



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

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

RUBEM JOSÉ PERES MOREIRA

Papel das vias de sinalização Rho-ROCK e STAT3 no controle da proliferação celular induzida pelo LPA em células de carcinoma de cólon, HCT-116

Orientador: Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz

Co-orientador: Dra. Fernanda Leve

**RIO DE JANEIRO
2014**



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

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

RUBEM JOSÉ PERES MOREIRA

Papel das vias de sinalização Rho-ROCK e STAT3 no controle da proliferação celular induzida pelo LPA em células de carcinoma de cólon, HCT-116

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

Orientador: Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz
Co-orientador: Dra. Fernanda Leve

**RIO DE JANEIRO
2014**



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

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

RUBEM JOSÉ PERES MOREIRA

Papel das vias de sinalização Rho-ROCK e STAT3 no controle da proliferação celular induzida pelo LPA em células de carcinoma de cólon, HCT-116

**ORIENTADOR: Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz
CO-ORIENTADOR: Dra. Fernanda Leve**

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Miguel Ângelo Martins Moreira
Prof. Dr. Etel Rodrigues Pereira Gimba
Prof. Dr. André Luiz Mencialha
Prof. Dr. Martin Bonamino – Suplente Interno
Prof. Dr. Leonardo Rodrigues de Andrade – Suplente Externo

**RIO DE JANEIRO
2014**

Esta dissertação de mestrado foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Estrutural do Programa de Biologia Celular no Centro de Pesquisa Ricardo Renzo Brentani do Instituto Nacional de Câncer (INCa), sob a orientação do Dr. José Andrés Morgado Díaz.

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

Aos meus pais, Cláudio e Guaciara, irmãs, Vívian e Cláudia, e sobrinhas, Ana Clara e Fernanda Helena, pelo apoio incondicional que sempre me deram, e por estarem ao meu lado em todos os momentos e circunstâncias.

Agradecimentos

A Deus, em primeiro lugar, por sempre me dar força e tranquilidade nos momentos mais difíceis, além de colocar pessoas incríveis em meu caminho.

À minha família, Cláudio, Guaciara, Vívian, Ana Clara, Cláudia, Marcos, Fernanda Helena, por serem meus pilares ao longo de toda a minha vida, me dando toda a base necessária para ser uma boa pessoa, prezando sempre o bem e a humildade.

À minha avó, Maria, tia, Adriana, e prima, Bárbara, por me apoiarem sempre e ajudarem em minha formação.

Aos meus tios e tias, Ivo, Tereza, Marcelo, Ivana, Jorge, Rosana por também ajudarem em minha criação.

Aos meus primos e primas, Larissa, João Pedro, Daniel, Thatiane, Sofia, Rafael, Camila e Rafaele, por todo amor e carinho que sempre tiveram comigo.

Aos meus tios, Vicente e Jurema, por me acolherem em sua casa, dando carinho e conselhos, exercendo o papel de meus pais fora de minha casa.

Aos primos, Thati, João e Bruna, por me aguentarem em sua casa e sempre me divertirem, apoiarem e aconselharem em todos os momentos.

Aos afilhados, Ana Clara, Fernanda Helena e Breno, presentes maiores que Deus colocou na minha vida, sempre me alegrando e me levantando nos dias mais difíceis.

Aos amigos, Edgar, Luciano, Leilane, Rodrigo, Tica, Camila, Erick, Felipe, Victor, por sempre estarem ao meu lado durante todos os nossos 10 anos de amizade.

Aos amigos, Raphael, Kaká, Thaísa, Bello, Kizzy, Fê Inecco, Jameli, por todo companheirismo e pelos momentos incríveis me proporcionados.

Aos amigos de lab, Tanaka, Xú (Júlio), Cidadão (Wallace), Waldema (Waldemir), Leo Epa (Leonardo), Muguilo (Murilo), Lili (Lilian), Sarali (Sarah), PD (Pedro), Obina (Pedro), Nat (Natalia), Pri Dantas (Priscila), Pri (Priscila), Magro (Carlos), Cléo (Adriana), Sisi (Simone), Jennifer, Jéssica e Andréa, pelos momentos simplesmente sensacionais que me proporcionaram. Pelas discussões da ciência, da vida, da história e da banalidade, rs.

À minha Co-orientadora e amiga, Fleve (Fernanda), por ter me aceito como seu aluno de IC e contribuir significativamente no crescimento como profissional.

Ao meu orientador e amigo, Dr Morgado, pela oportunidade de ingresso em seu laboratório e pelos ensinamentos tanto em questões científicas como da vida.

Aos amigos Zé Cláudio e Cristiano, por terem me apresentado a ciência e terem me iniciado na pesquisa, dando início a essa carreira que não pretendo deixar de seguir.

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é o segundo tipo de neoplasia mais incidente na população brasileira feminina e o terceiro na masculina. Durante a progressão do CCR, células adquirem capacidades proliferativas, migratórias e invasivas. Diversos estímulos são capazes de modular tais eventos, por exemplo, o ácido lisofosfatídico (LPA). Esse fosfolípídeo se liga em receptores específicos desencadeando diversas vias de sinalização envolvidas com a progressão tumoral. No entanto, pouco se sabe sobre o papel do LPA na progressão do CCR. O objetivo desse estudo foi investigar o papel do LPA em eventos celulares e moleculares relacionados com a progressão do CCR, assim como identificar as vias de sinalização ativadas por este agente. Inicialmente, células derivadas de câncer de cólon com diferentes potenciais invasivos e metastáticos (Caco-2, HT-29 e HCT-116) tiveram seu perfil de expressão proteica dos três principais receptores de LPA (LPA 1-3) analisados por *immunoblotting*. Em seguida, avaliamos a capacidade do LPA em mediar migração, invasão e crescimento independente de ancoragem e verificamos que este agente não induziu alteração destes eventos. Verificamos então, se o LPA era capaz de causar mudanças no potencial proliferativo nessas linhagens usando a técnica de cristal violeta e analisando a progressão do ciclo celular por citometria de fluxo. Observamos que o LPA causou um aumento de proliferação apenas nas células HCT-116 e de forma dependente da GTPase Rho e de sua efetora ROCK. Sabendo que as vias de β -catenina e de STAT 3 podem ser reguladas pela via Rho-ROCK, verificamos a capacidade do LPA modular a atividade transcricional de β -catenina e os níveis de fosforilação de STAT 3 (pSTAT). Embora os resultados não tenham indicado a ativação de β -catenina pelo ensaio de luciferase de TCF/Lef, observamos um aumento nos níveis de pSTAT por *immunoblotting* e de sua localização nuclear por microscopia confocal, indicando ativação desta via. Além disso, essa ativação foi independente da via Rho-ROCK, visto que o inibidor de ROCK, Y27632, não reverteu esse efeito. De forma interessante, observamos que a inibição farmacológica de ambos, STAT 3, com STA21, e ROCK, com Y27632, prevenia o aumento de proliferação induzido pelo LPA em HCT-116 e que a inibição conjunta dessas vias apresentava um efeito ainda maior na prevenção da progressão do ciclo celular causada pelo LPA. Finalmente, a análise de expressão gênica global das células HCT-116 tratadas com LPA por *ChipArray*, mostrou um aumento na expressão gênica das ciclinas E1, A2 e B1, efeito este confirmado por *immunoblotting*. Ainda, nossos resultados mostraram que a inibição concomitante das vias Rho-ROCK e STAT 3 preveniu o aumento da expressão dessas proteínas. Em conclusão, no presente estudo mostramos que o LPA aumenta o potencial proliferativo das células HCT-116, uma linhagem celular com potencial mais invasivo, através de um mecanismo envolvendo uma cooperação das vias Rho-ROCK e STAT3 no controle do ciclo celular.

Palavras-chave: 1. Câncer colorretal 2. Ácido Lisofosfatídico 3. GTPase RhoA 4. Proliferação celular

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the second most incident neoplasia among Brazilian women and the third in the men. During CRC progression, cells acquire proliferative, migratory and invasive abilities. Several molecules can modulate these events, including the lysophosphatidic acid (LPA). This phospholipid activates specific receptors triggering pathways involved in CRC progression, but the role that LPA plays downstream its receptors in this cancer type are poorly understood. The aim of this study was to investigate the role that LPA plays in specific events during the CRC progression, as well as to identify the LPA-mediated signaling pathways. First, the expression of LPA receptors (LPA 1-3) in cell lines with different invasive and metastatic potentials (Caco-2, HT-29 and HCT-116) was analyzed by immunoblotting. Then, we analyzed the capacity of LPA to mediate cell migration, invasion and anchorage-independent growth and observed that LPA did not affect these events. However, LPA induced cell proliferation in HCT-116 cells, as seen by crystal violet technique and cell cycle progression assay by flow cytometry. Also, we observed that LPA-induced cell proliferation is dependent on Rho GTPase and its effector, ROCK. Next, we investigated potentials downstream signaling pathways which could modulate Rho-ROCK-dependent proliferation induced by LPA, such as β -catenin and STAT 3. Using TCF/LEF luciferase assay we did not observe changes in the transcriptional activity of β -catenin after treatment with LPA. However, LPA promoted activation of STAT 3 in HCT-116 cells, as observed by increased levels of phosphorylated STAT 3 by immunoblotting, and its localization in the nucleus, as seen by confocal microscopy. Moreover, this activation was Rho-ROCK-independent, since Y27632, a pharmacological ROCK inhibitor, did not prevent this effect. Interestingly, the ROCK and STAT 3 inhibitors, Y27632 and STA 21 respectively, when used separately prevented the proliferation induced by LPA, and the combined inhibition of both proteins prevented the cell cycle progression caused by LPA in a stronger way than isolated inhibition. Finally, the global gene expression analysis after LPA treatment performed by ChipArray, showed increased expression of the cyclins E1, A2 and B1, which was confirmed by immunoblotting. The combined inhibition of ROCK and STAT 3 prevented this increased expression. In conclusion, these results demonstrate that LPA increases the proliferative potential of HCT-116 cells, a cell line with high invasive potential, through a mechanism involving cooperation between the Rho-ROCK and STAT 3 pathways in the cell cycle control.

Lista de figuras

	Página
Figura 1.1- Organização da cripta intestinal no cólon	2
Figura 1.2- Eventos celulares e moleculares que participam da sequência adenoma-carcinoma	7
Figura 1.3- Representação da cripta colônica e modelo proposto de formação da cripta aberrante	9
Figura 1.4- Síntese do LPA	10
Figura 1.5- Sinalização de LPA através de receptores acoplados à proteína G	12
Figura 1.6- Modelo do ciclo de ativação de GTPases da família Rho	14
Figura 1.7- Estrutura molecular e mecanismo de ativação de ROCK	16
Figura 1.8- A via de sinalização <i>Wnt</i>	18
Figura 1.9- Modelo de ativação do fator transcricional STAT	20
Figura 1.10- Modelo simplificado do ciclo celular	23
Figura 5.1 Perfil de expressão dos receptores de LPA (LPA1-3)	36
Figura 5.2 O tratamento com LPA não altera a migração celular das linhagens HT-29 e HCT116	38
Figura 5.3 O LPA não altera a invasividade celular nas linhagens de câncer de cólon	40
Figura 5.4 O LPA não aumenta o crescimento independente de ancoragem nas linhagens invasivas de câncer de cólon	41
Figura 5.5 O LPA aumenta o número relativo de células HCT-116	42
Figura 5.6 O LPA não reduz os níveis de morte celular em HCT-116	43
Figura 5.7 O LPA induz a progressão do ciclo celular em HCT-116	44

Figura 5.8	O LPA aumenta a atividade da GTPase RhoA e a expressão de ROCK 2	46
Figura 5.9	A inibição de ROCK previne o aumento na proliferação de células HCT-116 e a progressão do ciclo celular promovido pelo LPA	47
Figura 5.10	O LPA aumenta a expressão de β -catenina e a fosforilação de GSK-3 β	48
Figura 5.11	O LPA não medeia a translocação nuclear de β -catenina em HCT-116	50
Figura 5.12	O LPA não aumenta a atividade transcricional de β -catenina .	51
Figura 5.13	O LPA induz ativação do fator transcricional STAT 3	52
Figura 5.14	O fator transcricional STAT 3 participa do aumento de proliferação induzido pelo LPA	53
Figura 5.15	A inibição de ROCK não previne a fosforilação de STAT 3 mediada pelo LPA	54
Figura 5.16	O inibidor de ROCK não previne a translocação nuclear de STAT 3 induzida pelo LPA	55
Figura 5.17	As vias de Rho-ROCK e de STAT 3 cooperam no controle da proliferação induzida pelo LPA em células HCT-116	57
Figura 5.18	O LPA aumenta a expressão proteica das ciclinas E1, A2 e B1	60
Figura 5.19	A inibição das vias Rho-ROCK e STAT 3 previnem o aumento da expressão das ciclinas E1, A2 e B1 induzido pelo LPA	61
Figura 7.1	Modelo das vias ativadas pelo LPA na indução da proliferação na linhagem HCT-116	72

Lista de tabelas

	Páginas
Tabela 1.1- Estimativa de novos casos de CCR na população feminina e masculina brasileira para o ano de 2014	4
Tabela 4.1- Lista de anticorpos primários	26
Tabela 4.2- Lista de anticorpos secundários	27
Tabela 5.1- Principais alterações mediadas pelo LPA nos genes envolvidos diretamente com ciclo celular	59

Siglas e Abreviações

- AF – adesões focais
- Akt – protein quinase B
- APC – *adenomatous poliposis coli*
- ATX – autaxina
- bFGF – fator de crescimento fibroblástico
- BMP – *bone morphogenetic protein*
- CCR – câncer colorretal
- Cdk – Cyclin-dependent kinases
- CRD – domínio rico em cisteína
- CREB – *cAMP response element-binding protein*
- Dvl – *dishvelled*
- EDG-2 – *endothelial differentiation gene 2*
- EDG-4 – *endothelial differentiation gene 4*
- EDG-7 – *endothelial differentiation gene 7*
- FAK – quinase de adesão
- FAP – polipose adenomatosa familiar
- Fzd – *frizzled*
- G1 – fase *gap 1* do ciclo celular
- G2 – fase *gap 2* do ciclo celular
- GAP – proteínas ativadoras de GTPases
- GDI – inibidores de dissociação de nucleotídeo guanina
- GDP – difosfato de guanosina
- GEF – fator de troca de nucleotídeo de guanina
- GPCR – receptor acoplado à protein G
- GSK-3 β - *glycogen synthase kinase 3*
- GTP – trifosfato de guanosina
- HNPCC – câncer colorretal hereditário sem polipose
- IL – interleucina
- JAK – *janus kinase*
- KRAS – *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
- LGR5+ – *Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 positive*
- LIMK – *LIM kinase*
- LPA – ácido lisofosfatídico

LPA1-6 – receptor de LPA 1 ao 6
LPC – lisofosfatidilcolina
LPE – lisofosfatidiletanolamina
LPL – lisofosfolípídeos
LPS – lisofosfatidilserina
LysoPLD – lisofosfolipase D
MAPK – protein quinase ativada por mitógeno
MMP – metaloproteinase de matriz
NF κ B – *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
PA – ácido fosfatídico
PCNA – *Proliferating Cell Nuclear Antigen*
PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas
PH – região homóloga a plecstrina
PI – iodeto de propídeo
PLA 2 – fosfolipase A2
PLA1 – fosfolipase A1
PLC – fosfolipase C
PTP – proteínas fosfatases
RBD – região de ligação em Rho
Rho – *ras homolog family member*
ROCK – *rho-associated, coiled-coil containing protein kinase*
S – fase de síntese de DNA do ciclo celular
SOCS – supressores da sinalização de citocinas
STAT – *Signal transducer and activator of transcription*
Tcf-LEF – fator celular-T/fator intensificador linfóide
TNM – tumores nódulos e metástases
VEGF – fator de crescimento vascular endotelial
Wnt – *Wingless*

S mario

	Página
Resumo	viii
Abstract	ix
Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xii
Siglas e abrevia�es	xiii
1 Introdu�o	1
1.1 Epitélio intestinal	1
1.1.1 Epitélio intestinal e homeostase	1
1.2 Câncer colorretal	3
1.2.1 Epidemiologia e fatores de risco	3
1.2.2 Progressão do câncer colorretal	6
1.2.3 LPA	9
1.2.4 Pequena GTPase Rho e sua efetora ROCK	13
1.2.5 Via de sinaliza�o <i>Wnt</i> /�-catenina	16
1.2.6 Via de sinaliza�o de STAT 3	19
1.2.7 Rela�o entre as vias Rho/ROCK e �/catenina e de Rho/ROCK e STAT 3 no controle de eventos relacionados com a progressão tumoral ...	21
1.2.8 Ciclo celular	22
2 Justificativa do estudo	24
3 Objetivo	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25

