



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

A *N*-glicosilação do EGFR afeta a sinalização intracelular e a estabilidade das Junções *Tight* em células de câncer colorretal

Aluna: Amelia Gutierrez Pérez

Orientador: Dr. Julio Cesar Madureira de Freitas Junior

Co-orientador: Dr. José Andrés Morgado-Díaz

RIO DE JANEIRO

2017



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

A *N*-glicosilação do EGFR afeta a sinalização intracelular e a estabilidade das Junções *Tight* em células de câncer colorretal

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

Aluna: Amelia Gutierrez Pérez

Orientador: Dr. Julio Cesar Madureira de Freitas Junior

Co-orientador: Dr. José Andrés Morgado-Díaz

RIO DE JANEIRO

2017

P438n Pérez, Amelia Gutierrez.

A N-glicosilação do EGFR afeta a sinalização intracelular e a estabilidade das Junções Tight em células de câncer colorretal / Amelia Gutierrez Pérez. – Rio de Janeiro, 2017.

78 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2017.

Orientador: Julio Cesar Madureira de Freitas Júnior.

Co-orientador: José Andrés Morgado-Diaz.

1. Neoplasias Colorretais. 2. Junções Intercelulares. 3. Junções Aderentes. 4. Claudina-3. I. Freitas Júnior, Julio Cesar Madureira de (Orient.). II. Morgado-Diaz, José Andrés (Co-orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.99435



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

A *N*-glicosilação do EGFR afeta a sinalização intracelular e a estabilidade das
Junções *Tight* em células de câncer colorretal

Aluna: Amelia Gutierrez Pérez

Orientador: Dr. Julio Cesar Madureira de Freitas Junior

Co-orientador: Dr. José Andrés Morgado-Díaz

Aprovada em: 10/03/2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Miguel Ângelo Martins Moreira - INCA

Prof. Dr. Sheila Coelho Soares Lima - INCA

Prof. Dr. Mauro Sérgio Gonçalves Pavão - UFRJ

Prof. Dr. Leonardo Augusto Karam Teixeira - INCA

Prof. Dr. Andre Luiz Mencialha - UERJ

RIO DE JANEIRO

2017

Órgãos financiadores:

Instituto Nacional de Câncer – Ministério da saúde

(INCa – MS)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

(CAPES)

Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

(FAPERJ)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

(CNPq)

DEDICATÓRIA

Ao meu companheiro e amigo: meu esposo Marcos

AGRADECIMENTOS

Aos membros do laboratório de Biologia Estrutural. Em primeiro lugar, ao Dr. José Morgado por ter me acolhido em seu laboratório. Isso representou uma grande oportunidade dentro da minha carreira profissional. Em segundo lugar, à todos os colegas do grupo, Jennifer, Letícia, Renata, Cássio, Pri, Nat, Dri, Michele, Wallace, Leo, Peter, Érika, Annie, Murilo, Perony, Bruna e Thaisa. Quero agradecer á Dra Etel e as meninas por contaminar o ambiente de muita alegria. Quero agradecer ao Jovani, sempre disposto para me ajudar nas horas de mais estresse. À Jess, sempre com disposição em me ajudar em tudo. Ao Wal, por ser essa pessoa maravilhosa que é e pela parceria em muitos experimentos. E, por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer ao meu querido orientador Julio por todos os conselhos, palavras de incentivo, paciência e ensinamentos, e por me mostrar o doce que podem ser os glicanos.

Ao Magro, que fez os primeiros aportes a esse trabalho. Ao Paulo Thiago (Leão) pela força na parte dos pacientes. À Dra Ivanir pelo apoio, e por tudo o que me insinou na parte de imunohistoquímica. À Pricila Valverde pela sua importante contribuição com esse trabalho.

À Dra Mariana Boroni e seu grupo, pelo lindo presente que foi o estudo feito por Bioinformática. À Carina e Mateus, sempre dispostos a ajudar.

À minha família, em especial minha mãe, avó e tia, que embora não estiveram junto comigo nesse periodo, são meu maior incentivo e apoio sempre.

Ao meu esposo, meu amor, que além do seu apoio, sem ele eu não estaria no Brasil.



A *N*-glicosilação do EGFR afeta a sinalização intracelular e a estabilidade das Junções *Tight* em células de câncer colorretal

Aluna: Amelia Gutierrez Pérez

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RESUMO

Introdução: O câncer colorretal (CCR) constitui um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Durante a progressão de tumores epiteliais, como o CCR, é frequentemente observada uma desestabilização do complexo juncional apical, composto pelas junções *tight* (JT) e junções aderentes (JA). O aumento dos níveis de expressão das claudinas, principais proteínas transmembranas constituintes das JT, induz a perda da sua função de barreira e aumenta o potencial maligno das células do CCR. Embora cada vez mais estudos estejam focados em compreender melhor os aspectos moleculares que regulam a estabilidade das JT, o papel desempenhado por *N*-glicanos neste processo continua sendo pouco explorado. **Objetivo:** Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar o papel dos *N*-glicanos na regulação da estabilidade das JT em CCR. **Materiais e Métodos:** Utilizando a linhagem celular HCT-116 (carcinoma colorretal humano), foi avaliado o efeito do tratamento com dois inibidores de biossíntese de *N*-glicanos, swainsonina (SW) e tunicamicina (Tun), sobre a estabilidade das JT mediante: citometria de fluxo, *Western blot*, microscopia eletrônica de transmissão, co-imunoprecipitação e imunofluorescência. A expressão de ácido siálico na superfície celular também foi inibida utilizando análogo fluorinado de ácido siálico (Sia-F). Além disso, foram avaliados o grau de *N*-glicosilação do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) e os níveis de expressão de claudina-3 (cld-3) em tecidos de pacientes com CCR (n = 21) por imunohistoquímica e *Western blot* (Protocolo-CEP nº: 84/04). Para este estudo foram consultadas bases de dados internacionais (NCBI e TCGA) a fim de identificar os sítios de *N*-glicosilação (Asn-X-Ser/Thr) do EGFR e relatos de mutações nestes sítios em CCR. Utilizando um algoritmo classificador de subtipos de CCR foi avaliada também a expressão de glicogenes e de cld-3 em quatro subtipos moleculares de CCR. **Resultados:** Primeiramente, foi avaliado o efeito de SW e Tun na expressão proteica de vários constituintes das JT. Foi observado que apenas o tratamento com Tun diminuiu os níveis de expressão de cld-3. A Tun também promoveu, concomitantemente, diminuição dos níveis de fosforilação de proteínas na faixa de peso molecular da cld-3 (22kDa) e reorganização da sua localização celular do citoplasma à membrana. Os resultados mostraram que, após o tratamento com Tun, as células HCT-116 desenvolveram contatos celulares mais estabelecidos. Além disso, a *N*-glicosilação do EGFR promoveu redução dos seus níveis de expressão na membrana celular e também diminuiu tanto os seus níveis de ativação quanto a fosforilação das proteínas *downstream* ERK e AKT. Foi observado que o tratamento com Sia-F diminuiu tanto a ativação de EGFR quanto os níveis de expressão de cld-3. Os resultados mostraram também que tumores de pacientes com CCR, que expressavam maiores níveis proteicos de cld-3 do que os respectivos tecidos normais adjacentes, exibiram também um maior grau de *N*-glicosilação do EGFR. Finalmente, não foram encontrados relatos de mutações em sítios de *N*-glicosilação do EGFR em CCR, porém, foram encontradas diferenças na expressão de glicogenes e de cld-3 entre os quatro subtipos moleculares de CCR. **Conclusão:** Conjuntamente, os resultados demonstram que a *N*-glicosilação do EGFR desempenha um papel na regulação da cld-3, contribuindo para uma melhor compreensão da biologia do CCR. Estes achados também sugerem um potencial significado clínico de alterações no padrão de *N*-glicosilação do EGFR.

Palavras chave: Cancêr colorretal. Junções *Tight*. Junções Aderentes. Claudina-3.



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

A *N*-glicosilação do EGFR afeta a sinalização intracelular e a estabilidade das Junções *Tight* em células de câncer colorretal

Aluna: Amelia Gutierrez Pérez

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ABSTRAT

Introduction: Colorectal cancer (CCR) is an important public health problem in Brazil and worldwide. During the progression of epithelial tumors, such as CCR, the disruption of the apical junctional complex, composed of tight junctions (TJ) and adherens junctions (AJ), is frequently observed. The increased expression of different claudin isoforms, major integral transmembrane protein constituents of TJ, induces the loss of barrier function and increases malignant potential in CCR cells. Although more and more studies are contributing to a better understanding of the molecular aspects governing the destabilization of TJ, the role played by *N*-glycans in this process remains poorly understood. **Objective:** The aim of the present study is to investigate the role of the *N*-glycans in the regulation of stability of the TJ. **Materials and Methods:** To investigate the involvement of *N*-glycans with the stability of the TJ in HCT-116 cells (human colorectal carcinoma), we examined the effects of treatment with two *N*-glycan biosynthesis inhibitors, swainsonine (SW) and tunicamycin (Tun), by flow cytometry, western blot, electron microscopy, co-immunoprecipitation and immunofluorescence. We also inhibited the expression of sialic acid on the cell surface by treatment with fluorinated sialic acid analogs (Sia-F). Furthermore, we evaluated the *N*-glycosylation degree of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and the expression levels of Claudin-3 (cld-3) in CCR patients samples (n=21) by lectin blot and Immunohistochemistry. This study has been approved by the INCA Research Ethics Committee (Protocol No: 84/04). Besides, we searched in NCBI and TCGA databases, to identify the *N*-glycosylation sites on EGFR (Asn-X-Ser/Thr) and the reports of mutations on these sites in CCR. Using a CCR subtype classifier algorithm, the expression of glycogenes and cld-3 in four molecular subtypes of CCR was evaluated. **Results:** First of all, we tested the effect of SW and Tun in the protein expression of several TJ constituents. We saw that only Tun has significant effect. The treatment with this drug decreased the protein expression levels of cld-3. Tun also promoted, concomitantly, decrease of phosphorylation levels of proteins in the molecular weight range of cld-3 (22kDa) and reorganization of its cellular localization from cytoplasm to membrane. Our preliminary results also have shown that after Tun treatment HCT cells develop tight cell-cell contacts. In addition, deglycosylation of EGFR promoted reduction of its expression levels in the cell membrane and also decreased both its activation levels and phosphorylation of downstream proteins ERK and AKT. We demonstrated that treatment with Sia-F decrease both the activation of EGFR and the expression levels of cld-3. Furthermore, our results also have shown that malignant tumors from patients with CCR, which express a higher protein level of cld-3 than adjacent normal tissue, exhibit a greater degree of *N*-glycosylation of EGFR as compared to adjacent normal tissue. Finally, we did not find any report of mutations in *N*-glycosylation sites of EGFR in CCR. However, differences in glycogen and cld-3 expression were found among the four molecular subtypes of CCR. **Conclusion:** Together, our results demonstrate that *N*-glycosylation of EGFR plays a role in the regulation of TJ protein cld-3, contributing to a better understanding of the biology of CCR. Our results also suggest a potential clinical significance of changes in *N*-glycosylation pattern of EGFR.

Keywords: Colorectal cancer. Tight junctions. Adherent junctions. Claudin-3.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 - Subtipos moleculares de câncer colorretal.....	4
Figura 1.2 - Sequência adenoma-carcinoma colorretal.....	6
Figura 1.3 - Eventos celulares durante a transição epitélio-mesenquimal (EMT).	7
Figura 1.4 - Complexo juncional apical (CJA).....	8
Figura 1.5 - Montagem do CJA e polarização celular	9
Figura 1.6 - Os receptores da família ErbB.....	14
Figura 1.7 - Representação do processo de <i>N</i> -glicosilação	17
Figura 1.8 - Representação das funções dos <i>N</i> -glicanos	19
Figura 1.9 - Representação da regulação do EGFR mediada por ramificações β -1,6	20
Figura 1.10 - <i>N</i> -glicosilação da E-caderina e estabilidade das JTs e JAs	21
Figura 1.11 - Representação do processo de extensão e capeamento de <i>N</i> -glicanos β 1,6-ramificados	22
Figura 1.12 - Radio e quimo resistência mediada pela ST6GAL1 em CCR.....	23
Figura 1.13 - Mecanismo de ação dos análogos de ácido siálico fluorinados.....	24
Figura 4.14 - Inibição da expressão de <i>N</i> -glicanos complexos ramificados induzida por tunicamicina e swainsonina	355
Figura 4.15 - Efeito do tratamento com tunicamicina sobre os níveis de expressão de proteínas constituintes das JTs.....	366
Figura 4.16 - Avaliação do efeito da tunicamicina sobre a localização subcelular da cld-3 e a funcionalidade das JTs	388

Figura 4.17 - Avaliação do efeito do tratamento com tunicamicina sobre a funcionalidade do EGFR.....	411
Figura 4.18 - Tratamento das células HCT-116 com um inibidor tirosina cinase.....	422
Figura 4.19 - Avaliação da interação EGFR/cludina-3	433
Figura 4.20 - Avaliação do efeito do tratamento das células HCT-116 com Sia-F.....	444
Figura 4.21 - Avaliação do grau de N-glicosilação do EGFR em amostras de pacientes com CCR.....	477
Figura 4.22 - Sítios de N-glicosilação do EGFR	488
Figure 4.23 - Análise da expressão gênica de claudina-3 e glicogenes nos subtipos moleculares de CCR (CMS)	522
Figure 24 - Modelo proposto de regulação da claudina-3 pela N-glicosilação do EGFR.....	589
Tabela 1.1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2016/2017.	1
Tabela 3.2 - <i>Immunoreactive Score (IRS)</i>	323
Tabela 3.3: Pacientes utilizados no estudo.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância
Akt – proteína quinase B
APC – do inglês, *Adenomatous Polyposis Coli*
Asn – Asparagina
ATCC – do inglês *American Type Culture Collection*
ATP – do inglês *adenosin triphosphate*
BRAF – do inglês, *V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B*
BSA – Albumina bovina
B3GnT8 – β 1,3-N-acetilglicosaminiltransferase 8
B4GALNT3 – do inglês, *Beta-1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase 3*
CCR – câncer colorretal
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
CJA – complexo juncional apical
CMP – citidina monofosfato
CMS – subtipos moleculares consenso
Cld-3 – claudina-3
CIMP – do inglês, *Cp Gislandmethylator phenotype*
CIN – do inglês *Chromosomal Instability*
CMP – Citidina monofosfato
DEC – domínio extracelular
DNA – do inglês, deoxyribonucleic acid
DPAGT1 – do inglês, *Dolichyl-phosphate (UDP-N-acetylglucosamine) N-acetylglucosaminophosphotransferase 1 (GlcNAc-1-P transferase)*
EGF – do inglês, *Epidermal Growth Factor*
EGFR – do inglês, *Epidermal Growth Factor Receptor*
EMT– do inglês, *Epithelial-Mesenchymal Transition*
E-PHA – do inglês, *Phaseolus vulgaris E – Erythroagglutinating*
ER – reticulo endoplasmático
ERK – quinase regulada por sinal extracelular
FAP – do inglês, *Familiar Adenomatous Polyposis*
FITC – do inglês *fluorescein isothiocyanate*
Fuc – Fucose

Gal – Galactose
GalNAc – N-acetilgalactosamina
GDP – Guanosina difosfato
Glc – Glicose
GlcA – Ácido glicurônico
GlcNAc – N-acetilglicosamina
GMDS – GDP-mannose-4,6-dehidratase
GnT-V – N-acetilglicosaminiltransferase V
HNPC – do inglês, *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*
IdoA – Ácido idurônico
INCA – Instituto Nacional do Câncer
JAs – Junções Aderentes
JAM – do inglês, *Junctional Adhesion Molecule*
JTs – Junções *Tight*
KRAS – do inglês, *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*
L-PHA – do inglês, *Phaseolus vulgaris lectin*
Man – Manose
MAPK – do inglês, *mitogen-activated protein kinase*
MEC – matriz extracelular
MGAT5 – do inglês, *Mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase*
MSI – do inglês *Microsatellite Instability*
MMR – do inglês, *Mismatch Repair*
mRNA – RNA mensageiro
NeuNAc – ácido N-acetilneuramínico
NSCLC – carcinoma de pulmão de células não pequenas
OST – oligossacariltransferase
PDK1 – do inglês, *phosphoinositide dependent kinase1*
PI3K – fosfatidil-inositol-3-quinase
PIP2– fosfatidilinositol-4,5 bifosfato
PIP3– fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato
PKA – proteína quinase A
PLC γ – do inglês, *phospholipase C γ*
PP2A – do inglês, *Protein phosphatase 2A*
PTB – do inglês, *phospho-tyrosine-binding*

RNA – do inglês, *ribonucleic acid*
Ser – serina
Sia – ácido siálico
Sai-F – ácido siálico fluorinado
SMAD – do inglês, *Mothers against decapentaplegic homolog*
SNA – do inglês, *Sambucus nigra*
STAT – do inglês, *signal transducer and activator of transcription*
ST6GAL1 – β -galactoside α 2,6-sialyltransferase I
SW – swainsonina
TCGA – do inglês, *The Cancer Genome Atlas*
TGF- β – fator de crescimento transformante beta
Thr – treonina
TNM – Tumores nódulos e metástases
TP53 – do inglês, *Tumor Protein 53*
TUN – tunicamicina
UDP – uridina difosfato
VEGF – do inglês, *vascular endothelial growth factor*
Wnt – do inglês, *Wingless*
Xyl – xilose
ZO – *zonula occludens*

SUMARIO

RESUMO	vii
ABSTRAT	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O câncer colorretal (CCR)	1
1.1.1 Câncer colorretal: incidência, fatores de risco e terapias.	1
1.1.2 Subtipos moleculares do CCR	3
1.1.3 Desenvolvimento do CCR: Bases moleculares e celulares	5
1.2 O complexo juncional apical (CJA)	8
1.3 A desestabilização do CJA em CCR	10
1.4 O Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR)	12
1.4.1 Estrutura e ativação do EGFR	12
1.4.2 Vias de sinalização ativadas pelo EGFR	14
1.4.3 O papel do EGFR em câncer	15
1.5 Glicosilação de proteínas: N-glicanos	16
1.5.1 <i>N</i> -glicosilação e câncer	19
1.6 Agentes moduladores da expressão de glicanos: análogos de monossacarídeos e inibidores da biossíntese de <i>N</i> -glicanos.	23
1.7. Relevância do estudo	25
2. OBJETIVO	25
2.1 Geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Reagentes, anticorpos e drogas	26
3.2 Cultura de células e tratamento com drogas	26

3.3 Ensaio de viabilidade celular	27
3.4 Citometria de fluxo para avaliar a expressão de carboidratos na superfície celular	27
3.5 Coleta de amostras de pacientes	28
3.6 Obtenção de extratos proteicos totais	29
3.7 Obtenção de extratos proteicos de membrana citoplasmática.....	29
3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), e <i>Western blot</i>	29
3.9 Imunoprecipitação e <i>blotting</i> de lectinas	30
3.10 Imunofluorescência.....	30
3.11 Ensaio de Permeabilidade Paracelular ao Vermelho de Rutênio e Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	31
3.12 Imuno-histoquímica	322
3.13 Estudos por Bioinformática.....	333
3.14 Análise estatística	333
4. RESULTADOS	344
4.1 O tratamento com tunicamicina e swainsonina inibe a expressão de <i>N</i> -glicanos complexos ramificados em células HCT-116.	344
4.2 A tunicamicina diminui os níveis de expressão de claudina-3 em HCT-116.	355
4.3 A tunicamicina induz redistribuição de claudina-3 e promove contatos célula-célula mais estabelecidos em HCT-116.....	377
4.4 O tratamento com tunicamicina promove tanto a redução dos níveis de expressão do EGFR na membrana celular quanto a sua ativação e sinalização através de Erk e Akt....	399
4.5 A inibição específica da fosforilação do EGFR por PD153035 promove a redução dos níveis de expressão de claudina-3 em células HCT-116.	422
4.6 A diminuição dos níveis de expressão de claudina-3 não é mediada por interação direta com o EGFR	433
4.7 O tratamento com um análogo fluorinado de ácido siálico (Sia-F) promove tanto a inibição do EGFR quanto a diminuição dos níveis de expressão de claudina-3	444

4.8 Pacientes com CCR que apresentam maiores níveis de expressão de claudina-3 no tecido tumoral em relação aos normais adjacentes apresentam também maior grau de <i>N</i> -glicosilação do EGFR.....	455
4.9 Não existem relatos de mutações nos sítios de <i>N</i> -glicosilação (Asn-X-Ser/Thr) do EGFR na base de dados TCGA.....	488
4.10 A claudina-3 e as enzimas que participam na síntese e maturação dos <i>N</i> -glicanos apresentam padrões de expressão similar nos diferentes subtipos moleculares do CCR...	499
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÃO	60
7. REFERÊNCIAS.....	611

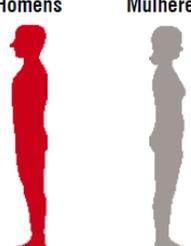
1. INTRODUÇÃO

1.1 O câncer colorretal (CCR)

1.1.1 Câncer colorretal: incidência, fatores de risco e terapias.

O CCR representa um importante problema de saúde pública no Brasil e, segundo dados do GLOBOCAN 2012, o CCR é a quarta maior causa de morte por câncer no mundo (FERLAY *et al.*, 2015). Como ilustrado na tabela 1.1, representa o terceiro tipo de câncer mais frequente entre os homens e o segundo entre as mulheres (Ministério da Saúde, 2016). No entanto, pacientes diagnosticados com a doença localizada chegam a ter uma sobrevida média global (taxa de sobrevivência cinco anos após a realização do diagnóstico) de até 90%. Seu diagnóstico precoce representa um fator crucial para a sobrevida média global, uma vez que pacientes diagnosticados em estádios intermediários apresentam sobrevida estimada de 70% enquanto que esse número cai para apenas 12% em estádios avançados (DESANTIS, 2014).

Tabela 1.1: Distribuição proporcional por sexo dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil segundo estimativas para 2016/2017, exceto pele não melanoma. Retirado de Estimativas 2016/2017: Incidência de Câncer no Brasil. INCA-RJ.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%	
Próstata	61.200	28,6%		Homens	Mama feminina	57.960	28,1%	
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Mulheres	Colón e Reto	17.620	8,6%
Colón e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%	
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%	
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%	
Esófago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%	
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%	
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%	
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%	
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%	

*Números arredondados para múltiplos de 10.

O risco de desenvolver CCR aumenta com a idade e está relacionado com dietas pobres em fibras (polissacarídeos vegetais não hidrolisados por enzimas endógenas do trato digestivo humano) e com elevado teor de gordura e carne vermelha, consumo de álcool, tabagismo, sedentarismo, obesidade, diabetes e doenças inflamatórias do intestino (JOHNSON *et al.*, 2013). Além disso, desordens hereditárias aumentam a susceptibilidade às neoplasias de cólon como, por exemplo, a polipose adenomatosa familiar (FAP, do inglês *familiar adenomatous polyposis*), uma síndrome autossômica dominante causada por mutação no gene supressor de tumor *APC* (*adenomatous polyposis coli*) que ocasiona a formação de diversos pólipos adenomatosos e cuja incidência é de menos de 1% do total de pacientes com

CCR, e o câncer de cólon não poliposo (HNPCC, do inglês *Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer*), outra autossômica dominante, causada por mutações em genes de reparo de DNA, cuja incidência é de 2 a 5% dos pacientes com CCR (CENTELLES, 2012; PAJARES *et al.*, 2015).

O CCR compreende tanto tumores que ocorrem no cólon quanto aqueles que ocorrem no reto. Estes tumores compartilham características como a origem, diagnóstico, patologia e tratamento da doença metastática. Toda essa semelhança se dá devido ao fato desses tecidos serem indistinguíveis a nível molecular (NETWORK, C. G. A 2012). Assim, o tipo de terapia usada para o tratamento do CCR varia de acordo com a localização e o estadiamento do tumor (DESANTIS, 2014), podendo incluir cirurgia, quimioterapia, radioterapia, terapia-alvo, imunoterapia ou cuidados paliativos (PATEL *et al.*, 2009).

O estadiamento consiste em atribuir o grau de invasividade e extensão tumoral. O sistema de classificação mais usado para tal é o TNM (do inglês *Tumor–Node–Metastasis*), o qual classifica o tumor de acordo com a extensão do tumor primário, ou seja, quanto o tumor primário penetrou pelas camadas do tecido; envolvimento regional dos linfonodos e presença ou ausência de metástase (EDGE *et al.*, 2010). Em estádios iniciais da doença, a cirurgia para remoção do tumor representa o tratamento mais comum tanto para tumores de cólon quanto para os de reto. Para pacientes com tumores de cólon em estágio II e III a cirurgia é seguida da terapia adjuvante (pós-cirurgia) por seis meses utilizando uma combinação de quimioterápicos que normalmente são 5-Fluorouracil, Leucovorin e Oxaliplatina (composto derivado da platina) ou Irinotecano (composto que inibe a topoisomerase I), com o intuito de reduzir o risco de recorrência. Nos últimos anos novas drogas foram incorporadas para uso no tratamento do CCR em situações e estadiamentos específicos, como nos casos da terapias-alvo usando Bevacizumab (anticorpo monoclonal anti-VEGF), Cetuximab e Panitumab (anticorpos monoclonais anti-EGFR) (LIN *et al.*, 2015). Por outro lado, pacientes com tumores retais nesses mesmos estádios geralmente fazem uso da quimioterapia neoadjuvante (pré-cirurgia) combinada com radiação (DESANTIS, 2014), que consiste na administração do análogo de pirimidina 5-Fluorouracila (5-FU) com radioterapia (RT).

Por ser esta doença bastante heterogênea, a resposta dos pacientes às terapias varia entre os indivíduos sendo em muitos casos pouco eficiente. Neste contexto, recentemente foi proposto que o CCR pode ser dividido em quatro subtipos moleculares com características biológicas, respostas ao tratamento e prognósticos diferentes (GUINNEY *et al.*, 2015).

1.1.2 Subtipos moleculares do CCR

Os pacientes com CCR apresentam uma ampla diversidade em relação ao prognóstico e a resposta ao tratamento, sendo difícil prever esses parâmetros clínicos para cada paciente de forma individual na prática clínica. Conseqüentemente, tem sido muito discutido na comunidade científica como diferenciar os pacientes em subtipos de CCR diferentes (MEDEMA, 2016). Marcadores moleculares como a instabilidade de microssatélites, fornecem valor prognóstico e preditivo, entretanto, estes só se aplicam a um grupo pequeno de pacientes (SARGENT *et al.*, 2010). Embora a combinação de diferentes marcadores ofereça uma classificação mais refinada dos pacientes e um prognóstico mais preciso (SINICROPE *et al.*, 2015), nem sempre a assinatura molecular de um tumor explica todas suas características, evidenciando a necessidade de avaliar também outros parâmetros, como, por exemplo, a atividade de vias de sinalização (TIAN *et al.*, 2013). Adicionalmente, estudos baseados na expressão gênica têm contribuído para um melhor entendimento da biologia tumoral. Avanços recentes na análise de perfis de expressão genética permitem estratificar pacientes em subgrupos de tumores biologicamente homogêneos. Devido às diferenças na geração de perfis de expressão gênica (por exemplo, métodos de extração de RNA e plataformas de expressão de genes) e análise de dados (por exemplo, processamento de dados e algoritmos para identificar subgrupos), as classificações resultantes apenas se sobrepõem parcialmente e consistem em um número de subtipos que varia de 3 a 6 (SCHLICKER *et al.*, 2012; MEDEMA, 2016).

Com o intuito de unificar as diferentes estratégias de classificação baseadas na expressão gênica, foi formado em 2014 um consórcio internacional de sub-tipificação do CCR (GUINNEY *et al.*, 2015). Este consórcio foi capaz de classificar um grande número de amostras de CCR em quatro subtipos moleculares consenso (CMS): 1) CMS1, o subtipo imune MSI, em que os tumores exibem um infiltrado imune e são frequentemente associados a instabilidade de microssatélites (MSI), metilação das ilhas CpG (CIMP) (do inglês, Cp *Gislandmethylator phenotype*); e mutações em *BRAF*; 2) CMS2, o subtipo canônico, caracterizado pela expressão de genes determinantes do fenótipo epitelial. Este grupo representa o tipo de CCR clássico por causa dos altos níveis de instabilidade cromossômica (CIN) e a ativação da via Wnt, o que sugere que estes tumores seguem a via canônica de progressão (FEARON; VOGELSTEIN, 1990); 3) CMS3, o subtipo metabólico, estes tumores apresentam marcadores epiteliais, desregulação de vias metabólicas e mutações em *KRAS*; 4) CMS4, o subtipo mesenquimal, que está relacionado com um pior prognóstico, apresenta infiltrado de células estromais, expressão de genes associados a transição epitélio-

mesenquimal (EMT, do inglês *epithelial-mesenchymal transition*), angiogênese, ativação de vias alvo do TGF- β (do inglês, *transforming growth factor- β*) e remodelamento da matriz extracelular (MEDEMA, 2016). Cada um destes subtipos associa-se a programas biológicos específicos e distintas vias de sinalização, por exemplo, JAK-STAT em CMS1; WNT e SRC em CMS2; integrina- β , TGF- β e VEGF (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*) em CMS4 (Figura 1.1).

