 19 jul. 2016.

SOLZAK, J. P. et al. Dual PI3K and Wnt pathway inhibition is a synergistic combination against triple negative breast cancer. **NPJ breast cancer**, v. 3, p. 17, 2017.

THANKI, K. et al. Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and their

Clinical Implications. **International biological and biomedical journal**, v. 3, n. 3, p. 105–111, 2017.

THOMPSON, M.; NEJAK-BOWEN, K.; MONGA, S. (PAUL). Crosstalk of the Wnt Signaling Pathway. In: **Targeting the Wnt Pathway in Cancer**. [s.l: s.n.]. p. 51–80.

VASUDEVAN, K. M. et al. AKT-Independent Signaling Downstream of Oncogenic PIK3CA Mutations in Human Cancer. **Cancer Cell**, v. 16, n. 1, p. 21–32, 2009.

VOLOSHANENKO, O. et al. Wnt secretion is required to maintain high levels of Wnt activity in colon cancer cells. **Nature Communications**, v. 4, n. May, p. 1–13, 2013.

WANG, C. B. et al. Impact of Tumor Location and Variables Associated With Overall Survival in Patients With Colorectal Cancer: A Mayo Clinic Colon and Rectal Cancer Registry Study. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 76, 19 fev. 2019.

WANG, Q. et al. Deptor is a novel target of Wnt/ β -Catenin/c-Myc and contributes to colorectal cancer cell growth. **Cancer Research**, v. 78, n. 12, p. 3163–3175, 2018.

WANG, Q.; SHI, C.-J.; LV, S.-H. Benchmarking pathway interaction network for colorectal cancer to identify dysregulated pathways. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 50, n. 5, p. e5981–e5981, 30 mar. 2017.

WEROHA, S. J.; HALUSKA, P. IGF signaling in cancer. **Endocrinology Metabolism Clinics of North America**, v. 41, n. 2, p. 335–350, 2012.

XU, J.-M. et al. PIK3CA Mutations Contribute to Acquired Cetuximab Resistance in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 23, n. 16, p. 4602–4616, ago. 2017.

YAMAGISHI, H. et al. Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. **Chinese journal of cancer**, v. 35, p. 4, jan. 2016.

YU, H.; ROHAN, T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 18, p. 1472–1489, set. 2000.

YUN, M. S. et al. Both ERK and Wnt/ β -catenin pathways are involved in Wnt3a-induced proliferation. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 2, p. 313–322, 2005.

ZHAN, T.; RINDTORFF, N.; BOUTROS, M. **Wnt signaling in cancer****Oncogene**The Author(s), , 12 set. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/onc.2016.304>>

ZHANG, Q. YUN et al. Knockdown of type I insulin-like growth factor receptor inhibits human colorectal cancer cell growth and downstream PI3K/Akt, WNT/ β -catenin signal pathways. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 73, p. 12–18, 2015.