4 Material e métodos	26
4.1 Anticopos	26
4.1.1 Anticorpos primários	26
4.1.2 Anticorpos secundários	27
4.2 Reagentes	27
4.3 Cultura de células	27
4.4 Tratamento com LPA	28
4.5 Tratamento com inibidores de vias de sinalização	28
4.6 Obtenção do lisado proteico	29
4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida usando sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE), <i>Immunoblotting</i> e análise densitométrica	29
4.8 Imunofluorescência	30
4.9 Atividade de atividade da GTPase RhoA	30
4.10 Ensaio de migração	31
4.11 Invasividade celular	31
4.12 Crescimento independente de ancoragem (CIA)	32
4.13 Proliferação celular	32
4.14 Análise de morte celular por citometria de fluxo	32
4.15 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo	33
4.16 Ensaio de luciferase para a atividade de TCF	34
4.17 Análise de expressão gênica diferencial por <i>Chiparray</i>	34
4.18 Análise estatística	35
5 Resultados	36
5.1 Análise da expressão dos receptores de LPA (LPA1-3) nas linhagens derivadas de câncer de cólon Caco-2, HT-29 e HCT-116	36

5.2 O LPA não aumenta a migração, a invasão e o crescimento independente de ancoragem nas células derivadas de câncer de cólon analisadas	37
5.3 Efeito do tratamento com LPA sobre a proliferação de células de adenocarcinoma de cólon	42
5.4 O tratamento com LPA aumenta a proliferação na linhagem HCT-116 através da ativação da via da GTPase RhoA e de sua efetora ROCK	45
5.5 O LPA não modula a atividade transcricional de β -catenina	47
5.6 O LPA é capaz de ativar o fator transcricional STAT 3	51
5.7 A ativação de STAT 3 induzida pelo LPA em células HCT-116 é independente da ativação de ROCK	53
5.8 O co-tratamento com os inibidores de ROCK e de STAT 3 potencializa a prevenção no número de células na fase S-G2/M induzido pelo LPA	56
5.9 O LPA altera a expressão de diversos genes reguladores do ciclo celular	58
5.10 As vias de Rho-ROCK e de STAT 3 cooperam na prevenção da expressão das ciclinas E1, A2 e B1 promovida pelo LPA	60
6 Discussão	62
7 Conclusões	72
8 Referências	73
9 Anexo	83
9.1 Lista de genes com expressão alterada pelo tratamento com LPA	83

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epitélio Intestinal

1.1.1 Epitélio intestinal e homeostase

O sistema digestório humano tem como função primária a digestão e a absorção de nutrientes, sendo constituído pelo trato digestivo, estrutura que se estende desde a cavidade oral até o ânus, e por glândulas associadas. O trato digestivo, por sua vez, é formado, a partir do lúmen, pelas seguintes camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa. O intestino, parte do trato digestivo, é dividido em delgado e grosso. Este último ainda é subdividido em ceco, cólon, sigmoide, reto e ânus. Particularmente, o cólon se caracteriza por apresentar numerosas criptas, estruturas sem vilosidades presentes na camada da mucosa com abertura para a superfície. Essas criptas constituem o compartimento proliferativo do epitélio intestinal. Em sua base se encontram as células tronco positivas para LGR5+ (*leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5*), que se dividem e dão origem às células proliferativas transientes. Essas então migram ao longo da cripta em direção à superfície epitelial, se diferenciando em diferentes tipos celulares (BARKER, 2014) (Fig. 1.1).

Aproximadamente duzentas células são produzidas por dia em cada cripta do epitélio intestinal e a homeostase é garantida pela descamação de células da superfície do epitélio para o lúmen do intestino (SANCHO *et al.*, 2004). As células-tronco do epitélio intestinal dão origem a duas linhagens: a secretória, representada pelas células caliciformes, enteroendócrinas e de Paneth; e a enterocítica, representada pelas células absorptivas. As células absorptivas formam uma única camada de células colunares responsáveis pela absorção de nutrientes, água e eletrólitos. As células caliciformes sintetizam, armazenam e secretam mucinas (glicoproteínas ácidas responsáveis por reter água em superfícies expostas do organismo), enquanto as células enteroendócrinas secretam hormônios peptídicos que regulam a atividade do sistema digestório. As células de Paneth apresentam-se nas criptas do intestino delgado e muito raramente no ceco e cólon ascendente, e secretam lisozima, enzima responsável por digerir a parede de algumas bactérias (RADTKE & CLEVERS, 2005).

A homeostase e a manutenção de um epitélio saudável, em relação ao equilíbrio entre a perda de células por descamação e a produção de novas células,

são garantidas por um controle preciso da proliferação celular ao longo da cripta, regulado por diversas vias de sinalização, dentre essas, a via *Wnt*/β-catenina é uma das mais importantes e será discutida mais adiante.

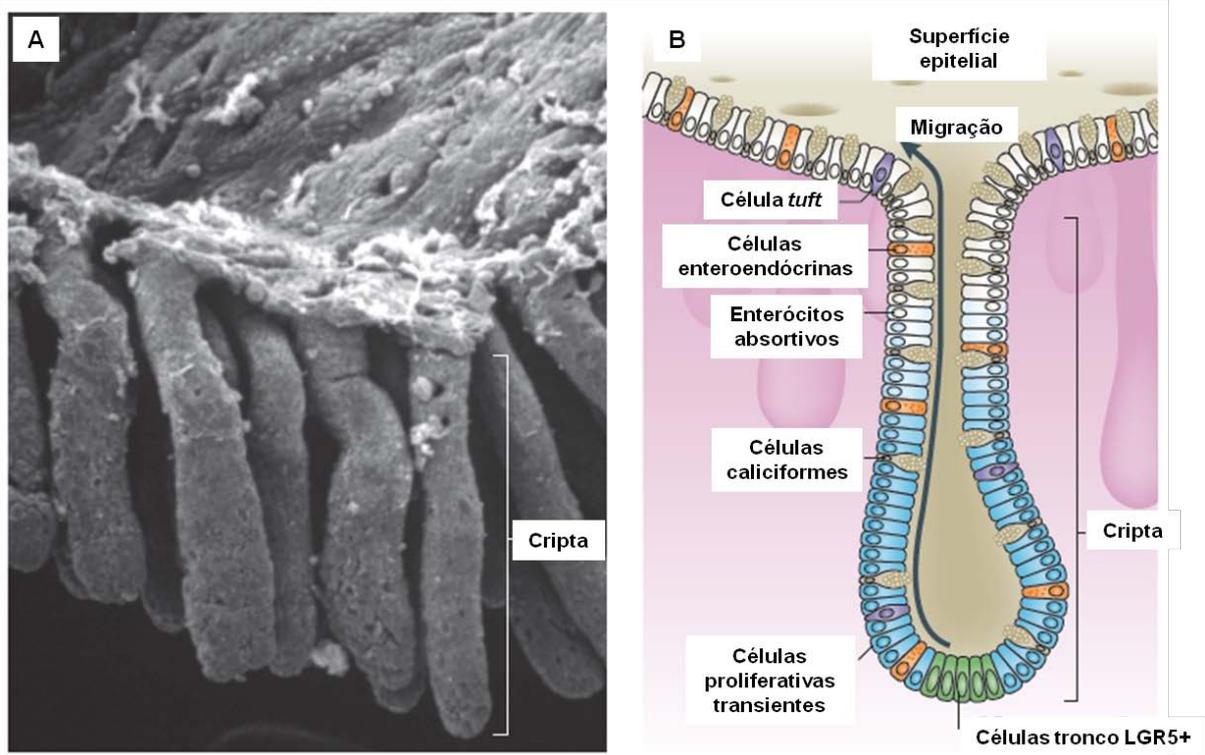


Figura 1.1: Organização da cripta intestinal no cólon. A) Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de diversas criptas intestinais do cólon. B) Esquema simplificado da cripta intestinal colônica, onde as células-tronco proliferativas se encontram na base da cripta. Essas se dividem dando origem às células proliferativas transitentes, que vão se diferenciando em diferentes tipos celulares ao longo da cripta até atingirem a superfície epitelial. Adaptado de BARKER (2014).

1.2 Câncer colorrectal (CCR)

1.2.1 Epidemiologia e fatores de risco

O CCR é a quarta neoplasia mais incidente e a quinta que mais causa mortes no mundo, em ambos os sexos, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (GLOBOCAN, 2012). No Brasil, é o segundo tumor mais incidente na população feminina e o terceiro na masculina. Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o número de casos novos estimados para a população em 2014 é de 17.530 para as mulheres e de 15.070 para os homens (Tabela 1.1) (Estimativa de casos novos de 2014, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, INCA). A sobrevida média global em cinco anos se encontra em torno de 55% nos países desenvolvidos e 40% em países em desenvolvimento.

Tabela 1.1. Estimativa de novos casos de CCR na população feminina e masculina brasileira para o ano de 2014.

Localização Primária	Casos Novos	%
Mama feminina	57.120	20,8%
Cólon e Reto	17.530	6,4%
Colo do útero	15.590	5,7%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Estômago	7.520	2,7%
Corpo do útero	5.900	2,2%
Ovário	5.680	2,1%
Linfoma não-Hodgkin	4.850	1,8%
Leucemias	4.320	1,6%
Sistema Nervoso Central	4.130	1,5%
Cavidade Oral	4.010	1,5%
Pele Melanoma	2.930	1,1%
Esôfago	2.770	1,0%
Bexiga	2.190	0,8%
Linfoma de Hodgkin	880	0,3%
Laringe	770	0,3%
Todas as Neoplasias sem pele*	190.520	
Todas as Neoplasias	274.230	



Localização Primária	Casos Novos	%
Próstata	68.800	22,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%
Estômago	12.870	4,3%
Cavidade Oral	11.280	3,7%
Esôfago	8.010	2,6%
Laringe	6.870	2,3%
Bexiga	6.750	2,2%
Leucemias	5.050	1,7%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%
Linfoma não-Hodgkin	4.940	1,6%
Pele Melanoma	2.960	1,0%
Linfoma de Hodgkin	1.300	0,4%
Glândula Tireoide	1.150	0,4%
Todas as Neoplasias sem pele*	203.930	
Todas as Neoplasias	302.350	



Fonte: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

Diversos fatores de risco estão relacionados com o desenvolvimento da doença, sendo a inflamação intestinal crônica um dos mais importantes (TRIANAFILLIDIS *et al.*, 2009). Além disso, uma dieta altamente calórica e com altos índices de gordura animal, o consumo de carne vermelha, de bebidas alcoólicas e de tabaco, e o sedentarismo parecem aumentar o risco de desenvolvimento da doença. Já o consumo de vegetais, o uso de anti-inflamatórios

não-hormonais, terapia de reposição de estrogênio e atividade física são fatores de proteção (CHAN & GIOVANNUCCI, 2010).

Os tumores colorretais podem ser divididos quanto aos riscos familiares em: a) hereditários (Câncer colorretal hereditário sem polipose ou Polipose adenomatosa familiar), quando a primeira mutação ocorre em células germinativas, seja herdada ou *de novo*, podendo ser passada de geração para geração; ou b) esporádicos, quando a mutação ocorre em células somáticas.

O câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC), conhecido também como síndrome de Lynch, corresponde a cerca de 5% de todos os casos de CCR (LYNCH & SMYRK, 1996) e é causado pela ocorrência de mutação germinativa em um dos genes de reparo do DNA: *hMSH2* (2p16); *hMLH1* (3p21); *hPMS1* (2q31-33); *hMPS2* (7p22); *hMSH6/GTPB* (2p16). As proteínas geradas por esses genes atuam no reparo do tipo *mismatch*. Esta mutação é transmitida de forma autossômica dominante (JIRICNY & NYSTRÖM-LATHI, 2000). O diagnóstico dessa síndrome é feito através de aspectos clínicos, e confirmado por testes moleculares. Já a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) é uma síndrome hereditária rara correspondendo a 1% dos casos de câncer colorretal. Este tipo de tumor caracteriza-se pela predisposição hereditária ao desenvolvimento de centenas a milhares de adenomas que se localizam especialmente no cólon e no reto, mas podendo ocorrer também no intestino delgado e no estômago (KUWADA & BYRT, 1996). O gene que, quando mutado resulta nessa doença, é denominado *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*). A proteína codificada por esse gene é multifuncional, sendo crucial para a sobrevivência e proliferação das células do cólon. A perda da função desta é um evento tão grave que a maioria dos casos de CCR esporádico apresenta esse defeito em algum momento da carcinogênese (MACRAE *et al.*, 2009).

Por outro lado, o CCR esporádico ocorre em cerca de 90-95% de todos os casos de câncer colorretal. A instabilidade genômica é um processo essencial para o desenvolvimento desse tipo de tumor. O surgimento do carcinoma a partir de adenomas (pólipos epiteliais) é chamado de sequência adenoma-carcinoma e promove uma desestabilização morfofisiológica do órgão, comprometendo a homeostase do epitélio intestinal.

O estadiamento do tumor é feito através da classificação TNM (diferenciação tumoral, linfonodos afetados e metástase) como proposto pela União Internacional

de Combate ao Câncer – UICC em 2002. Esse método é um sistema dual que inclui a classificação clínica (pré-tratamento) e histopatológica (pós-cirúrgica). O tratamento convencional indicado é a cirurgia em todos os estadiamentos (quando possível), seguido de quimioterapia e/ou radioterapia.

1.2.2 Progressão do câncer colorretal

A progressão tumoral é uma sequência de eventos moleculares e celulares que ocorrem a partir das primeiras alterações de um tecido normal até a formação de um tumor maligno. No que diz respeito ao CCR, um dos tumores sólidos mais bem estudados, análises histopatológicas e moleculares possibilitaram definir uma sequência de eventos que participavam da progressão deste câncer. Esta sequência é atualmente conhecida como adenoma-carcinoma (Fig. 1.2) (PAN *et al.*, 2011).

As lesões teciduais causadas por fatores ambientais, carcinógenos ou bactérias resultam em inflamação. Durante a inflamação crônica as células inflamatórias recrutadas induzem instabilidade cromossômica e danos no DNA das células proliferativas do cólon, contribuindo assim para transformação maligna. O começo da sequência adenoma-carcinoma ocorre como consequência de uma hiperplasia (desequilíbrio proliferativo), seguida de uma displasia no epitélio colônico (proliferação desregulada em conjunto com alterações citológicas), provocando alterações nas criptas conhecidas como lesões aberrantes. Essas se expandem ao longo do tempo formando adenomas (pólipos), que são tumores benignos, isto é, se mantêm os tipos celulares do tecido normal e as células do tumor são incapazes de penetrar o tecido adjacente. A transição de um tumor benigno (adenoma) para um maligno (carcinoma) ocorre devido ao acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas ao longo do tempo na lesão inicial. O carcinoma é constituído de células capazes de invadir e migrar pelo tecido adjacente ao tumor, podendo resultar na formação de micro ou macrometástases. Diversas mutações em oncogenes e supressores de tumor estão relacionadas com essa progressão, onde alterações nos genes *KRAS*, *APC*, *SMAD4* e *TP53* são de grande importância (ROWLEY, 2005).

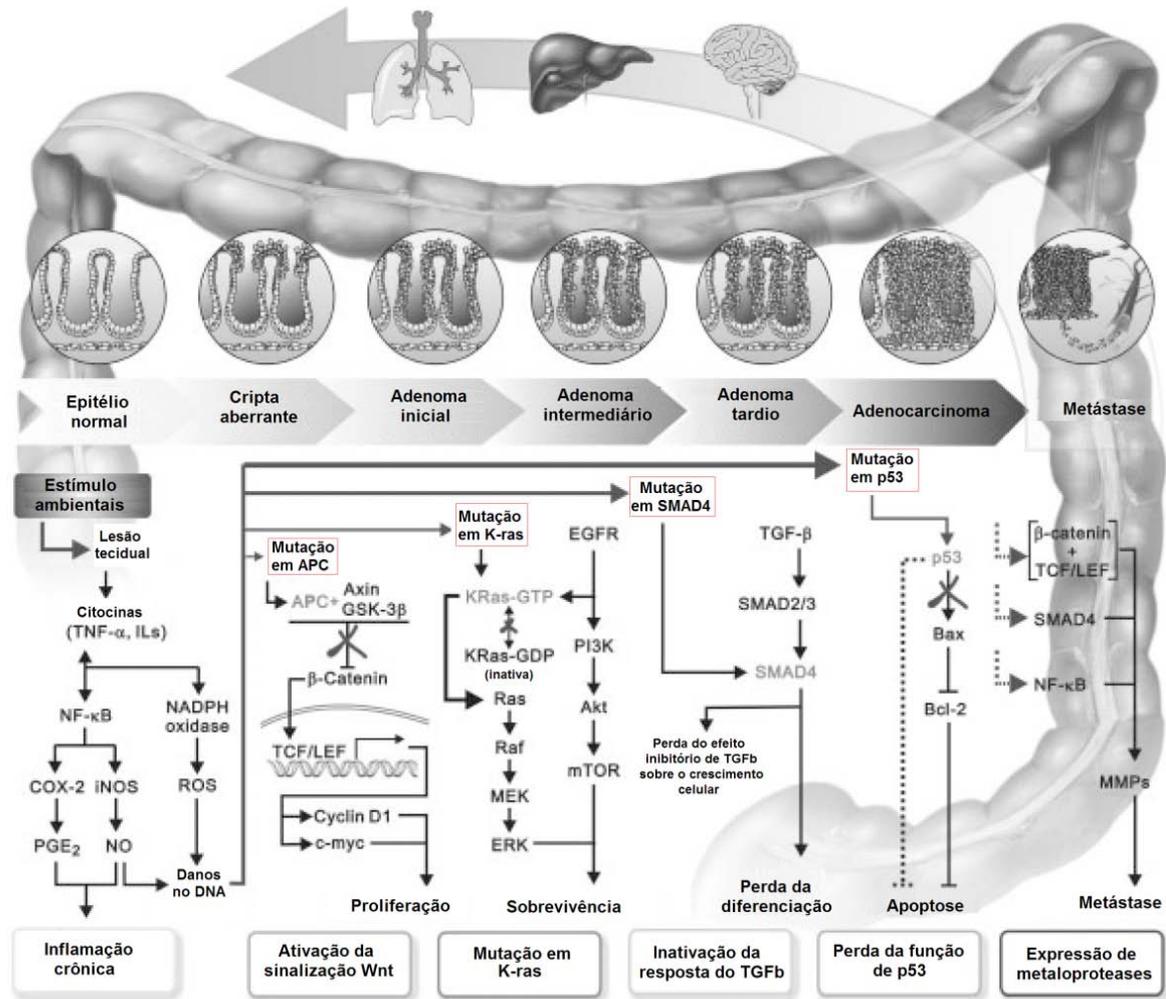


Figura 1.2: Eventos celulares e moleculares que participam da sequência adenoma-carcinoma. A inflamação crônica induz instabilidade cromossômica e danos ao DNA das células proliferativas do cólon. Uma etapa subsequente é a formação de criptas aberrantes, associadas à perda de APC, o que leva a um desequilíbrio proliferativo. A aquisição de mutações em outros genes, tais como K-RAS, TP53 E SMAD4, também contribui diretamente para a aquisição do fenótipo maligno. O esquema mostra também algumas vias de sinalização importantes que regulam esse evento. A seta superior indica os possíveis sítios de metástase. Adaptado de PAN *et al.*, 2011.