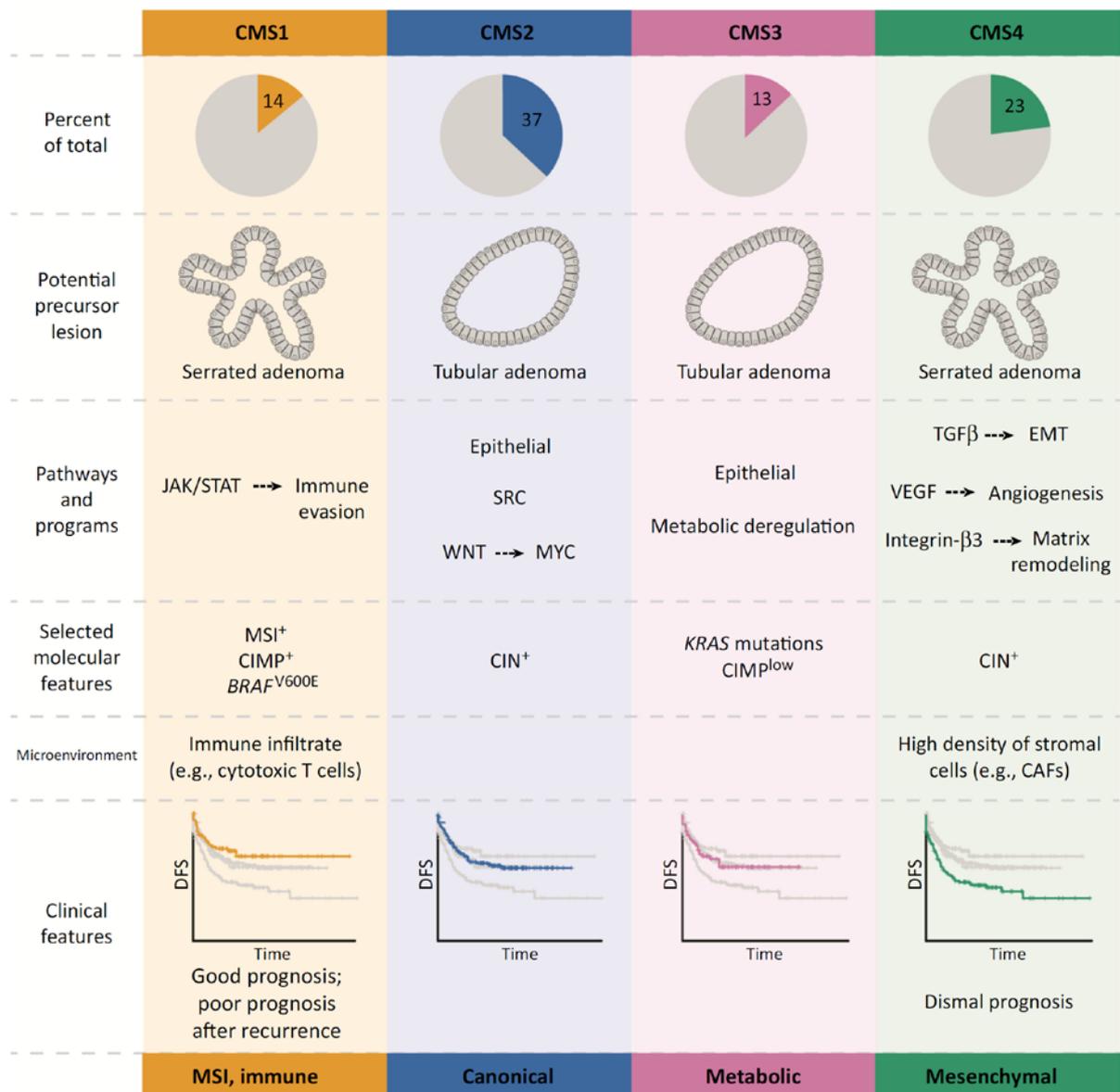


Figura 1.1 : Subtipos moleculares de câncer colorretal. Cada subtipo molecular consenso (CMS) constitui uma entidade distinta com características moleculares e clínicas específicas. As lesões precursoras que dão origem a cada CMS são determinadas baseadas na expressão gênica. As vias ativas e os programas biológicos estão relacionados com setas, baseados na sua possível conexão. MEDEMA, 2016.

A afiliação de um tumor a um subtipo determinado não é necessariamente definida pelas mutações iniciadoras do tumor e sim pode ser moldada durante a sua progressão pelas mutações subsequentes e pelo microambiente tumoral. Por exemplo, os subtipos CMS1 e CMS4, que compartilham a mesma mutação iniciadora (*BRAF*), apresentam infiltrado celular diferente (Figura 1.1). As mutações no gene *BRAF* têm sido descritas como iniciadoras de tumores serrilhados (glândulas em forma de serrilha) (IJSPEERT *et al.*, 2015), já as mutações no gene *APC* resultam geralmente no desenvolvimento de adenomas tubulares (glândulas arredondadas) (FEARON, 2011).

1.1.3 Desenvolvimento do CCR: Bases moleculares e celulares

O CCR pode se desenvolver gradualmente com o acúmulo de diferentes alterações somáticas e/ou hereditárias do genoma e epigenoma, induzindo a transformação da mucosa colônica em um câncer invasivo (DAVIES *et al.*, 2005 ;VOGELSTEIN *et al.*, 2013) (Figura 1.2). Têm sido descritos diferentes mecanismos moleculares que governam a progressão do CCR: (1) instabilidade genômica, induzida por CIMP; CIN; MSI e defeitos nos mecanismos de reparo do DNA induzidos por mutações em genes que raparam alterações por incompatibilidade (MMR) (AL-SOHAILY *et al.*, 2012); (2) desregulação da expressão de microRNAs; (3) inativação de genes supressores de tumor tais como *APC*, *SMAD4* e *TP53*; (4) ativação de vias ontogênicas como Braf, Ras (KRas e NRas), Fosfatidilinositol 3-cinase (PIK-3), VEGF, TGF- β e o receptor do fator de crescimento epitélio (EGFR) (AGHAGOLZADEH *et al.*, 2016).

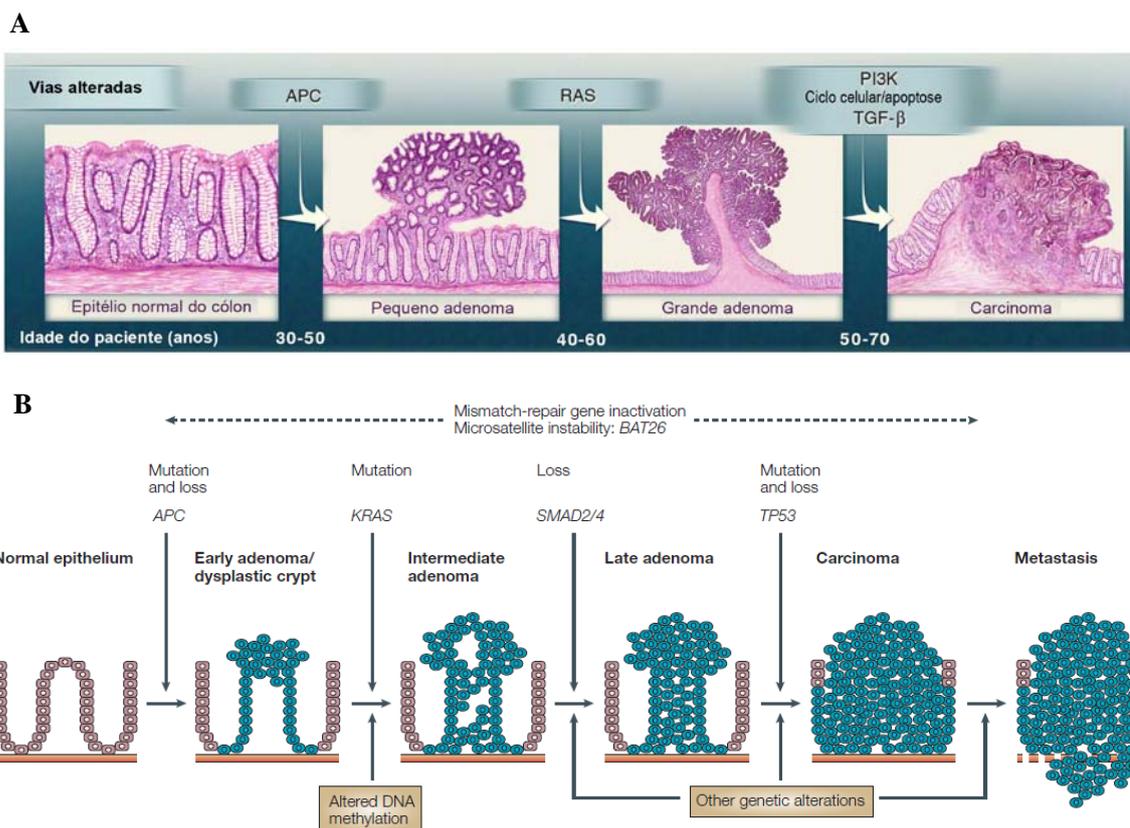


Figura 1.2: Sequência adenoma-carcinoma colorretal. A progressão do epitélio normal a carcinoma passando por adenoma, é caracterizada pelo acúmulo de anomalias histológicas (A), genéticas e epigenéticas (B). As mutações em genes de reparo de emparelhamentos incorretos causa instabilidade de microssatélites e mutações sucessivas em oncogenes e genes supressores de tumor, o que pode ocorrer em qualquer ponto na sequência adenoma-carcinoma (como mostrado pela linha de pontos) Adaptado de DAVIES, *et al.* 2005 e VOGELSTEIN *et al.* 2013.

Além das já bem caracterizadas alterações moleculares aqui apresentadas, muitos estudos têm se dedicado a investigar também as bases celulares da progressão de tumores colorretais. A EMT tem sido apontada como um evento importante no desenvolvimento do CCR de forma geral, devido a sua relação com a migração e invasão das células tumorais (ZHU *et al.*, 2013), e, especificamente, caracteriza o fenótipo do subtipo CMS4 (GUINNEY *et al.*, 2015). Neste processo as células mudam seu programa genético característico de células epiteliais e adquirem um fenótipo mesenquimal de forma gradual (Figura 1.3). Adicionalmente, mudam a polaridade celular “apical-basal” (distribuição assimétrica dos componentes celulares ao longo do eixo ápico-basal) para uma polaridade de “front-rear” (distribuição desigual dos componentes celulares entre a porção frontal, definida pela borda dianteira da membrana, e a porção caudal, onde ocorre a perda da aderência que é necessária para direcionar a migração). Neste processo também ocorre uma reorganização da actina cortical, formando fibras de estresse e projeções que direcionam o alongamento e motilidade celular. Estas projeções consistem em protrusões de membrana em forma de folha chamadas lamelipódios e extensões em forma de espiga na borda do lamelipódio, chamadas

filopódio. Por outro lado, outras projeções chamadas de invadopódios exercem função proteolítica, o que permite degradar a matriz extracelular (MEC), facilitando assim a invasão das células (LAMOUILLE *et al.*, 2014).

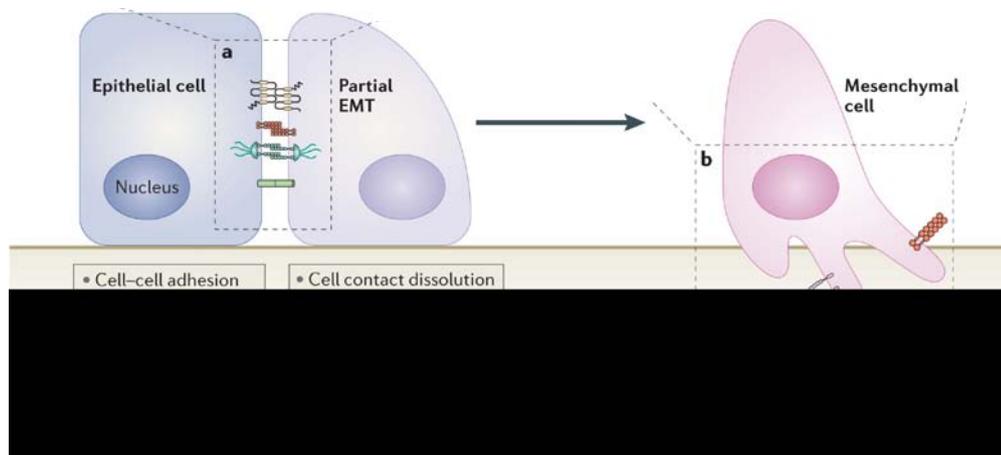


Figura 1.3: Eventos celulares durante a transição epitélio-mesênquimal (EMT). As primeiras etapas deste processo são a desmontagem dos complexos proteicos de adesão célula-célula e a perda de polaridade celular. Ao longo do processo ocorre repressão de genes relacionados ao fenótipo epitelial, ativação de genes associados a manutenção do fenótipo mesênquimal e reorganização do citoesqueleto de actina. Finalmente, as células adquirem motilidade e capacidade invasiva. Adaptado de LAMOUILLE *et al.*, 2014.

Outro evento chave que caracteriza a EMT é a perda ou desmontagem das estruturas responsáveis pela adesão célula-célula, induzida por mudanças tanto na expressão quanto na localização de proteínas que fazem parte do complexo juncional apical (CJA) e que medeiam a adesão intercelular. Durante este processo a caderina epitelial (E-caderina), proteína constituinte das junções aderentes e principal mediadora da adesão intercelular, pode ser clivada, degradada, ter sua expressão reprimida ou, até mesmo, ter comprometimento de suas funções, devido, por exemplo, a modificações pós-traducionais (CARVALHO *et al.*, 2016; NIETO *et al.*, 2016). Conseqüentemente, a β -catenina (proteína que contribui para a ancoragem da E-caderina aos filamentos de actina) pode ser translocada ao núcleo, em resposta a ativação da via Wnt, e ativar a transcrição de genes que reprimem a expressão da E-caderina (YILMAZ *et al.*, 2009). Além disso, outras que constituem o CJA têm seus níveis de expressão diminuídos, como, por exemplo, claudinas, ZO-1 e ocludinas (LAMOUILLE *et al.*, 2014).

1.2 O complexo juncional apical (CJA)

O tecido epitelial é caracterizado pela forte adesão entre as células que é mantida pelas junções intercelulares: junções *tight* (JTs), junções aderentes (JAs) e desmossomos. Atualmente, o conjunto formado pelas JTs e JAs se conhece como complexo juncional apical (CJA). Este complexo (Figura 1.4) é composto por estruturas protéicas, que ligadas ao citoesqueleto, estabilizam a adesão intercelular (NEUNLIST *et al.*, 2013). Além disso, o CJA também é responsável pelo estabelecimento e manutenção da polaridade celular, uma vez que bloqueia a difusão de moléculas entre os domínios apical e basolateral da membrana plasmática.

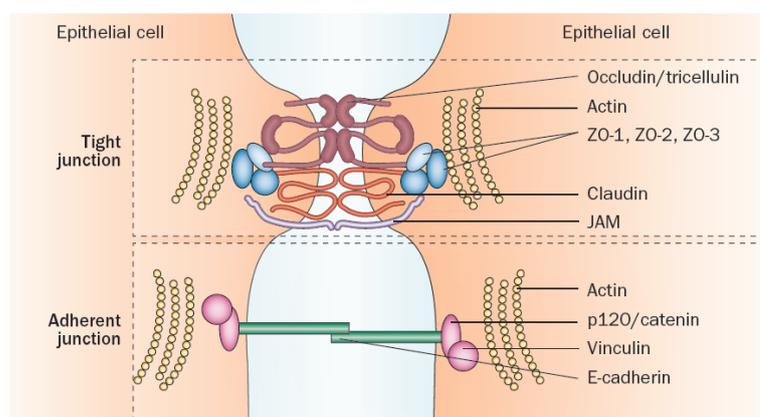


Figura 1.4: Complexo juncional apical (CJA). O CJA é constituído pelas JTs (região mais apical) e pelas JAs (localizadas inferior às JTs). As proteínas ZO e cateninas ligam, respectivamente, os constituintes transmembrana das JTs (occludina, claudina e JAM) e das JAs (E-caderina) ao citoesqueleto de actina. Adaptado de NEUNLIST *et al.*, 2013.

O recrutamento gradual dos componentes do CJA induz seu amadurecimento e, conseqüentemente, a polarização da célula, como pode ser observado na Figura 1.5. Neste contexto, a distribuição diferencial das proteínas entre os domínios apical e basolateral da membrana também permite regular a livre difusão de moléculas e íons através da via paracelular (espaço intercelular entre células adjacentes) (ZIHNI *et al.*, 2016).

O CJA também participa em diversas vias de sinalização que regulam eventos celulares como o remodelamento do citoesqueleto de actina, evasão da apoptose, aumento da proliferação celular, remodelamento da cromatina, e o aumento do potencial migratório (ZIHNI *et al.*, 2016).

As JAs, que se localizam na região inferior do CJA (Figura 1.4), medeiam a adesão célula-célula. Um dos componentes principais destas junções é a E-caderina, glicoproteína transmembrana e dependente de Ca^{2+} que se liga homotipicamente a E-caderina da célula

adjacente. A cauda citoplasmática da E-caderina interage com proteínas da família das cateninas como p120-catenina, β -catenina e α -catenina, que regulam a estabilidade do citoesqueleto de actina perijuncional, o que proporciona maior resistência a estas estruturas. Adicionalmente, se sabe que as JAs são necessárias para a montagem eficiente das JTs. A formação das JAs induz à montagem das JTs que se encontram na parte superior do CJA (Figura 1.4) (CAPALDO *et al.*, 2007).

Por sua vez, as JTs exercem duas funções principais, impedir o intercâmbio entre os componentes da membrana plasmática apical e basolateral e manter a barreira que controla a passagem de íons, macromoléculas e solutos pela via paracelular. Estas junções apresentam dois tipos de proteínas transmembrana, ocludinas e claudinas, que garantem estas funções; e proteínas adaptadoras citoplasmáticas como as *zonula occludens* (ZOs), que são responsáveis pela ligação das proteínas transmembrana ao citoesqueleto (Figura 1.4) (ZIHNI *et al.*, 2016). A barreira constituída pelas JTs exhibe seletividade por carga e por tamanho mediante duas vias: a via do "poro" e a via do "extravasamento". A via do poro se refere a uma maior seletividade e é regulada pelo tipo de claudina presente na junção; já a via do "extravasamento" constitui uma via menos seletiva, e esta regulada pelas proteínas ZO-1 (*zonula occludens1*) e ocludina (SHEN *et al.*, 2011).

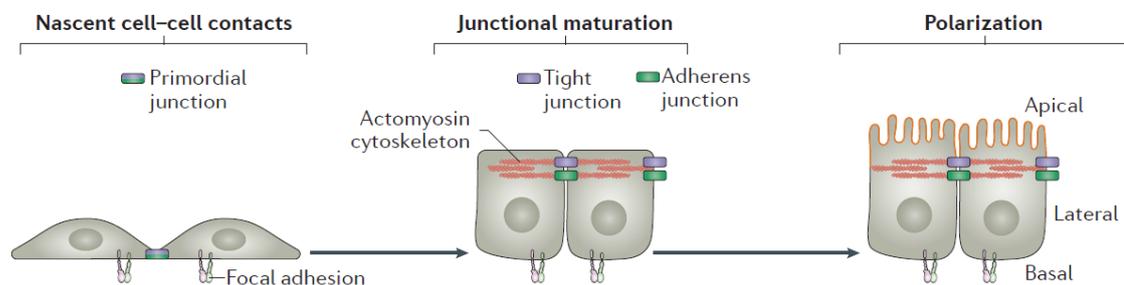


Figura 1.5: Montagem do CJA e polarização celular. As células epiteliais formam contatos célula-célula mediante a formação de uma junção primitiva formada por E-caderina e nectina, que induz o recrutamento de componentes da JT. O incremento subsequente dos componentes da JT induz a maturação da mesma que envolve a separação das junções e o enriquecimento da região perijuncional com o citoesqueleto de actomiosina. Finalmente, a polarização é induzida pela ativação de complexos de sinalização associados às junções que dirigem a diferenciação da membrana apical. Adaptado de ZIHNI *et al.*, 2016.

De forma geral, a manutenção das funções da JTs depende da estabilidade das mesmas que pode ser regulada pela sua composição protéica. Por exemplo, se sabe que existem 27 tipos de claudinas que formam poros com seletividades diferentes e que se expressam diferencialmente entre os tecidos do organismo (DÖRFEL *et al.*, 2012). Neste contexto, tem sido demonstrado que a expressão das claudinas pode ser regulada por fatores de crescimento e interleucinas. (ODENWALD *et al.*, 2016). Outro fator que regula a estabilidade das JTs é a interação entre as proteínas que a compõem e a localização subcelular das mesmas. Sabe-se

também que a fosforilação de claudinas e ocludinas modifica a interação destas proteínas com a ZO-1, assim como a sua localização na membrana celular (SAKAKIBARA *et al.*, 1997; TWISS *et al.*, 2013; LEE, 2015).

O CJA é uma estrutura dinâmica, pois a interação entre as moléculas que o compõe, bem como a expressão das mesmas, pode ser alterada de acordo com as necessidades fisiológicas da célula (TURNER, 2009). Além disso, durante a progressão de tumores malignos de origem epitelial, como o CCR, frequentemente observa-se uma desorganização do CJA que favorece tanto a difusão de fatores importantes para o crescimento e sobrevivência tumoral quanto outros eventos-chave no processo metastático (MULLIN, 1997; CHUNG *et al.*, 2014).

1.3 A desestabilização do CJA em CCR

Muitos estudos têm relatado a desregulação das proteínas componentes do CJA em amostras de tumores humanos e linhagens celulares; esta desregulação pode ser o resultado do aumento ou diminuição da expressão e/ou mudanças na localização subcelular destas proteínas (GEHREN *et al.*, 2015).

A desregulação da E-caderina tem mostrado associação com a progressão de vários tumores epiteliais, incluindo o CCR. Especificamente, a diminuição da sua expressão tem sido relacionada com a regulação positiva de genes mesenquimais como SNAIL e TWIST (KROEPIL *et al.*, 2012). Por outro lado, análises por imunohistoquímica de amostras de pacientes mostraram que a perda da E-caderina estava associada com o desenvolvimento de metástase no fígado (GAVERT *et al.*, 2013). Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que as progênies de células de CCR que são resistentes à irradiação adquirem um fenótipo tipo mesenquimal, caracterizado pela expressão reduzida da E-caderina e, concomitantemente, expressão aumentada da β -catenina (BASTOS *et al.*, 2014).

A interação entre a β -catenina e a E-caderina é fundamental para manter a estabilidade das JAs e, conseqüentemente, do CJA. Assim, quando a β -catenina está livre no citoplasma, esta proteína pode então ser translocada para o núcleo e ativar a transcrição de genes alvo da via Wnt/ β -catenina (VALENTA *et al.*, 2012). Em CCR, são frequentemente observadas mutações em APC ou CTNNB1 (gene que codifica para a β -catenina), resultando na ativação da via Wnt/ β -catenina (WHITE *et al.*, 2012). A disfunção na via de sinalização Wnt/ β -catenina resulta no acúmulo nuclear da β -catenina, evento que tem sido diretamente relacionado com um crescimento tumoral mais rápido e pior prognóstico (CHEN *et al.*, 2013).

No que diz respeito às JTs, tem sido estudado o papel da família das proteínas ZO na formação destas junções. Neste contexto, foi demonstrado que a formação destas junções são dependentes da proteína ZO-1, enquanto que, as deficiências em ZO-2 e/ou ZO-3 não tem efeito na sua formação (TSUKITA *et al.*, 2009). Por outro lado, em um estudo que utilizou tumores primários de CCR, foi achada uma correlação entre os baixos níveis de expressão de ZO-1 e E-caderina com o desenvolvimento de metástases hepáticas (KAIHARA *et al.*, 2003). Já a ocludina, parece não ser essencial para a formação das JTs (DÖRFEL *et al.*, 2012) porém, esta proteína, que é recrutada pelas claudinas, participa na regulação do fluxo paracelular (FURUSE *et al.*, 1998; AL-SADI *et al.*, 2011). Além disso, estudos têm mostrado que os tecidos de CCR humano apresentam diminuição dos níveis de expressão da ocludina em comparação com os tecidos normais, e essa diminuição se correlaciona com o estadiamento do tumor, pois as lesões mais avançadas apresentam progressivamente menos expressão de ocludina que lesões menos avançadas (WANG *et al.*, 2011).

Por sua vez, as claudinas estão diretamente envolvidas com a montagem das JTs e com a regulação da barreira paracelular. Estas proteínas atuam na adesão celular através das suas interações em membranas celulares adjacentes (GÜNZEL *et al.*, 2013). Além disso, as claudinas desempenham papéis importantes na organização do citoesqueleto, vias de sinalização e transporte de vesículas (TAMURA *et al.*, 2014). Alterações na expressão e localização destas proteínas têm sido correlacionadas com a perda da homeostase, contribuindo para o desenvolvimento de diversas doenças, inclusive do CCR (KRUG *et al.*, 2014). Estudos têm demonstrado que a diminuição da expressão de claudina-1 está diretamente associada com estádios avançados de CCR e a baixa sobrevida dos pacientes (RESNICK *et al.*, 2005; KINUGASA *et al.*, 2012). Em modelos *in vivo* de CCR, foi observado também uma menor localização desta proteína nos contatos das células tumorais em comparação com as células da mucosa normal (DHAWAN *et al.*, 2005).

Por outro lado, o aumento da expressão das claudinas 3 e 4, em amostras de CCR humano, foi relacionado com a desorganização das JTs e com maior permeabilidade celular (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005). Em estudo desenvolvido por nosso grupo de pesquisa utilizando linhagens de CCR, foi demonstrado que o aumento de expressão da cld-3, induzida pela ativação de vias de sinalização do EGFR, potencializa a malignidade das células e altera o fluxo paracelular de macromoléculas (DE SOUZA *et al.*, 2013). Adicionalmente, foi relatado que o EGFR pode atuar na fosforilação de resíduos de tirosina da ZO-1, causando a perda de função desta proteína em eventos precoces da progressão do CCR (KAWAMATA *et al.*, 2003). No entanto, até o presente momento, os refinados mecanismos moleculares que interconectam o EGFR às JTs ainda não são compreendidos na sua totalidade.

1.4 O Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR)

1.4.1 Estrutura e ativação do EGFR

O Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR/HER1/ErbB1) pertence a uma família de receptores tirosina-quinase conhecidos como a família ErbB, que é formada por outros três membros HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 e Her4/ErbB4 (Figura 1.6 A) (NORMANNO *et al.*, 2005). Estes receptores traduzem a informação de fatores de crescimento extracelulares a vias de sinalização intracelular que modulam funções biológicas tais como proliferação, migração, diferenciação e apoptose (HOLBRO; HYNES, 2004). Além disso, eles encontram-se ubiquamente expressos em células epiteliais, mesenquimais, neuronais e seus progenitores (ROSKOSKI, 2014), podendo formar homodímeros ou heterodímeros o que gera uma rede complexa de transdução de sinais (ALROY *et al.*, 1997; YARDEN *et al.*, 2012).

O EGFR é uma glicoproteína transmembrana de 170 kDa que apresenta uma estrutura que consiste em: um Domínio Extracelular (DEC), um único domínio transmembranar hidrofóbico e um domínio intracelular em alfa-hélice com atividade tirosina-quinase (Figura 1.6 A) (KOVACS *et al.*, 2015). O DEC, que possui 12 sítios potenciais de N-glicosilação (FERNANDES *et al.*, 2001) é formado por quatro subdomínios chamados I (L1), II (S1), III (L2) e IV (S2) (Figura 1.6). Os subdomínios I e III são as regiões que formam o local de ligação do ligante (LEMMON *et al.*, 2014). Os Subdomínios II e IV são regiões ricas em cisteína que não formam pontes de dissulfeto entre eles. O subdomínio II constitui a região de dimerização do receptor e em ausência de ligante, encontra-se completamente oculto por interações intermoleculares com o domínio IV, estado que é conhecido como “conformação fechada” (Figura 1.6 A).

A união do ligante ao DEC promove uma rotação de 130° dos subdomínios I e II em relação aos subdomínios III e IV, deixando o subdomínio II exposto, o que possibilita a dimerização. Esta configuração é conhecida como “conformação aberta” (TALAVERA *et al.*, 2009). A dimerização resulta na auto-fosforilação de resíduos de tirosina na cauda intracelular C-terminal (Figura 1.6 B). Isto induz o recrutamento de proteínas efetoras com domínios SH2 (do inglês, *Src homology domains*) e PTB (do inglês, *phospho tyrosine binding domains*) para os sítios de fosfo-tirosina e a consequente ativação de cascatas de sinalização (KOVACS *et al.*, 2015).

A região citoplasmática deste receptor, por sua vez, compreende três subdomínios: o subdomínio justamembrana; a cauda carboxi-terminal, que não apresenta atividade catalítica e

possui seis tirosinas que são os locais de transfosforilação e ligação de proteínas adaptadoras e/ou efetoras (Grb2 e fosfolipase Cy respectivamente); e o subdomínio central tirosina cinase (domínio de homologia de Src1 (SH1)), que é responsável pela transfosforilação dos seis resíduos de tirosina da região carboxi-terminal (BAZLEY *et al.*, 2005).

Evidências experimentais sugerem que antes da ligação do ligante, o domínio catalítico da região intracelular do EGFR adota uma conformação inativa que é inacessível às proteínas adaptadoras e efetoras, assim como ao trifosfato de adenosina (ATP, do inglês, *adenosin triphosphate*) (DIBB *et al.*, 2004). Além disso, se sabe que as tirosinas que são fosforiladas no EGFR dependem de qual ligante produziu a ativação (SWEENEY *et al.*, 2000) e o padrão de fosforilação determina o tipo de segundo mensageiro que será recrutado (VANDER GEER *et al.*, 1995). Os resíduos de tirosina e os aminoácidos que os circundam são especificamente localizados para a interação com um grupo específico de segundos mensageiros, de modo que a resposta biológica é induzida de forma correta.

Os ligantes conhecidos do EGFR são: o Fator de Crescimento Epidérmico (EGF, do inglês, *Epidermal Growth Factor*), que tem um efeito promotor da proliferação de células epidérmicas que expressam o receptor; o Fator de Crescimento Transformante (TGF α , do inglês, *Transforming Growth Factor*), a Amphiregulin, a Betacelulina, o Fator de Crescimento de ligação de Heparina (HB-EGF, do inglês, *heparine binding growth factor*), e a Epirregulina (NORMANNO *et al.*, 2005).

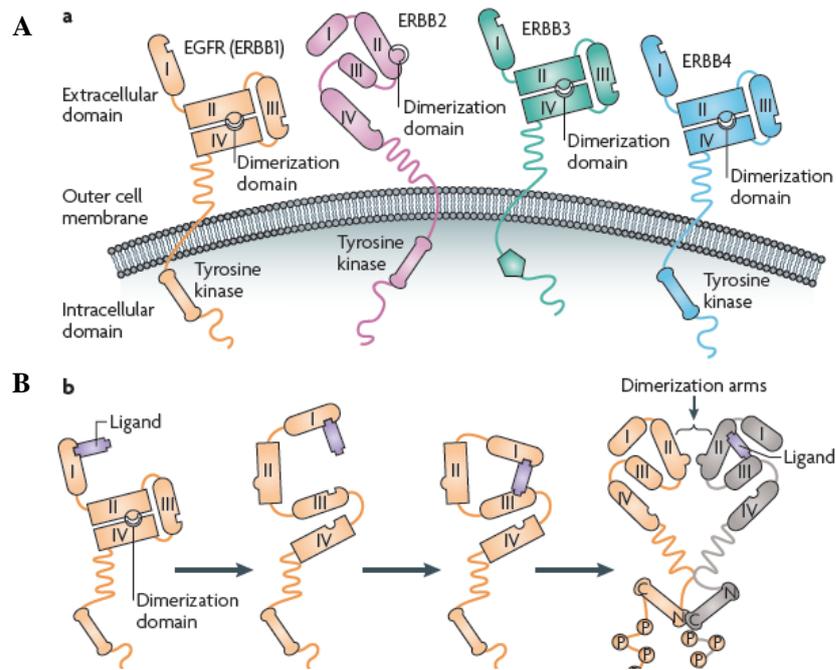


Figura 1.6: Os receptores da família ErbB. A) Os quatro receptores ErbB estão formados por três domínios funcionais: o domínio extracelular (DEC), o domínio transmembrana e o intracelular com atividade tirosina cinase. B) A união do ligante ao DEC do EGFR induz mudanças conformacionais que permitem a sua dimerização e, conseqüentemente, a fosforilação do domínio intracelular Adaptado de BESELGA, 2009.

1.4.2 Vias de sinalização ativadas pelo EGFR

As redes de sinais transmitidas pelo EGFR são muito complexas. Uma dessas é via das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs, do inglês, *mitogen-activated protein kinases*). A proteína Grb2 que interage com os receptores ativa o fator de troca Sos e seguidamente a proteína Ras é ativada. Subseqüentemente, Raf e MEK1/2 são ativadas; estas últimas fosforilam as proteínas Erk 1/2 (do inglês, *extracellular signal-regulated kinase 1 and 2*) que induzem a expressão de fatores de transcrição que aumentam a transcrição de genes envolvidos na proliferação celular, tais como ciclina D1, que promove a progressão do ciclo celular para a fase G1/S. A atividade aberrante das MAPKs está relacionada com a proliferação celular descontrolada observada em tumores (BASELGA *et al.*, 2009). Outra via utilizada por este receptor para transmitir sinais para o núcleo é a PI3K/Akt (do inglês, *phosphatidylinositol-3 kinase serine-threonine protein kinase*). A ativação do receptor induz o recrutamento de PI3K para a membrana celular, onde a fosforilação do composto fosfatidilinositol 4,5-bifosfato- (PIP2) gera o segundo mensageiro fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfato (PIP3). O PIP3 constitui um local de ligação de alta afinidade para Akt. Uma vez posicionada na membrana plasmática, Akt é fosforilada pela

serina-treonina cinase dependente de fosfolipídios (PDK1, do inglês *phosphoinositide dependent kinase1*). A proteína Akt quando fosforilada regula uma variedade de substratos diferentes que influenciam a sobrevivência, a angiogênese, a proliferação e o metabolismo celular (BASELGA *et al.*, 2009).

O EGFR modula outras vias de sinalização, tais como: a via de c-Src, uma tirosina-cinase citoplasmática envolvida em numerosos processos celulares, incluindo sinais mitogênicos (PRENZEL *et al.*, 2001) e a via de sinalização mediada pela proteína fosfolipase C γ (PLC γ , do inglês, *phospholipaseC γ*), que controla processos celulares complexos, tais como a proliferação, a migração e a apoptose (BASELGA *et al.*, 2009).

1.4.3 O papel do EGFR em câncer

A ativação do EGFR induz o crescimento celular de forma fisiológica, porém a sinalização aberrante deste receptor, devido à super-expressão, sinalização autócrina ou mutação, pode proporcionar vantagens às células tumorais. Geralmente, as células normais expressam aproximadamente entre 4×10^4 e 1×10^5 receptores por célula mas as células tumorais podem expressar 2×10^6 receptores por célula (HERBST *et al.*, 2002). Foi relatado que o microambiente hipóxico de tumores também pode induzir a super-expressão do EGFR aumentando seus níveis de mRNA, sendo este mecanismo causado geralmente por amplificação gênica (FRANOVIC *et al.*, 2007; MAIRE *et al.*, 2014).

A expressão aumentada do EGFR tem sido observada numa ampla variedade de tumores, incluindo pulmão, mama, cabeça e pescoço, cólon, pâncreas (BRAND *et al.*, 2011), próstata (OKEGAWA *et al.*, 2016), bexiga (CARLSSON *et al.*, 2015), ovários (XU *et al.*, 2016) e glioma (KWATRA, 2016). Curiosamente, no caso de carcinoma da cabeça e pescoço a expressão aumentada do EGFR ocorre em 100% dos casos estudados, e em carcinoma de pulmão de células não pequenas (NSCLC), foi encontrada em 80% dos casos (NORMANNO *et al.*, 2005). Além disso, nestes tumores, a super-expressão do EGFR tem sido associada com um prognóstico desfavorável e um elevado risco de recorrência da doença (TURKERI *et al.*, 1998 ; GAO *et al.*, 2016). Já em tumores de ovário, cólon, bexiga e tireoide a super-expressão do EGFR está relacionada com diminuição da sobrevida dos pacientes (GRANDIS *et al.*, 1998; TAS *et al.*, 2014; KOC *et al.*, 2015). Adicionalmente, níveis aumentados de expressão do EGFR têm sido correlacionados com a resistência a terapias convencionais (HOLBRO *et al.*, 2003).

Com relação a presença de mutações do EGFR em tumores, tem sido descrito em glioblastoma o mutante truncado EGFRvIII, produto de deleção dos exons 2 - 7 (SUGAWA *et al.*, 1990; FREDERICK *et al.*, 2000). Esta variante truncada também tem sido encontrada em outros tipos de câncer como mama, ovário e NSCLC (GARCIA DE PALAZZO *et al.*, 1993; MOSCATELLO *et al.*, 1995). Adicionalmente, em NSCLC também ocorrem mutações em regiões que codificam para a o domínio tirosina cinase, tais como o exon 19, que induzem ativação constitutiva independente de ligante (MITSUDOMI *et al.*, 2007), o que causa resistência a terapias que utilizam anticorpos monoclonais e inibidores da atividade tirosina cinase (KOBAYASHI *et al.*, 2005; YEWALE *et al.*, 2013).

Além dos mecanismos clássicos aqui apresentados que levam a alterações nas vias de sinalização desencadeadas pelo EGFR, a sinalização aberrante deste receptor pode ser causada também por modificações nos *N*-glicanos desta proteína, promovendo o crescimento e malignidade tumoral (TAKAHASHI *et al.*, 2009; PARK *et al.*, 2012).

1.5 Glicosilação de proteínas: N-glicanos

A glicosilação é definida como um processo enzimático no qual são adicionados carboidratos a proteínas, lipídios, ou, até mesmo a outros carboidratos, mediante a formação de ligações glicosídicas (FUSTER *et al.*, 2005). No que tange às proteínas, a glicosilação constitui uma das modificações pós-traduçionais mais comuns e ocorre, geralmente, no retículo endoplasmático (ER) e no aparelho de Golgi (DELL *et al.*, 2001; KHOURY *et al.*, 2011). As glicoproteínas apresentam na sua estrutura predominantemente dois tipos de glicanos covalentemente ligados à cadeia polipeptídica através de átomos de nitrogênio ou oxigênio, que são conhecidos como *N*-glicanos ou *O*-glicanos respectivamente (VARKI, A. *et al.*, 2009; BENNETT *et al.*, 2012).

A *N*-glicosilação é iniciada pela síntese de um oligossacarídeo precursor mediante a adição sequencial de monossacarídeos a uma molécula de dolichol-fosfato ancorada na membrana do ER, até completar um oligossacarídeo composto por 14 unidades (Figura 1.7, painel inferior). Este processo é levado a cabo por glicosiltransferases que utilizam nucleotídeos doadores de açúcar como substrato. Esses nucleotídeos doadores de açúcar são constituídos por um monossacarídeo associado à uridina difosfato (UDP), guanosina difosfato (GDP) ou citidinamofosfato (CMP) e podem ser obtidos por meio da dieta, pela via de síntese de novo ou pela via de reaproveitamento. Por sua vez, os monossacarídeos associados a esses nucleotídeos doadores de açúcar podem ser: ácido siálico (Neu5Ac); glicose (Glc),

galactose (Gal) e manose (Man); fucose (Fuc); N-acetilgalactosamina (GalNAc) e N-acetilglucosamina (GlcNAc); xilose (Xyl); ácido glicurônico (GlcA) e o ácido idurônico (IdoA) (VARKI, A. *et al.*, 2008)

Uma vez sintetizado, o oligossacarídeo é transferido para os resíduos de asparagina das proteínas nascentes, que se encontram numa sequência consenso (Asn-X-Ser/Thr) onde X pode ser qualquer aminoácido exceto prolina. Esta reação é catalisada pelo complexo multimérico oligossacariltransferase (OST) (Figura 1.7 painel inferior) (SEARS *et al.*, 1998) e os locais de *N*-glicosilação podem ou não ser ocupados; a esse respeito, sabe-se que as propriedades químicas dos aminoácidos que circundam estes locais influenciam o reconhecimento por parte da OST (PETRESCU *et al.*, 2004; JAMALUDDIN *et al.*, 2011).

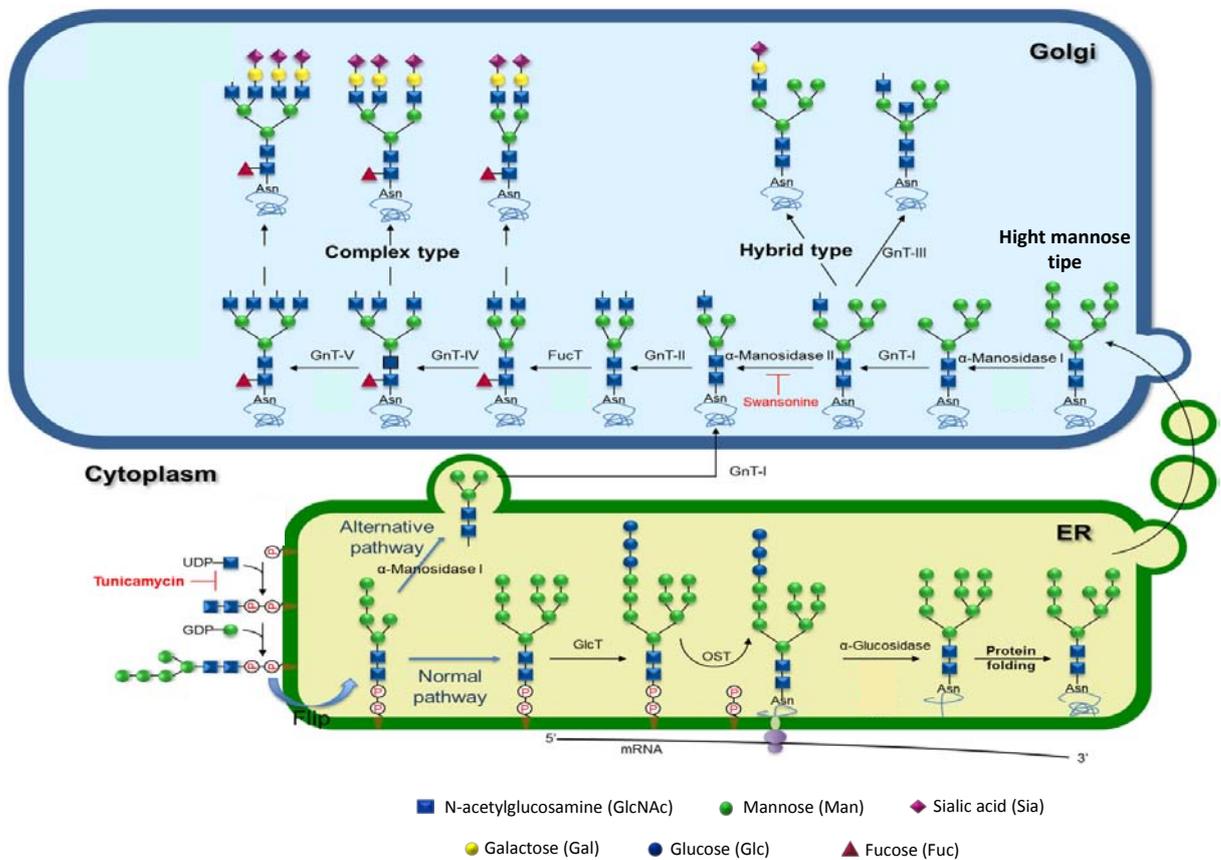


Figura 1.7: Representação do processo de *N*-glicosilação. As proteínas nascentes sintetizadas no retículo endoplasmático são glicosiladas através da transferência *en bloc* de um composto de 14 unidades de monossacarídeos (oligossacarídeo precursor) para um resíduo de asparagina na sequência (Asn-X-Ser/Thr) em que X é qualquer aminoácido exceto prolina. Esta reação é catalisada pela OST (oligosacariltransferase). Logo, no aparelho de Golgi o *N*-glicano é modificado por glicosiltransferases e glicosidases gerando diferentes tipos de *N*-glicanos: os ricos em manose, os híbridos e os complexos. Adicionalmente os *N*-glicanos podem ser fucosilado e sialilados. Em vermelho se indica as etapas inibidas pela tunicamicina e swainsonina. Mais adiante, no item 1.6, será apresentada a função destas drogas. Adaptado de (VASCONCELOS-DOS-SANTOS *et al.*, 2015).

Os *N*-glicanos apresentam uma estrutura básica conhecida como *core* e a diversidade dos mesmos depende do tipo de monossacarídeo que é adicionado a esse *core*, assim como a ordem e o tipo de ligação entre os monossacarídeos (BROOKS *et al.*, 2008). Durante o processo de maturação no aparelho de Golgi, que é mediado por glicosiltransferases e glicosidases (Figura 1.7, painel superior) (DELL *et al.*, 2001), são gerados três tipos de *N*-glicanos: (I) os ricos em manose, onde são adicionados ao *core* entre cinco e nove resíduos de Man; (II) os híbridos, que apresentam características estruturais tanto do tipo ricos em manose quanto do tipo complexo; e (III) os complexos, gerados a partir da ação de α -manosidases, nos quais a adição de GlcNAc permite o alongamento de cadeias ou antenas que podem ser bi-, tri- ou tetra-antenas. Adicionalmente, estas estruturas podem ser decoradas pela ação de transferases que adicionam Gal, Fuc e Neu5Ac. Assim, os *N*-glicanos exibem uma ampla variedade de estruturas que são cruciais para desempenhar os mais diversos papéis funcionais nas células.

Nas últimas décadas, muitos estudos têm sido dedicados a relacionar as estruturas dos glicanos com as suas funções, dando origem a um novo campo na ciência denominado glicômica funcional (ZHAO *et al.*, 2008). Estes estudos têm demonstrado que os *N*-glicanos participam no controle de qualidade das proteínas uma vez que afetam o enovelamento e a conformação das mesmas (FERRIS *et al.*, 2014). Assim, os *N*-glicanos modificam as funções das proteínas e, conseqüentemente, os eventos celulares nos quais elas participam, seja no metabolismo, sinalização, adesão célula-célula e interação célula-matriz (OHTSUBO; MARTH, 2006). A Figura 1.8 ilustra algumas destas funções.

É importante ressaltar que a expressão aberrante dos *N*-glicanos impacta na sua função contribuindo assim para o desenvolvimento de diversas patologias (BLOMME *et al.*, 2009), inclusive do câncer (VASCONCELOS-DOS-SANTOS *et al.*, 2015).

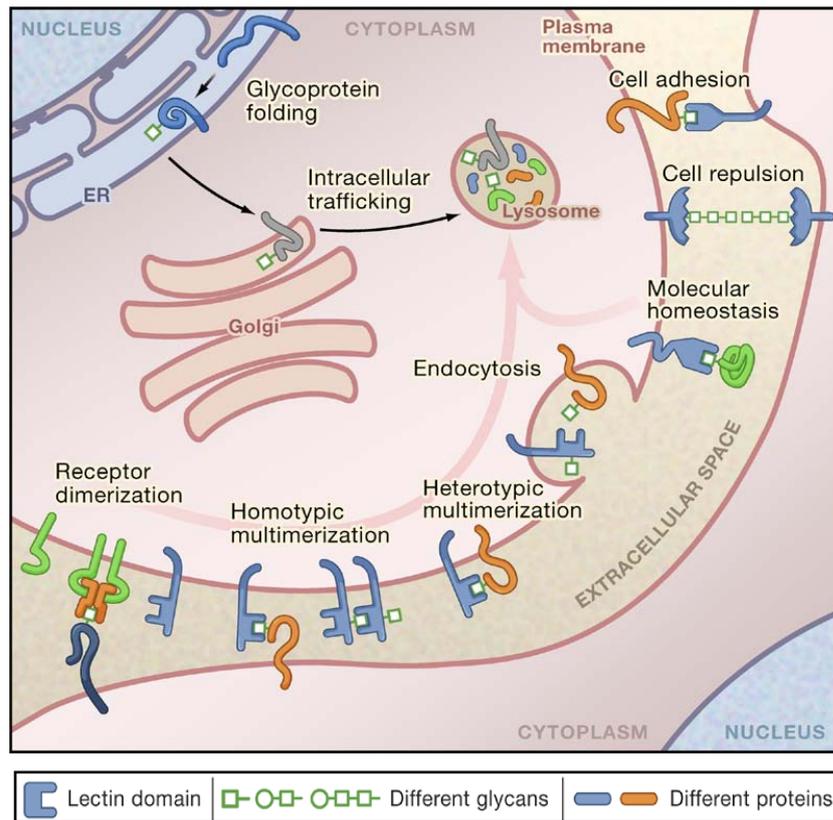


Figura 1.8: Representação das funções dos N-glicanos. Os N-glicanos participam de processos celulares como: adesão célula-célula, endocitose, funcionalidade de receptores e controle de qualidade na síntese de proteínas. Adaptado de OHTSUBO; MARTH, 2006.

1.5.1 N-glicosilação e câncer

As alterações na glicosilação são consideradas uma característica do câncer (DE FREITAS JUNIOR; MORGADO-DÍAZ; 2016). Estas alterações podem ser atribuídas a diversos fatores: (a) disponibilidade das moléculas precursoras da reação de glicosilação (Kumamoto *et al.*, 2001); (b) alterações na conformação terciária do esqueleto peptídico e da cadeia do glicano nascente, (c) *up* ou *down* regulação das glicosiltransferases (KANNAGI *et al.*, 2008; PINHO *et al.*, 2012).

Mudanças no padrão de expressão de N-glicanos complexos β -1,6 ramificados, que são produtos da enzima N-acetilglucosaminiltransferase V (GnT-V ou MGAT5), têm sido relacionadas com o incremento do potencial replicativo e a capacidade de invadir e metastizar de alguns tipos de câncer (GUO *et al.*, 2010; KIZUKA *et al.*, 2016). Especificamente, tem sido observado um frequente aumento dos transcritos de MGAT 5 e seu produto em diversos tumores como, por exemplo: gástrico (HUANG *et al.*, 2014), esôfago (ISHIBASHI *et al.*, 2005) cólon (GUO *et al.*, 2014), e fígado (ITO *et al.*, 2001). Além disso, o incremento da

expressão das estruturas β -1,6 ramificadas também se associa com piores prognósticos em pacientes com câncer de mama (HANDERSON *et al.*, 2005).

Muitos estudos têm sido dedicados a elucidar os mecanismos moleculares mediados por *N*-glicanos β -1,6 ramificados. Sabe-se que estas estruturas regulam a função de proteínas cruciais no processo de tumorigênese como, por exemplo, o EGFR (WANG *et al.*, 2009) e a E-caderina (GUO *et al.*, 2003).

No que tange ao EGFR estudos tem demonstrado que o aumento da expressão de MGAT5 induz o incremento dos níveis de fosforilação deste receptor, assim como de proteínas *downstream*, favorecendo processos de migração em células tumorais de fígado (WANG *et al.*, 2009). Por outro lado, acredita-se que as ramificações β -1,6 dos *N*-glicanos do EGFR favorecem a permanência desta proteína na membrana plasmática e, como consequência, a persistência da sua sinalização (LAU *et al.*, 2007), uma vez que estas estruturas interagem com galectinas (Figura 1.9) (TAKAHASHI *et al.*, 2016).

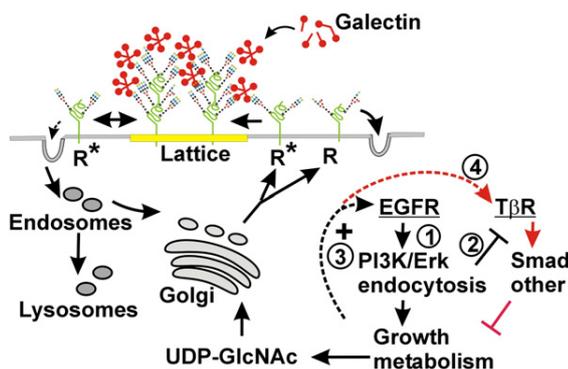


Figura 1.9: Representação da regulação do EGFR mediada por ramificações β -1,6. A expressão de *N*-glicanos complexos β -1,6 ramificados no EGFR impede a sua endocitose mediante a interação com a galectina 3, tendo como consequência aumento dos níveis de ativação das vias de sinalização de PI3K e Erk. LAU *et al.*, 2007.

As galectinas são proteínas com domínios que reconhecem β -galactose (BARONDES *et al.*, 1994) e se ligam com alta afinidade aos *N*-glicanos complexos ramificados, estabilizando os mesmos na membrana (PATNAIK *et al.*, 2006; DENNIS *et al.*, 2009).

Diversos estudos têm demonstrado o papel dos *N*-glicanos complexos na regulação do CJA. A E-caderina, proteína essencial na manutenção da estabilidade deste complexo (Figura 1.4), apresenta quatro sítios potenciais de *N*-glicosilação (ZHAO *et al.*, 2008) e, alterações no perfil de expressão desses glicanos, estão relacionadas com a aquisição de um fenótipo maligno (PINHO *et al.*, 2009; DE FREITAS JUNIOR *et al.*, 2011). A expressão de *N*-glicanos β 1,6-ramificados na E-caderina afeta a adesão célula-célula, uma vez que desestabiliza as interações E-caderina/cateninas (PINHO *et al.*, 2013). Considerando que os

produtos de MGAT5 tornam-se *N*-glicanos tri e tetra-antennados, existe uma hipótese que estas moléculas com ramificações β 1,6 possam atuar como uma barreira química contra o estabelecimento da adesão célula-célula, funcionando como obstáculo para interações homotípicas entre E-caderinas de células vizinhas (LANGER *et al.*, 2012).

Por outro lado, tem sido demonstrado que quando a E-caderina encontra-se pobremente glicosilada esta recruta a proteína PP2A (proteína fosfatase A2), promovendo a organização das JTs e a estabilidade das JAs (Figura 1.10) (LIWOSZ *et al.*, 2006; NITA-LAZAR *et al.*, 2010).

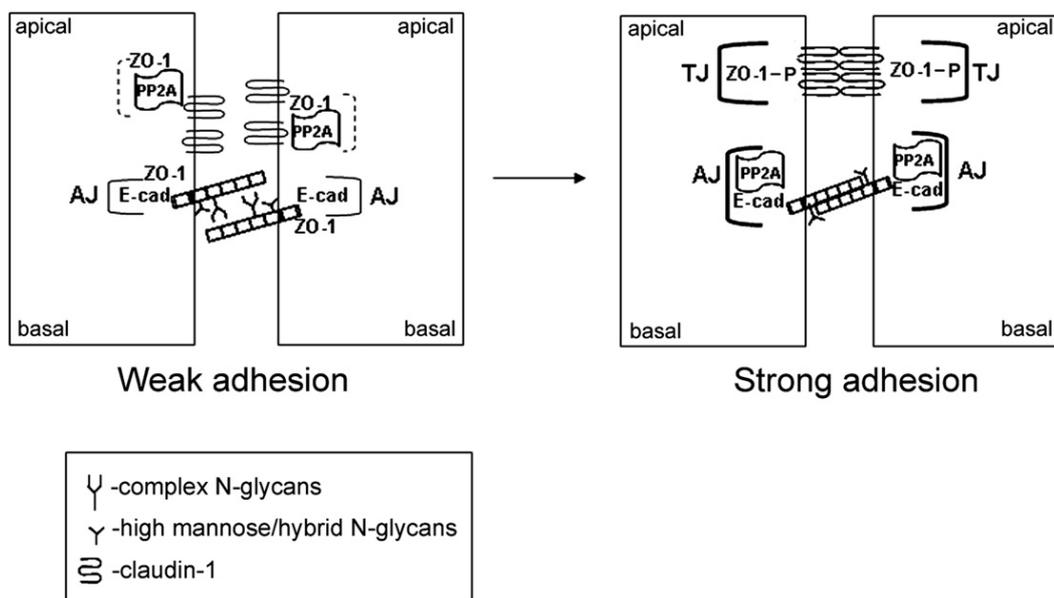


Figura 1.10: *N*-glicosilação da E-caderina e estabilidade das JTs e JAs. A E-caderina hiperglicosilada interfere no recrutamento de PP2A para as junções aderentes, facilitando associação de PP2A com ZO-1 e claudina-1, o que inibe a formação das JTs. Já a E-caderina hipoglicosilada recruta as moléculas de PP2A para as JAs, o que promove o estabelecimento das JTs. NITA-LAZAR *et al.*, 2010.

Os *N*-glicanos β 1,6-ramificados frequentemente são alvo de extensão com cadeias de poli-*N*-acetilactosamina compostas por unidades repetidas de LacNAc (Figura 1.11) (Gal β 1,4-GlcNAc β 1,3); (YOUSEFI *et al.*, 1991). As enzimas que sintetizam estas estruturas são as β 1,3-*N*-acetilglicosaminiltransferase (β 3GnT), e, entre elas, a B3GnT8 é a que modifica os *N*-glicanos β 1,6-ramificados (SHEN *et al.*, 2014). Vários estudos tem achado altos níveis do mRNA da B3GnT8 em diferentes linhagens de CCR (ISHIDA *et al.*, 2005); (HOLST *et al.*, 2016) e, tem sido demonstrado que a superexpressão da mesma potencializa a capacidade invasiva das células tumorais (NI *et al.*, 2014). Por outro lado a expressão da B3GnT8 tem sido relacionada com a progressão de gliomas, encontrando-se também mais expressa nos tecidos tumorais do que nos normais (LIU *et al.*, 2014).

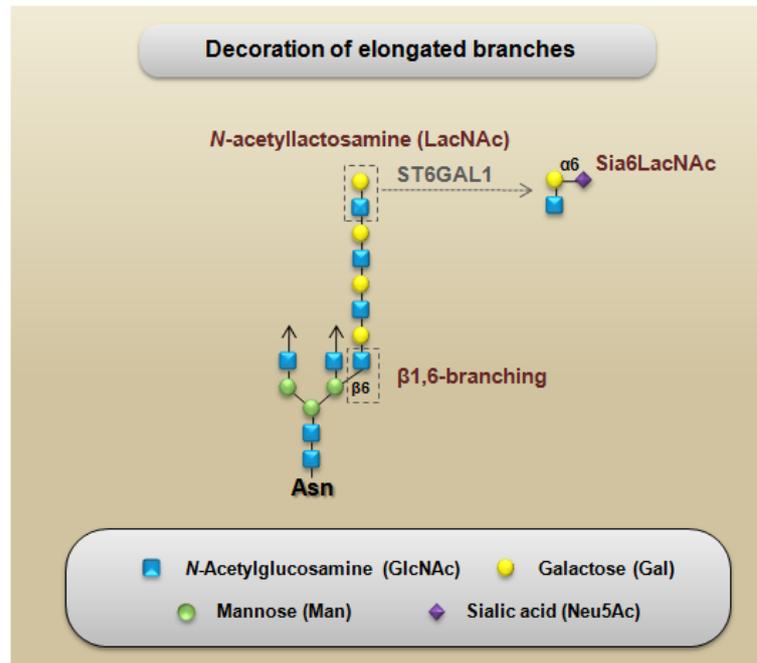


Figura 1.11: Representação do processo de extensão e capeamento de *N*-glicanos β 1,6-ramificados. As ramificações β 1,6 podem ser alongadas com cadeias de LacNAc e finalmente, a enzima ST6GAL1 adiciona o ácido siálico terminal na cadeia de poli-*N*-acetilactosamina. Adaptado de DE-FREITAS-JUNIOR; MORGADO-DÍAZ; 2015.