Dentre todas as etapas que ocorrem na sequência adenoma-carcinoma, um evento muito importante é a formação da cripta aberrante, onde, como mencionado, as células da base da cripta perdem o controle sobre suas taxas de morte e proliferação. Essa etapa ocorre no começo do processo tumorigênico do CCR e contribui significativamente para que possam ocorrer mutações ao acaso que possibilitem a transformação maligna. A proliferação e a diferenciação dessas células tronco da base da cripta são muito bem reguladas por diversas vias de

sinalização como a *wingless (Wnt)*, *bone morphogenetic protein (BMP)*, e NOTCH (KOSINSKI *et al.*, 2007). A via canônica *Wnt* atua principalmente na manutenção da célula tronco intestinal e na proliferação de células progenitoras (BARKER & CLEVERS 2006), sendo a principal reguladora da expressão gênica ao longo do eixo da cripta (KOSINSKI *et al.*, 2007), e a β -catenina cumpre um papel central desta via. A sinalização BMP atua na diferenciação intestinal (GIEPMANS *et al.*, 2008). Já a via NOTCH, direciona as células para a linhagem secretória do intestino (VAN *et al.*, 2005). Mutações em genes que codificam a expressão das proteínas APC ou β -catenina, uma proteína central do complexo de adesão célula-célula, podem tornar a via *Wnt*/ β -catenina constitutivamente ativa causando um descontrole na proliferação e diferenciação celular, originando uma cripta aberrante (Fig. 1.3).

O estudo não só dessas vias de sinalização, como de outras que controlam a proliferação e o ciclo celular, assim como o estudo de moléculas que promovam esses efeitos, se mostram relevantes para um melhor entendimento e controle desses eventos em carcinomas. Nesse sentido, existem algumas moléculas que fazem parte do microambiente tumoral e auxiliam na promoção e manutenção de eventos como sobrevivência, invasividade e proliferação. Uma molécula que vêm ganhando destaque nos últimos anos em alguns tipos tumorais, incluindo o câncer de cólon, é o ácido lisofosfatídico (LPA).

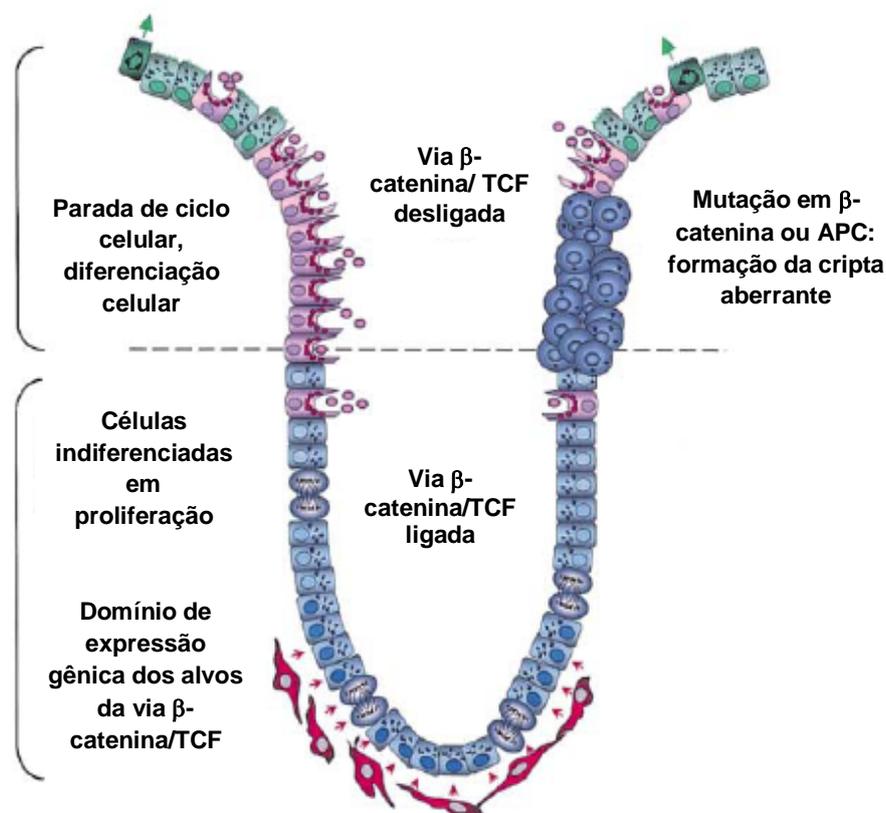


Figura 1.3: Representação da cripta colônica e modelo proposto de formação da cripta aberrante. Note que células normais diferenciadas presentes na parte superior da cripta apresentam parada do ciclo celular. No processo de carcinogênese, tal compartimentalização diferenciada é perdida, ocorrem mutações em genes que codificam a expressão das proteínas APC ou β -catenina, causando um descontrole na proliferação e diferenciação celular, originando a formação de pólipos e conseqüentemente uma cripta aberrante (Adaptado de van de WETERING, 2002).

1.2.3 LPA

O LPA é um fosfolípídeo hidrossolúvel fisiologicamente presente no soro, com concentração podendo exceder 10 μM , e no plasma em torno de 0,1-1 μM (LIN *et al.*, 2010). O LPA do soro está ligado à albumina, lipoproteínas e a outras proteínas, que impedem sua rápida degradação (PAGES *et al.*, 2001). Este fosfolípídeo está relacionado a diferentes respostas celulares, como proliferação, resistência à apoptose, quimiotaxia, secreção de fatores angiogênicos, ativação de metaloproteinases (MMPs), entre outros. É produzido localmente em resposta a injúrias, gerado e secretado por plaquetas, macrófagos, células epiteliais e tumorais,

mas sendo gerado principalmente por via extracelular através de ecto-enzimas num processo ainda pouco entendido (MILLS & MOOLENAAR, 2003).

Existem pelo menos duas vias principais de síntese de LPA. Uma delas envolve a hidrólise de ácidos fosfatídicos (PAs), gerados a partir de fosfolipídeos e diacilglicerol pela fosfolipase A1 (PLA1) ou pela fosfolipase A2 (PLA2). Esta via é conhecida por ser principalmente intracelular ou na membrana plasmática, já que seu substrato, o PA, está localizado nesta última. O segundo mecanismo de produção ocorre via clivagem de lisofosfolipídeos (LPLs), como a lisofosfatidilcolina (LPC), lisofosfatidiletanolamina (LPE) e a lisofosfatidilserina (LPS), pela lisofosfolipase D/autaxina (LysoPLD/ATX), uma ecto-enzima (Fig. 1.4) (MILLS & MOOLENAAR, 2003; AOKI *et al.*, 2008). A ATX está presente no sangue e sua atividade está intimamente relacionada com a concentração de LPA.

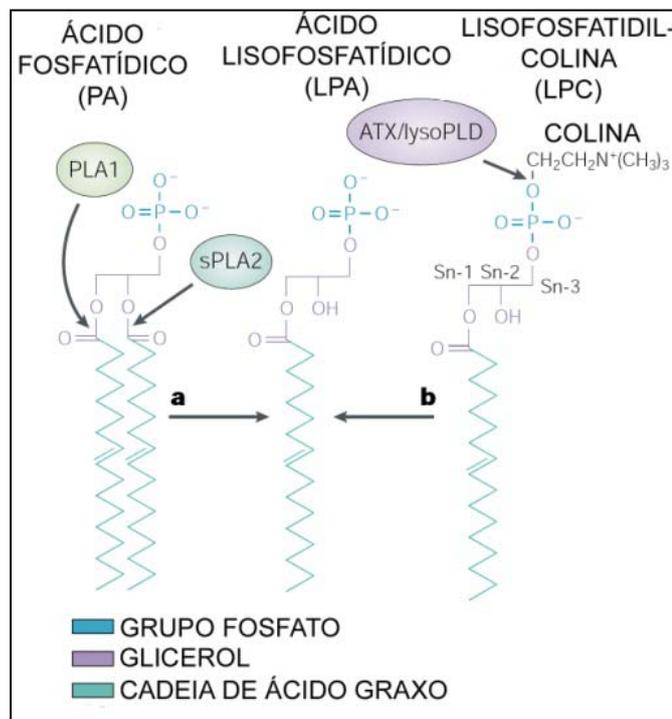


Figura 1.4: Síntese do LPA. O LPA pode ser produzido por hidrólise do ácido fosfatídico (PA) pela fosfolipase A1 (PLA1) ou A2 (PLA2), que clivam a cadeia do ácido graxo do glicerol ou pela hidrólise de lisofosfolipídeos, ilustrados na figura pela lisofosfatidilcolina (LPC), por autaxina (ATX) ou lisofosfolipase D (LPD), que libera a colina. Adaptado de MILLS & MOOLENAAR, 2003.

Os efeitos celulares mediados pelo LPA ocorrem em resposta à ativação de seus receptores (LPA1-6), que são acoplados a proteína G (GPCRs) (NOGUCHI *et al.*, 2009). Dentre esses receptores, os mais conhecidos e descritos são os receptores LPA1, LPA2 e LPA3, que são membros da família do gene de diferenciação endotelial, sendo conhecidos também como EDG-2, EDG-4 e EDG-7, respectivamente. Esses três receptores estão acoplados a três grandes membros da família de proteína G: G_i , G_q e $G_{12/13}$. O LPA1 pode estar acoplado aos três membros, assim como o LPA2. Já o LPA3 pode estar acoplado a G_i ou a G_q , mas não a $G_{12/13}$. Assim, um mesmo receptor pode mediar diferentes efeitos intracelulares, dependendo da proteína G em que está acoplado (ANLIKER & CHUN, 2004). A ativação do LPA1 induz a ativação de uma série de cascatas de sinalização como: proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), fosfolipase C(PLC)/ mobilização de Ca^{++} , Akt, e pequena GTPase Rho, podendo acarretar aumento de sobrevivência e proliferação celular, arredondamento celular, formação de fibras de estresse, entre outros. Já o receptor LPA2 é responsável por aumentar a proliferação celular, ativação de PLC, mobilização de Ca^{++} e ativação de JNK e Akt. Enquanto o receptor LPA3 pode mediar ativação de PLC, mobilização de Ca^{++} , e ativação de MAPK (ISHII *et al.*, 2004).

Os receptores LPA 4-6 não pertencem à família EDG e são pouco conhecidos. Porém já se sabe que o LPA4 e o LPA5 podem mobilizar Ca^{++} e ocasionar acúmulo de AMP cíclico. Além disso, LPA 4-6 podem ativar Rho e Rac, assim como o LPA1 e 2, e induzir projeções de membrana (VALENTINE *et al.*, 2008; HARPER *et al.*, 2010). E, recentemente, foi mostrado que o tratamento com LPA regula a proliferação de células de câncer de cólon através do LPA 4 (TSUKAHARA *et al.*, 2010). Os principais receptores e as vias ativadas encontra-se representados na figura 1.5.

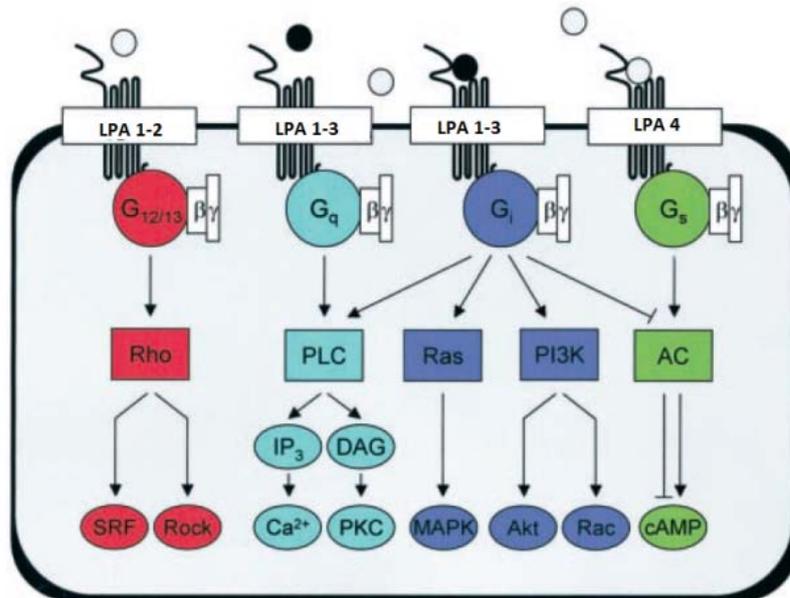


Figura 1.5: Sinalização de LPA através de receptores acoplados à proteína G. Receptores de LPA acoplados a diferentes classes de proteína G, induzindo a ativação ou inibição de diversas moléculas *downstream*. Adaptado de ANLIKER & CHUN, 2004.

Além das sinalizações já citadas, a relação entre alterações nos níveis de LPA e de seus receptores e a progressão de vários tipos de tumores está intimamente relacionada. Diversos estudos têm mostrado a contribuição da via ativada pelo LPA tanto na supressão quanto na promoção tumoral. O acúmulo de LPA foi identificado em ascite e no sangue de pacientes com câncer de ovário (LIN *et al.*, 2010). Ele ativa as células do câncer de ovário e as protege de apoptose, além de aumentar a expressão de MMPs, que são importantes mediadores de invasão e metástase. Além disso, acelera a formação de adesão focal e de migração através da via Rho/ROCK/actino-miosina e de Ras/MEKK1 (LIN *et al.*, 2010). Efeitos similares foram observados em tumores gástricos, de cólon, de pâncreas, de próstata, de fígado e de cérebro. Os eventos descritos acima são mediados através dos receptores LPA2 e LPA3 (LIN *et al.*, 2010). Foi visto também um aumento de LPA2 em amostras de pacientes com câncer colorretal em comparação com o tecido normal adjacente, indicando a participação desse receptor e a ativação das vias já descritas nesse tipo de tumor (WATANBE *et al.*, 2004). Por outro lado, o LPA1 tem sido reportado como um regulador negativo de câncer de ovário, além de ter sido encontrado mutado para perda de função em tumores de pulmão e fígado de camundongos, agindo como um supressor tumoral (OBO *et al.*, 2008; YAMADA *et al.*, 2008). Recentemente, nosso grupo relatou que o LPA estimulava migração celular em

células Caco-2 através de um *crosstalk* entre as vias de Rho/ROCK e de Src-FAK (LEVE *et al.*, 2011).

Como mencionado, o LPA pode ativar diversas vias de sinalização desencadeando vários eventos envolvidos na progressão tumoral, tais como: migração, invasão, resistência à apoptose, sobrevivência e proliferação. Algumas dessas vias serão abordadas a seguir.