As cadeias de poli-*N*-acetilactosamina podem ser modificadas por sialiltransferases que adicionam um ácido siálico terminal (Figura 1.11) (LANGE *et al.*, 2014) e, de forma geral, mudanças no padrão de sialilação terminal na superfície celular têm sido observadas em diferentes tipos de tumores, por exemplo: de mama (ALLEY; NOVOTNY; 2010), de pulmão (VASSEUR *et al.*, 2012), de próstata (SALDOVA *et al.*, 2011), de ovário (WANG *et al.*, 2005), de cólon (DALL'OLIO *et al.*, 1999) e fígado (POUSSET *et al.*, 1997). A enzima ST6GAL1 (β -galactoside α 2,6-sialiltransferase I) faz parte da família de sialiltransferases e é responsável pela sialilação α -2,6. Estudos têm mostrado o papel desta proteína na progressão do CCR. Neste contexto, tem sido observado que a ST6GAL1 apresenta altos níveis de expressão em adenocarcinomas de cólon e a sua expressão esta relacionada com a capacidade invasiva e migratória das células (DALL'OLIO *et al.*, 1989; PARK *et al.*, 2012). O aumento da expressão do produto da ST6GAL1 é capaz de promover a diminuição da expressão de E-caderina reprimindo a sua transcrição e afetando seu *turnover* (LU *et al.*, 2014).

A sialilação α 2,6 mediada pela ST6GAL1 também tem sido relacionada com mecanismos de escape a morte celular por apoptose (LICHTENSTEIN *et al.*, 2013). Um estudo demonstrou que este tipo de sialilação do receptor de morte Fas impede a indução de apoptose mediada pela sinalização desde receptor (SWINDALL *et al.*, 2011).

Conseqüentemente com essa maior sobrevivência, a expressão da ST6GAL1 também tem sido relacionada a quimo e radio resistência em CCR (Figura 1.12) (PARK *et al.*, 2013).

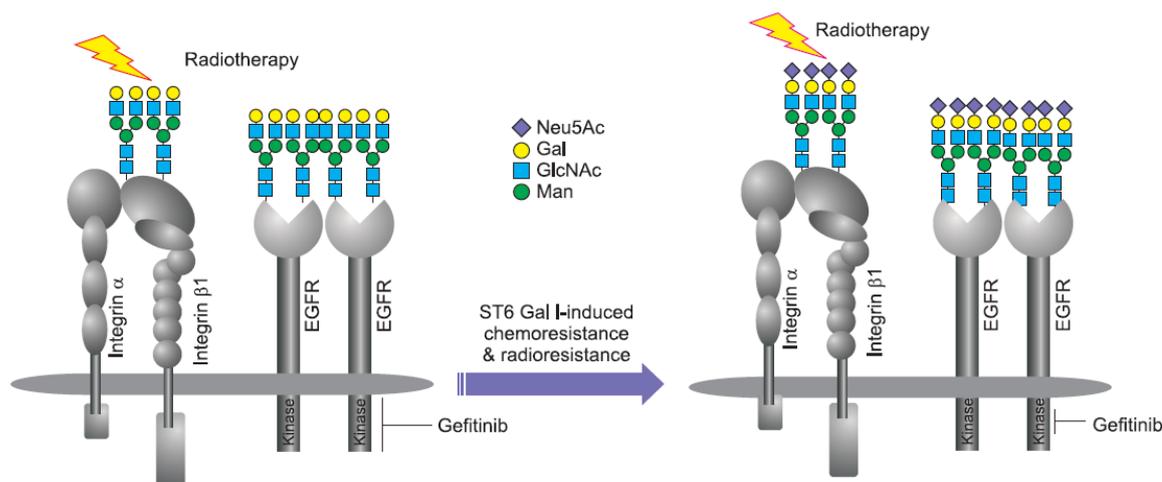


Figura 1.12: Radio e quimo resistência mediada pela ST6GAL1 em CCR. A sialilação $\alpha 2,6$ da integrina $\beta 1$ mediada pela ST6GAL1, potencializa a ativação de sinais de sobrevivência como Akt. No caso do EGFR, a sua hipersialilação o torna resistente ao Gefitinib (inibidor tirosina cinase). PARK *et al.*, 2013.

Os *N*-glicanos desempenham diversos papéis durante a progressão tumoral, por isso o emprego de agentes capazes de modular a expressão desses carboidratos pode representar uma estratégia terapêutica promissora em vários tipos de câncer (PADLER-KARAVANI, 2014). Além disso, o uso desses agentes em pesquisas possibilita elucidar tanto mecanismos moleculares relacionados com eventos de sinalização desencadeados por *N*-glicanos e suas implicações, quanto as correlações entre as estruturas dos *N*-glicanos e suas funções (GRIFFIN *et al.*, 2016).

1.6 Agentes moduladores da expressão de glicanos: análogos de monossacarídeos e inibidores da biossíntese de *N*-glicanos.

A manipulação da expressão de *N*-glicanos pode ser alcançada mediante diferentes estratégias como, por exemplo, manipulação da expressão gênica de glicosiltransferases, utilizando inibidores farmacológicos do processo de biossíntese, ou através do uso de análogos de monossacarídeos (GRIFFIN *et al.*, 2016).

Os análogos de monossacarídeos apresentam modificações na sua estrutura e competem com o substrato das glicosiltransferases, impedindo a adição dos monossacarídeos aos glicanos nascentes. São constituintes desse grupo os análogos fluorinados de ácido siálico (RILLAHAN *et al.*, 2012) que, uma vez internalizados pelas células, são adicionados aos

nucleotídeos doadores de açúcar que, ao se ligar nas sialiltransferases, inibem o processo de sialilação (Figura 1.13) (GRIFFIN *et al.*, 2016).

No grupo dos inibidores farmacológicos estão a swainsonina e a tunicamicina. O mecanismo de ação da swainsonina consiste na inibição da enzima α -manosidase II, impedindo a formação de *N*-glicanos complexos (ELBEIN, 1987) (Figura 1.7), enquanto que a tunicamicina bloqueia a biossíntese de qualquer tipo de *N*-glicano através da inibição da síntese do oligossacarídeo precursor de *N*-glicosilação (MAHONEY *et al.*, 1980), como ilustrado na Figura 1.7. Ambos vêm sendo usados como potenciais novas drogas anticâncer. No caso da swainsonina, foi testada em estudos clínicos em fase I e II (GOSS *et al.*, 1997; SHAHEEN *et al.*, 2005). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que ela é capaz de inibir o crescimento de células de câncer gástrico (SUN *et al.*, 2007). Já a tunicamicina em baixas doses provou ser capaz de induzir adesão célula-célula mediada por E-caderina, levando a inibição da proliferação celular e ao desenvolvimento de um fenótipo diferenciado em células HCT-116 indiferenciadas, como demonstrou um trabalho publicado por nosso grupo (DE FREITAS JUNIOR *et al.*, 2011).

Apesar dos resultados *in vitro* e *in vivo* obtidos com inibidores da biossíntese de *N*-glicanos, a avaliação do potencial terapêutico desta abordagem, bem como o papel que alterações no processo de *N*-glicosilação podem desempenhar durante a progressão do câncer colorretal não tem sido efetivamente explorados. Especificamente, o papel dos *N*-glicanos na regulação da estabilidade das JTs é pouco conhecido.

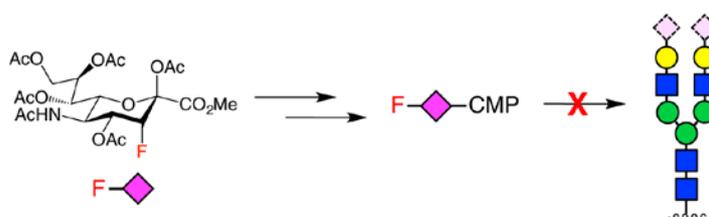


Figura 1.13: Mecanismo de ação dos análogos de ácido siálico fluorinados. Estes compostos são metabolizados em nucleotídeos doadores de açúcar e usados para inibir a sialilação. Adaptado de (GRIFFIN *et al.*, 2016).

1.7. Relevância do estudo

Durante um longo período, os estudos no campo da glicobiologia em câncer não foram enfatizados, em parte, por serem considerados tecnicamente complexos. Nas últimas décadas, com o surgimento da glicômica funcional, tem se tornado possível compreender de forma mais detalhada o papel dos glicanos em mecanismos moleculares relacionados com a aquisição do fenótipo maligno, sobretudo em carcinomas. Em CCR é importante compreender os mecanismos relacionados com a perda de características epiteliais, tendo em vista a importância da integridade do fenótipo epitelial no tecido normal, assim como sua perda durante a progressão tumoral. A desestabilização das junções *tight* é um dos eventos chave que tem sido observado ao longo deste processo, porém o envolvimento dos *N*-glicanos na sua regulação não têm sido efetivamente explorado. Desta forma, estudos como este possibilitam uma melhor caracterização da biologia tumoral fornecendo elementos anteriormente não descritos.

2. OBJETIVO

2.1 Geral

O presente estudo visa caracterizar o papel da *N*-glicosilação na estabilidade das junções *tight* assim como identificar os mecanismos envolvidos neste processo.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da inibição do processo de biossíntese de *N*-glicanos sobre proteínas constituintes das junções *tight*, assim como o efeito sobre a sua funcionalidade
- Identificar mecanismos moleculares mediados pela *N*-glicosilação do EGFR envolvidos na regulação da estabilidade das junções *tight*
- Investigar o papel da manipulação da *N*-glicosilação sobre a funcionalidade do EGFR e a ativação de vias *downstream*
- Avaliar o grau de *N*-glicosilação do EGFR e a expressão de claudina-3 em amostras de pacientes com CCR.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes, anticorpos e drogas

Os anticorpos monoclonais produzidos em coelho anti-pEGFR(Tyr 1068), anti-EGFR, anti-pAkt (Ser473), anti-Akt, anti- α -tubulina, e os produzidos em camundongo anti-pERK ½ e anti- ERK ½, foram adquiridos da Cell Signaling Technology (MA, EUA). Os anticorpos policlonais anti-claudina-3, anti-occludina e anti-ZO1 produzidos em coelho foram obtidos da Invitrogen Co. (CA, EUA). O anticorpo policlonal anti-EGFR e o monoclonal anti-Rab5, produzidos em camundongo foram adquiridos da Sigma - Aldrich (MO, EUA). O anticorpo monoclonal anti-Pan-p-tirosina produzido em camundongo foi adquirido da EMD Millipore Co. (MA, EUA). O anticorpo monoclonal anti-GAPDH produzido em camundongo e os anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho conjugados à peroxidase, foram obtidos da Santa Cruz *Biotechnology* (CA, EUA). Os anticorpos secundários conjugados a AlexaFluor 488 (anti-coelho) e o AlexaFluor 546 (anti-camundongo) foram adquiridos da Molecular Probes (OR, EUA). As lectinas L-PHA (*Phaseolus vulgaris lectin*) e SNA (*Sambucus nigra agglutinin*) biotiniladas ou conjugadas a fluoresceína foram adquiridas da Vector Laboratories, (CA, EUA). A L-PHA reconhece *N*-glicanos complexos β -1,6 ramificados e a SNA reconhece ácido siálico terminal.

As drogas swainsonina (SW) e tunicamicina (TUN), inibidoras da biossíntese de *N*-glicanos, foram adquiridas da Sigma - Aldrich (MO, EUA). Os análogos fluorinados de ácido siálico (Sia-F, 3Fax-Peracetyl-Neu5Ac) e o inibidor do EGFR (PD 153035, 4-[(3-Bromofenil) amino] - 6,7-dimetoxiquimazolina), foram obtidos da Calbiochem (CA, EUA). O [3-4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide (MTT) e o 4' dicloridrato de 6 - diamidino - 2 -fenilindole (DAPI) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (MO, EUA). O composto vermelho de Rutênio foi adquirido da Ted Pella Inc. (CA, EUA). A resina Epóxi foi obtida da Electron Microscopy Sciences (PA, EUA).

3.2 Cultura de células e tratamento com drogas

A Linhagem celular de carcinoma colorretal humano HCT-116 (CCL-247 TM) foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC) (VA, EUA). Estas células apresentam mutações em *KRAS*, *PIK3CA* e β -catenina, sendo *TP53 wildtype*, com um fenótipo indiferenciado e alto potencial tumorigênico (AHMED *et al.*, 2013). As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), suplementado com 10%

de soro fetal bovino (Invitrogen Co.), 60 mg/L de estreptomicina, 100 mg/L de penicilina G (todos adquiridos da InvitrogenCo.), e mantidas a 37°C em uma atmosfera de 5% CO₂. Para expansão da cultura, células em subconfluência foram lavadas com PBS (solução salina, do inglês *Phosphate Buffered Saline*) e soltas da garrafa incubando-se com uma solução de 0,25% de tripsina (Invitrogen Co.) em PBS, por 5 minutos a 37°C. Posteriormente, as células foram cultivadas em placas de 6 poços para ensaios de *Western blot* e imunoprecipitação, de 96 poços para ensaios de viabilidade, ou sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços para imunofluorescência, todas obtidas da Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Suíça). Para a microscopia eletrônica, as células foram transferidas para insertos *Transwell* (Corning Inc.) contendo poros de 0,4 μm e área de 0,33 cm^2 . Uma vez que as células alcançaram a confluência adequada, foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas em meio com droga a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24, 48, 72 e 96 h de acordo com o experimento realizado, ou receberam apenas o meio descrito anteriormente no caso das células controle. As drogas utilizadas para os diferentes ensaios foram Sia-F nas concentrações de 50 e 100 μM ; swainsonina a 0,5, 1, 2 e 4 μM ; tunicamicina a 0,25, 0,50, 0,75, 1 μM ; e PD153035 a 1, 10 e 20 μM .

3.3 Ensaio de viabilidade celular

As células HCT-116 ($1,5 \times 10^3$) tratadas com tunicamicina e swainsonina foram cultivadas em placas de 96 poços por 0, 24, 48, 72, e 96 horas antes de serem incubadas por 2h a 37°C com MTT. Em seguida, foram centrifugadas a 1500g por 5 min. O sobrenadante foi removido e os cristais formados foram diluídos em DMSO. A absorbância a 538 nm foi medida em espectrofotômetro modelo Spectra Max 190 spectrophotometer (Molecular Devices, LLC) (CA, EUA).

3.4 Citometria de fluxo para avaliar a expressão de carboidratos na superfície celular

Decorridas 24 h do tratamento das células HCT-116 com tunicamicina e swainsonina, as mesmas foram lavadas com PBS e, posteriormente centrifugadas a 1500 rpm durante 2 min. O *pellet* resultante da centrifugação foi ressuscitado em 1 mL de PBS e centrifugado novamente. Em seguida, a L-PHA conjugada a fluoresceína a uma concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi adicionada e incubada por 20 min a temperatura ambiente (TA), quando se sucedeu nova centrifugação e posterior lavagem do precipitado com PBS por duas vezes. Por sua vez, as

células tratadas por 24 h com Sia-F, depois de serem fixadas com paraformaldeído (PFA) (4%) por 8 minutos a TA, foram lavadas e bloqueadas com BSA (4%) (albumina sérica bovina) (Sigma-Aldrich Co.) por 30 minutos. Em seguida foram incubadas com a SNA conjugada a fluoresceína a 2,5µg/mL por 30 minutos e lavadas. Finalmente, foram adquiridas 10⁴ células utilizando um citometro FASCalibur (Becton–Dickinson) (NE, EUA). Células não marcadas foram utilizadas como controles negativos do reconhecimento das lectinas. As células foram caracterizadas segundo a intensidade da fluorescência emitida pelo fluoróforo, seu tamanho e granularidade. Os dados obtidos foram convertidos em histogramas utilizando o *software* CellQuest (Becton–Dickinson) (NE, EUA).

3.5 Coleta de amostras de pacientes

Amostras de tecido de 14 pacientes com câncer colorretal, mostrados da tabela 3.3, foram obtidas mediante ressecção cirúrgica realizadas no Hospital do Câncer-I do Instituto Nacional de Câncer. A coleta e análise das amostras foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (CEP-INCA prot: 84/04), tendo sido realizada após a autorização dos pacientes, através de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Em todos os casos, foram coletadas amostras de tecido tumoral e normal adjacente em um padrão de distância de 5 a 10 cm do carcinoma. As amostras coletadas foram mantidas -80 °C.

Tabela 3.3: Pacientes utilizados no estudo

Paciente	Sexo	Localização	Histologia	Estadio
P3	M	cólon direito	Adenocarcinoma bem diferenciado, intramucoso	O
P4	F	cólon sigmóide	Adenocarcinoma mucinoso	IIA
P8	F	íleo terminal e cólon direito	Adenocarcinoma mucinoso	IIIB
P19	M	cólon sigmóide	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado com áreas mucossecretoras	IIIC
P21	F	cólon sigmóide	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	I
P28	M	cólon sigmóide	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	IIIB
P48	F	cólon esquerdo	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	IIA
P49	M	íleo terminal e cólon direito	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	IIIB
P50	F	íleo terminal e cólon direito	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	I
P51	M	íleo terminal e cólon direito	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	IIIC
P53	F	cólon direito	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado com áreas mucinosas	IIIB
P54	F	cólon sigmóide	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	IIIB
P56	F	cólon direito	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	IIIB
P57	F	cólon direito	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	IIIB

3.6 Obtenção de extratos proteicos totais

Células HCT-116 (tratadas com tunicamicina, Sia-F e PD153035) e amostras de tecido previamente maceradas foram lavadas com PBS e homogeneizadas a 4° C em tampão de lise contendo: Triton X-100 1% (Sigma-Aldrich Co.); deoxicolato de sódio 0,5% (Reagen-Quimibrás Ind., Brasil); SDS 0,2% (Invitrogen Corp.); cloreto de sódio 150 mM (Merk&Co. Inc., Alemanha); EDTA 2 mM (Sigma-Aldrich Co.); Hepes 10 mM (Sigma-Aldrich Co.), pH 7,4; fluoreto de sódio 20 mM; ortovanadato de sódio 1 mM (Sigma-Aldrich Co.); e um coquetel de inibidores de proteases (PMSF 1 mM, aprotinina 1µg/mL, fenantrolina 2,5 µM, leupeptina 10 µM e pepstatina 5 µg/mL - Sigma-Aldrich Co.). Após centrifugação a 10000 g por 10 min, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80° C.

3.7 Obtenção de extratos proteicos de membrana citoplasmática.

As células foram coletadas e homogenizadas usando um homogenizador tipo *Potter* em tampão Tris-HCL 10mM, PH 7.5, contendo sacarose 250 mM, MgCl₂ 1mM, ortovanadato 1mM, NaF 20 mM e inibidores de protease (1:100). Os lisados celulares foram centrifugados a 3.000 g por 10 min a 4° C. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 15.000 g por 1 h a 4° C. O pellet resultante (fração de membrana) foi coletado e homogenizado em tampão de lise. Após centrifugação a 10000 g por 10 min, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80° C para análise posterior.

3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), e *Western blot*

O conteúdo protéico de extratos totais e frações de membrana foi estimado utilizando-se um kit comercial para dosagem de proteína (Bio-Rad Laboratories Inc.) (CA, EUA). A proteína BSA foi utilizada como padrão. Quantidades iguais de proteínas foram separadas eletroforéticamente por SDS-PAGE usando géis na concentração de 7,5, 10 e 13%, e transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando-se o aparelho de eletrotransferência semi-seco (Bio-Rad Laboratories Inc.) a 10 V por 60 min. As membranas foram mantidas em tampão de bloqueio TBS-T (Tris-HCl, 20 mM, pH 7,6, NaCl 137 mM e Tween 20 0,1% (Sigma-Aldrich Co.) contendo leite desnatado 5%, durante 60 min em agitador orbital. Em seguida, foram incubadas com o anticorpo primário *overnight*. Após 5 lavagens com TBS-T,

as membranas foram incubadas com anticorpos secundários conjugados a peroxidase por 60 min. Finalmente, as membranas foram lavadas 5 vezes em TBS-T e a reatividade para as proteínas em estudo foi determinada utilizando-se um kit comercial de quimioluminescência (Amersham Biosciences GE healthcare, Reino Unido). A densitometria dos filmes fotográficos sub-expostos foi efetuada utilizando-se o *software* Labworks 4.6 (UVP Inc.) (NY, EUA).

3.9 Imunoprecipitação e *blotting* de lectinas

Foram utilizados extratos de células tratadas com tunicamicina e de tecido tumoral e normal de pacientes para imunoprecipitar quantidades iguais de proteínas. Estes extratos foram *precleared* com 25µl de proteína G conjugada a esferas de sefarose (Sigma-Aldrich Co.) por 1 hora. Após a centrifugação, o sobrenadante foi incubado *overnight* com 4µg de anticorpo e posteriormente com proteína G conjugada a *esferas de sefarose* por 2 horas. Em seguida, os imunocomplexos foram lavados 3 vezes com PBS e aquecidos a 95°C em tampão de amostra Laemmli (Laemmli, 1970) por 5 min. As amostras foram então separadas eletroforéticamente por SDS-PAGE usando géis na concentração de 7,5% e transferidas para membranas de nitrocelulose como descrito anteriormente. As membranas foram mantidas em tampão de bloqueio PBS-T (PBS e Tween 20 0,05% - Sigma-Aldrich Co.) contendo BSA 4%, durante 120 min em agitador orbital. Em seguida, foram incubadas com L-PHA biotinizada por 60 min. Finalmente, as membranas foram lavadas 5 vezes em PBS-T e a reatividade dos carboidratos em estudo foi determinada utilizando-se um kit comercial de quimioluminescência Vector stain ABC kit (Vector Lab.).

3.10 Imunofluorescência

Após o tratamento com tunicamicina por 24h, células cultivadas sobre lamínulas de vidro foram lavadas com PBS e fixadas com metanol 100% durante 20 min a -20° C. Depois foram re-hidratadas com PBS/CM (PBS contendo CaCl₂ 100 mM e MgCl₂ 100 mM, pH 8,0). Posteriormente, foram bloqueadas a TA com BSA 0,2% por 60 min. Logo após, foram incubadas *overnight* com o anticorpo primário anti-claudina-3 (diluição 1:40), lavadas com PBS e incubadas por 1 h com o anticorpo secundário de coelho conjugado a Alexafluor 488 (diluição 1:500). Para visualizar as proteínas Rab5 e EGFR, as células foram lavadas três vezes com PBS/CM, fixadas com PFA 4% a TA por 20 min, e incubadas a TA com 50 µM de

NH₄Cl em PBS pH 8. Em seguida as células foram lavadas com PBS pH 8, permeabilizadas com Triton X-100 0,5% e bloqueadas com BSA 0.2% (em PBS pH 8) por 1 hora a TA. Posteriormente, incubou-se com o anticorpo primário anti-EGFR (1/50) em BSA 0.2% *overnight*, lavou-se e incubou-se com o anticorpo secundário de coelho conjugado a Alexafluor 488 (diluição 1:500). Logo após, para a segunda marcação, as células foram lavadas e incubadas com o anticorpo primário anti-Rab5 e posteriormente com o secundário de camundongo conjugado a Alexafluor 546 (diluição 1:500). Finalmente todas as lamínulas foram incubadas com DAPI (1:1000; 1 min), lavadas e montadas utilizando n-propil-galato (Sigma Aldrich, USA). As imagens foram adquiridas utilizando um microscópio confocal a laser FV10i-O. A quantificação da co-localização do EGFR e Rab5 foi realizada utilizando o coeficiente de correlação de *Pearson* (r) gerado pelo programa de processamento de imagem FV10-ASW (Olympus, Japão).

3.11 Ensaio de Permeabilidade Paracelular ao Vermelho de Rutênio e Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Monocamadas de células HCT-116 cultivadas em insertos Transwell foram fixadas por 1 hora sob agitação, em tampão de Karnovsky (glutaraldeído 2,5 %, paraformaldeído 1 %, sacarose 8 % e CaCl₂ 2 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2) contendo vermelho de rutênio 0,6%. Logo após, foram lavadas 3 vezes durante 10 em tampão cacodilato contendo vermelho de rutênio 0,6% e incubadas em solução de tetróxido de ósmio 2% contendo vermelho de rutênio 0,6% por 40 minutos sob agitação. Em seguida as membranas foram lavadas e desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, 2 vezes em 100% e outras 2 vezes em super seca) por 10 min cada, sendo incluídas posteriormente em resina Epóxi. Cortes ultrafinos, entre 60 – 70 nm, foram obtidos usando um Ultramicrotomo (Leica Microsystem, Wetzlar, Alemanha), contrastados com citrato de chumbo por 3 min e analisados usando um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900 (Carl ZeissInc.).

3.12 Imuno-histoquímica

Blocos de parafina contendo biópsias de pacientes com câncer colorretal, arquivados no Departamento de Patologia do INCA, foram cortados para posterior processamento para imuno-histoquímica. Os cortes foram fixados em estufa por 1h e desparafinizados com xilol durante 20 min. Posteriormente, foi realizada a recuperação antigênica incubando os cortes em tampão EDTA (pH 8.0) por 30 min e a atividade endógena da peroxidase foi bloqueada com peróxido de hidrogênio 10% durante 20 min. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpos primários (anti-claudina- 3 e anti-EGFR) e L-PHA *overnight*. A reatividade das proteínas e carboidratos em estudo foi determinada utilizando-se o Kit Novolink Polymer Detection System (Leica, Wetzlar, Alemanha) e o Vector stain ABC kit respectivamente. Finalmente foi utilizado como cromógeno a diaminobenzidina (Leica) e a contracoloração foi realizada com hematoxilina (Leica). Para quantificar os resultados foi utilizado o *Immunoreactive Score* (IRS) (KROEPIL *et al.*, 2013) que é calculado a partir da porcentagem de células marcadas e a intensidade dessa marcação, como segue na tabela 3.2.

Tabela 3.2: *Immunoreactive Score* (IRS)

Proporção de células positivas	Intensidade de marcação	IRS (Proporção x Intensidade)
0 = Nenhuma célula positiva	0 = negativa	0 - 1 = Expressão negativa
1 = <10% de células positivas	1 = Fraca	2 - 3 = Expressão fraca
2 = 10-50% células positivas	2 = Fraca	4 - 8 = Expressão moderada
3 = 51-80% de células positivas	3 = Moderada	9 - 12 = Expressão forte
4 = >80% de células positivas		

3.13 Estudos por Bioinformática

Foram identificados os sítios potenciais de *N*-glicosilação do EGFR utilizando a base de dados Uniprot (<http://www.uniprot.org/>). Em seguida, foi realizada uma pesquisa no banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (<https://cancergenome.nih.gov/>) para verificar a existência de relatos de mutações nesses sítios.

Para avaliar a expressão de glicogênes nos quatro CMS de CCR foi utilizado um algoritmo classificador aplicado em aproximadamente 5000 amostras. Este classificador se encontra disponível em <https://github.com/Sage-Bionetworks/crcsc>.

3.14 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). A análise de significância foi realizada utilizando os seguintes testes: *two-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni para análise da viabilidade celular, teste *t-student* para análise de expressão proteica de constituintes das JT e teste *t-student* de pares para análise de expressão do EGFR e *N*-glicanos complexos em amostras de pacientes. A avaliação de correlação entre a imuno-reatividade do EGFR e PHA foi realizada mediante análise do coeficiente de correlação de *Spearman* (r_s). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 O tratamento com tunicamicina e swainsonina inibe a expressão de *N*-glicanos complexos ramificados em células HCT-116.

Com o intuito de determinar condições de tratamento que não afetassem a viabilidade celular foi realizado um ensaio de MTT utilizando células tratadas por 24, 48, 72 e 96 h com diferentes concentrações de dois inibidores da biossíntese de *N*-glicanos, tunicamicina e swainsonina (Figura 4.14 A). O tratamento com swainsonina não teve efeito significativo sobre a viabilidade celular. Por outro lado, a partir das 48h de tratamento a tunicamicina diminuiu significativamente a viabilidade celular; por esta razão foi escolhido o tempo de tratamento de 24h para os experimentos posteriores, já que nesta condição não foi observada diminuição da viabilidade nas células tratadas em comparação com as controle (Figura 4.14 A). Posteriormente, no tempo de tratamento escolhido, foi verificada a eficiência das drogas no que tange a capacidade inibitória. Para isso, foi avaliada por citometria de fluxo a expressão de *N*-glicanos complexos na superfície celular utilizando a lectina L-PHA conjugada a fluoresceína (FIT-C). Como pode ser observado na Figura 4.14 B, nas células tratadas com as drogas há diminuição da intensidade da fluorescência coletada pelo canal FL1 (gerada pela marcação da L-PHA na superfície celular) em comparação com as não tratadas.

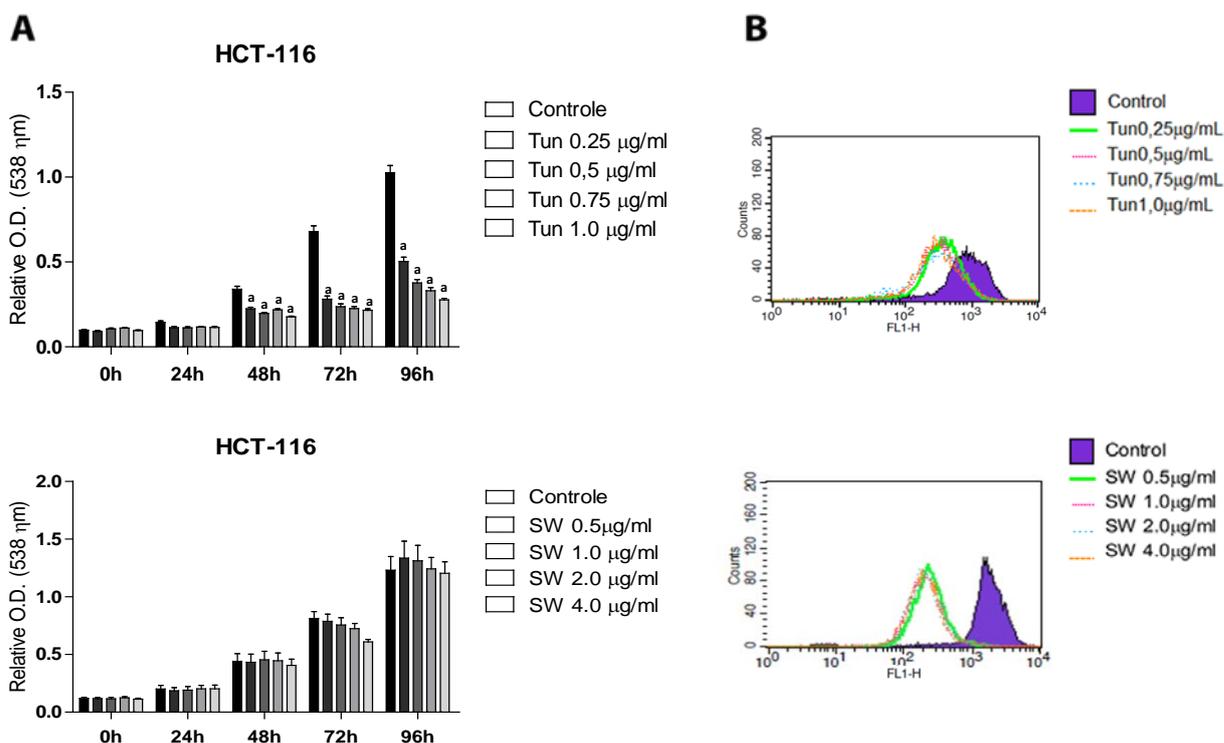


Figura 4.14: Inibição da expressão de *N*-glicanos complexos ramificados induzida por tunicamicina e swainsonina. (A) Viabilidade celular avaliada mediante MTT. Os gráficos de barras mostram a densidade óptica relativa (DO) a 538 nm, após 24, 48, 72 e 96 h de tratamento com swainsonina ou tunicamicina. Em todos os tempos analisados os valores foram normalizados pelo valor do grupo controle do tempo 0h. As barras de erro indicam o erro padrão. (n=3). a = *** $P < 0,001$; teste *two-way* ANOVA. (B) Após tratamento por 24h, as células foram incubadas com lectina L-PHA conjugada a FIT-C e analisadas por citometria de fluxo. Os histogramas de fluorescência foram gerados pelo software Cell Quest. O deslocamento dos histogramas para a esquerda indica diminuição da intensidade de fluorescência. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Cores dos histogramas para swainsonina: controle (roxo); 0,5µM (verde); 1µM (rosa); 2 µM (azul); e 4µM (laranja); para tunicamicina: controle (roxo); 0,25µM (verde), 0,5µM (rosa); 0,75µM (azul) e 1 µM (laranja). Tun, tunicamicina; SW, swainsonina.

4.2 A tunicamicina diminui os níveis de expressão de claudina-3 em HCT-116.

Para estudar o papel da inibição da expressão de *N*-glicanos complexos ramificados na estabilidade das JT, foi avaliado o efeito do tratamento com tunicamicina e swainsonina sobre a expressão de diferentes proteínas componentes das JTs (claudina-3, ZO-1 e ocludina) através do ensaio de *Western blot*. Não foram observadas mudanças significativas nos níveis de expressão destas proteínas nas células tratadas com swainsonina (Figura 4.15 A). No entanto, a tunicamicina apenas teve efeito sobre a claudina-3 (cld-3) diminuindo de forma dependente da concentração os seus níveis de expressão (Figura 4.15 B). Uma vez que a swainsonina não mostrou efeito sobre os níveis de expressão de nenhuma das proteínas constituintes das JTs, os experimentos subsequentes foram realizados apenas com a tunicamicina.

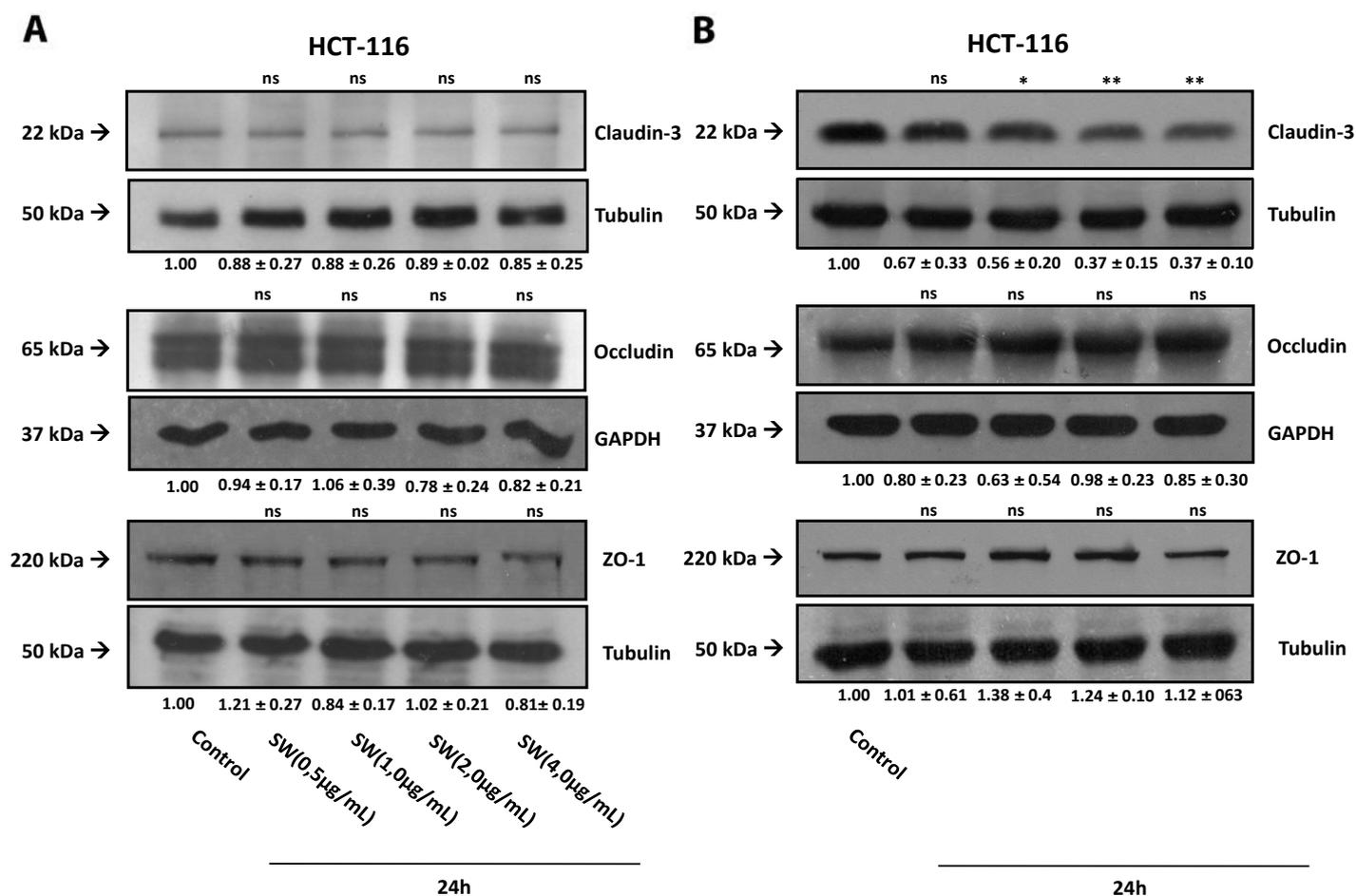


Figura 4.15: Efeito do tratamento com tunicamicina sobre os níveis de expressão de proteínas constituintes das JTs. (A) As células foram tratadas com diferentes concentrações de swainsoina ou (B) tunicamicina durante 24 horas, e, em seguida, foi avaliada a expressão de diferentes proteínas constituintes das JTs. Após o tratamento, os lisados celulares foram obtidos e analisados por *Western blot*. A tubulina foi utilizada como controle endógeno de expressão proteica. Se mostram as unidades densitométricas ± o erro padrão. (n=3). *P < 0,05; ***P < 0,001; teste t-student.

4.3 A tunicamicina induz redistribuição de claudina-3 e promove contatos célula-célula mais estabelecidos em HCT-116.

Sabe-se que mudanças na expressão de claudinas podem ocorrer concomitantemente com mudanças na localização subcelular destas proteínas (DE SOUZA *et al.*, 2013). Sendo assim, foi avaliado o efeito da tunicamicina sobre a localização subcelular da cld-3 mediante imunofluorescência. O tratamento com tunicamicina promoveu o aumento da localização da cld-3 na membrana celular (Figura 4.16 A). Um dos principais mecanismos que regulam a localização subcelular dessa proteína é a fosforilação de resíduos de tirosina e treonina na sua porção carboxi-terminal (KWON, 2013) Sabendo isto, foi avaliada a fosforilação de tirosinas em células tratadas com tunicamicina mediante *Western blot*, utilizando um anticorpo primário pan-tirosina. Foi observado que a tunicamicina induziu diminuição da fosforilação de tirosinas na faixa de peso molecular da cld-3 (22 kDa) (Figura 4.16 B).

Adicionalmente, foi investigado se as mudanças na localização da cld-3, induzidas pela inibição da síntese de *N*-glicanos complexos ramificados, afetavam a funcionalidade das JTs. Para tal, foi avaliada a permeabilidade ao corante vermelho de rutênio em células tratadas com tunicamicina por microscopia eletrônica de transmissão. Este composto, por ser catiônico, interage com moléculas negativas da membrana celular, podendo ser visualizado pela formação de regiões elétron-densas (SCHMIDLEY *et al.*, 1986). O tratamento não afetou a permeabilidade ao vermelho de rutênio, que permeou pela região paracelular das células em monocamadas. No entanto, embora não tenha comprometido a permeabilidade, promoveu contatos célula-célula mais estabelecidos (Figura 4.16 C).

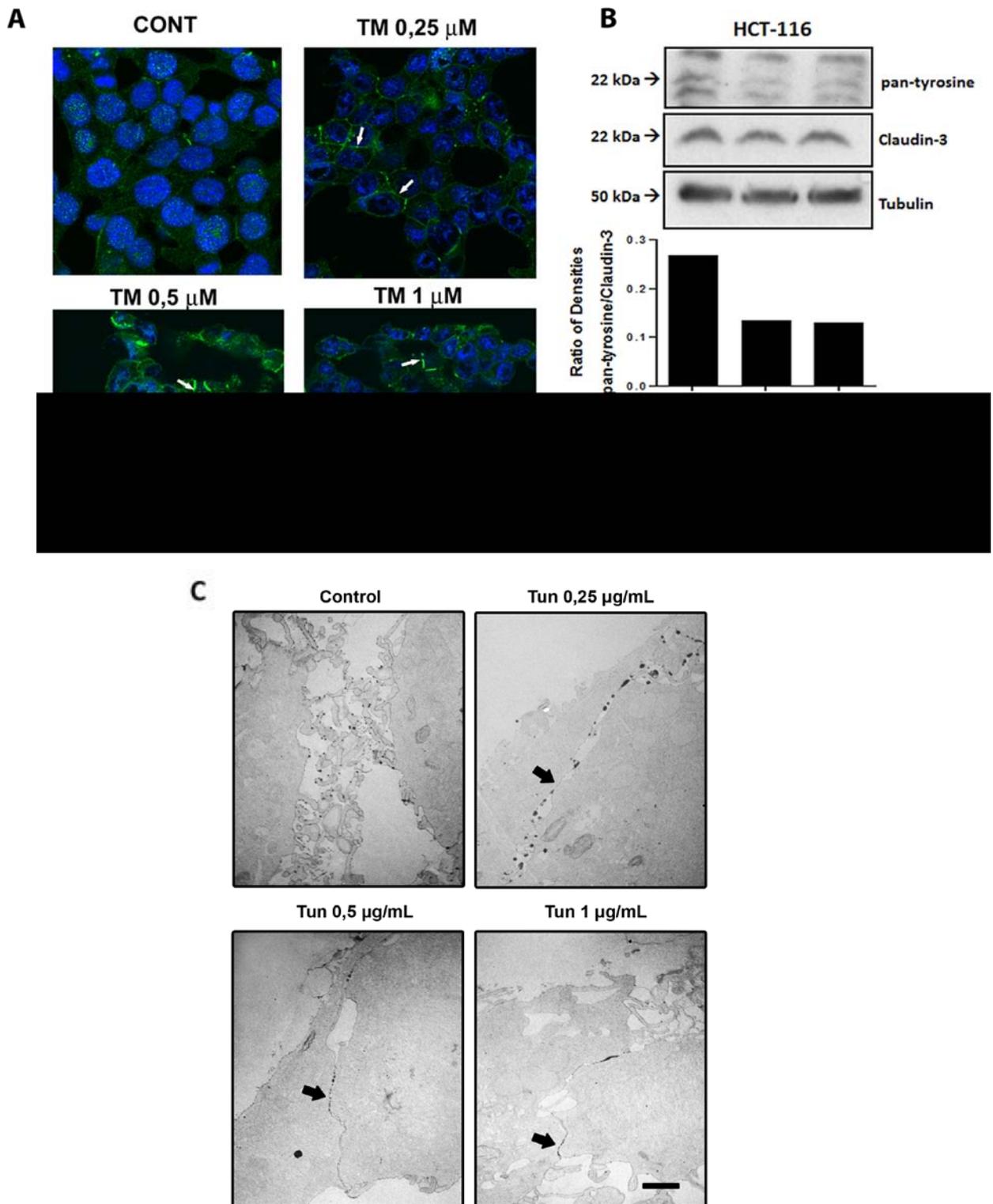
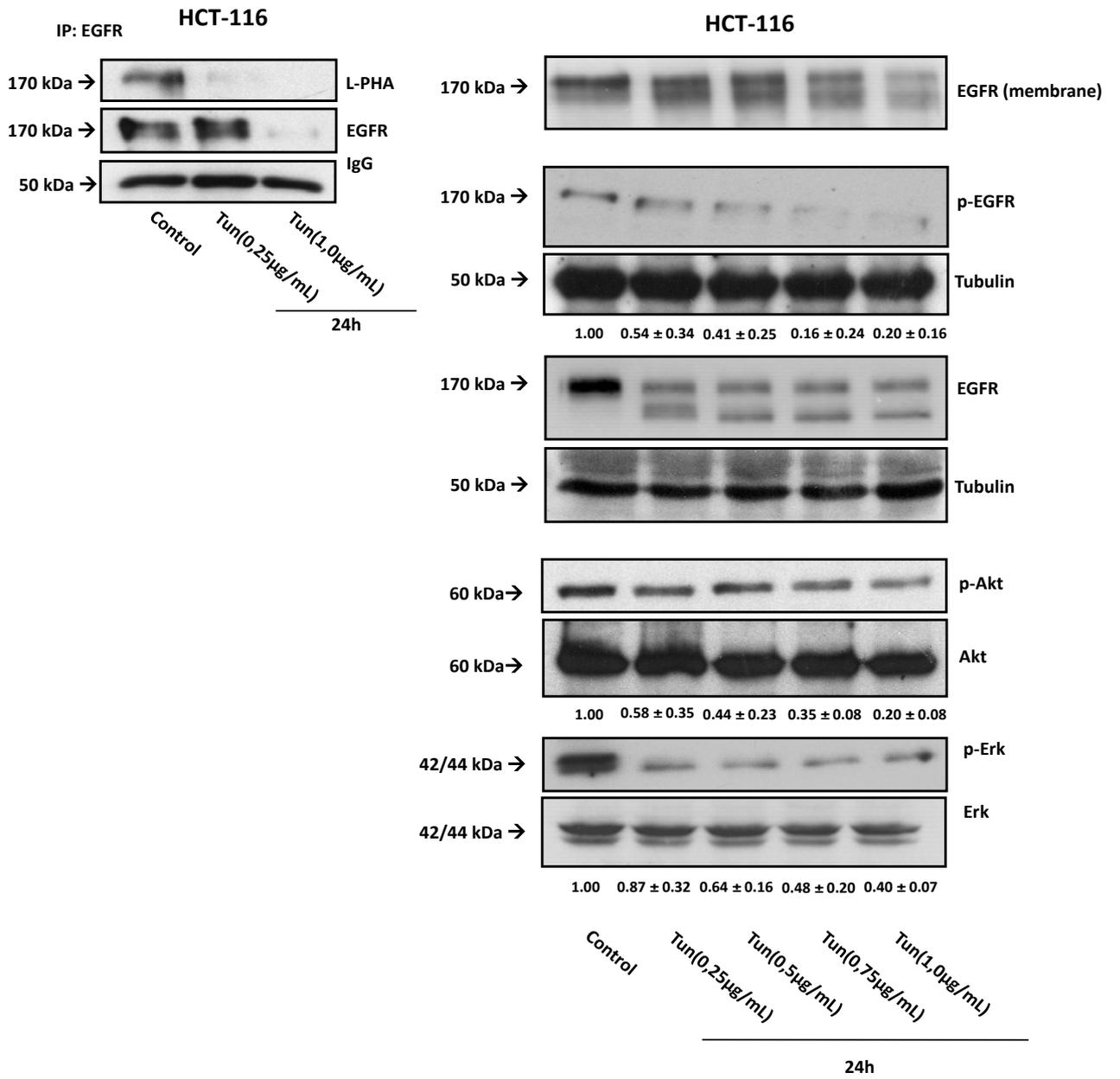


Figura 4.16: Avaliação do efeito da tunicamicina sobre a localização subcelular da cld-3 e a funcionalidade das JTs. (A) Após tratamento com diferentes concentrações de tunicamicina durante 24 h as células foram fixadas e marcadas para claudina-3 (verde) e núcleo (azul) (DAPI). As setas brancas indicam a marcação da membrana. Bar = 10 μ m. As imagens foram obtidas por microscopia confocal. (B) Os lisados celulares totais foram obtidos e analisados para pan-tirosina e claudina-3 por *Western blot*. O gráfico de barras mostra a quantidade relativa de fosfo-pan-tirosina normalizada pela claudina-3. (C) As células foram cultivadas em filtros de polycarbonato *Transwell* e a funcionalidade das TJs foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão (MET), utilizando o traçador vermelho de rutênio. As imagens são representativas de seções ultrafinas de células controle e tratadas. As setas pretas indicam o contato célula-célula. Bar = 2 μ m.

4.4 O tratamento com tunicamicina promove tanto a redução dos níveis de expressão do EGFR na membrana celular quanto a sua ativação e sinalização através de Erk e Akt

Tendo em vista que a cld-3 não é uma proteína *N*-glicosilada e que a sinalização através do EGFR regula a sua expressão (DE SOUZA *et al.*, 2013), foi avaliado o papel da *N*-glicosilação deste receptor na regulação da cld-3. Primeiramente, foi verificado mediante imunoprecipitação, com posterior *blotting* de lectinas e *Western blot*, que o tratamento com tunicamicina inibiu a expressão de *N*-glicanos complexos ramificados no EGFR gerando uma segunda banda de menor peso molecular que corresponde à proteína de-glicosilada (Figura 4.17 A e B). Em seguida, foi investigado o efeito da de-glicosilação sobre a sua funcionalidade. Foi observado que o tratamento com tunicamicina diminuiu tanto a expressão do EGFR na membrana celular (Figura 4.17 B e C superior) quanto os seus níveis de fosforilação e das proteínas *downstream* Erk e Akt (Figura 4.17 B).

Para verificar a hipótese de que a tunicamicina estivesse induzindo a endocitose do EGFR, foi analisada mediante microscopia confocal a co-localização do EGFR com um marcador de endossomo inicial Rab5. Não foram observadas diferenças entre o controle e as células tratadas, o que sugere que a tunicamicina não induz internalização do EGFR (Figura 4.17 C inferior). Conjuntamente, estes dados sugerem que a diminuição tanto dos níveis de expressão do EGFR na membrana celular quanto de sua atividade, induzidas pelo tratamento com tunicamicina, podem estar relacionadas a um bloqueio do transporte do receptor para a membrana.



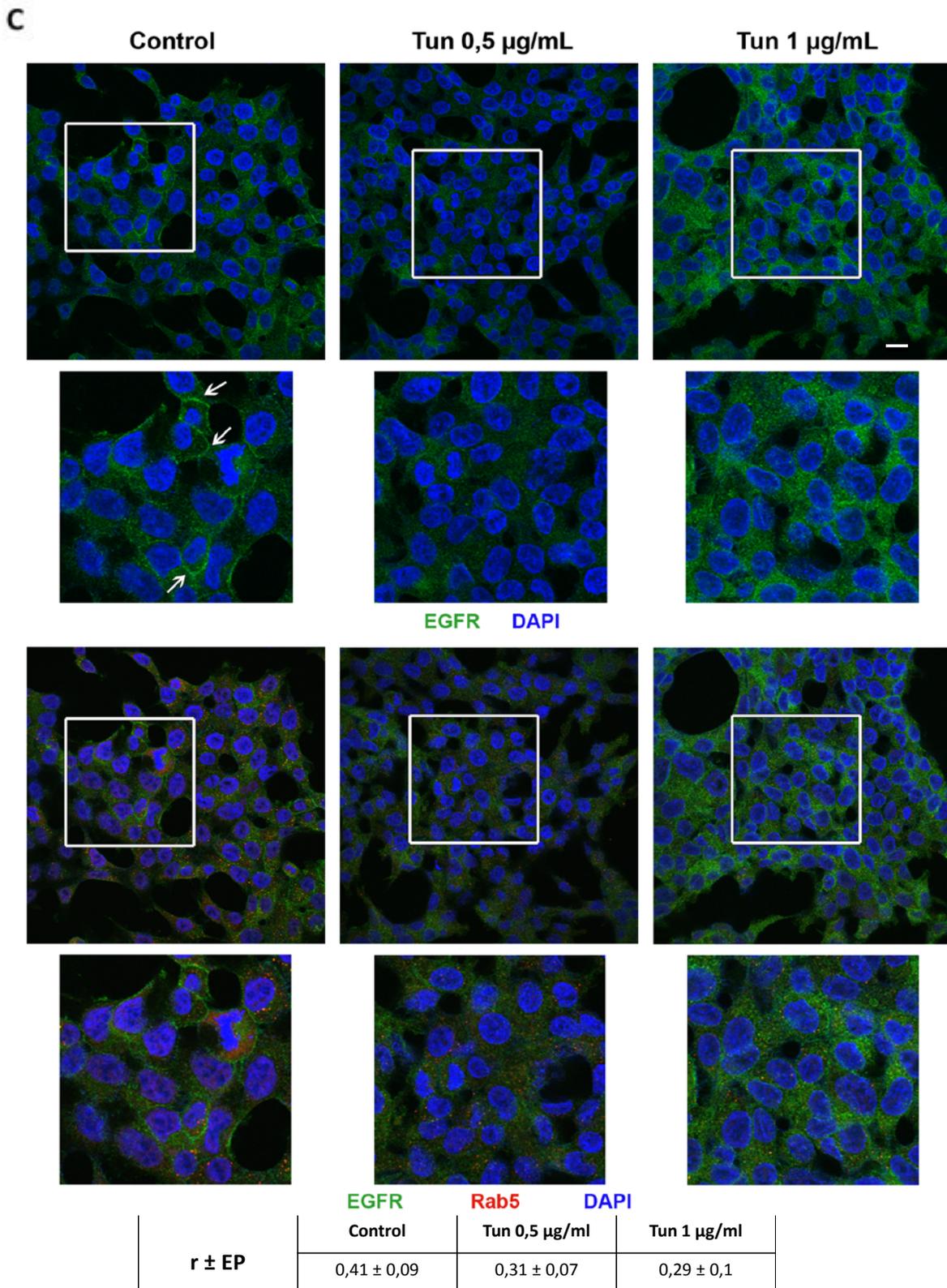


Figura 4.17: Avaliação do efeito do tratamento com tunicamicina sobre a funcionalidade do EGFR. As células foram incubadas com diferentes concentrações de tunicamicina durante 24 h. (A, B e C). (A) Os lisados celulares totais foram obtidos e imunoprecipitados utilizando um anticorpo IgG anti-EGFR e analisados em seguida por *Western blot* e por blotting de lectinas (L-PHA). (B). Frações de membrana celular foram obtidas e analisadas por *Western blot* para EGFR e lisados totais foram analisados por *Western blot* para p-EGFR, EGFR, Erk, p-Erk, Akt e p-Akt. Se mostram as unidades densitométricas \pm o erro padrão. (n=3). (C) Após o tratamento, as células foram permeabilizadas e a imunofluorescência foi realizada para EGFR (verde), Rab5 (vermelho) e núcleo (DAPI). Bar = 10 µm. A tabela mostra o coeficiente de correlação de *Pearson* (r) \pm o erro padrão calculado com base nas intensidades de verde e vermelho de 30 áreas por lamínula. As imagens foram obtidas por microscopia confocal.

4.5 A inibição específica da fosforilação do EGFR por PD153035 promove a redução dos níveis de expressão de claudina-3 em células HCT-116.

Sabendo que a tunicamicina inibe o processo de biossíntese de *N*-glicanos de forma geral na célula, foi avaliado o papel da inativação específica do EGFR sobre os níveis de expressão de cld-3. Para isso, as células foram tratadas por 24h com diferentes concentrações de um inibidor da atividade tirosina-quinase do EGFR denominado PD153035 e, em seguida, foi observado que este tratamento, além de promover diminuição da fosforilação do EGFR, também induz uma redução dos níveis de expressão de cld-3 (Figura 4.18). Este resultado demonstra que a inativação do EGFR diminui a expressão da cld-3.

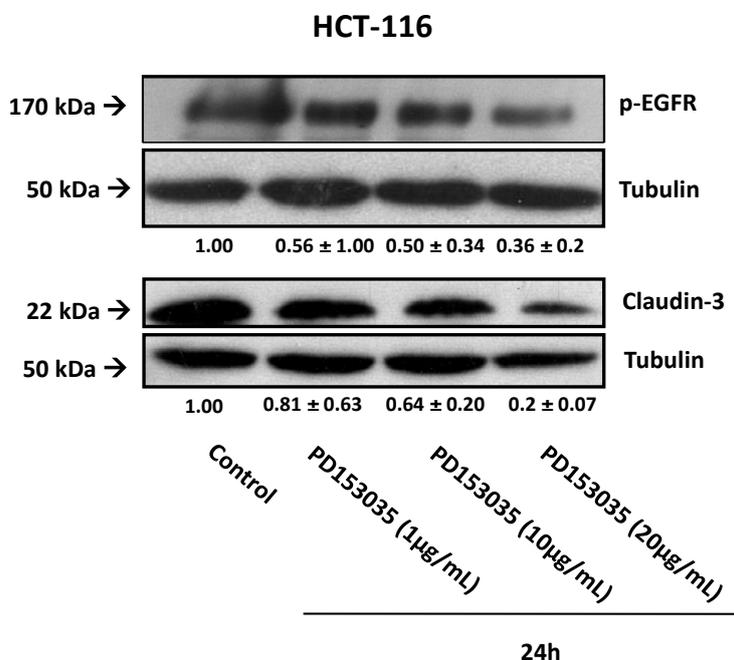


Figura 4.18: Tratamento das células HCT-116 com um inibidor tirosina cinase. As células foram tratadas com diferentes concentrações de PD153035 durante 24 horas e depois foram avaliados os níveis de fosforilação do EGFR e de expressão da claudina-3 por *Western blot*. Se mostram as unidades densitométricas \pm o erro padrão. (n=3).

4.6 A diminuição dos níveis de expressão de claudina-3 não é mediada por interação direta com o EGFR

Tendo em vista que o EGFR interage com proteínas componentes do CJA (Moon *et al.*, 2001; KAWAMATA *et al.*, 2003), foi avaliada uma possível interação direta entre o EGFR e a cld-3 que pudesse interconectar a *N*-glicosilação do EGFR com a regulação da cld-3. Para tal, lisados totais de células tratadas com tunicamicina foram imunoprecipitados para EGFR e posteriormente analisados para cld-3 por *Western blot*. Na fração imunoprecipitada não foram encontrados níveis detectáveis de cld-3 (Figura 4.19), sendo descartada assim a possível existência de interação direta entre estas proteínas. Assim, a cld-3 pode estar sendo regulada diretamente por vias *downstream* do EGFR afetadas pelo tratamento com tunicamicina.

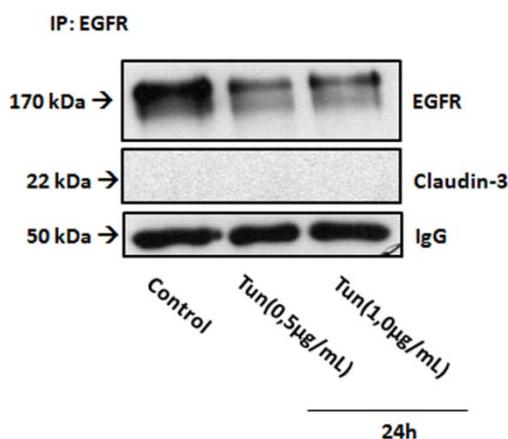


Figura 4.19: Avaliação da interação EGFR/clauidina-3. As células foram tratadas com tunicamicina durante 24 horas e depois foram obtidos os lisados celulares totais e imunoprecipitados utilizando anticorpo anti-EGFR. A presença de claudina-3 na fracção imunoprecipitada foi avaliada por *Western blot*. Experimento único.