1.2.4 Pequena GTPase Rho e sua efetora ROCK

As GTPases Rho são proteínas monoméricas com a capacidade intrínseca de clivar guanosina trifosfato (GTP), e ciclam entre um estado ativo ligado em GTP, predominantemente associado à membrana plasmática, e um inativo ligado em guanosina difosfato (GDP), predominantemente no citoplasma (Fig. 1.6). As proteínas que regulam esse ciclo são: o fator de troca de nucleotídeo de guanina (GEF), que catalisam a troca entre GDP por GTP para gerar a forma ativa de Rho, capaz de reconhecer seus efetores *downstream*; as proteínas ativadoras de GTPases (GAPs), cuja função é acelerar a capacidade intrínseca de Rho para hidrolisar GTP, restaurando o estado ligado em GDP, ocasionando então a inativação da GTPase; e os inibidores de dissociação de nucleotídeo guanina (GDIs) (SCHMIDT & HALL, 2002). Convencionalmente, RhoGDIs são inibidores de Rho porque mantêm as GTPases no citosol. No entanto, estudos mostraram que RhoGDIs exibem afinidades similares por Rac e Cdc42, outros membros da família GTPases Rho, ativas e inativas, indicando seu possível papel no transporte e compartimentalização das GTPases ativas (NOMANBHOY & CERIONE, 1996). Uma vez ativadas, as GTPases Rho adquirem uma mudança conformacional que as permitem interagir com aproximadamente 100 proteínas efetoras e desempenhar a sua função biológica (VEGA & RIDLEY, 2008). Ainda, as GTPases Rho podem modular fatores de transcrição envolvidos na tumorigênese, tais como o fator nuclear κ B (NF κ B), STAT e CREB (BENITAH *et al.*, 2004).

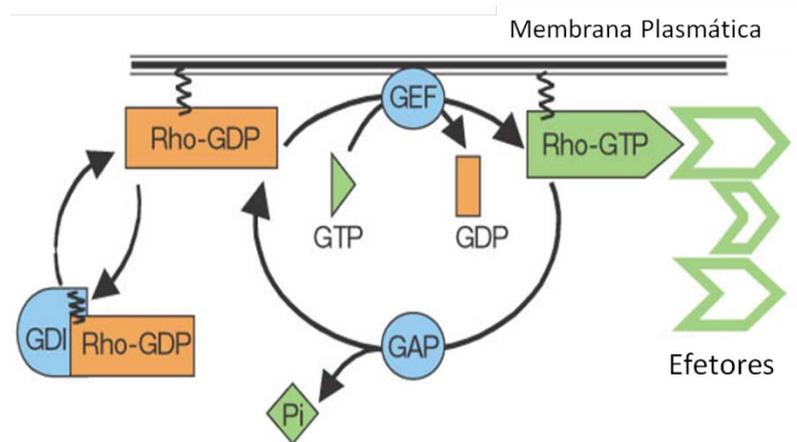


Figura 1.6: Modelo do ciclo de ativação de GTPases da família Rho. As GTPases Rho ativas (RhoGTP) são estimuladas pela GAP a clivarem GTP, e são mantidas no seu estado inativo (RhoGDP) através da ligação em GDI até que a GEF seja estimulada e catalise a troca de GDP por GTP, permitindo a interação entre a Rho GTPase ativa e sua proteína efetora, e reiniciando o ciclo. Adaptado de ETIENNE-MANNEVILLE & HALL, 2002.

Estudos prévios mostraram que as GTPases Rho podem ser ativadas também por ligantes extracelulares, ocasionando modificações de membrana e do citoesqueleto. O LPA é um conhecido ativador de Rho, e o tratamento de fibroblastos com esse agente, induziu a montagem de fibras de estresse e adesões focais (AFs), estruturas de contato célula-matriz extracelular. Já o tratamento dessas mesmas células com o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e insulina, que ativam Rac e Cdc42, induziu a formação de lamelipódios e filopódios, respectivamente (HALL, 1998). Estudos subsequentes mostraram o envolvimento dessas GTPases na regulação do crescimento, polaridade e adesão celular, apoptose, sobrevivência e tráfego de vesículas (BENITAH *et al.*, 2004). Além disso, foi observado que a sinalização de Rho medeia a adesão célula-célula e a organização do citoesqueleto de actina em células de adenocarcinoma de cólon, eventos esses importantes na aquisição de um fenótipo migratório (LEVE *et al.*, 2008). Vale lembrar que todos esses eventos são mediados através das efetoras de Rho.

Uma das principais efetoras de Rho é a proteína ROCK, que possui duas isoformas, ROCKI (ROK β ou p160ROCK) e ROCKII (ROK α). Essas efetoras são serina/treonina quinases e possuem um domínio de ligação em Rho, chamado de *Rho binding domain* (RBD). Quando inativas, uma alça auto-inibitória é formada de modo a impedir a exposição do sítio catalítico. Entretanto, quando Rho está em sua forma ativa, esta se liga à região RBD de ROCK promovendo uma mudança

conformacional da efetora, liberando seu domínio quinase e tornando-a ativa. Além disso, a ativação de Rho induz a translocação de ROCK do citosol para a membrana (Fig. 1.7) (MUELLER *et al.*, 2005). A função de ROCK mais descrita está associada à indução de fibras de estresse e adesões focais através de proteínas que regulam o citoesqueleto de actina e contratilidade celular tais como miosina, *LIM kinase* (LIMK) e a *focal adhesion kinase* (FAK) (KIMURA *et al.*, 1996), sendo muito associada então a processos migratórios. Porém, estudos recentes têm mostrado seu papel também na indução de proliferação celular. Zhao e colaboradores (2013) observaram que ROCK estimulava aumento de proliferação em células vasculares do músculo liso por meio da ativação de ERK e indução de expressão de ciclina D1 e PCNA (do inglês, *Proliferating Cell Nuclear Antigen*). Além disso, foi visto que o microRNA miR-126 reduz a proliferação celular através da supressão da via RhoA/ROCK, e que esse microRNA tem uma expressão reduzida em diversas linhagens celulares derivadas de câncer colorretal que possuem alto grau de agressividade (LI *et al.*, 2013). Ainda, ROCK, em conjunto com a *cyclin-dependent kinase 1* (Cdk1), pode alterar a dinâmica de polimerização dos microtúbulos e assim estimular a proliferação em células derivadas de osteosarcoma (SCHOFIELD *et al.*, 2013).

Uma revisão detalhada, recentemente publicada pelo nosso Grupo, ressalta o papel das GTPases Rho e de suas proteínas efetoras na progressão do câncer colorretal (LEVE & MORGADO-DÍAZ, 2012). Nesse contexto, todos esses resultados demonstram a importância de se estudar a via Rho/ROCK na progressão tumoral epitelial, e particularmente do câncer colorretal. Entretanto, outras sinalizações possuem papel significativo na promoção do câncer de cólon. Dentre essas, as vias *Wnt*/ β -catenina e do fator transcricional STAT3 têm se mostrado muito importantes na aquisição de um fenótipo mais agressivo. A relação entre estas vias de sinalização e as Rho GTPases neste evento permanece por ser elucidada.

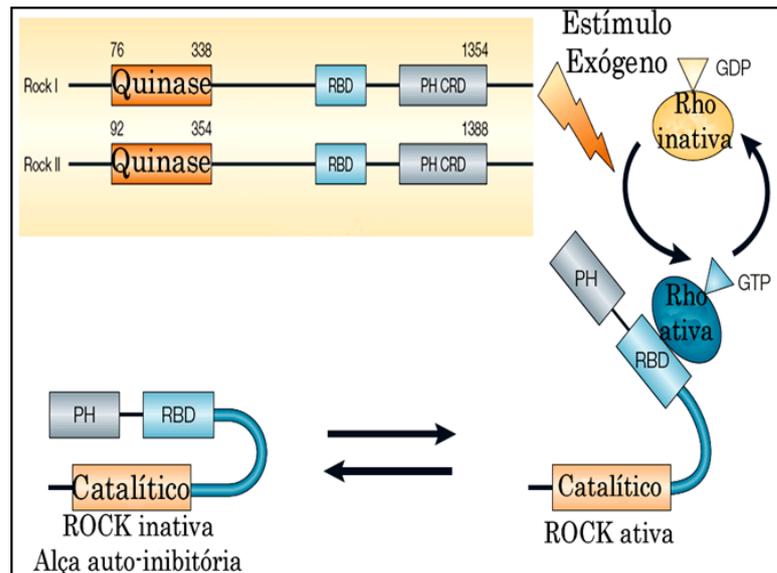


Figura 1.7: Estrutura molecular e mecanismo de ativação de ROCK. A parte superior esquerda da figura corresponde à estrutura molecular da efetora ROCK e mostra que o domínio catalítico de ROCK está na região N-terminal, seguida pelas regiões RBD, PH e CRD na região C-terminal. No lado direito, a figura mostra que quando algum estímulo ativa a GTPase Rho, essa expõe seu sítio de ligação à ROCK. A ligação entre Rho e ROCK promove a liberação do sítio catalítico desta última, sendo desencadeado assim os efeitos biológicos induzidos por Rho. RBD: região de ligação em Rho; PH: região homóloga a plecstrina; CRD: domínio rico em cisteína. Adaptado de MUELLER *et al.*, 2005.

1.2.5 Via de sinalização *Wnt*/β-catenina

A via de sinalização *Wnt*/β-catenina é fundamental no desenvolvimento de tecidos embrionários e na manutenção tecidual regulando processos como diferenciação, crescimento e sobrevivência celular. Entretanto, a ativação crônica desta via resulta em eventos desregulados de sobrevivência e proliferação das células intestinais, tendo como consequência o desenvolvimento do CCR (BARKER & CLEVERS, 2006).

A sinalização da via inicia-se com a associação das lipoglicoproteínas da família *Wnt* com um complexo de receptores específicos, o receptor *Frizzled* (Fzd) e membros da família de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), o Lrp 5/6. Na presença da *Wnt*, há uma transdução de sinais por esses receptores, os quais induzem a interação da Axina com a porção citoplasmática fosforilada do receptor Lrp. Além disso, como consequência dessa transdução, outra proteína denominada *Dishvelled* (Dvl) também se associa ao outro receptor Fzd intermediando a ligação entre Axina e esse receptor. Uma vez estabelecidas as interações, outras proteínas são recrutadas e o complexo é localizado na membrana

plasmática, ligando-se irreversivelmente a β -catenina. Esse complexo proteico, chamado de complexo destrutivo, é formado pelas proteínas APC e Axina, as quais juntas facilitam a fosforilação de β -catenina por ação da caseína quinase 1 α (CK1 α) e da GSK-3 β . Essa associação entre o complexo e a β -catenina viabiliza a fosforilação dessa proteína em seus quatro sítios específicos: Ser45, Thr41, Ser37 e Ser33. No entanto, apesar do estabelecimento da fosforilação, a via de sinalização *Wnt* inviabiliza a ubiquitinação e a degradação da β -catenina por proteassoma. Esse impedimento se caracteriza pela incapacidade do complexo E3 ligase ubiquitinase β -TrCP, responsável pela ubiquitinação, e do proteassoma de se associarem ao complexo (CLEVERS & NUSSE, 2012).

Dessa maneira, a saturação do complexo destrutivo e seu ancoramento à membrana viabilizam o acúmulo de β -catenina no citoplasma e sua translocação para o núcleo, onde interage com o fator celular-T/fator intensificador linfóide (Tcf-LEF), um fator transcricional que regula a atividade de genes como *C-MYC* e *MMP9*, envolvidos em eventos tumorigênicos tais como proliferação, migração e sobrevivência celular (ANASTAS & MOON, 2013).

É válido ressaltar que, na ausência da sinalização de *Wnt*, o complexo destrutivo de β -catenina forma-se no citoplasma e a associação com a E3 ligase ubiquitinase β -TrCP e o proteassoma são estabelecidos, possibilitando a ubiquitinação e a degradação dessa proteína, e assim impedindo seu acúmulo. Na ausência de β -catenina no núcleo, há a ativação de um repressor transcricional chamado Groucho, que se associa ao Tcf-LEF, inibindo a transcrição dos genes alvos de *Wnt* (CLEVERS & NUSSE, 2012). A Figura 1.8 descreve a organização da ativação da via de sinalização de *Wnt* em CCR.

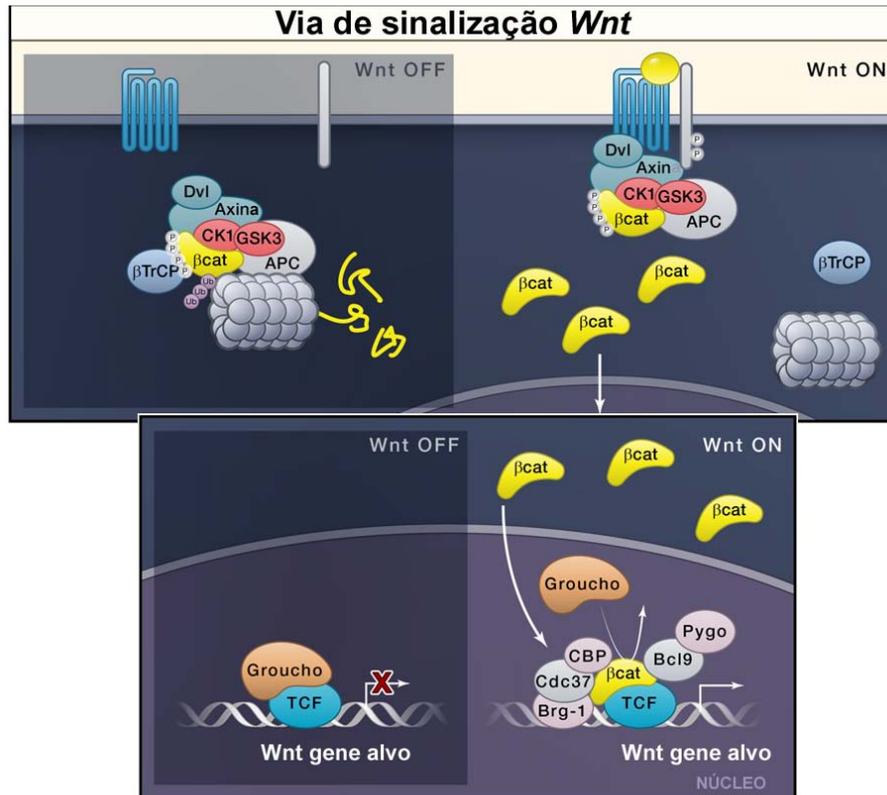


Figura 1.8: A via de sinalização *Wnt*. Na ausência de sinalização da *Wnt*, a β -catenina se associa ao complexo destrutivo que contém APC e Axina, sendo alvo de fosforilação das quinases GSK-3 β e CK1 α para degradação via proteossoma (via inativa ou *Wnt OFF*). Já na presença da *Wnt*, a β -catenina não se acopla ao complexo destrutivo, viabilizando seu acúmulo no citoplasma e sua translocação ao núcleo, onde se liga ao fator transcrricional TCF/LEF, ativando genes alvo relacionados à tumorigênese (via ativa ou *Wnt ON*). Adaptado de CLEVERS & NUSSE, 2012.

Além dessa ativação clássica de β -catenina, foi observado em células de carcinoma de cólon que o LPA pode promover a translocação nuclear desse fator transcrricional induzindo a expressão de ciclina D1 e c-myc, estimulando assim a proliferação celular (YANG *et al.*, 2005). Em adição, foi visto que esse fosfolípido estimulava a migração de células-tronco mesenquimais também por meio da ativação dessa via (BRADI & LAMA, 2012). Juntos, esses dados demonstram a importância de estudar o papel do LPA como um mecanismo alternativo de ativação da via de β -catenina.

1.2.6 Via de sinalização de STAT3

As proteínas STAT (do inglês, *Signal transducer and activator of transcription*) foram descobertas como fatores de transcrição citoplasmáticos que medeiam respostas celulares induzidas por citocinas e fatores de crescimento (DARNELL, 1997; BROMBERG & DARNELL, 2000). Após a interação entre o ligante e o receptor, ocorre a ativação de STAT, que é induzida pela fosforilação de seu resíduo tirosina específico. Isso induz uma homodimerização, seguida por translocação nuclear, ligação ao DNA e indução da expressão de seus genes alvos. As principais proteínas responsáveis pela fosforilação desse fator transcricional são: os próprios receptores do tipo tirosina quinase, as proteínas da família *janus kinase* (JAK), quinases da família Src, e outras quinases. Por outro lado, STAT pode ser regulada negativamente por supressores da sinalização de citocinas (SOCS) e por proteínas fosfatases (MIKLOSSY *et al.*, 2013) (Fig. 1.9).

Essa família, que consiste em sete membros (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B e STAT6), promove respostas celulares fundamentais, incluindo crescimento e diferenciação celular, desenvolvimento, apoptose, resposta imune e inflamação (MIKLOSSY *et al.*, 2013). Dentre todos, um dos membros mais importantes é a proteína STAT3. Ela possui função essencial no início do desenvolvimento embrionário, uma vez que embriões de camundongo deficientes para tal proteína morreram logo nos primeiros dias de vida (AKIRA, 1999). Além disso, queratinócitos deficientes para STAT3 tiveram uma baixa resposta ao *wound healing in vitro* e *in vivo*, demonstrando sua relação com a migração celular (SANO *et al.*, 1999). As principais proteínas que possuem sua expressão aumentada em resposta à ativação de STAT3 são: p21, ciclina D1, c-myc, BCL-X_L, BCL-2, VEGF, MMP1, MMP7, MMP9 e survivina. Todas essas envolvidas em processos relacionados com a tumorigênese, já que participam de eventos como proliferação, sobrevivência, angiogênese e invasão.

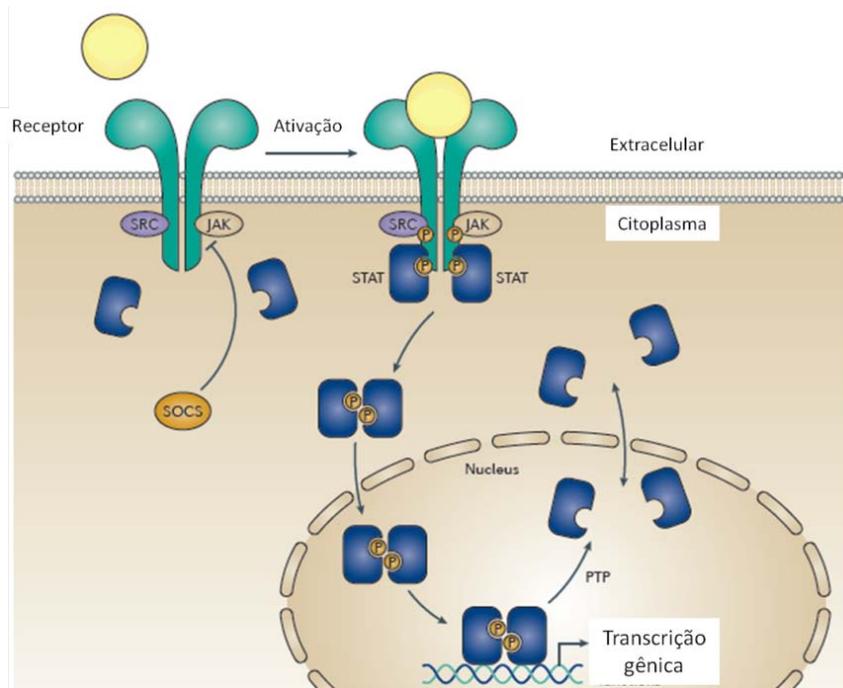


Figura 1.9: Modelo de ativação do fator transcricional STAT. A proteína STAT se torna ativa quando é fosforilada em seu resíduo tirosina específico. Essa fosforilação ocorre em resposta a um ligante, que pode ser uma citocina ou uma molécula que se ligue a um receptor tirosina quinase. A proteína fosforilada forma então um homodímero, transloca ao núcleo onde se liga aos genes alvos e estimula a transcrição desses. Os supressores da sinalização de citocinas (SOCS) e as proteínas fosfatases (PTP) regulam negativamente essa sinalização. Adaptado de MIKLOSSY *et al.*, 2013.

Como esperado, esse fator transcricional possui sua função desregulada em muitos tipos de câncer, participando de forma importante na promoção e na progressão da transformação maligna. A proteína STAT3 foi encontrada constitutivamente ativa em tumores de mama, de próstata, de pâncreas e de ovário, além de melanomas e mieloma múltiplo (MIKLOSSY *et al.*, 2013). Em tumores colorretais, foi observado um importante papel desta proteína em células iniciadoras do tumor. Células com alto potencial de iniciar tumores colorretais em camundongo tinham níveis elevados da forma fosforilada (ativa) de STAT3. Além disso, a *downregulation* desse fator transcricional reduziu a proliferação e sobrevivência dessas células (LIN *et al.*, 2011). Ainda, foi visto que a superexpressão de STAT3 aumenta o potencial maligno de células de câncer colorretal, aumentando sua invasão e a sua capacidade de formar colônias. Quando essas mesmas células tinham a expressão reduzida desse fator transcricional, suas taxas de invasão e de formação de colônia também diminuía (XIONG *et al.*, 2011).

De forma interessante, foi observado que a estimulação de células derivadas de carcinoma de ovário com LPA apresentavam maior potencial migratório em decorrência da indução de atividade de STAT3 (SEO *et al.*, 2010). Além disso, foi observado que o LPA induzia a expressão de IL-6 por células estromais da próstata *in vitro*, e quando esse meio condicionado era colocado em contato com células de câncer de próstata, essas apresentavam ativação de STAT3 (SIVASHANMUGAM *et al.*, 2004), indicando uma relação entre LPA, via de IL-6 e ativação de STAT3. Esses trabalhos demonstram a possibilidade de ativação dessa proteína por meio do LPA em tumores colorretais.

1.2.7 Relação entre as vias Rho/ROCK e β -catenina e de Rho/ROCK e STAT3 no controle de eventos relacionados com a progressão tumoral

Na progressão tumoral, existem diversas vias de sinalização que são ativadas de modo a promover eventos relacionados com a malignidade. Tendo sido abordadas, de forma separada, as sinalizações de Rho/ROCK e β -catenina e de STAT3, é interessante uma abordagem sobre a relação que possa existir entre elas, considerando que eventos relacionados com a malignidade não dependem de uma via isolada, mas da cooperação entre várias delas.

No entanto, ainda são poucos os trabalhos que mostram a interação destas vias de sinalização na progressão tumoral. SAMUEL e colaboradores (2011) observaram em queratinócitos que a ativação estável de ROCK, efetora de Rho, promovia um acúmulo nuclear de β -catenina, seguido de um aumento na atividade transcricional dessa proteína e uma hiperproliferação. Ainda, ROCK2 foi capaz de regular a proliferação induzida pelo fator de crescimento fibroblástico (bFGF) em células derivadas de neuroblastoma através da via de GSK-3 β e de β -catenina (BOKU *et al.*, 2013). Por fim, foi visto que a ativação da via de ROCK induz aumento de expressão de β -catenina em células de osteosarcoma (SCHOFIELD *et al.*, 2013).

Já em relação à interação das sinalizações de Rho/ROCK e STAT3, foi observado que ROCK1 é capaz de fosforilar a proteína JAK2, e esta ativar STAT3 em células imortalizadas do hipotálamo, GT1-7. Além disso, quando ROCK1 tinha sua expressão inibida, a fosforilação de STAT3 era prevenida (HUANG *et al.*, 2012). Ainda, foi visto que a ativação de ROCK era capaz de ativar JAK1, e esta ativar STAT3 em fibroblastos associados a carcinoma oral (SANZ-MORENO *et al.*, 2011).

A ativação sustentada de RhoA foi também capaz de induzir fosforilação de STAT3 em células HEK293 (REIPSCHLAGER *et al.*, 2012), demonstrando mais uma vez a interação entre essas duas vias. Esses trabalhos demonstram a relação que existe entre a atividade de Rho/ROCK e a via de β -catenina e de STAT 3 na progressão tumoral. No entanto a interrelação entre essas vias ainda não foi demonstrada em câncer colorretal.

Para finalizar, sabe-se que tanto STAT3 quanto β -catenina são fatores de transcrição envolvidos na indução de diversas proteínas, tais como c-myc e ciclina D1, e que ROCK também pode induzir a expressão de proteínas envolvidas no ciclo celular e, conseqüentemente modular proliferação. Além disso, foi observado que a ativação de ROCK é suficiente para estimular a progressão das fases G1-S do ciclo celular, através do aumento de expressão da ciclina A e da redução da p27 (CROFT & OLSON, 2006). Todos esses estudos demonstram a importância de se estudar proteínas que participem de alguma forma da regulação do ciclo celular, de modo a compreender melhor esse evento e descobrir novos mecanismos de controle da proliferação em câncer colorretal.

1.2.8 Ciclo Celular

A divisão celular é dividida em fases, as quais constituem o ciclo celular. A fase *Gap 1* (G1) é aquela onde a célula está exercendo sua fisiologia normal. Quando esta recebe um estímulo externo que induza a divisão, ocorre passagem para fase de Síntese (S) (duplicação do DNA) e posterior fase *Gap 2* (G2), onde as proteínas necessárias para a mitose são expressas, e M (mitose), na qual ocorre a divisão de fato. Essas fases são controladas por diversas proteínas e sua desregulação pode causar um desequilíbrio tecidual podendo induzir um tumor. As células tumorais, inclusive, acumulam mutações que resultam numa sinalização mitótica constitutiva, além de um defeito na resposta anti-mitótica, promovendo assim uma proliferação descontrolada através da progressão do ciclo celular (MALUMBRES & BARBACID, 2001).

Os principais componentes do sistema de controle do ciclo celular são membros da família das quinases dependentes de ciclina (Cdk, do inglês *cyclin-dependent kinases*). A atividade dessas quinases varia ao longo do ciclo, levando a

mudanças cíclicas na fosforilação de proteínas intracelulares que iniciam ou regulam os principais eventos do ciclo celular.

Os reguladores de Cdks mais importantes são as proteínas ciclinas, uma vez que a atividade quinase das Cdks só ocorre quando estas estão ligadas a uma das ciclinas. Essas proteínas receberam o nome de ciclinas por sofrerem um ciclo de degradação e síntese a cada ciclo celular. Já as Cdks possuem seu nível proteico constante. As mudanças nos níveis das ciclinas resultam na montagem e ativação cíclica dos complexos de ciclina-Cdk, desencadeando os eventos do ciclo celular.

De maneira simplificada, existem quatro classes de ciclinas. A ciclina D tem sua expressão estimulada por sinais mitóticos. Ela se liga à Cdk4/Cdk6 e é a responsável pela progressão da fase G1, onde promove a liberação de fatores transcricionais que provocam a expressão da ciclina E. Essa, por sua vez, tem como parceira a Cdk2, e estimula a transição entre as fases G1 e S. De forma subsequente, a ciclina A se liga à Cdk2/Cdk1 e é a responsável pela progressão da fase S e transição S-G2. Finalmente, a ciclina B forma um complexo com a Cdk1 e estimula a passagem G2-M para que a mitose possa então ocorrer (Fig. 1.10). Cada um desses complexos fosforila um conjunto diferente de proteínas, desencadeando assim diferentes eventos ao longo do ciclo (MALUMBRES & BARBACID, 2009).

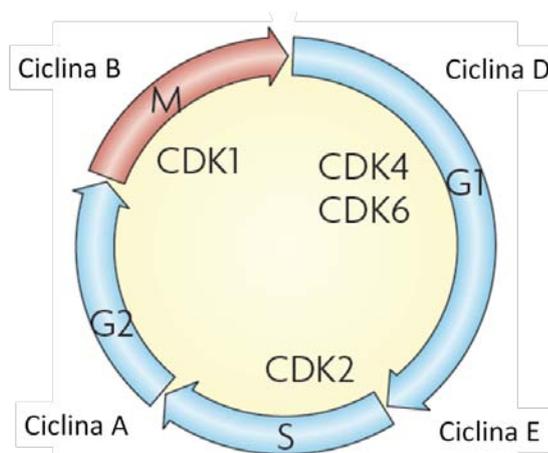


Figura 1.10: Modelo simplificado do ciclo celular. O esquema mostra as diferentes fases do ciclo celular e seus principais componentes, destacando as diferentes ciclinas e CDKs que participam da regulação deste evento. Adaptado de MALUMBRES & BARBACID, 2009.

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O CCR é a quarta neoplasia mais incidente e a quinta que mais causa mortes no mundo, e apesar do crescente conhecimento da base genética e molecular deste tipo de câncer, o desenvolvimento de um tratamento efetivo tem sido limitado. Particularmente, doenças metastáticas são fatais porque malignidades em estágio tardio respondem pobremente a regimes terapêuticos comuns, e o prognóstico dos pacientes é frequentemente ruim. Tratamentos utilizando alvos moleculares para o câncer têm sido relatados. No entanto, esses agentes estão baseados nas propriedades de tumores primários e, considerando que a transformação do fenótipo benigno para o maligno é crítica em CCR, é de fundamental importância elucidar a biologia que medeia a evolução metastática dessa doença. Nesse contexto, o LPA têm se mostrado uma importante molécula presente no microambiente tumoral atuando em diversos eventos envolvidos com a progressão do CCR, como migração, invasão, sobrevivência e proliferação. Ainda que haja um aumento nos conhecimentos relacionados com essa molécula, os mecanismos celulares e moleculares mediados por ela ainda não estão completamente elucidados, particularmente em CCR. Fica claro, então, a necessidade de se conhecer melhor o papel deste fosfolípeo em diversos eventos envolvidos na progressão tumoral, assim como as diversas vias de sinalização que interagem para regular tais eventos. Além disso, os resultados obtidos podem contribuir também para propor novos candidatos terapêuticos para o tratamento desta doença.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Investigar o papel do ácido lisofosfatídico em eventos celulares e moleculares relacionados com a progressão do câncer colorretal, assim como as vias de sinalização celular induzidas por este agente.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a expressão dos receptores de LPA 1, 2 e 3 nas linhagens derivadas de CCR com diferentes potenciais invasivos;
- Investigar o potencial migratório, invasivo, de crescimento independente de ancoragem e de proliferação dessas células após o tratamento com LPA;
- Elucidar as vias de sinalização participantes das alterações induzidas pelo LPA nos eventos mencionados acima;
- Investigar as alterações globais de expressão gênica mediadas pelo LPA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Anticorpos

4.1.1 Anticorpos primários

Tabela 4.1: Lista de anticorpos primários

Anticorpo	Fonte	Concentração usada para Western blot	Concentração usada para imunofluorescência	Empresa fabricante
anti-LPAR1 (EDG-2)	Coelho	1:1000	-	<i>Sigma-Aldrich St Louis, MO, EUA</i>
anti-LPAR2 (EDG-4)	Coelho	1:1000	-	<i>Santa Cruz Biotech Dallas, TX, EUA</i>
anti-LPAR3 (EDG-7)	Coelho	1:1000	-	<i>Sigma-Aldrich St Louis, MO, EUA</i>
anti-RhoA	Coelho	1:1000	-	<i>Cell Signaling Beverly, MA, EUA</i>
anti-ROCK 2	Coelho	1:1000	-	<i>Sigma-Aldrich St Louis, MO, EUA</i>
anti- β -actina	Camundongo	1:1000	-	<i>Santa Cruz Biotech Dallas, TX, EUA</i>
anti-STAT3	Camundongo	1:1000	-	<i>Cell Signaling Beverly, MA, EUA</i>
anti-p-STAT3 (Tyr 705)	Coelho	1:1000	1:40	<i>Cell Signaling Beverly, MA, EUA</i>
anti- β -catenina	Coelho	1:3500	1:250	<i>Sigma-Aldrich St Louis, MO, EUA</i>
anti- α -tubulina	Coelho	1:1000	-	<i>Cell Signaling Beverly, MA, EUA</i>
anti-GSK-3 β	Coelho	1:1000	-	<i>Cell Signaling Beverly, MA, EUA</i>
anti-p-GSK-3 β (ser9)	Coelho	1:1000	-	<i>Cell Signaling Beverly, MA, EUA</i>
anti-GAPDH	Coelho	1:3000	-	<i>Cell Signaling Beverly, MA, EUA</i>
anti-Ciclina A2	Coelho	1:2000	-	<i>Santa Cruz Biotech Dallas, TX, EUA</i>
anti-Ciclina E1	Camundongo	1:2000	-	<i>Santa Cruz Biotech Dallas, TX, EUA</i>
anti-Ciclina B1	Coelho	1:2000	-	<i>Sigma-Aldrich St Louis, MO, EUA</i>

4.1.2 Anticorpos secundários

Tabela 4.2: Lista de anticorpos secundários:

Anticorpo	Conjugação	Concentração usada	Empresa fabricante
anti-Camudongo	Peroxidase	1:5000	<i>Sigma-Aldrich St Louis, MO, EUA</i>
anti-Coelho	Peroxidase	1:5000	<i>Sigma-Aldrich St Louis, MO, EUA</i>
anti-Camudongo	Alexa488	1:300	<i>Invitrogen Carlsbad, CA, EUA</i>
anti-Coelho	Alexa488	1:300	<i>Invitrogen Carlsbad, CA, EUA</i>

4.2 Reagentes

Ácido Lisofosfatídico (LPA) (Sigma-Aldrich) foi mantido em solução estoque de 10 mM em etanol 20% e armazenado a -80°C, sendo usado a 10 µM (concentração final). O inibidor de ROCK (1 e 2), Y27632, (Calbiochem, La Jolla, CA, EUA) foi mantido a -20°C, na concentração de 5 mM, sendo usado na concentração final de 10 µM. O inibidor de STAT 3, STA-21 (Santa Cruz Biotech, Dallas, Texas, EUA) foi dissolvido em DMSO na concentração estoque de 10 mM, mantido a -20°C e utilizado na concentração final de 10 µM.