4.7 O tratamento com um análogo fluorinado de ácido siálico (Sia-F) promove tanto a inibição do EGFR quanto a diminuição dos níveis de expressão de claudina-3

O ácido siálico é um dos monossacarídeos presentes nos *N*-glicanos do EGFR e sabe-se que alterações nos níveis de sialilação são capazes de regular a função do receptor (PARK *et al.*, 2012). Portanto, foi avaliado o efeito do tratamento com análogos fluorinados de ácido siálico (Sia-F) sobre a ativação do EGFR e a expressão da cld-3 mediante *Western blot*. O tratamento com Sia-F, que reduziu os níveis de expressão de ácido siálico na superfície celular conforme esperado (Figura 4.20 A), promoveu também diminuição da ativação do EGFR e dos níveis de expressão da claudina-3 (Figura 4.20 B). Este dado sugere que a sialilação dos *N*-glicanos do EGFR regula a ativação do EGFR e conseqüentemente, os níveis de expressão de cld-3.

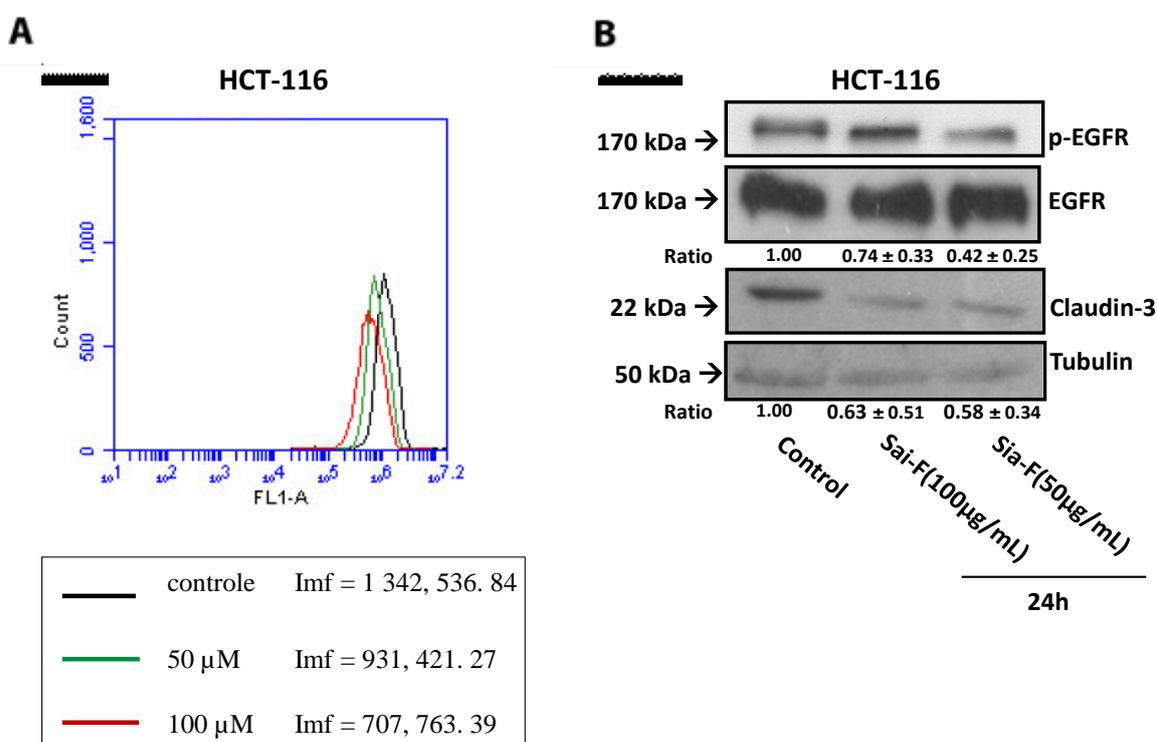
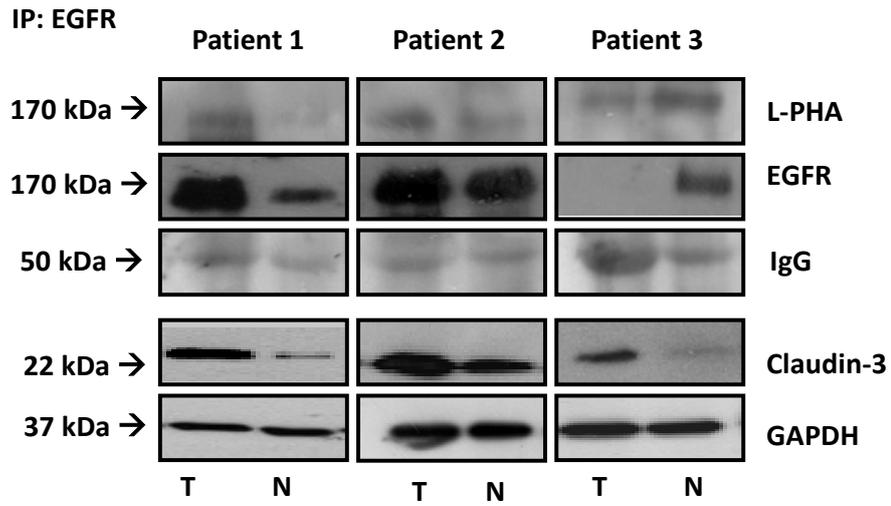
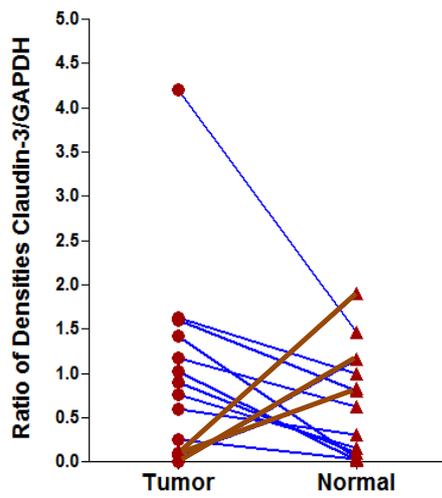
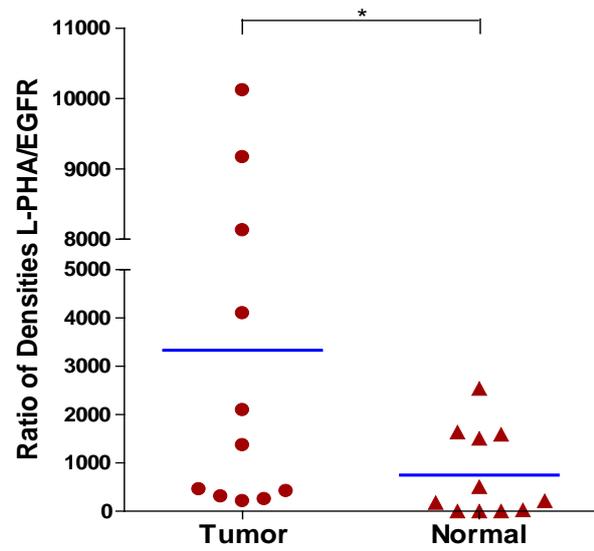


Figura 4.20: Avaliação do efeito do tratamento das células HCT-116 com Sia-F. (A,B) As células foram incubadas com Sia-F como indicado. (A) Após tratamento, as células foram incubadas com lectina SNA conjugada a FIT-C e analisadas por citometria de fluxo. Foram utilizadas células não tratadas como controle. Os histogramas de fluorescência foram gerados pelo software Cell Quest. O deslocamento dos histogramas para a esquerda indica diminuição da intensidade média de fluorescência (Imf). Cores dos histogramas: controle (preto); 50 μM (verde); 100 μM (vermelho); (B) Os lisados celulares totais foram obtidos e analisados para EGFR, P-EGFR e claudina-3 mediante *Western blot*. Os valores numéricos representam os médias densitométricas ± o desvio padrão de três experimentos independentes.

4.8 Pacientes com CCR que apresentam maiores níveis de expressão de claudina-3 no tecido tumoral em relação aos normais adjacentes apresentam também maior grau de *N*-glicosilação do EGFR

Em um estudo prévio realizado em amostras de pacientes com CCR, o nosso grupo de pesquisa observou aumento da expressão de cld-3 nos tecidos tumorais em comparação com os normais (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005). Tendo em vista isto e os nossos resultados obtidos nas células HCT-116, onde foi observado que os *N*-glicanos do EGFR regulam a expressão da cld-3, foi avaliado o grau de *N*-glicosilação do EGFR em amostras de pacientes com CCR onde a cld-3 estivesse aumentada no tecido tumoral em relação ao normal. Para tal, foi analisada por *Western blot* a expressão de cld-3 em amostras de tecido normal e tumoral de 14 pacientes. Onze desses pacientes mostraram aumento da expressão da cld-3 no tecido tumoral, e os três restantes mostraram diminuição da mesma no tecido tumoral com relação ao normal (Figura 4.21 B). As amostras de tecido normal e tumoral desses onze pacientes foram processadas para posterior imunoprecipitação do EGFR e análise da presença de *N*-glicanos complexos ramificados mediante *blotting* de lectinas utilizando a L-PHA. Foi encontrado que nas amostras de tecido tumoral o EGFR encontrou-se significativamente mais *N*-glicosilado (Figura 4.21 A,C).

Adicionalmente, foi realizado outro estudo de amostras em parafina de nove pacientes avaliando-se a expressão de *N*-glicanos complexos ramificados, do EGFR e da cld-3 por imunohistoquímica. Embora não tenham sido observadas diferenças na expressão e localização da cld-3 entre as amostras tumorais e normais, foi achada maior expressão de *N*-glicanos complexos e do EGFR nos tumores, onde mantiveram uma correlação positiva (Figura 4.21 D,E). Estes resultados sugerem que o aumento da expressão de cld-3 em tumores de CCR pode estar causado por um maior grau de *N*-glicosilação do EGFR.

A**B****C**

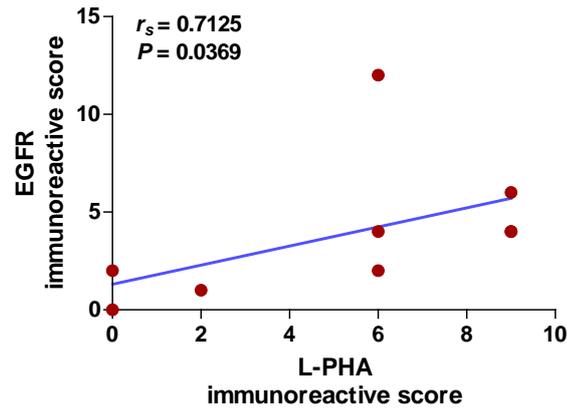
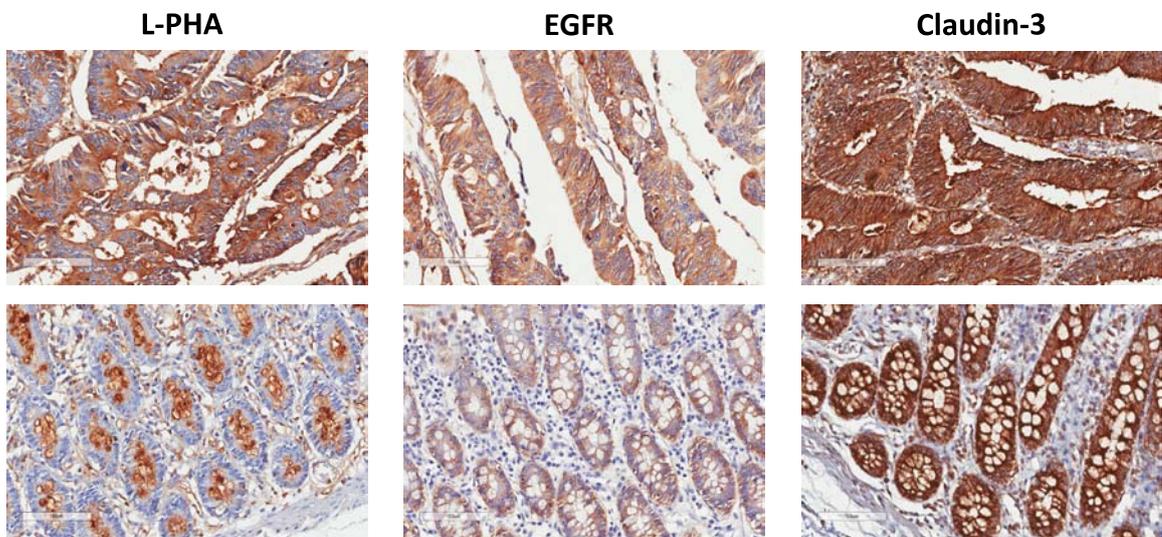
D**E**

Figura 4.21: Avaliação do grau de *N*-glicosilação do EGFR em amostras de pacientes com CCR. (A,B,C) Foram obtidos e processados estratos de amostras de tecido normal adjacente (N) e tecido tumoral (T) para posterior análise da expressão de claudina-3 mediante *Western blot* (n=14) e imunoprecipitação do EGFR utilizando um anticorpo IgG (n=11). Posteriormente, foi analisada a presença de *N*-glicanos complexos no imunoprecipitado mediante *blotting* de lectinas (L-PHA). Mostram-se os resultados dos *blottings* de três pacientes. O gráfico de linhas representa aumento (azul) ou diminuição (marrom) da relação entre as unidades de densitometria da claudina-3 e o GAPDH (controle endógeno de expressão proteica) nas amostras tumorais e normais de cada paciente. O gráfico de pontos mostra a relação entre as unidades de densitometria de L-PHA e EGFR nas amostras tumorais e normais de cada paciente, onde as linhas representam as médias de cada grupo. * $P=0,0487$ teste t para pares. (E) Imagens representativas de imuno-histoquímica para L-PHA, EGFR e claudina-3 em tecidos tumorais e normais adjacentes (n = 9). Bar = 100 μm . (D) O gráfico representa a correlação entre a quantificação da marcação (em termos de *Immunoreactive Score*) do EGFR e L-PHA.

4.9 Não existem relatos de mutações nos sítios de *N*-glicosilação (Asn-X-Ser/Thr) do EGFR na base de dados TCGA

Com o intuito de avaliar se as diferenças no grau de *N*-glicosilação do EGFR achadas nos pacientes com CCR estavam relacionadas com possíveis mutações nos sítios de *N*-glicosilação, foi realizada uma pesquisa na base de dados TCGA para verificar a existência de informes de mutações em algum dos 12 sítios Asn-X-Ser/Thr do EGFR (Figura 4.22) e não foi achado nenhum relato. Este achado sugere que as diferenças no grau de *N*-glicosilação do EGFR observados no pacientes com CCR não estão suportadas por mutações nos sítios de *N*-glicosilação.

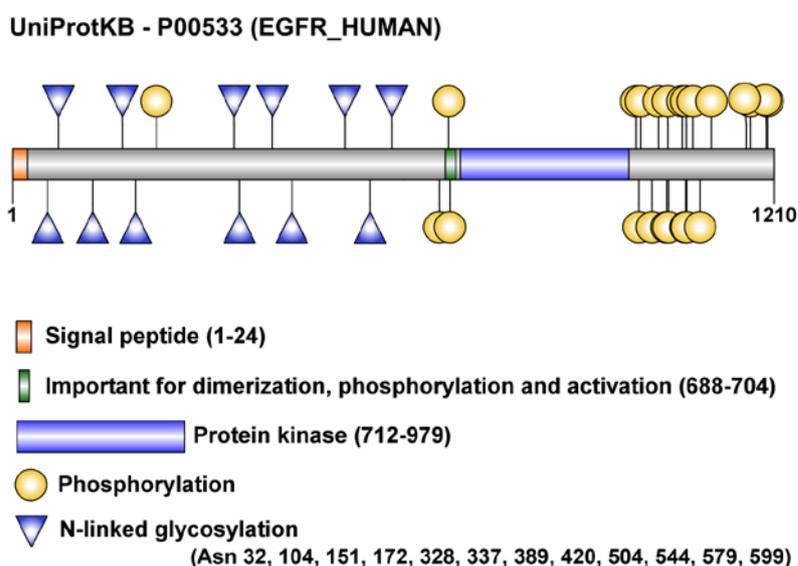
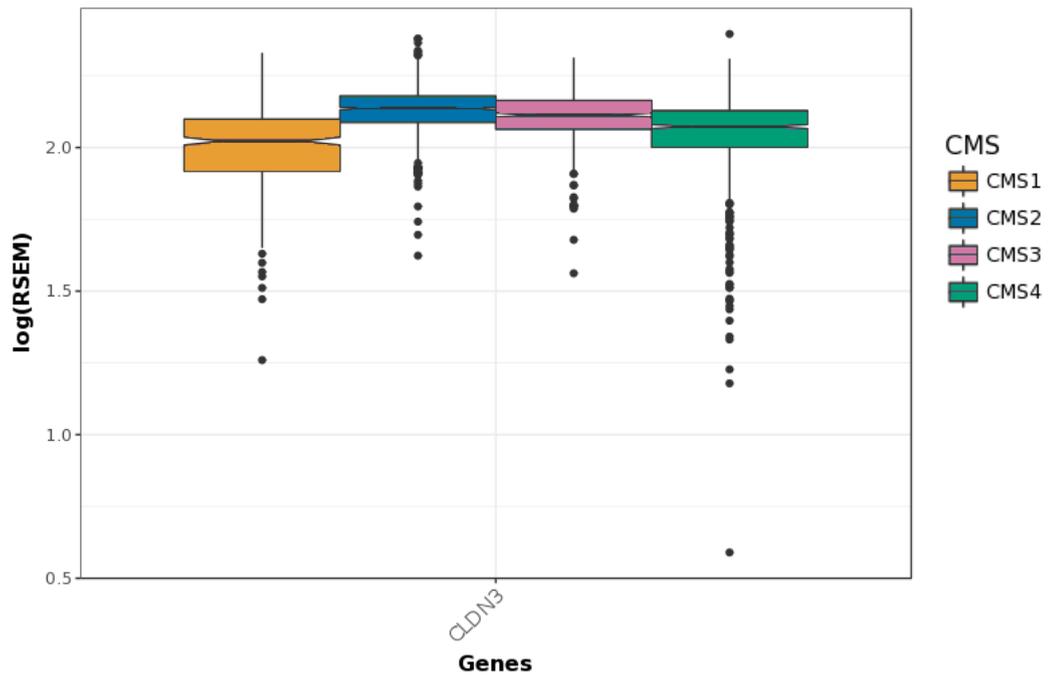
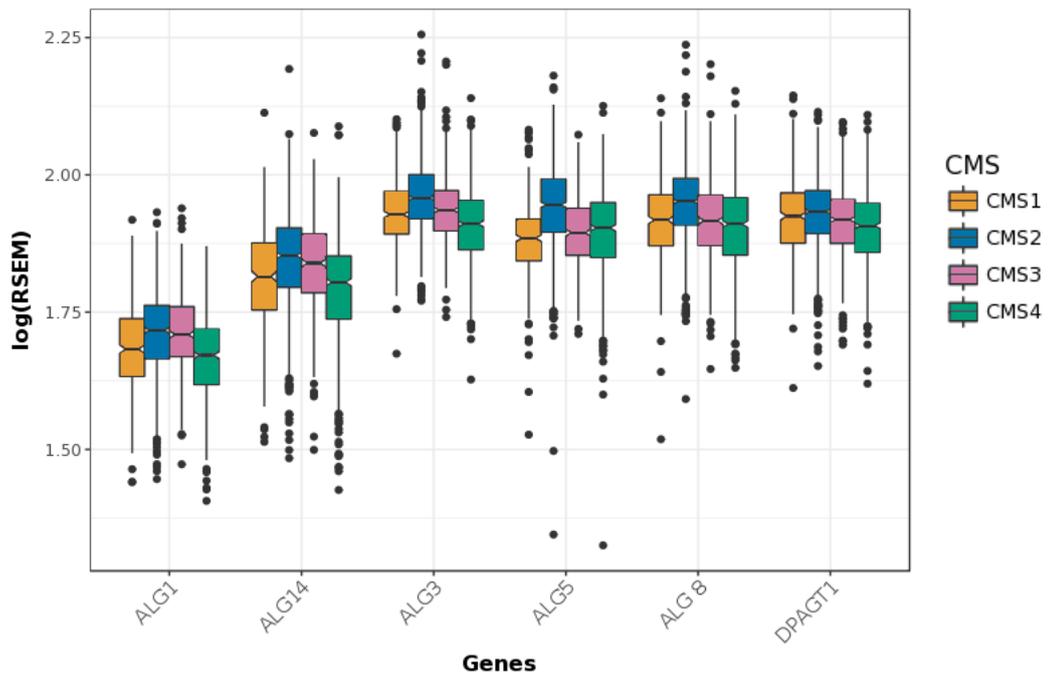


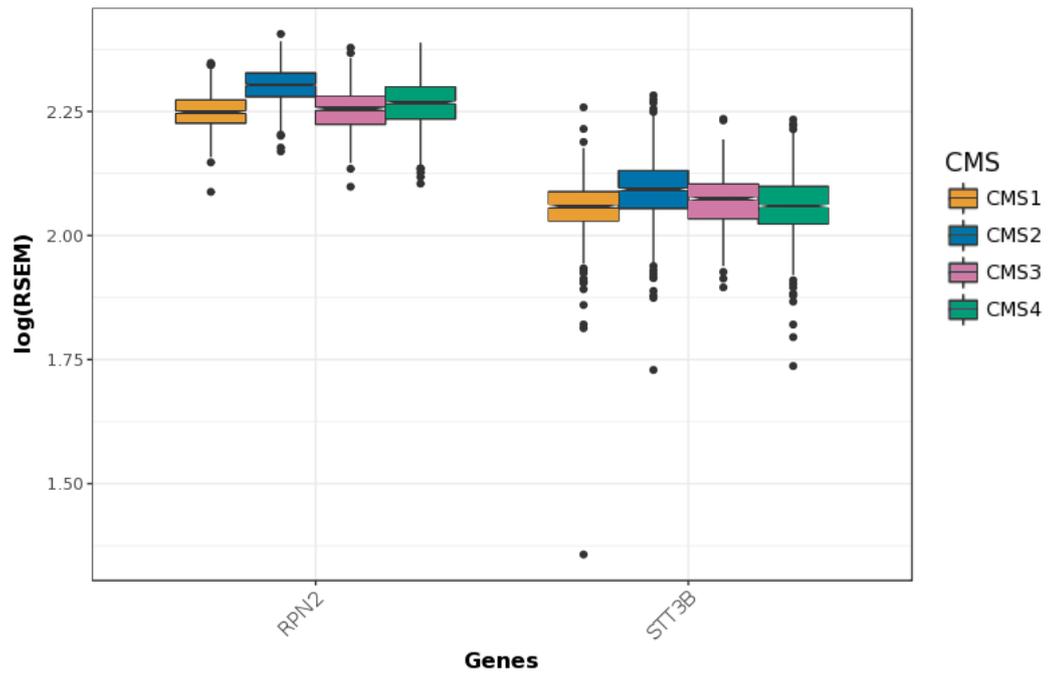
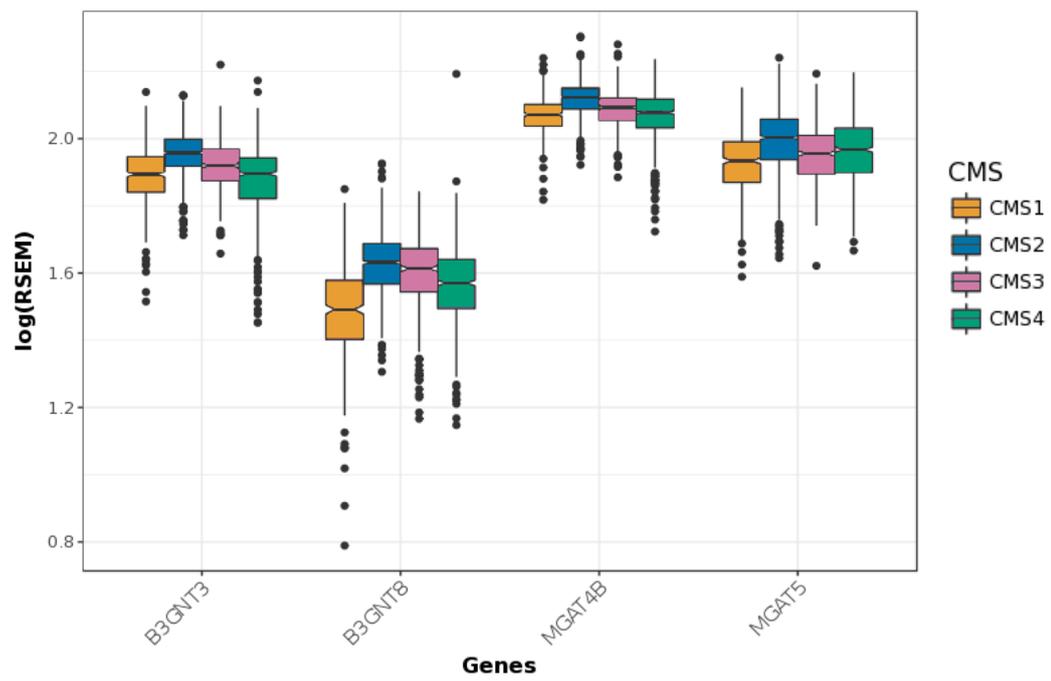
Figura 4.22: Sítios de *N*-glicosilação do EGFR. Mostram-se os locais de *N*-glicosilação do EGFR informados no banco de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos EUA (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Figura elaborada com auxílio da ferramenta *Illustrator for Biological Sequences* (<http://ibs.biocuckoo.org/>).

4.10 A claudina-3 e as enzimas que participam na síntese e maturação dos *N*-glicanos apresentam padrões de expressão similar nos diferentes subtipos moleculares do CCR

Com o intuito de validar os resultados em grande escala foi utilizado um algoritmo classificador de CCR que utiliza para a sua análise dados de expressão gênica de aproximadamente 5000 amostras de pacientes. Foi avaliada a expressão do EGFR, de claudina-3 e de alguns glicogenes nos quatro subtipos moleculares de CCR. Foram observadas diferenças de expressão da *cld-3* entre os quatro CMS, sendo o subgrupo CMS2 o que apresentou maiores níveis de expressão e o CMS1 o que mostrou menores níveis (Figura 4.23 A).

Além disso, genes que codificam para enzimas que participam nos processos de biossíntese do oligossacarídeo precursor de *N*-glicosilação (Figura 4.23 B), transferência desse oligo para o sitio Asn-X-Ser/Thr (Figura 4.23 C), e maturação do *N*-glicano (Figura 4.23 D e E); mostraram um padrão de expressão similar àquele apresentado pela *cld-3*. A análise de expressão do EGFR nos CMS está sendo processada e não foi possível apresentá-la neste trabalho. Conjuntamente, estes dados mostram que há diferenças na expressão de glicogenes entre os CMS o que pode explicar as diferenças observadas para a *cld-3*.

A**B**

C**D**

E

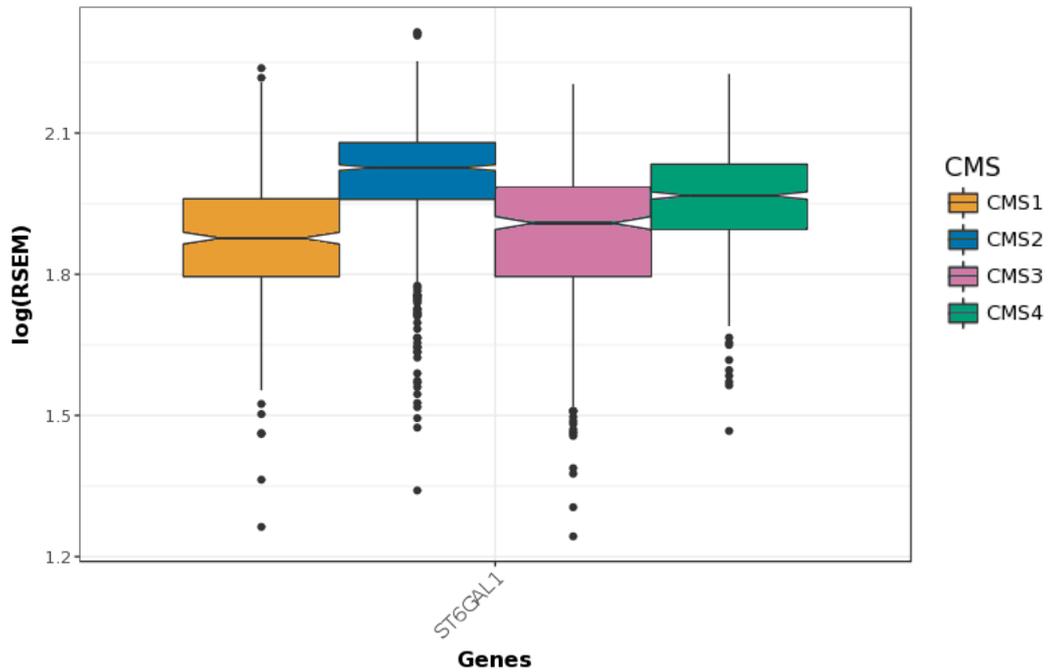


Figure 4.23: Análise da expressão gênica de claudina-3 e glicogenes nos subtipos moleculares de CCR (CMS). Foi utilizado um algoritmo classificador para avaliar a expressão gênica de claudina-3 (A), enzimas que participam na síntese do oligossacarídeo precursor de *N*-glicosilação (B), na transferência do oligo à proteína nascente (C), maturação (D) e capeamento (E) do *N*-glicano. O gráfico mostra valores absolutos da expressão de mRNA de cada gene em aproximadamente 5000 amostras de pacientes com CCR. CMS1: laranja; CMS2: azul; CMS3: roxo; CMS4: verde.