4.3 Cultura de células

Diferentes linhagens derivadas de CCR humano (Caco-2, HT-29 e HCT-116) e uma linhagem derivada de câncer de ovário (Ovcar-3) foram utilizadas nesse estudo. Células Caco-2 foram obtidas da ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA; catálogo CRL-2102). Essa célula é um modelo que sofre diferenciação morfológica e funcional de um enterócito quando em confluência, apresenta mutações em *APC*, *TP53* e *SMAD4* (ROWAN *et al.*, 2000; FLATMARK *et al.*, 2004). A linhagem HT-29 (ATCC: HTB-38) possui diferenciação e invasividade intermediária, e apresenta mutações em *BRAF*, *PIK3CA*, *TP53*, *SMAD4* e *APC* (ROWAN *et al.*, 2000; FLATMARK *et al.*, 2004; DOHI *et al.*, 2004). Já as células HCT-116 (ATCC: CCL-247) crescem em multicamadas, são indiferenciadas com alto potencial invasivo e metastático, carregam mutações em *K-RAS*, *PI3KCA* e no gene que transcreve a proteína β-catenina (*CTNNB1*), e possuem o gene *TP53* selvagem

(BRATTAIN *et al.*, 1981; ROWAN *et al.*, 2000; AHMED *et al.*, 2013). A linhagem Ovc3 (ATCC: HTB-161) é derivada de um adenocarcinoma de ovário, com receptores de andrógeno, de estrogênio e de progesterona positivos. Foi utilizada como controle positivo do tratamento com LPA, por ser conhecidamente responsiva a esse agente (SAWADA *et al.*, 2002). As linhagens celulares Caco-2, HT-29 e HCT-116 foram cultivadas em meio Dulbecco's modificado, DMEM (GIBCO BRL, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 60 mg/L de estreptomicina, 100 mg/L de penicilina G (Invitrogen), e mantidas a 37°C em uma atmosfera de 5% CO₂. Já a linhagem Ovc3 foi cultivada em meio RPMI-1640 (GIBCO BRL, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), 60 mg/L de estreptomicina, 100 mg/L de penicilina G (Invitrogen), e mantidas a 37°C em uma atmosfera de 5% CO₂. Para os experimentos, as células foram cultivadas em placas de cultura (6, 12, 24 ou de 96 poços), garrafas de 25 cm², lamínulas de vidro ou em filtros de policarbonato do tipo *Transwell*, com poros de 8,0 µm (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA).

4.4 Tratamento com LPA

Em todos os experimentos, exceto no ensaio de cristal violeta, as linhagens celulares foram inicialmente depletadas de SFB durante 24 horas e, posteriormente, submetidas ao tratamento com LPA na concentração final de 10 µM (LEVE *et al.*, 2011) nos tempos indicados. No ensaio de proliferação, por ser plaqueada uma quantidade pequena de células e o ensaio ser iniciado apenas 4 horas após o plaqueamento, as células não tiveram o SFB depletado.

4.5 Tratamento com inibidores de vias de sinalização

Com o objetivo de inibir a proteína ROCK I e II utilizou-se o inibidor Y27632. Para inibir o fator de transcrição STAT-3, foi utilizado o inibidor STA-21. Ambos foram utilizados na concentração final de 10 µM. As células depletadas de SFB por 24 horas foram pré-tratadas com os inibidores por 1 hora, para então serem incubadas com meio sem SFB contendo LPA e os inibidores, nos tempos indicados em cada tipo de experimento.

4.6 Obtenção do lisado proteico

Após os tratamentos, as células foram lavadas 2 vezes com PBS, e homogenizadas a 4°C em tampão de extração (Triton X-100 1%, Deoxicolato 0,5%, SDS 0,2%, NaCl 0,15 M, HEPES 10 mM pH 7,3, EDTA 2 mM), contendo coquetel de inibidores de proteases (1:100), fluoreto de sódio (NaF) 20mM, e ortovanadato (2 mM), todos obtidos da Sigma Co.. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.600 g por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante resultante, estocado em freezer a – 20 °C.

4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida usando sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE), *Immunoblotting* e análise densitométrica

Para análise do perfil de expressão das proteínas totais e fosforiladas, quantidades iguais de proteínas (30–60 µg) foram separadas por SDS-PAGE usando géis de 7,5, 10 e 13%. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando o aparelho de transferência semi-seco (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EUA) a uma diferença de potencial equivalente a 10 V por 60 minutos. Posteriormente, as membranas foram bloqueadas por 1 hora em uma solução de 5% de leite desnatado, ou 1% de leite desnatado juntamente com 1% de BSA, em TBS-T (Tris 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM, Tween-20 0,1%). Em seguida, foram incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos primários: anti- α -tubulina; anti- β -actina; anti-LPAR1; anti-LPAR2; anti-LPAR3; anti-ROCKII; anti- β -catenina; anti-fosfo-GSK3 β (Ser 9); anti-GSK3 β ; anti-fosfo-STAT3 (Tyr 705); anti-STAT3 II, anti-CiclinaA2; anti-CiclinaE1; anti-CiclinaB1; e anti-GAPDH, nas concentrações descritas na tabela 1, em TBS-T. Após duas lavagens com TBS-T (15 minutos cada), as membranas foram incubadas durante 60 minutos com os respectivos anticorpos secundários conjugados a peroxidase (HRP) na diluição de 1:5000. As membranas foram lavadas e a reatividade para as proteínas em estudo foi feita usando um kit de quimioluminescência (ECL). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria utilizando o software LabWorks 4.6 (Bio Rad Lab. Hercules, CA, EUA).

4.8 Imunofluorescência

As células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro inseridas em placas de 24 poços até atingirem a subconfluência. Posteriormente, foram depletadas de SFB por 24 horas, pré-tratadas ou não com os inibidores por 1 hora, e então tratadas com LPA juntamente com os inibidores, ou apenas com LPA, durante 6, 24, 48 e 72 horas para avaliar a localização da β -catenina e 15 minutos para avaliar a localização de STAT 3. Após os respectivos tratamentos, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e fixadas com metanol 100% a -20°C durante 20 minutos. Logo, as células foram re-hidratadas com PBS (pH 8.0) por 15 minutos e bloqueadas com BSA 0,2% em PBS (pH 8.0) durante 60 minutos. Posteriormente, foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários anti- β -catenina e anti-fosfo-STAT3, nas concentrações descritas na tabela 2, em BSA 0,2% contendo Triton X-100 0,1% em PBS (pH 8.0). Em seguida, foram realizadas novas lavagens com PBS (pH 8.0) e incubadas com os anticorpos secundários conjugados a Alexa 488 por 1 hora. Para marcação do núcleo, foi utilizado 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:1000) por 1 minuto. Posteriormente as lâminas foram montadas com reagente Antifade Gold ProLong (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), e observadas em microscópio confocal a laser (Fluoview FV10i Overview, Olympus, USA) acoplado a um programa de processamento de imagens (Olympus Fluoview FV1000).

4.9 Ensaio de atividade da GTPase RhoA

A avaliação dos níveis de atividade da GTPase RhoA foi feita utilizando o G-LISA™ *RhoA Activation Assay Biochem Kit*™ (Cytoskeleton, CO, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, enquanto a forma ativa de RhoA (ligada a GTP) presente nos lisados celulares se liga à proteína Rhotekina (uma efetora de RhoA) presente nos poços da placa contida no kit, a forma inativa, ligada a GDP, é removida durante as seguidas lavagens feitas durante o procedimento. A forma ativa de RhoA, ligada em sua efetora, é detectada através de incubação com anticorpo específico anti-RhoA, seguida de uma reação de quimioluminescência. Os valores foram representados em porcentagens e plotados em um gráfico.

4.10 Ensaio de migração

A migração celular foi avaliada através da técnica de *wound healing*. Células HT-29, HCT-116 e OVCAR-3 foram plaqueadas na densidade de 4×10^4 células/cm² e, após atingirem confluência foram depletadas de SFB por 24 h. Em seguida, um risco foi feito manualmente sobre a monocamada utilizando uma ponteira de micropipeta estéril. Para cada tratamento, foram feitos três riscos e três campos de cada risco foram selecionados e marcados. Após lavagem em PBS, meio de cultura contendo LPA, ou não, foi adicionado às células, que foram incubadas a 37°C. Células tratadas e não tratadas migraram para as áreas riscadas e foram fotografadas imediatamente (0 hora) e no final do experimento (16 ou 24 horas), em microscópio invertido (Zeiss Observer.Z1) acoplado a um programa de processamento de imagens AxioVision Release 4.8.2 (Zeiss). A distância entre as duas margens da monocamada celular riscada foi quantificada utilizando o Programa Adobe Photoshop 6.0 em três experimentos independentes. Os valores foram representados em porcentagens e plotados em um gráfico.

4.11 Invasividade celular

A invasão celular foi avaliada utilizando membranas *Transwell* com poros de 8,0 µm revestidos com Matrigel® (1:10), que contém os componentes de membrana basal (colágeno, laminina, proteoglicanos, enzimas e fatores de crescimento). As células Caco-2, HT-29, HCT-116 e OVCAR-3 ($2,5 \times 10^4$ células) foram cultivadas na câmara superior sobre o matrigel em meio depletado de SFB com ou sem tratamento com LPA. Na câmara inferior, foi utilizado meio contendo 20% de SFB como quimioatraente. Após 48 horas em 37°C, as células que invadiram o matrigel foram fixadas com etanol 100%, coradas com cristal violeta na concentração de 0,05% em etanol 20% e fotografadas em microscópio invertido (Zeiss Observer Z.1) acoplado a um programa de processamento de imagens AxionVision Release 4.8.2 (Zeiss).

4.12 Crescimento independente de ancoragem (CIA)

Placas de 12 poços foram revestidas com ágar 0,6% em meio DMEM contendo 10% de SFB. Após a solidificação a 4°C por 30 minutos, 250 células por poço foram suspensas em ágar 0,3% em DMEM contendo 10% de SFB na presença ou ausência de 10 μ M de LPA, e plaqueadas sobre a primeira camada de ágar. Após a solidificação, meio de cultura contendo 10% de SFB na presença ou ausência de 10 μ M de LPA foi adicionado. As células cresceram por duas semanas, trocando o meio de cultura a cada três dias. As colônias foram observadas em microscópio invertido (Zeiss Observer Z.1), contadas e os valores obtidos foram plotados num gráfico utilizando o programa GraphPad Prisma 4.0.

4.13 Proliferação celular

O número relativo de células viáveis foi determinado pelo ensaio de cristal violeta. Células Caco-2 (4×10^4), HT-29 ($2,5 \times 10^3$) e HCT-116 ($1,0 \times 10^4$) foram plaqueadas por 4 h em placas de 96 poços, incubadas com meio de cultura sem SFB e tratadas com LPA por 24, 48 e 72 horas. O meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS, fixadas com etanol absoluto por 10 minutos, e coradas com cristal violeta por 10 minutos na concentração de 0,05% em etanol 20% à temperatura ambiente. Após lavagem em água e secagem ao ar, o corante foi solubilizado com metanol e as densidades ópticas foram mensuradas em espectrofotômetro em 595 nm (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) e avaliadas utilizando o software Soft Max pro 4.3 LS.

4.14 Análise de morte celular por citometria de fluxo

Com o objetivo de analisar as mudanças na viabilidade e na morte celular causadas pelo LPA, células HCT-116 foram duplamente marcadas com Anexina-V e Iodeto de Propídeo (PI) e monitoradas através de citometria de fluxo. Após 24 horas do plaqueamento das células ($10^5 - 10^6$), o SFB foi depletado por 24 horas. Em seguida, as células foram tratadas com LPA em diferentes intervalos de tempo (24, 48 e 72 horas). Inicialmente, após os respectivos tratamentos, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas a 200 g por 2 minutos. Feito isso, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1 mL de PBS para, posteriormente, realizar a contagem de células usando o corante Azul de Tripán e

câmara de Neubauer. Após a padronização do número de células (5×10^5 mL), essas foram centrifugadas a 240 g a 4°C durante 2 minutos. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspensionado utilizando tampão e PI provenientes do FITC Annexin V *Apopstosis Detection Kit I* (BD Biosciences, CA, EUA). Após um intervalo de 15 minutos, foi feita a leitura no citômetro de fluxo (BD Transduction Labs, Lexington, KY, EUA). Células com marcação positiva, apenas para Anexina V, foram classificadas como em apoptose inicial; com marcação positiva para Anexina V e PI, como estando em apoptose tardia; com marcação positiva, apenas para PI, como estando em necrose; e com marcação negativa para Anexina V e PI, como células viáveis.

4.15 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo

Com o objetivo de analisar as mudanças no ciclo celular ocasionadas pelo LPA e pelos inibidores, células HCT-116 foram analisadas através da marcação com iodeto de Propídeo (PI). Após 24 horas do plaqueamento das células ($10^5 - 10^6$), o SFB foi depletado por 24 horas. Em seguida, as células foram pré-tratadas com os inibidores ou não por 1 hora, para então serem tratadas apenas com LPA, ou com LPA e os inibidores, em diferentes intervalos de tempo (8, 12 e 16 horas). Inicialmente, após os respectivos tratamentos, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas a 240 g por 2 minutos. Feito isso, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 1 mL de PBS para, posteriormente, realizar a contagem de células usando o corante Azul de Tripán e câmara de Neubauer. Após a padronização do número de células (5×10^5 /mL), essas foram centrifugadas a 240 g a 4°C durante 2 minutos. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspensionado com 300 μ l de tampão PI (Tris -HCl 3,4mM (pH 7,6), NaCl 10mM, Triton X-100 0,2%, RNase 3500 U/L, PI 0,075mM). Após um intervalo de 10 minutos, foi feita a leitura no citômetro de fluxo (BD Transduction Labs, Lexington, KY, EUA). A análise das fases do ciclo celular foi feita utilizando o programa ModFit LT.

4.16 Ensaio de luciferase para a atividade de TCF

Com o objetivo de analisar a atividade nuclear de β -catenina, células HCT-116 (2×10^4 células) foram plaqueadas em placa de 24 poços. Após 24 horas, as células foram transfectadas com dois diferentes genes reporter TCF luciferase: um plasmídeo TCF-luciferase Super8x TOPflash (*wild-type*) e o outro plasmídeo mutado o Super8x FOPflash, o qual serve como controle negativo para a atividade do Super8x TOPflash. As células foram co-transfectadas transientemente com 2 μ g de Super8x TOPflash ou FOPflash com 0,2 μ g de PRL-TK Renilla luciferase. Para a realização da co-transfecção foi utilizado 3 μ l de FuGENE® 6 Transfection Reagent (Roche Applied Science, Basel, Switzerland). Após um intervalo de 24 horas de transfecção, onde as células ficavam num meio sem SFB, as células foram lavadas 2 vezes com PBS, e em seguida tratadas com LPA durante 6 e 24 horas. Em seguida, as células foram lisadas com auxílio do Kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega, Madison WI, EUA). Foi utilizado o Luminômetro de placas Veritas (Turner Biosystems) para realizar a leitura. A atividade da luciferase foi normalizada pela atividade da Renilla luciferase, controle da taxa de transfecção, e os valores plotados no gráfico.

4.17 Análise de expressão gênica diferencial por *Chiparray*

Para os ensaios de *chiparray*, os mRNAs das células não tratadas e tratadas com LPA por 12 horas foram extraídos utilizando o *Rneasy Mini kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA) segundo as instruções do fabricante. Posteriormente, 100 ng de RNA total foi reversamente transcrito e o DNA obtido foi marcado de acordo com o protocolo do kit *GeneChip whole transcription (WT) sense target labeling assay* (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Em seguida, o DNA foi hibridizado contra o *GeneChip human gene 1.0 ST array* (Affymetrix), o qual possui sondas que cobrem todo o genoma. As informações sobre hibridização foram avaliadas no *GeneChip® Scanner 3000* e analisadas no programa *GeneChip® Operating Software (GCOS)* (Affymetrix). Os dados obtidos foram então analisados com o auxílio do *software PARTEK* (www.partek.com). Para a tabela com as alterações globais, incluída no anexo, foram considerados apenas aqueles genes com aumento ou redução de duas vezes na expressão gênica após o tratamento com LPA.

4.18 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Para cada experimento, os dados das triplicatas foram calculados e foi feita a análise de significância utilizando os seguintes testes: *one-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni para análise do ciclo celular e da densitometria proteica da expressão das ciclinas; *two-tailed* ANOVA com pós-teste de Bonferroni para proliferação celular com cristal violeta; e teste *t-student* para análise da migração, da invasão, do crescimento independente de ancoragem, da atividade de TCF e da densitometria proteica. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Análise da expressão dos receptores de LPA (LPA1-3) nas linhagens derivadas de câncer de cólon Caco-2, HT-29 e HCT-116

O primeiro passo do trabalho, antes de tratar as células com LPA, foi avaliar o perfil de expressão dos três principais receptores de LPA (LPA1-3) nas linhagens usadas. Para isso, foi feita a extração proteica das células para a análise da expressão por meio de *western blotting*. Os resultados da Figura 5.1 mostram que esses receptores são expressos nas três linhagens analisadas, porém em níveis diferentes. As células com um baixo grau de invasividade, Caco-2, apresentaram uma expressão elevada apenas do LPA2. Já em relação às linhagens invasivas, as células HT-29 apresentaram uma alta expressão de todos os três receptores, enquanto as células HCT-116 expressavam altos níveis de LPA 2 e 3. Dessa forma, visto que os principais receptores de LPA são expressos em todas as linhagens estudadas, indicando que são responsivas ao LPA, prosseguimos com os ensaios subsequentes.