5. DISCUSSÃO

A manutenção da estabilidade do CJA, formado pelas JTs e JAs, tem sido apontada como um supressor de carcinomas devido ao seu papel na determinação da polaridade apical-basolateral, adesão intercelular e manutenção da arquitetura epitelial (ROYER *et al.*, 2011) (HALAOUI *et al.*, 2015). Em CCR é frequentemente observada a desregulação deste complexo proteico (SOLER *et al.*, 1999; TSANOU *et al.*, 2008; ROYER *et al.*, 2011), sendo de vital importância estudar os eventos moleculares que medeiam a sua desestabilização. Neste contexto, tem sido demonstrado o papel regulador dos *N*-glicanos na estabilidade e função do CJA (NITA-LAZAR *et al.*, 2010; PINHO *et al.*, 2013), entretanto, no que tange especificamente às JTs ainda são poucos os estudos dedicados a investigar o papel de modificações pós-traducionais neste processo. Nesse sentido, o presente trabalho se propôs a estudar o papel da *N*-glicosilação na estabilidade das JTs.

Neste estudo, realizado na linhagem HCT-116, foram utilizadas duas drogas que inibem o processo de biossíntese dos *N*-glicanos, a tunicamicina e a swainsonina. Para definir condições de tratamento que não afetassem a viabilidade celular foi realizado um ensaio de MTT avaliando diferentes tempos de tratamento (24, 48,96 e 72 h) e concentrações de droga (tunicamicina: 0.25, 0.50, 0.75, 1 μ M; swainsonina 0.5, 1, 2 e 4 μ M). Foi observado que no tempo de 24 h nenhuma das drogas diminuiu a viabilidade celular. Este dado é similar ao achado num trabalho anterior do nosso grupo que demonstrou que estas drogas não induzem morte celular por apoptose quando utilizadas nessas condições de tratamento (DE FREITAS JUNIOR *et al.*, 2011). Uma vez escolhidas as condições de tratamento foi avaliada a efetividade das drogas mediante citometria de fluxo, analisando a expressão de *N*-glicanos na superfície celular. Constatamos que tanto a tunicamicina quanto a swainsonina inibiram a síntese de *N*-glicanos complexos em 24 h de tratamento. Com isso, foi estudado o efeito das drogas sobre a estabilidade das JTs.

Em primeiro lugar, foi demonstrado que a inibição da biossíntese de *N*-glicanos mediada pela tunicamicina promove a diminuição da expressão proteica de cld-3. É necessário destacar que, embora as claudinas sejam consideradas marcadores epiteliais (AROEIRA *et al.*, 2007), variações nos seus níveis proteicos em células tumorais, seja aumento ou diminuição, podem causar perda da funcionalidade das JTs (FURUSE *et al.*, 2002; HERSCHKOWITZ *et al.*, 2007; DE SOUZA *et al.*, 2013). Cabe ressaltar também que estudos têm demonstrado a relação entre o aumento da expressão das claudinas e a malignidade de tumores de mama, pâncreas, gástrico, ovário (KWON, 2013), e, em CCR,

sabe-se que o aumento da expressão de cld-3 induz destabilização das JTs e aquisição de um fenótipo maligno (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005; DE SOUZA *et al.*, 2013). A expressão proteica das claudinas pode ser regulada em nível transcricional (VAN ITALLIE *et al.*, 2006) e, especificamente a respeito da cld-3, sabe-se que ela é reprimida pelo fator de transcrição Snail (IKENOUCI *et al.*, 2003). Tendo em vista este fato, seria interessante investigar futuramente se a inibição da biossíntese de *N*-glicanos, como, por exemplo, através do tratamento com tunicamicina, afeta os níveis de expressão de mRNA da cld-3.

Foi observado também que o tratamento com tunicamicina não teve efeito sobre os níveis protéicos de nenhuma das outras duas proteínas componentes das JTs avaliadas, ocludina e ZO-1. Nosso resultado está de acordo com um relato na literatura mostrando que as claudinas e as restantes proteínas das JTs são reguladas de forma diferente, neste estudo foi demonstrado que o EGF incrementa a expressão de claudinas, porém, não afeta os níveis proteicos da ZO-1 e ocludina (SINGH *et al.*, 2004). Por outro lado, o tratamento com swainsonina não modificou os níveis de expressão de nenhuma das proteínas constituintes das JTs avaliadas. A explicação para este fato pode ter sua base na diferença entre os mecanismos de ação destas drogas, sendo que a swainsonina inibe a formação apenas de *N*-glicanos complexos, resultando em *N*-glicanos ricos em manose, já a tunicamicina impede que a proteína seja *N*-glicosilada.

Sabendo que o tratamento com tunicamicina afetou a expressão de cld-3, foi avaliado em seguida se esta droga era capaz de induzir mudanças na sua localização subcelular. Foi verificado mediante imunofluorescência que a tunicamicina induziu o aumento da localização da cld-3 na membrana celular. A localização subcelular das claudinas é regulada principalmente pela sua fosforilação em resíduos de tirosina e treonina da porção carboxi-terminal (WANG *et al.*, 2011; BUTT *et al.*, 2012). Foi constatado que o tratamento com tunicamicina induziu a diminuição da fosforilação de tirosinas da faixa de peso molecular da cld-3 (22kDa), o que corresponde com o aumento da sua localização na membrana celular. Estes achados estão de acordo com relatos de outros autores, que também mostraram que a fosforilação da cld-3 em resíduos de tirosina induzem a localização desta proteína no citoplasma devido à perda da sua interação com a ZO-1 (TWISS *et al.*, 2013; NOMME *et al.*, 2015).

Com o intuito de estudar se o incremento da localização da cld-3 na membrana citoplasmática induzido pela tunicamicina tinha repercussão na funcionalidade das JTs, foi avaliada a permeabilidade paracelular ao corante vermelho de rutênio mediante microscopia eletrônica de transmissão. Foi observado que o corante permeou a monocamada pela via paracelular tanto nas células controle quanto nas tratadas com tunicamicina. Este resultado

sugere que a permeabilidade paracelular não é afetada pela inibição do processo de biossíntese de *N*-glicanos, entretanto, outros ensaios serão necessários para confirmar este resultado. Por exemplo, avaliar a permeabilidade a macromoléculas, uma vez que tem sido mostrado que a permeabilidade das JTs a pequenos solutos e a macromoléculas são afetadas de forma diferente por mudanças na expressão de claudinas (DE SOUZA *et al.*, 2013). Embora o tratamento com tunicamicina não tenha afetado a permeabilidade das JTs ao vermelho de rutênio, promoveu contatos célula-célula mais estabelecidos, fato que pode contribuir para um fenótipo mais diferenciado (DE FREITAS JUNIOR *et al.*, 2011) e para a diminuição da capacidade invasiva das células (NAMI *et al.*, 2016).

A *cld-3* não contém sítios de *N*-glicosilação na sua estrutura (BUTT *et al.*, 2012) por isso a inibição da *N*-glicosilação mediada pela tunicamicina não afeta de maneira direta esta proteína. Sabendo que o EGFR regula a estabilidade das JTs modificando a expressão e localização da *cld-3* (SINGH *et al.*, 2004; DE SOUZA *et al.*, 2013), no presente estudo, os esforços foram concentrados em investigar o papel dos *N*-glicanos deste receptor na regulação da estabilidade das JTs. Para tal, primeiramente, foi avaliado o efeito da inibição da *N*-glicosilação sobre a funcionalidade deste receptor. Constatamos que a de-glicosilação do EGFR, induzida pela tunicamicina, reduziu tanto a sua localização na membrana celular quanto os seus níveis de fosforilação, diminuindo assim a ativação das proteínas *downstream* Akt e Erk ½. Especulamos que a fosforilação do EGFR que se encontra na membrana celular é afetada porque este receptor teria, neste caso, menos parceiros para dimerizar. Foi descartada a hipótese de que a tunicamicina estivesse promovendo a internalização do EGFR, já que não foram observadas mudanças na sua co-localização com Rab5 (endossomo inicial). Nossos dados corroboram os mostrados na literatura que demonstram que a tunicamicina afeta a sinalização de receptores tirosina-cinase como o EGFR, promovendo o acúmulo das novas proteínas sintetizadas e de-glicosiladas no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi (CONTESSA *et al.*, 2008). Levando em consideração o modelo celular utilizado, o resultado mostrando que a tunicamicina foi capaz de inibir a sinalização do EGFR pode, a princípio, parecer controverso, pois a linhagem HCT-116 apresenta uma variante mutada de KRAS, uma proteína GTPase codificada pelo gene *KRAS* que ativa cinases *downstream* ao EGFR, como MAPK e PI3k/AKT. Contudo, este achado está de acordo com o relatado na literatura mostrando que a manipulação da *N*-glicosilação do EGFR mediante o silenciamento da enzima B4GALNT3, responsável pela síntese de estruturas LacdiNAc (caracterizada pela transferência de *N*-acetilgalactosamina terminal a resíduos de *N*-acetilglicosamina), foi capaz de diminuir a sinalização do EGFR em células HCT-116 (CHE *et al.*, 2014). Ainda se desconhecem os detalhes da relação entre a *N*-glicosilação e a superativação da família de

proteínas RAS. Um trabalho mostrou que células de camundongo NIH3T3 transfectadas com variantes ativas de HRAS apresentavam maiores níveis de expressão de *N*-glicanos complexos β 1,6 ramificados em comparação com as células controle (LU *et al.*, 1993). Futuramente, seria interessante avaliar se a manipulação da *N*-glicosilação pode influenciar a ativação de proteínas RAS mutadas, especificamente, de KRAS. Contudo, os resultados obtidos sugerem que uma estratégia terapêutica que manipulasse a *N*-glicosilação do EGFR poderia ser efetiva em pacientes de CCR com mutação em KRAS.

Tendo em vista que a tunicamicina inibe o processo de biossíntese de *N*-glicanos da célula e não tem especificidade pelo EGFR, foi avaliado especificamente o papel da sinalização deste receptor na regulação da cld-3. Para tal, foi utilizado um inibidor específico da sua atividade tirosina-cinase, o PD153035. Foi confirmado que o tratamento com este inibidor diminuiu tanto os níveis de fosforilação do EGFR quanto os níveis de expressão da cld-3, o que permitiu afirmar que a sinalização deste receptor, afetada pelo seu padrão de *N*-glicosilação, modula os níveis proteicos de cld-3. No entanto, não podemos descartar a participação de outras glicoproteínas na regulação da cld-3, como pode ser o caso do receptor do fator de crescimento de hepatócito (HGF) (TWISS *et al.*, 2013). Sabe-se que o EGFR, além de regular a expressão da cld-3, também interage diretamente com proteínas constituintes do CJA (KAWAMATA, *et al.*, 2003). Com o intuito de avaliar se existia interação direta entre o EGFR e a cld-3 foi realizada uma co-immunoprecipitação usando um anticorpo anti-EGFR, e na fração imunoprecipitada, não foram encontrados níveis detectáveis de cld-3. Este resultado sugere que a fosforilação da cld-3 está sendo induzida por outra proteína. Neste contexto, sabe-se que a proteína cinase A (PKA, do inglês *protein kinase A*), que é ativada pelo EGFR (CALDWELL *et al.*, 2012) fosforila a cld-3 em células de câncer de ovário (D'SOUZA *et al.*, 2005).

O ácido siálico é um dos monossacarídeos que decoram as antenas de *N*-glicanos ligados ao EGFR regulando assim a sua ativação. Levando isto em consideração, foi avaliado o efeito do tratamento com análogo fluorinado de ácido siálico sobre a expressão de cld-3. Constatamos que esta droga diminuiu tanto a fosforilação do EGFR quanto os níveis de expressão de cld-3. Embora a ação desta droga não seja específica para um tipo de sialilação, por exemplo, α -2,6 ou α -2,3; nosso dado diverge de um estudo que demonstrou que o silenciamento da enzima ST6Gal1 (Figura 1.11) aumentou a fosforilação do EGFR em células de câncer colorretal SW480 (PARK *et al.*, 2012). Essa divergência pode ser explicada pelas características da linhagem celular utilizada no nosso estudo, pois a linhagem HCT-116 apresenta uma mutação no gene que codifica para a enzima GMDS (GDP-mannose-4,6-dehidratase), a qual catalisa a reação de síntese de GDP-fucose (HOLST *et al.*, 2016). Já é

cohecido que a *core*-fucosilação exerce efeito contrário ao da sialilação sobre a ativação do EGFR, uma vez que propicia a ligação do EGF (WANG *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2011). Por este motivo podemos especular que a sialilação terminal do *N*-glicano do EGFR no nosso modelo pode ter efeito compensatório pela falta de *core*-fucosilação. No entanto, são necessários novos estudos utilizando ferramentas para manipular a sialilação de forma mais específica e, adicionalmente, restaurar a expressão da GMDS na linhagem HCT-116 para confirmar esta hipótese.

No estudo realizado utilizando amostras de tecido de pacientes com CCR, foi observado que nos tumores que expressavam maiores níveis de cld-3 em relação aos respectivos tecidos normais adjacentes, o EGFR apresentava maior grau de *N*-glicosilação. Este resultado corrobora o que foi observado no modelo celular, onde foi visto que a deglicosilação do EGFR afetava negativamente a expressão da cld-3, evidenciando a potencial relevância clínica dos achados.

Com o intuito de verificar a existência de relatos de mutações em sítios de *N*-glicosilação (Asn-X-Ser/Thr) que pudessem dar base para diferenças no grau de *N*-glicosilação do EGFR, foi realizada uma pesquisa no banco de dados internacional TCGA e não foi achado nenhum relato. Cabe ressaltar que não foi pesquisada a existência de mutações em aminoácidos vizinhos aos locais de *N*-glicosilação, as quais poderiam afetar também a ocupação dos sítios por glicanos.

A fim de realizar uma análise em grande escala que permitisse relacionar padrões de *N*-glicosilação com a expressão do EGFR e da cld-3, foi avaliada a expressão gênica destas proteínas e de enzimas que participam no processo de biossíntese e maturação de *N*-glicanos nos subtipos moleculares (CMS) de CCR propostos por Justin Guinney e colaboradores em 2015. Foram apresentados neste trabalho os resultados correspondentes com a expressão de cld-3 e alguns dos principais glicogenes, os resultados da análise da expressão do EGFR ainda estão em processamento.

Foram observadas diferenças de expressão de cld-3 entre os quatro CMS, sendo o subgrupo CMS2 o que apresentou maiores níveis e o CMS1 o que mostrou menores níveis de expressão. Estas diferenças na expressão de cld-3 podem explicar o achado do presente estudo com as amostras de pacientes com CCR, onde foram observados dois grupos de pacientes, um grupo (11 pacientes) em que os tumores apresentavam maiores níveis proteicos de cld-3 e outro grupo (3 pacientes) onde os tumores apresentavam menores níveis em comparação com os respectivos tecidos normais adjacentes. Estes dados são similares aos de um trabalho mostrando que subtipos moleculares de câncer de mama apresentam níveis de expressão de cld-3 diferentes (KWON, 2013)

Além disso, genes que codificam para enzimas que participam nos processos de biossíntese do oligossacarídeo precursor, transferência desse oligo para o sítio Asn-X-Ser/Thr, e maturação do *N*-glicano; mostraram um padrão de expressão similar ao apresentado pela *cld-3*. Entre essas enzimas observamos a *MGAT5* e a *ST6GAL1*, responsáveis respectivamente pela síntese dos *N*-glicanos complexos β 1,6 ramificados e adição de sialilação terminal do tipo α 2,6. Este dado complementa os obtidos nos experimentos *in vitro* realizados na linhagem HCT-116, onde foi demonstrado o papel regulatório destes glicanos sobre a *cld-3*. É importante destacar que este trabalho mostrou pela primeira vez padrões de expressão de glicogênes e *cld-3* nos diferentes CMS de CCR, o que contribui para uma melhor caracterização desses subtipos.

Conjuntamente, os nossos resultados demonstram que a *N*-glicosilação do EGFR desempenha um papel na regulação da *cld-3*, contribuindo para uma melhor compreensão da biologia do CCR. A Figura 4.24 sintetiza nossos achados e apresenta o modelo proposto de regulação da *cld-3* pelos *N*-glicanos do EGFR.

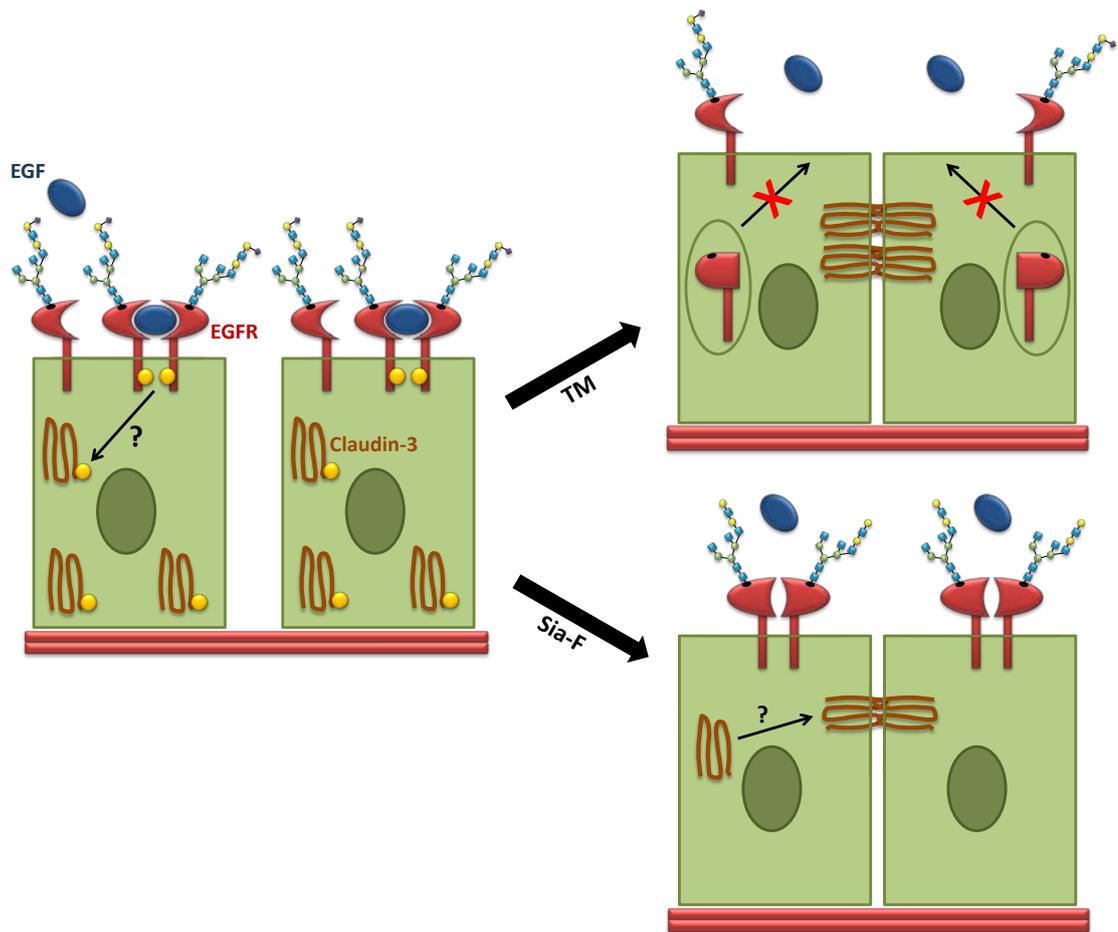


Figura 4.24: Modelo proposto de regulação da claudina-3 pela N-glicosilação do EGFR. A de-glicosilação de novas moléculas do EGFR induzida pelo tratamento com tunicamicina promove o acúmulo do receptor no citoplasma, diminuindo os seus níveis de fosforilação; como consequência, diminuem também os níveis de fosforilação da cld-3, aumentando a sua localização na membrana. Adicionalmente, o tratamento com tunicamicina promove interações célula-célula mais estabelecidas. Já a falta de ácido sialico nos N-glicanos diminui tanto a fosforilação do EGFR quanto a expressão da cld-3.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados é possível concluir que a *N*-glicanos desempenham um papel na estabilidade das junções *tight*. Os resultados sugerem que diferentes perfis de *N*-glicosilação do EGFR modulam vias de sinalização *downstream* que regulam os níveis de expressão e fosforilação de claudina-3. Conjuntamente, estes achados contribuem para uma melhor compreensão da biologia do CCR. Adicionalmente, foi observado que tumores de pacientes com CCR que apresentavam maiores níveis de expressão de claudina-3, em comparação com os tecidos normais adjacentes, apresentavam maior grau de *N*-glicosilação do EGFR, o que sugere um potencial significado clínico de alterações no padrão de *N*-glicosilação deste receptor.

7. REFERÊNCIAS

1. AGHAGOLZADEH, P.; RADPOUR, R. New trends in molecular and cellular biomarker discovery for colorectal cancer. **World J Gastroenterol**, v. 22, n. 25, p. 5678-93, Jul 2016. ISSN 2219-2840.
2. AHMED, D. *et al.* Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. **Oncogenesis**, v. 2, p. e71, Sep 2013.
3. AL-SADI, R. *et al.* Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 300, n. 6, p. G1054-64, Jun 2011. ISSN 1522-1547.
4. AL-SOHAILY, S. *et al.* Molecular pathways in colorectal cancer. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 27, n. 9, p. 1423-31, Sep 2012. ISSN 1440-1746.
5. ALLEY, W. R.; NOVOTNY, M. V. Glycomic analysis of sialic acid linkages in glycans derived from blood serum glycoproteins. **J Proteome Res**, v. 9, n. 6, p. 3062-72, Jun 2010. ISSN 1535-3907.
6. ALROY, I.; YARDEN, Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. **FEBS Lett**, v. 410, n. 1, p. 83-6, Jun 23 1997. ISSN 0014-5793.
7. AROEIRA, L. S. *et al.* Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potential therapeutic interventions. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, n. 7, p. 2004-13, Jul 2007. ISSN 1046-6673.
8. BARONDES, S. H. *et al.* Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. **Cell**, v. 76, n. 4, p. 597-8, Feb 1994. ISSN 0092-8674.
9. BASELGA, J.; SWAIN, S. M. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 7, p. 463-75, Jul 2009. ISSN 1474-1768.

10. BASTOS, L. G. *et al.* Progeny from irradiated colorectal cancer cells acquire an EMT-like phenotype and activate Wnt/ β -catenin pathway. **J Cell Biochem**, v. 115, n. 12, p. 2175-87, Dec 2014. ISSN 1097-4644.
11. BAZLEY, L. A.; GULLICK, W. J. The epidermal growth factor receptor family. **Endocr Relat Cancer**, v. 12 Suppl 1, p. S17-27, Jul 2005. ISSN 1351-0088.
12. BENNETT, E. P. *et al.* Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. **Glycobiology**, v. 22, n. 6, p. 736-56, Jun 2012. ISSN 1460-2423.
13. BLOMME, B. *et al.* Alteration of protein glycosylation in liver diseases. **J Hepatol**, v. 50, n. 3, p. 592-603, Mar 2009. ISSN 1600-0641.
14. BROOKS, S. A. *et al.* Altered glycosylation of proteins in cancer: what is the potential for new anti-tumour strategies. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 8, n. 1, p. 2-21, Jan 2008. ISSN 1871-5206.
15. BUTT, A. M. *et al.* Role of post translational modifications and novel crosstalk between phosphorylation and O-beta-GlcNAc modifications in human claudin-1, -3 and -4. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 2, p. 1359-69, Feb 2012. ISSN 1573-4978.
16. CALDWELL, G. B. *et al.* Direct modulation of the protein kinase A catalytic subunit α by growth factor receptor tyrosine kinases. **J Cell Biochem**, v. 113, n. 1, p. 39-48, Jan 2012. ISSN 1097-4644.
17. CAPALDO, C. T.; MACARA, I. G. Depletion of E-cadherin disrupts establishment but not maintenance of cell junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. **Mol Biol Cell**, v. 18, n. 1, p. 189-200, Jan 2007. ISSN 1059-1524.
18. CARLSSON, J. *et al.* EGFR-expression in primary urinary bladder cancer and corresponding metastases and the relation to HER2-expression. On the possibility to target these receptors with radionuclides. **Radiol Oncol**, v. 49, n. 1, p. 50-8, Mar 2015. ISSN 1318-2099.
19. CARVALHO, S. *et al.* O-mannosylation and N-glycosylation: two coordinated mechanisms regulating the tumour suppressor functions of E-cadherin in cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 40, p. 65231-65246, Oct 2016. ISSN 1949-2553.

20. CENTELLES, J. J. General aspects of colorectal cancer. **ISRN Oncol**, v. 2012, p. 139268, 2012. ISSN 2090-567X.
21. CHE, M. I. *et al.* β 1, 4-N-acetylgalactosaminyltransferase III modulates cancer stemness through EGFR signaling pathway in colon cancer cells. **Oncotarget**, v. 5, n. 11, p. 3673-84, Jun 2014. ISSN 1949-2553.
22. CHEN, Z. *et al.* β -catenin overexpression in the nucleus predicts progress disease and unfavourable survival in colorectal cancer: a meta-analysis. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63854, 2013. ISSN 1932-6203.
23. CHUNG, Y. C. *et al.* Rab11 regulates E-cadherin expression and induces cell transformation in colorectal carcinoma. **BMC Cancer**, v. 14, p. 587, Aug 2014. ISSN 1471-2407.
24. CONTESSA, J. N. *et al.* Inhibition of N-linked glycosylation disrupts receptor tyrosine kinase signaling in tumor cells. **Cancer Res**, v. 68, n. 10, p. 3803-9, May 2008. ISSN 1538-7445.
25. D'SOUZA, T.; AGARWAL, R.; MORIN, P. J. Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. **J Biol Chem**, v. 280, n. 28, p. 26233-40, Jul 2005. ISSN 0021-9258.
26. DALL'OLIO, F.; CHIRICOLO, M.; LAU, J. T. Differential expression of the hepatic transcript of beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase in human colon cancer cell lines. **Int J Cancer**, v. 81, n. 2, p. 243-7, Apr 1999. ISSN 0020-7136.
27. DALL'OLIO, F. *et al.* Increased CMP-NeuAc:Gal beta 1,4GlcNAc-R alpha 2,6 sialyltransferase activity in human colorectal cancer tissues. **Int J Cancer**, v. 44, n. 3, p. 434-9, Sep 1989. ISSN 0020-7136.
28. DAVIES, R. J.; MILLER, R.; COLEMAN, N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 3, p. 199-209, Mar 2005. ISSN 1474-175X.
29. DE FREITAS JUNIOR, J. C.; MORGADO-DÍAZ, J. A. The role of N-glycans in colorectal cancer progression: potential biomarkers and therapeutic applications. **Oncotarget**, v. 7, n. 15, p. 19395-413, Apr 2016. ISSN 1949-2553.

30. DE FREITAS JUNIOR, J. C. *et al.* Inhibition of N-linked glycosylation by tunicamycin induces E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and inhibits cell proliferation in undifferentiated human colon cancer cells. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 68, n. 1, p. 227-38, Jul 2011. ISSN 1432-0843.
31. DE OLIVEIRA, S. S. *et al.* Claudins upregulation in human colorectal cancer. **FEBS Lett**, v. 579, n. 27, p. 6179-85, Nov 2005. ISSN 0014-5793.
32. DE SOUZA, W. F. *et al.* Claudin-3 overexpression increases the malignant potential of colorectal cancer cells: roles of ERK1/2 and PI3K-Akt as modulators of EGFR signaling. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74994, 2013. ISSN 1932-6203.
33. DELL, A.; MORRIS, H. R. Glycoprotein structure determination by mass spectrometry. **Science**, v. 291, n. 5512, p. 2351-6, Mar 2001. ISSN 0036-8075.
34. DENNIS, J. W. *et al.* Adaptive regulation at the cell surface by N-glycosylation. **Traffic**, v. 10, n. 11, p. 1569-78, Nov 2009. ISSN 1600-0854.
35. DESANTIS, C. E. Cancer treatment and survivorship statistics **CA Cancer J Clin**. 64: 252-71 p. 2014.
36. DHAWAN, P. *et al.* Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. **J Clin Invest**, v. 115, n. 7, p. 1765-76, Jul 2005. ISSN 0021-9738.
37. DIBB, N. J.; DILWORTH, S. M.; MOL, C. D. Switching on kinases: oncogenic activation of BRAF and the PDGFR family. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 9, p. 718-27, Sep 2004. ISSN 1474-175X.
38. DÖRFEL, M. J.; HUBER, O. Modulation of tight junction structure and function by kinases and phosphatases targeting occludin. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 807356, 2012. ISSN 1110-7251.
39. EDGE, S. B.; COMPTON, C. C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. **Ann Surg Oncol**, v. 17, n. 6, p. 1471-4, Jun 2010. ISSN 1534-4681.
40. ELBEIN, A. D. Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharide chains. **Annu Rev Biochem**, v. 56, p. 497-534, 1987. ISSN 0066-4154.

41. FEARON, E. R. Molecular Genetics of Colorectal Cancer: Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 6: 479-507 p. 2011.
42. FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, n. 5, p. 759-67, Jun 1990. ISSN 0092-8674.
43. FERLAY, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, Mar 2015. ISSN 1097-0215.
44. FERNANDES, H.; COHEN, S.; BISHAYEE, S. Glycosylation-induced conformational modification positively regulates receptor-receptor association: a study with an aberrant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII/DeltaEGFR) expressed in cancer cells. **J Biol Chem**, v. 276, n. 7, p. 5375-83, Feb 2001. ISSN 0021-9258.
45. FERRIS, S. P.; KODALI, V. K.; KAUFMAN, R. J. Glycoprotein folding and quality-control mechanisms in protein-folding diseases. **Dis Model Mech**, v. 7, n. 3, p. 331-41, Mar 2014. ISSN 1754-8411.
46. FRANOVIC, A. *et al.* Translational up-regulation of the EGFR by tumor hypoxia provides a nonmutational explanation for its overexpression in human cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 32, p. 13092-7, Aug 2007. ISSN 0027-8424.
47. FREDERICK, L. *et al.* Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. **Cancer Res**, v. 60, n. 5, p. 1383-7, Mar 2000. ISSN 0008-5472.
48. FURUSE, M. *et al.* Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. **J Cell Biol**, v. 156, n. 6, p. 1099-1111, Mar 2002. ISSN 0021-9525.
49. _____. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. **J Cell Biol**, v. 143, n. 2, p. 391-401, Oct 1998. ISSN 0021-9525.
50. FUSTER, M. M.; ESKO, J. D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 7, p. 526-42, Jul 2005. ISSN 1474-175X.

51. GAO, J.; ULEKLEIV, C. H.; HALSTENSEN, T. S. Epidermal growth factor (EGF) receptor-ligand based molecular staging predicts prognosis in head and neck squamous cell carcinoma partly due to deregulated EGF- induced amphiregulin expression. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 35, n. 1, p. 151, Sep 2016. ISSN 1756-9966.
52. GARCIA DE PALAZZO, I. E. *et al.* Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. **Cancer Res**, v. 53, n. 14, p. 3217-20, Jul 1993. ISSN 0008-5472.
53. GAVERT, N. *et al.* c-Kit is suppressed in human colon cancer tissue and contributes to L1-mediated metastasis. **Cancer Res**, v. 73, n. 18, p. 5754-63, Sep 2013. ISSN 1538-7445.
54. GEHREN, A. S. *et al.* Alterations of the apical junctional complex and actin cytoskeleton and their role in colorectal cancer progression. **Tissue Barriers**, v. 3, n. 3, p. e1017688, 2015 Jul-Sep 2015. ISSN 2168-8362.
55. GOSS, P. E. *et al.* Phase IB clinical trial of the oligosaccharide processing inhibitor swainsonine in patients with advanced malignancies. **Clin Cancer Res**, v. 3, n. 7, p. 1077-86, Jul 1997. ISSN 1078-0432.
56. GRIFFIN, M. E.; HSIEH-WILSON, L. C. Glycan Engineering for Cell and Developmental Biology. **Cell Chem Biol**, v. 23, n. 1, p. 108-21, Jan 2016. ISSN 2451-9456.
57. GUINNEY, J. *et al.* The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. **Nat Med**, v. 21, n. 11, p. 1350-6, Nov 2015. ISSN 1546-170X.
58. GUO, A. *et al.* Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 2, p. 692-7, Jan 2008. ISSN 1091-6490.
59. GUO, H.; NAGY, T.; PIERCE, M. Post-translational glycoprotein modifications regulate colon cancer stem cells and colon adenoma progression in Apc(min/+) mice through altered Wnt receptor signaling. **J Biol Chem**, v. 289, n. 45, p. 31534-49, Nov 2014. ISSN 1083-351X.
60. GUO, H. B. *et al.* Specific posttranslational modification regulates early events in mammary carcinoma formation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 49, p. 21116-21, Dec 2010. ISSN 1091-6490.

61. _____. N-acetylglucosaminyltransferase V expression levels regulate cadherin-associated homotypic cell-cell adhesion and intracellular signaling pathways. **J Biol Chem**, v. 278, n. 52, p. 52412-24, Dec 2003. ISSN 0021-9258.
62. GÜNZEL, D.; YU, A. S. Claudins and the modulation of tight junction permeability. **Physiol Rev**, v. 93, n. 2, p. 525-69, Apr 2013. ISSN 1522-1210.
63. HALAOUI, R.; MCCAFFREY, L. Rewiring cell polarity signaling in cancer. **Oncogene**, v. 34, n. 8, p. 939-50, Feb 2015. ISSN 1476-5594.
64. HANDERSON, T. *et al.* Beta1,6-branched oligosaccharides are increased in lymph node metastases and predict poor outcome in breast carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 8, p. 2969-73, Apr 2005. ISSN 1078-0432.
65. HERBST, R. S.; SHIN, D. M. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. **Cancer**, v. 94, n. 5, p. 1593-611, Mar 2002. ISSN 0008-543X.
66. HERSCHKOWITZ, J. I. *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biol**, v. 8, n. 5, p. R76, 2007. ISSN 1474-760X.
67. HOLBRO, T.; CIVENNI, G.; HYNES, N. E. The ErbB receptors and their role in cancer progression. **Exp Cell Res**, v. 284, n. 1, p. 99-110, Mar 2003. ISSN 0014-4827.
68. HOLBRO, T.; HYNES, N. E. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 44, p. 195-217, 2004. ISSN 0362-1642.
69. HOLST, S. *et al.* N-glycosylation Profiling of Colorectal Cancer Cell Lines Reveals Association of Fucosylation with Differentiation and Caudal Type Homebox 1 (CDX1)/Villin mRNA Expression. **Mol Cell Proteomics**, v. 15, n. 1, p. 124-40, Jan 2016. ISSN 1535-9484.
70. HUANG, B. *et al.* Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in gastric cancer correlates with metastasis and prognosis. **Int J Oncol**, v. 44, n. 3, p. 849-57, Mar 2014. ISSN 1791-2423.

71. IJSPEERT, J. E. *et al.* Serrated neoplasia-role in colorectal carcinogenesis and clinical implications. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 12, n. 7, p. 401-9, Jul 2015. ISSN 1759-5053.
72. IKENOUCHI, J. *et al.* Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 10, p. 1959-67, May 2003. ISSN 0021-9533.
73. ISHIBASHI, Y. *et al.* Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in the development of human esophageal cancers: immunohistochemical data from carcinomas and nearby noncancerous lesions. **Oncology**, v. 69, n. 4, p. 301-10, 2005. ISSN 0030-2414.
74. ISHIDA, H. *et al.* A novel beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (beta3Gn-T8), which synthesizes poly-N-acetyllactosamine, is dramatically upregulated in colon cancer. **FEBS Lett**, v. 579, n. 1, p. 71-8, Jan 2005. ISSN 0014-5793.
75. ITO, Y. *et al.* Elevated expression of UDP-N-acetylglucosamine: alphanmannoside beta1,6 N-acetylglucosaminyltransferase is an early event in hepatocarcinogenesis. **Int J Cancer**, v. 91, n. 5, p. 631-7, Mar 2001. ISSN 0020-7136.
76. JAMALUDDIN, M. F. *et al.* Polypeptide binding specificities of Saccharomyces cerevisiae oligosaccharyltransferase accessory proteins Ost3p and Ost6p. **Protein Sci**, v. 20, n. 5, p. 849-55, May 2011. ISSN 1469-896X.
77. JOHNSON, C. M. *et al.* Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. **Cancer Causes Control**, v. 24, n. 6, p. 1207-22, Jun 2013. ISSN 1573-7225.
78. KAIHARA, T. *et al.* Redifferentiation and ZO-1 reexpression in liver-metastasized colorectal cancer: possible association with epidermal growth factor receptor-induced tyrosine phosphorylation of ZO-1. **Cancer Sci**, v. 94, n. 2, p. 166-72, Feb 2003. ISSN 1347-9032.
79. _____. Dedifferentiation and decreased expression of adhesion molecules, E-cadherin and ZO-1, in colorectal cancer are closely related to liver metastasis. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 22, n. 1, p. 117-23, Mar 2003. ISSN 0392-9078.
80. KANNAGI, R. *et al.* Current relevance of incomplete synthesis and neo-synthesis for cancer-associated alteration of carbohydrate determinants--Hakomori's concepts revisited. **Biochim Biophys Acta**, v. 1780, n. 3, p. 525-31, Mar 2008. ISSN 0006-3002.

81. KHOURY, G. A.; BALIBAN, R. C.; FLOUDAS, C. A. Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. **Sci Rep**, v. 1, Sep 2011. ISSN 2045-2322.
82. KINUGASA, T. *et al.* Increased claudin-1 protein expression in hepatic metastatic lesions of colorectal cancer. **Anticancer Res**, v. 32, n. 6, p. 2309-14, Jun 2012. ISSN 1791-7530.
83. KIZUKA, Y.; TANIGUCHI, N. Enzymes for N-Glycan Branching and Their Genetic and Nongenetic Regulation in Cancer. **Biomolecules**, v. 6, n. 2, Apr 2016. ISSN 2218-273X.
84. KOBAYASHI, S. *et al.* EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. **N Engl J Med**, v. 352, n. 8, p. 786-92, Feb 2005. ISSN 1533-4406.
85. KOC, M. *et al.* Expression of FHIT, p16, p53 and EGFR as prognostic markers in thyroid tumors of uncertain malignant potential. **J BUON**, v. 20, n. 2, p. 567-72, 2015 Mar-Apr 2015. ISSN 1107-0625.
86. KOVACS, E. *et al.* A structural perspective on the regulation of the epidermal growth factor receptor. **Annu Rev Biochem**, v. 84, p. 739-64, 2015. ISSN 1545-4509.
87. KROEPIL, F. *et al.* Down-regulation of CDH1 is associated with expression of SNAI1 in colorectal adenomas. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e46665, 2012. ISSN 1932-6203.
88. _____. Snail1 expression in colorectal cancer and its correlation with clinical and pathological parameters. **BMC Cancer**, v. 13, p. 145, Mar 2013. ISSN 1471-2407.
89. KRUG, S. M.; SCHULZKE, J. D.; FROMM, M. Tight junction, selective permeability, and related diseases. **Semin Cell Dev Biol**, v. 36, p. 166-76, Dec 2014. ISSN 1096-3634.
90. KUMAMOTO, K. *et al.* Increased expression of UDP-galactose transporter messenger RNA in human colon cancer tissues and its implication in synthesis of Thomsen-Friedenreich antigen and sialyl Lewis A/X determinants. **Cancer Res**, v. 61, n. 11, p. 4620-7, Jun 2001. ISSN 0008-5472.
91. KWATRA, M. M. A Rational Approach to Target the Epidermal Growth Factor Receptor in Glioblastoma. **Curr Cancer Drug Targets**, Dec 2016. ISSN 1873-5576.

92. KWON, M. J. Emerging roles of claudins in human cancer. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 9, p. 18148-80, Sep 2013. ISSN 1422-0067.
93. LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 3, p. 178-96, Mar 2014. ISSN 1471-0080.
94. LANGE, T. *et al.* Importance of altered glycoprotein-bound N- and O-glycans for epithelial-to-mesenchymal transition and adhesion of cancer cells. **Carbohydr Res**, v. 389, p. 39-45, May 2014. ISSN 1873-426X.
95. LANGER, M. D. *et al.* N-glycosylation alters cadherin-mediated intercellular binding kinetics. **J Cell Sci**, v. 125, n. Pt 10, p. 2478-85, May 2012. ISSN 1477-9137.
96. LAU, K. S. *et al.* Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. **Cell**, v. 129, n. 1, p. 123-34, Apr 2007. ISSN 0092-8674.
97. LEE, S. H. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. **Intest Res**, v. 13, n. 1, p. 11-8, Jan 2015. ISSN 1598-9100.
98. LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J.; FERGUSON, K. M. *The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases.* **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 6, n. 4, p. a020768, Apr 2014. ISSN 1943-0264.
99. LICHTENSTEIN, R. G.; RABINOVICH, G. A. Glycobiology of cell death: when glycans and lectins govern cell fate. **Cell Death Differ**, v. 20, n. 8, p. 976-86, Aug 2013. ISSN 1476-5403.
100. LIN, C. *et al.* Exploring Different Strategies for Efficient Delivery of Colorectal Cancer Therapy. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 11, p. 26936-52, Nov 2015. ISSN 1422-0067.
101. LIU, J. *et al.* High expression of β 3GnT8 is associated with the metastatic potential of human glioma. **Int J Mol Med**, v. 33, n. 6, p. 1459-68, Jun 2014. ISSN 1791-244X.
102. LIU, Y. C. *et al.* Sialylation and fucosylation of epidermal growth factor receptor suppress its dimerization and activation in lung cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 28, p. 11332-7, Jul 2011. ISSN 1091-6490.

103. LIWOSZ, A.; LEI, T.; KUKURUZINSKA, M. A. N-glycosylation affects the molecular organization and stability of E-cadherin junctions. **J Biol Chem**, v. 281, n. 32, p. 23138-49, Aug 2006. ISSN 0021-9258.
104. LU, J. *et al.* β -Galactoside α 2,6-sialyltransferase 1 promotes transforming growth factor- β -mediated epithelial-mesenchymal transition. **J Biol Chem**, v. 289, n. 50, p. 34627-41, Dec 2014. ISSN 1083-351X.
105. MAHONEY, W. C.; DUKSIN, D. Separation of tunicamycin homologues by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr**, v. 198, n. 4, p. 506-10, Oct 1980.
106. MAIRE, C. L.; LIGON, K. L. Molecular pathologic diagnosis of epidermal growth factor receptor. **Neuro Oncol**, v. 16 Suppl 8, p. viii1-6, Oct 2014. ISSN 1523-5866.
107. MEDEMA, E. F. A. J. P. Colorectal Cancer Subtypes: Developmental Origin and Microenvironmental Regulation. MEDEMA, J. P. **Cell Press Cell Press**. 2: p505-518 p. 2016.
108. MITSUDOMI, T.; YATABE, Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. **Cancer Sci**, v. 98, n. 12, p. 1817-24, Dec 2007. ISSN 1349-7006.
109. MOSCATELLO, D. K. *et al.* Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. **Cancer Res**, v. 55, n. 23, p. 5536-9, Dec 1995. ISSN 0008-5472.
110. MULLIN, J. M. Potential interplay between luminal growth factors and increased tight junction permeability in epithelial carcinogenesis. **J Exp Zool**, v. 279, n. 5, p. 484-9, Dec 1997. ISSN 0022-104X.
111. NAMI, B.; DONMEZ, H.; KOCAK, N. Tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress reduces in vitro subpopulation and invasion of CD44+/CD24- phenotype breast cancer stem cells. **Exp Toxicol Pathol**, v. 68, n. 7, p. 419-26, Aug 2016. ISSN 1618-1433.
112. NETWORK, C. G. A. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. **Nature**, v. 487, n. 7407, p. 330-7, Jul 2012. ISSN 1476-4687.
113. NEUNLIST, M. *et al.* The digestive neuronal-glia-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 10, n. 2, p. 90-100, Feb 2013. ISSN 1759-5053.

114. NI, J. *et al.* β 3GnT8 regulates the metastatic potential of colorectal carcinoma cells by altering the glycosylation of CD147. **Oncol Rep**, v. 31, n. 4, p. 1795-801, Apr 2014. ISSN 1791-2431.
115. NIETO, M. A. *et al.* EMT: 2016. **Cell**, v. 166, n. 1, p. 21-45, Jun 2016. ISSN 1097-4172.
116. NITA-LAZAR, M. *et al.* Hypoglycosylated E-cadherin promotes the assembly of tight junctions through the recruitment of PP2A to adherens junctions. **Exp Cell Res**, v. 316, n. 11, p. 1871-84, Jul 2010. ISSN 1090-2422.
117. NOMME, J. *et al.* Structural Basis of a Key Factor Regulating the Affinity between the Zonula Occludens First PDZ Domain and Claudins. **J Biol Chem**, v. 290, n. 27, p. 16595-606, Jul 2015. ISSN 1083-351X.
118. NORMANNO, N. *et al.* The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. **Curr Drug Targets**, v. 6, n. 3, p. 243-57, May 2005. ISSN 1389-4501 .
119. ODENWALD, M. A.; TURNER, J. R. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, Nov 2016. ISSN 1759-5053.
120. OHTSUBO, K.; MARTH, J. D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. **Cell**, v. 126, n. 5, p. 855-67, Sep 2006. ISSN 0092-8674.
121. OKEGAWA, T. *et al.* Epidermal Growth Factor Receptor Status in Circulating Tumor Cells as a Predictive Biomarker of Sensitivity in Castration-Resistant Prostate Cancer Patients Treated with Docetaxel Chemotherapy. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 12, Nov 2016. ISSN 1422-0067.
122. PADLER-KARAVANI, V. Aiming at the sweet side of cancer: aberrant glycosylation as possible target for personalized-medicine. **Cancer Lett**, v. 352, n. 1, p. 102-12, Sep 2014. ISSN 1872-7980.
123. PAJARES, J. A.; PEREA, J. Multiple primary colorectal cancer: Individual or familial predisposition? **World J Gastrointest Oncol**, v. 7, n. 12, p. 434-44, Dec 2015.
124. PARK, J. J.; LEE, M. Increasing the α 2, 6 sialylation of glycoproteins may contribute to metastatic spread and therapeutic resistance in colorectal cancer. **Gut Liver**, v. 7, n. 6, p. 629-41, Nov 2013. ISSN 2005-1212.

125. PARK, J. J. *et al.* Sialylation of epidermal growth factor receptor regulates receptor activity and chemosensitivity to gefitinib in colon cancer cells. **Biochem Pharmacol**, v. 83, n. 7, p. 849-57, Apr 2012. ISSN 1873-2968.
126. PATEL, B. B.; MAJUMDAR, A. P. Synergistic role of curcumin with current therapeutics in colorectal cancer: minireview. **Nutr Cancer**, v. 61, n. 6, p. 842-6, 2009. ISSN 1532-7914.
127. PATNAIK, S. K. *et al.* Complex N-glycans are the major ligands for galectin-1, -3, and -8 on Chinese hamster ovary cells. **Glycobiology**, v. 16, n. 4, p. 305-17, Apr 2006. ISSN 0959-6658.
128. PETRESCU, A. J. *et al.* Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. **Glycobiology**, v. 14, n. 2, p. 103-14, Feb 2004. ISSN 0959-6658.
129. PINHO, S. S. *et al.* E-cadherin and adherens-junctions stability in gastric carcinoma: functional implications of glycosyltransferases involving N-glycan branching biosynthesis, N-acetylglucosaminyltransferases III and V. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 3, p. 2690-700, Mar 2013. ISSN 0006-3002.
130. _____. Loss and recovery of Mgat3 and GnT-III Mediated E-cadherin N-glycosylation is a mechanism involved in epithelial-mesenchymal-epithelial transitions. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33191, 2012. ISSN 1932-6203.
131. _____. The role of N-acetylglucosaminyltransferase III and V in the post-transcriptional modifications of E-cadherin. **Hum Mol Genet**, v. 18, n. 14, p. 2599-608, Jul 2009. ISSN 1460-2083.
132. POUSSET, D. *et al.* Increased alpha2,6 sialylation of N-glycans in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. **Cancer Res**, v. 57, n. 19, p. 4249-56, Oct 1997. ISSN 0008-5472.
133. PRENZEL, N. *et al.* The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. **Endocr Relat Cancer**, v. 8, n. 1, p. 11-31, Mar 2001. ISSN 1351-0088.
134. RESNICK, M. B. *et al.* Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. **Mod Pathol**, v. 18, n. 4, p. 511-8, Apr 2005. ISSN 0893-3952.

135. RILLAHAAN, C. D. *et al.* Global metabolic inhibitors of sialyl- and fucosyltransferases remodel the glycome. **Nat Chem Biol**, v. 8, n. 7, p. 661-8, Jul 2012. ISSN 1552-4469.
136. ROSKOSKI, R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. **Pharmacol Res**, v. 79, p. 34-74, Jan 2014. ISSN 1096-1186.
137. ROYER, C.; LU, X. Epithelial cell polarity: a major gatekeeper against cancer? **Cell Death Differ**, v. 18, n. 9, p. 1470-7, Sep 2011. ISSN 1476-5403.
138. SAKAKIBARA, A. *et al.* Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. **J Cell Biol**, v. 137, n. 6, p. 1393-401, Jun 1997. ISSN 0021-9525.
139. SALDOVA, R. *et al.* Core fucosylation and alpha2-3 sialylation in serum N-glycome is significantly increased in prostate cancer comparing to benign prostate hyperplasia. **Glycobiology**, v. 21, n. 2, p. 195-205, Feb 2011. ISSN 1460-2423.
140. SARGENT, D. J. *et al.* Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 20, p. 3219-26, Jul 2010. ISSN 1527-7755.
141. SCHLICKER, A. *et al.* Subtypes of primary colorectal tumors correlate with response to targeted treatment in colorectal cell lines. **BMC Med Genomics**, v. 5, p. 66, Dec 2012. ISSN 1755-8794.
142. SCHMIDLEY, J. W.; WISSIG, S. L. Basement membrane of central nervous system capillaries lacks ruthenium red-staining sites. **Microvasc Res**, v. 32, n. 3, p. 300-14, Nov 1986. ISSN 0026-2862.
143. SEARS, P.; WONG, C. H. Enzyme action in glycoprotein synthesis. **Cell Mol Life Sci**, v. 54, n. 3, p. 223-52, Mar 1998. ISSN 1420-682X.
144. SHAHEEN, P. E. *et al.* Phase II study of the efficacy and safety of oral GD0039 in patients with locally advanced or metastatic renal cell carcinoma. **Invest New Drugs**, v. 23, n. 6, p. 577-81, Dec 2005. ISSN 0167-6997.
145. SHEN, L. *et al.* Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. **Annu Rev Physiol**, v. 73, p. 283-309, 2011. ISSN 1545-1585.

146. _____. Knockdown of β 3GnT8 reverses 5-fluorouracil resistance in human colorectal cancer cells via inhibition the biosynthesis of polylactosamine-type N-glycans. **Int J Oncol**, v. 45, n. 6, p. 2560-8, Dec 2014. ISSN 1791-2423.
147. SINGH, A. B.; HARRIS, R. C. Epidermal growth factor receptor activation differentially regulates claudin expression and enhances transepithelial resistance in Madin-Darby canine kidney cells. **J Biol Chem**, v. 279, n. 5, p. 3543-52, Jan 2004. ISSN 0021-9258.
148. SINICROPE, F. A. *et al.* Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. **Gastroenterology**, v. 148, n. 1, p. 88-99, Jan 2015. ISSN 1528-0012.
149. SOLER, A. P. *et al.* Increased tight junctional permeability is associated with the development of colon cancer. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 8, p. 1425-31, Aug 1999. ISSN 0143-3334.
150. SUGAWA, N. *et al.* Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 21, p. 8602-6, Nov 1990. ISSN 0027-8424.
151. SUN, J. Y. *et al.* Inhibition of the growth of human gastric carcinoma in vivo and in vitro by swainsonine. **Phytomedicine**, v. 14, n. 5, p. 353-9, May 2007. ISSN 0944-7113.
152. SWEENEY, C.; CARRAWAY, K. L. Ligand discrimination by ErbB receptors: differential signaling through differential phosphorylation site usage. **Oncogene**, v. 19, n. 49, p. 5568-73, Nov 2000. ISSN 0950-9232.
153. SWINDALL, A. F.; BELLIS, S. L. Sialylation of the Fas death receptor by ST6Gal-I provides protection against Fas-mediated apoptosis in colon carcinoma cells. **J Biol Chem**, v. 286, n. 26, p. 22982-90, Jul 2011. ISSN 1083-351X.
154. TAKAHASHI, M. *et al.* Disease-associated glycans on cell surface proteins. **Mol Aspects Med**, v. 51, p. 56-70, Oct 2016. ISSN 1872-9452.
155. _____. Core fucose and bisecting GlcNAc, the direct modifiers of the N-glycan core: their functions and target proteins. **Carbohydr Res**, v. 344, n. 12, p. 1387-90, Aug 2009. ISSN 1873-426X.

156. TALAVERA, A. *et al.* Nimotuzumab, an antitumor antibody that targets the epidermal growth factor receptor, blocks ligand binding while permitting the active receptor conformation. **Cancer Res**, v. 69, n. 14, p. 5851-9, Jul 2009. ISSN 1538-7445.
157. TAMURA, A.; TSUKITA, S. Paracellular barrier and channel functions of TJ claudins in organizing biological systems: advances in the field of barriology revealed in knockout mice. **Semin Cell Dev Biol**, v. 36, p. 177-85, Dec 2014. ISSN 1096-3634.
158. TAS, F. *et al.* Increased serum level of epidermal growth factor receptor (EGFR) is associated with poor progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 73, n. 3, p. 631-7, Mar 2014. ISSN 1432-0843.
159. TIAN, S. *et al.* A combined oncogenic pathway signature of BRAF, KRAS and PI3KCA mutation improves colorectal cancer classification and cetuximab treatment prediction. **Gut**, v. 62, n. 4, p. 540-9, Apr 2013. ISSN 1468-3288.
160. TSANOOU, E. *et al.* The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach. **Anticancer Res**, v. 28, n. 6A, p. 3815-26, 2008 Nov-Dec 2008. ISSN 0250-7005.
161. TSUKITA, S. *et al.* Roles of ZO-1 and ZO-2 in establishment of the belt-like adherens and tight junctions with paracellular permselective barrier function. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1165, p. 44-52, May 2009. ISSN 1749-6632.
162. TURNER, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 11, p. 799-809, Nov 2009. ISSN 1474-1741.
163. TWISS, F. *et al.* HGF signaling regulates Claudin-3 dynamics through its C-terminal tyrosine residues. **Tissue Barriers**, v. 1, n. 4, p. e27425, Oct 2013. ISSN 2168-8362.
164. VALENTA, T.; HAUSMANN, G.; BASLER, K. The many faces and functions of β -catenin. **EMBO J**, v. 31, n. 12, p. 2714-36, Jun 2012. ISSN 1460-2075.
165. VAN DER GEER, P.; PAWSON, T. The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. **Trends Biochem Sci**, v. 20, n. 7, p. 277-80, Jul 1995. ISSN 0968-0004.
166. VAN ITALLIE, C. M.; ANDERSON, J. M. Claudins and epithelial paracellular transport. **Annu Rev Physiol**, v. 68, p. 403-29, 2006. ISSN 0066-4278.

167. VARKI, A. *et al.* **Essentials of Glycobiology**. In: (Ed.) Cold Spring Harbor, NY, USA: CSH press, 2008. p.204-205.
168. VARKI, A. *et al.* **Essentials of Glycobiology** 2nd edn Cold Spring Harbor , NY, USA: Laboratory Press, 2009.
169. VASCONCELOS-DOS-SANTOS, A. *et al.* Biosynthetic Machinery Involved in Aberrant Glycosylation: Promising Targets for Developing of Drugs Against Cancer. **Front Oncol**, v. 5, p. 138, 2015.
170. VASSEUR, J. A. *et al.* Smoking and lung cancer-induced changes in N-glycosylation of blood serum proteins. **Glycobiology**, v. 22, n. 12, p. 1684-708, Dec 2012. ISSN 1460-2423.
171. VOGELSTEIN, B. *et al.* Cancer genome landscapes. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1546-58, Mar 2013. ISSN 1095-9203.
172. WANG, C. *et al.* EGF-mediated migration signaling activated by N-acetylglucosaminyltransferase-V via receptor protein tyrosine phosphatase kappa. **Arch Biochem Biophys**, v. 486, n. 1, p. 64-72, Jun 2009. ISSN 1096-0384.
173. WANG, P. H. *et al.* Altered mRNA expressions of sialyltransferases in ovarian cancers. **Gynecol Oncol**, v. 99, n. 3, p. 631-9, Dec 2005. ISSN 0090-8258.
174. WANG, X. *et al.* Core fucosylation regulates epidermal growth factor receptor-mediated intracellular signaling. **J Biol Chem**, v. 281, n. 5, p. 2572-7, Feb 2006. ISSN 0021-9258.
175. _____. Epithelial tight junctional changes in colorectal cancer tissues. **ScientificWorldJournal**, v. 11, p. 826-41, Apr 2011. ISSN 1537-744X.
176. WHITE, B. D.; CHIEN, A. J.; DAWSON, D. W. Dysregulation of Wnt/ β -catenin signaling in gastrointestinal cancers. **Gastroenterology**, v. 142, n. 2, p. 219-32, Feb 2012. ISSN 1528-0012.
177. XU, L. *et al.* Dacomitinib, a new pan-EGFR inhibitor, is effective in killing ovarian cancer cells. **Discov Med**, v. 22, n. 122, p. 297-309, Nov 2016. ISSN 1944-7930.
178. YARDEN, Y.; PINES, G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 8, p. 553-63, Jul 2012. ISSN 1474-1768.

179. YEWALE, C. *et al.* Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies. **Biomaterials**, v. 34, n. 34, p. 8690-707, Nov 2013. ISSN 1878-5905.
180. YILMAZ, M.; CHRISTOFORI, G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. **Cancer Metastasis Rev**, v. 28, n. 1-2, p. 15-33, Jun 2009. ISSN 1573-7233.
181. YOUSEFI, S. *et al.* Increased UDP-GlcNAc:Gal beta 1-3GalNAc-R (GlcNAc to GalNAc) beta-1, 6-N-acetylglucosaminyltransferase activity in metastatic murine tumor cell lines. Control of polylectosamine synthesis. **J Biol Chem**, v. 266, n. 3, p. 1772-82, Jan 1991. ISSN 0021-9258.
182. ZHAO, H. *et al.* N-glycosylation affects the adhesive function of E-Cadherin through modifying the composition of adherens junctions (AJs) in human breast carcinoma cell line MDA-MB-435. **J Cell Biochem**, v. 104, n. 1, p. 162-75, May 2008. ISSN 1097-4644.
183. ZHU, Q. C. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition and its role in the pathogenesis of colorectal cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, n. 5, p. 2689-98, 2013. ISSN 1513-7368.
184. ZIHNI, C. *et al.* Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 17, n. 9, p. 564-80, Sep 2016. ISSN 1471-0080.