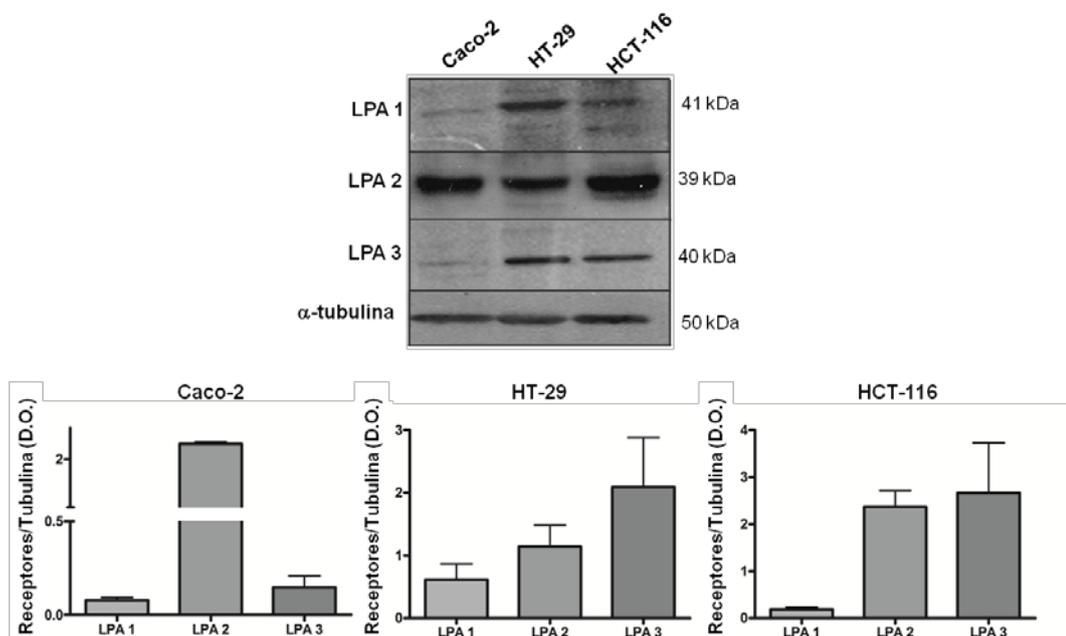


Figura 5.1: Perfil de expressão dos receptores de LPA (LPA1-3). Os lisados celulares de Caco-2, HT-29 e HCT-116 foram obtidos e a expressão dos receptores de LPA1-3 foi analisada por *western blotting*. A linhagem Caco-2 apresentou uma expressão elevada apenas do LPA2, enquanto HCT-116 possui uma alta expressão de LPA2 e 3, e HT-29 de todos os três receptores. Os gráficos de barras mostram a quantidade relativa das proteínas normalizada pela tubulina. As barras de erro indicam o erro padrão (n=3).

5.2 O LPA não aumenta a migração, a invasão e o crescimento independente de ancoragem nas células derivadas de câncer de cólon analisadas

Diversos estudos vêm mostrando que o LPA modula efeitos pró-tumorais em diferentes tipos de câncer (LIN *et al.*, 2010). Em concordância, um estudo recente publicado por LEVE *et al.* (2011) mostrou que o LPA aumenta a migração de células Caco-2. Sendo assim, após a confirmação da expressão dos principais receptores de LPA nas linhagens em estudo (Fig.5.1), as células HCT-116 e HT-29 foram tratadas com LPA na concentração previamente estabelecida de 10 μ M, a fim de avaliar se esse fosfolípido modulava alterações no potencial migratório, invasivo e de sobrevivência dessas células.

Através do ensaio de *wound healing*, foi observado que as células não tratadas migraram para a área livre, praticamente fechando toda a área disponível, após 24 (HCT-116) ou 16 horas (HT-29) do rompimento da monocamada. Ao contrário do que foi descrito para as células Caco-2, o LPA não foi capaz de aumentar o potencial migratório das células HT-29 e HCT-116 (Fig. 5.2, B e C). A linhagem OVCAR-3, derivada de câncer de ovário foi utilizada como controle positivo por ser conhecidamente responsiva ao LPA no aumento da migração (Fig. 5.2 A).

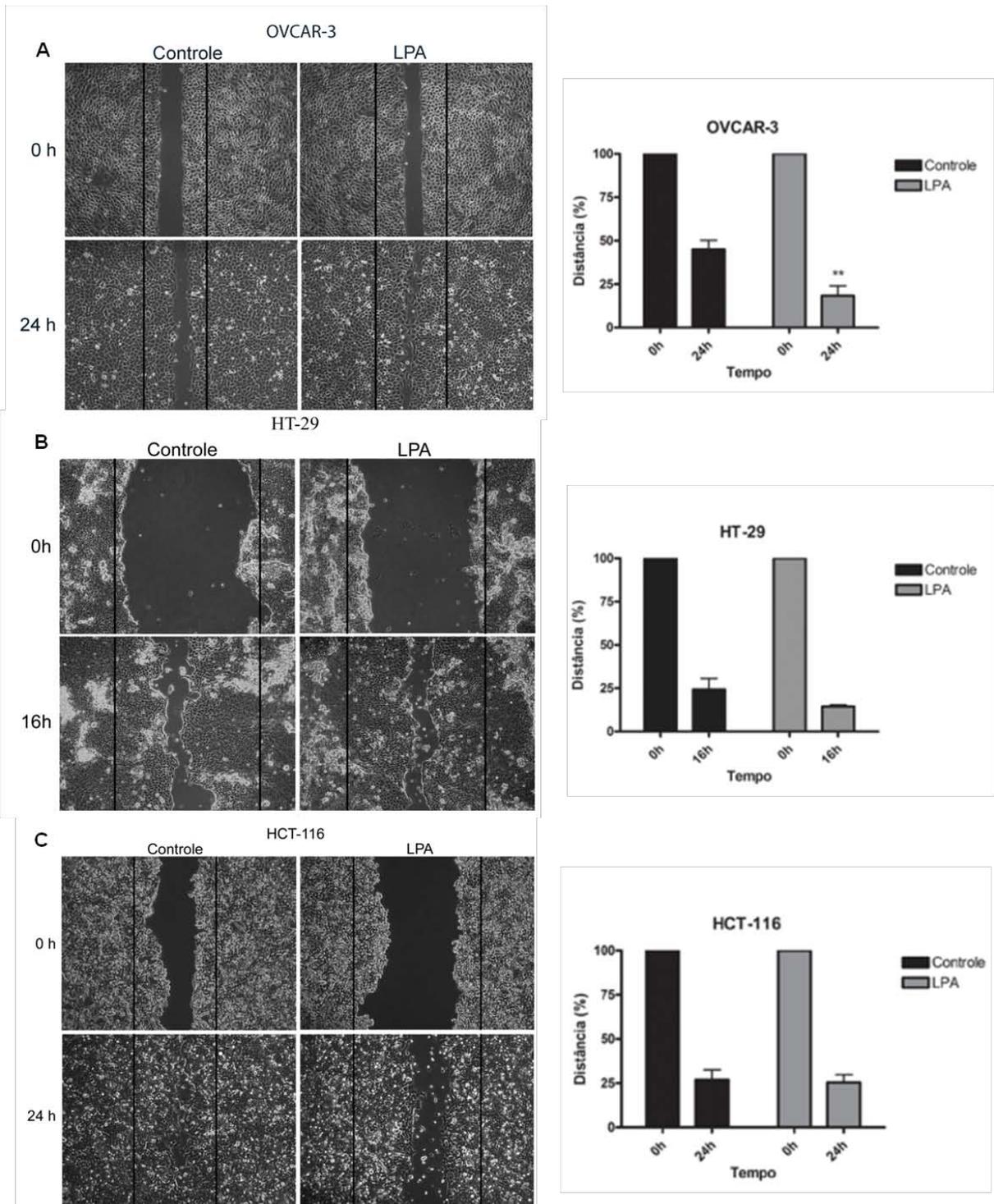


Figura 5.2: O tratamento com LPA não altera a migração celular das linhagens HT-29 e HCT-116. Células de carcinoma de cólon e de ovário (OVCAR-3) foram depletadas de SFB por 24 horas e subsequentemente tratadas com LPA (10 μ M) nos tempos indicados. A migração foi avaliada através do ensaio de *wound-healing*. O LPA não foi capaz de aumentar o potencial migratório de HT-29 e de HCT-116 (B e C). A análise estatística utilizada foi o teste *t-student*. (** $p < 0,01$).

Tem sido mostrado que o LPA aumenta a capacidade invasiva de diversos tipos celulares, incluindo da linhagem de câncer de ovário OVCAR-3 (SAWADA *et al.*, 2002). Assim, decidimos também testar a capacidade deste agente em aumentar o potencial invasivo nas células de adenocarcinoma de cólon Caco-2, HCT-116 e HT-29 usando insertos *transwell* revestidos com Matrigel®. Conforme mostrado na Figura 5.3, o tratamento com LPA não aumentou a capacidade invasiva das células Caco-2, HT-29 e HCT-116. No entanto, conforme esperado, esse agente induziu a invasão das células OVCAR-3.

Além dos aspectos abordados, é conhecido que a tumorigenicidade celular pode ser avaliada *in vitro* através do ensaio de crescimento independente de ancoragem (CIA). Por isso, decidimos verificar se o LPA aumenta o CIA das células Caco-2, HT-29 e HCT-116. Os resultados da Figura 5.4 mostram que as três linhagens são capazes de crescer mesmo na ausência de adesão ao substrato, formando colônias. Entretanto, o tratamento com 10 μ M de LPA não alterou estatisticamente o número de colônias formadas em relação ao controle, de todas as células usadas, mesmo tendo sido observado um aparente aumento na linhagem Caco-2. Em conjunto, esses resultados demonstram que o LPA não modula a migração, invasão e sobrevivência de células invasivas de câncer de cólon (HCT-116 e HT-29), assim como a invasão e sobrevivência nas células Caco-2.

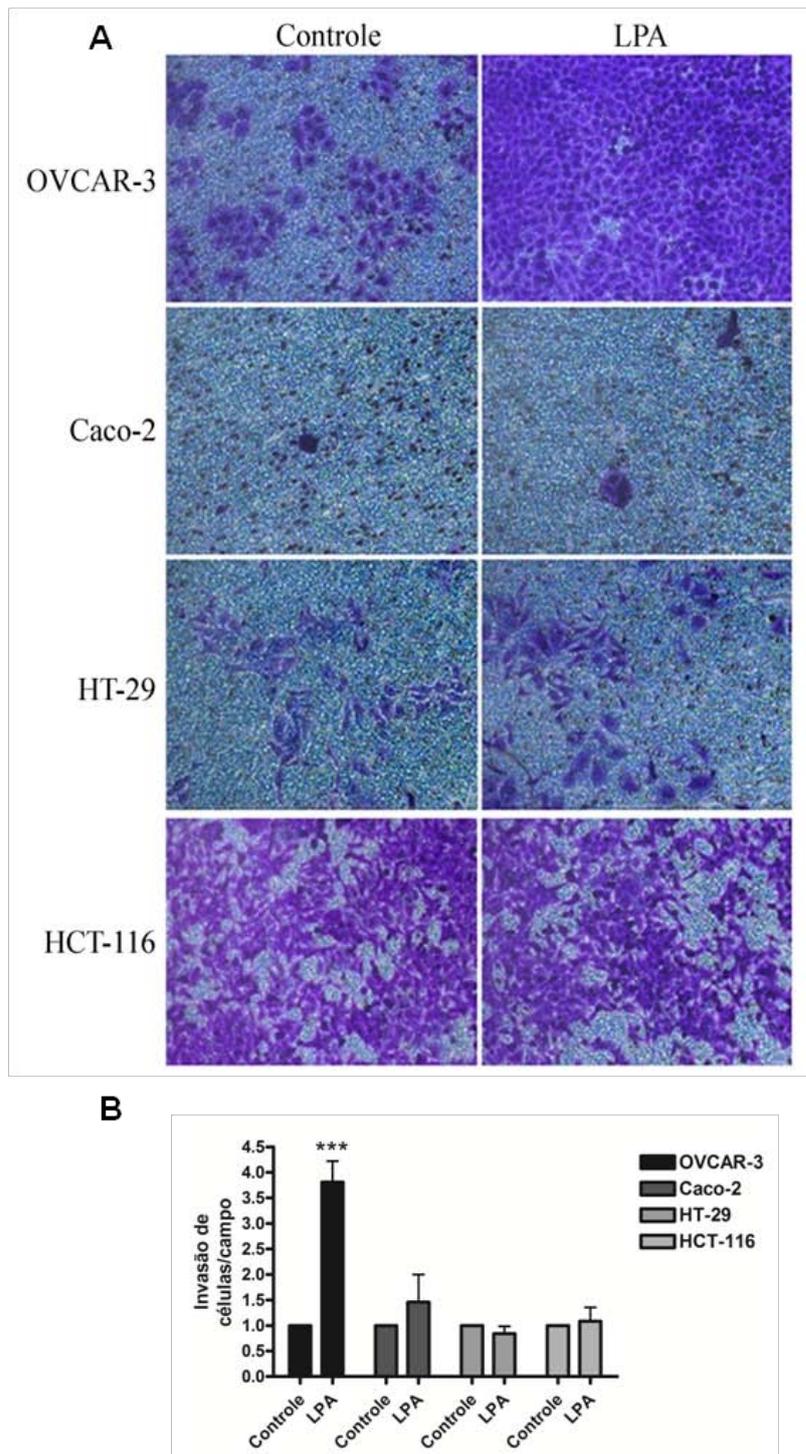


Figura 5.3: O LPA não altera a invasividade celular nas linhagens de câncer de cólon. Células depletadas de SFB durante 24 horas foram crescidas em insertos *transwell* revestidos com Matrigel® e tratadas com LPA (10 μ M) por 48 horas. A) Imagens representativas de três experimentos independentes mostrando as células que atingiram a câmara inferior dos insertos coradas com cristal violeta. B) As células capazes de invadir o Matrigel® foram contadas e os valores obtidos normalizados para 1 (controle) e plotados no gráfico. A linhagem OVCAR-3 foi utilizada como controle positivo. A análise estatística utilizada foi o teste *t-student* (***) $p < 0,001$.

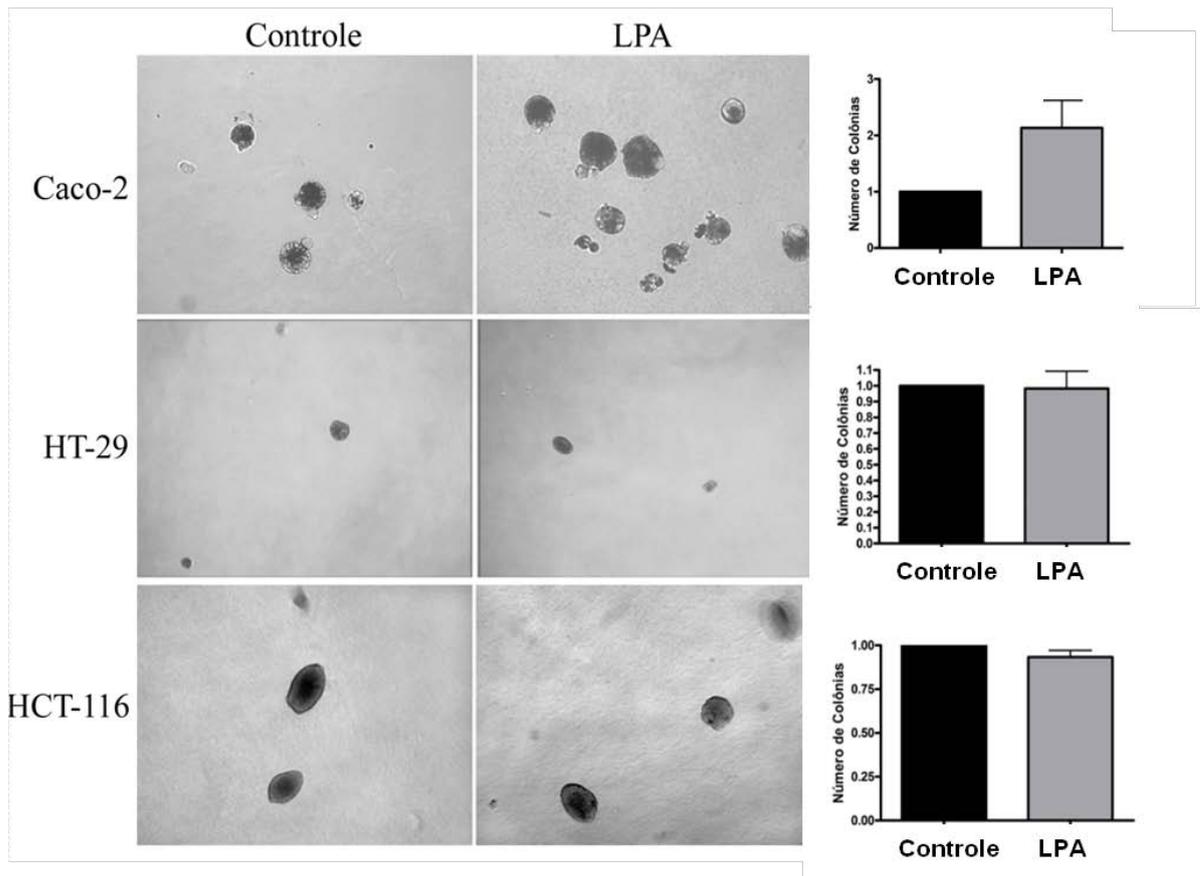


Figura 5.4: O LPA não aumenta o crescimento independente de ancoragem nas linhagens invasivas de câncer de cólon. Células plaqueadas em um substrato de agarose cresceram por 14 dias na presença ou ausência de 10 μM de LPA. As colônias formadas foram contadas e o número encontrado foi normalizado para 1 (controle) e plotado nos gráficos. A análise estatística utilizada foi o teste *t-student*.

5.3 Efeito do tratamento com LPA sobre a proliferação de células de adenocarcinoma de cólon

Considerando que o aumento do potencial proliferativo, assim como a redução da morte celular, são dois importantes *Hallmarks* do câncer (HANAHAN & WEINBERG, 2011), e visto que o LPA modula o aumento de proliferação e de evasão de morte celular em diversos tipos celulares derivados de câncer de cólon (YANG *et al.*, 2005; RUSOVICI *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007), decidimos verificar se esse agente era capaz de alterar o perfil proliferativo das células Caco-2, HT-29 e HCT-116. Através da técnica de cristal violeta, nossos resultados mostraram que o LPA causou um aumento no número de células da linhagem HCT-116 após 48 e 72 horas de tratamento, mas não em Caco-2 e HT-29 (Fig. 5.5).

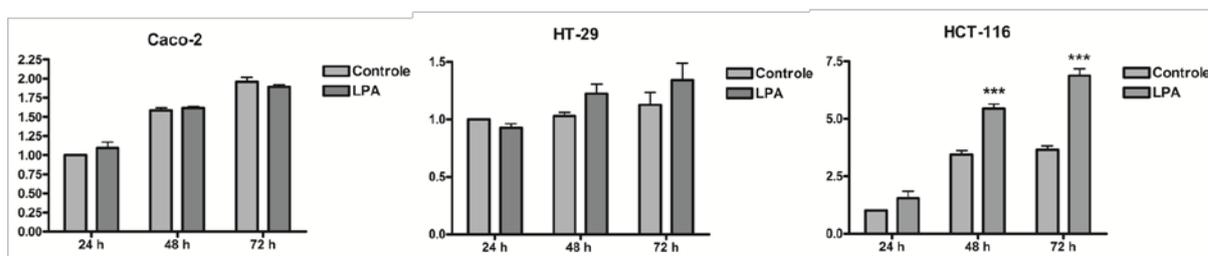


Figura 5.5: O LPA aumenta o número relativo de células HCT-116. As células foram tratadas com LPA (10 μ M) durante 24, 48 ou 72 horas e a proliferação celular foi quantificada usando a técnica de cristal violeta a 595 nm. O LPA aumentou apenas o número relativo de células em HCT-116. A análise estatística utilizada foi o *two-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni (***) $p < 0.001$.

Para verificar se o aumento no número relativo de células HCT-116 mediado pelo LPA foi ocasionado por um aumento na proliferação ou por uma redução na morte celular, foram feitos os ensaios de morte celular utilizando anexina V/Iodeto de Propídeo (PI) e análise de ciclo celular, ambos por citometria de fluxo (Fig 5.6 e Fig. 5.7, respectivamente). Num primeiro momento, as células foram tratadas ou não com LPA durante 24, 48 e 72 horas e então, avaliadas para morte celular. Nesse ensaio, células negativas para PI e para anexina V são consideradas viáveis; positivas apenas para anexina V em apoptose inicial; positivas para ambos os marcadores em apoptose tardia; e por fim, positivas apenas para PI em necrose. Não foram observadas alterações entre as populações tratadas e não tratadas com LPA, indicando que a diferença encontrada anteriormente foi ocasionada por um aumento na proliferação celular (Fig. 5.6).

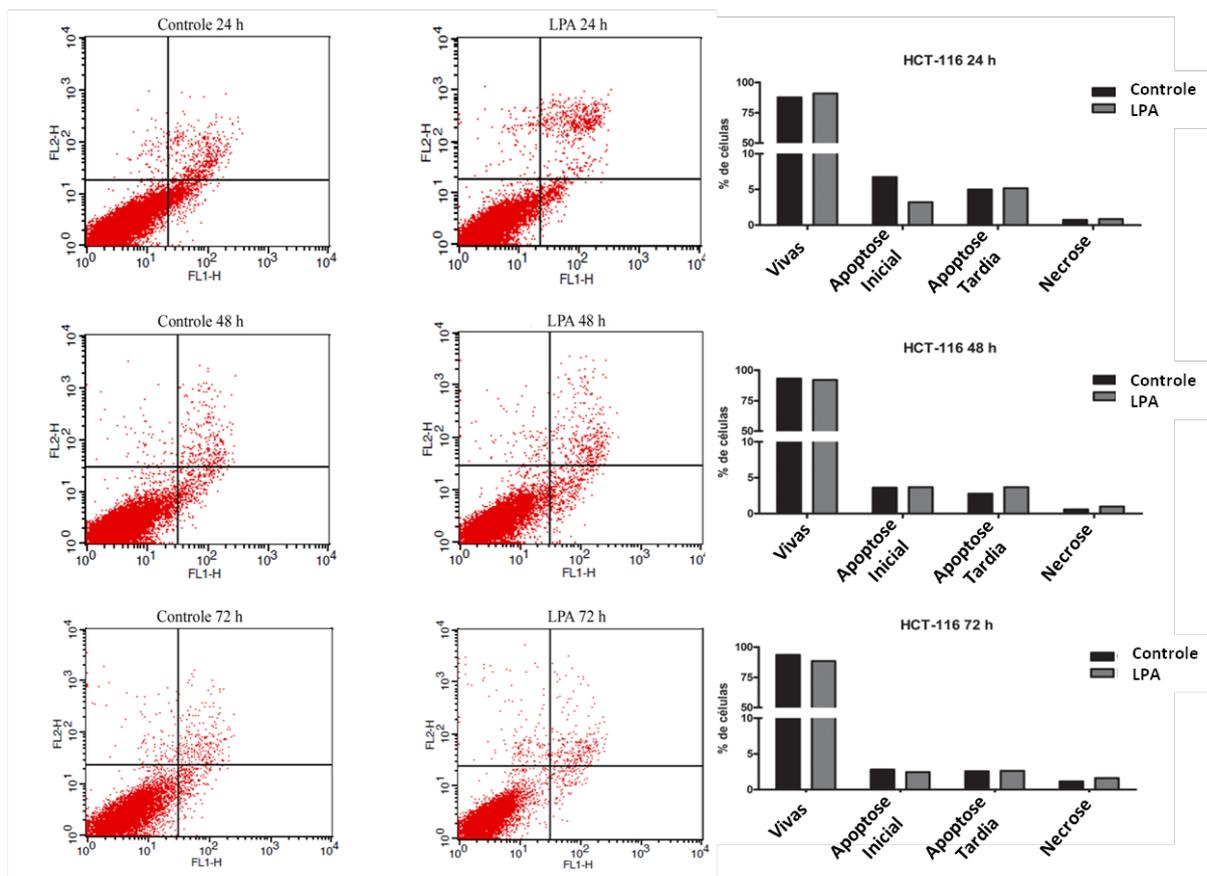


Figura 5.6: O LPA não reduz os níveis de morte celular em HCT-116. Células HCT-116 foram crescidas até a subconfluência (70%), depletadas de SFB por 24 horas e então, tratadas com LPA nos respectivos tempos, em experimento único. Em seguida, foram tripsinizadas, marcadas com Anexina V e PI para análise em citometria de fluxo. A porcentagem de cada população celular foi plotada nos gráficos à direita. FL1-H, marcação para Anexina V; FL2-H, marcação para PI.

Em seguida, foi feita a análise do ciclo celular por citometria de fluxo utilizando PI como marcador. Células HCT-116 foram depletadas de SFB por 24 horas no intuito de sincronizar as células em fase G1 do ciclo celular, e então tratadas com LPA durante 8, 12 e 16 horas. Foi visto que as células não tratadas (controle) permaneceram paradas na fase G1 do ciclo celular. Por outro lado, as células tratadas com LPA começaram a progredir pelo ciclo celular a partir de 8 horas de tratamento, sendo visto um aumento evidente e estatisticamente significativo nas populações presentes na fase S-G2/M do ciclo celular após 12 e 16 horas de tratamento, indicando que o LPA estava promovendo a proliferação (Fig. 5.7).

Juntos, esses resultados confirmam que a diferença no número relativo de células HCT-116 encontrada após 48 e 72 horas de tratamento com LPA (Fig. 5.5) foi promovida por um aumento na proliferação celular, e não por uma redução na morte daquelas células tratadas com esse fosfolípido.

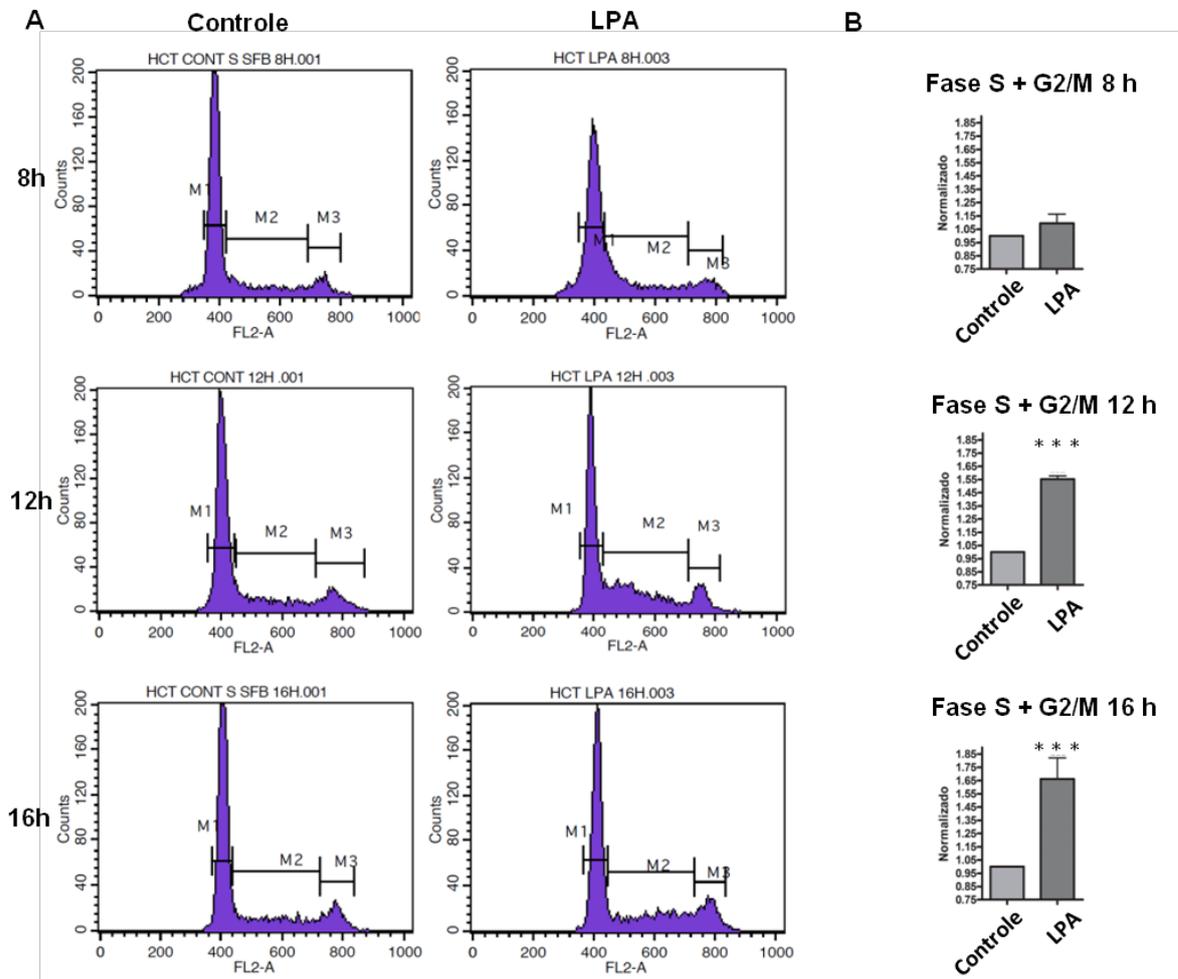


Figura 5.7: O LPA induz a progressão do ciclo celular em HCT-116. A) Células HCT-116 foram crescidas até a subconfluência (70%), depletadas de SFB por 24 horas e então, tratadas com LPA nos tempos indicados. Em seguida, foram tripsinizadas, marcadas com PI para análise de ciclo celular por citometria de fluxo. Foi observado um aumento no número de células na fase S e na fase G2/M após 12h e 16h de tratamento com LPA. M1: células em G1; M2: células em S; M3: células em G2/M. B) Gráfico normalizado em relação a porcentagem de células presentes nas fases S e G2/M do ciclo celular do controle. A análise estatística utilizada foi o *one-way* ANOVA (***) $p < 0.001$.

5.4 O tratamento com LPA aumenta a proliferação na linhagem HCT-116 através da ativação da via da GTPase RhoA e de sua efetora ROCK

Uma vez que o LPA provocou aumento de proliferação apenas nas células HCT-116, essa foi a única linhagem utilizada nos experimentos subsequentes, e esse evento foi o único onde se investigou as vias de sinalização participantes.

Após a confirmação da proliferação induzida pelo LPA (Figs. 5.6 e 5.7), foi investigada a via de sinalização que estaria participando desse evento. Como mencionado anteriormente, o LPA é um clássico ativador da GTPase Rho (WILLIER *et al*, 2013), sendo esta então a primeira via analisada.

A fim de avaliar a participação de RhoA no aumento de proliferação de células HCT-116 mediado por LPA, foi realizado o ensaio de atividade de RhoA usando um kit específico, descrito na seção de materiais e métodos. Como esperado, o tratamento das células HCT-116 com 10 μ M de LPA aumentou a atividade da GTPase RhoA nos tempos de 5 e 15 minutos (Fig. 5.8 A). Em seguida, foi avaliada a participação desse lipídeo na expressão de ROCK 2, uma das principais efetoras de RhoA. Na Figura 5.8 B, podemos observar um aumento de expressão dessa proteína após 72 horas de tratamento com LPA. Esses dados em conjunto indicam que o LPA estaria modulando a via RhoA-ROCK 2 em HCT-116.

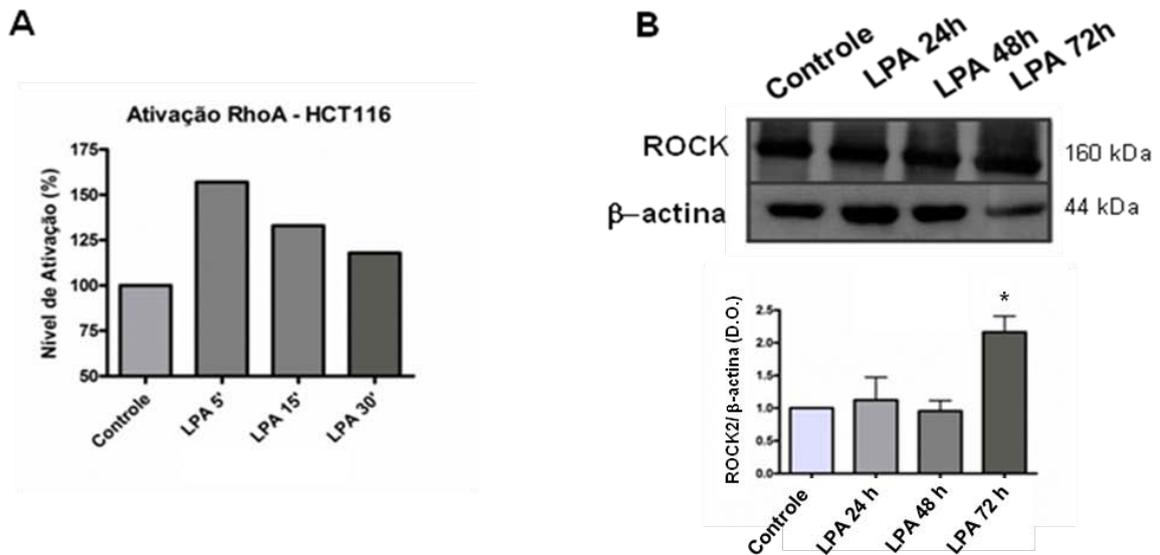


Figura 5.8: O LPA aumenta a atividade da GTPase RhoA e a expressão de ROCK 2. A linhagem HCT-116 foi crescida até a subconfluência (70%), depletada de SFB por 24 horas e tratada com LPA (10 μ M) nos tempos indicados. A) Os lisados celulares de HCT-116 foram submetidos à análise da atividade de RhoA por meio da técnica G-lisa, em experimento único. Note que o LPA aumentou a atividade de RhoA após 5 e 15 minutos de tratamento. B) A expressão de ROCK foi verificada através da técnica de *western blotting*. Os gráficos de barras mostram a quantidade relativa das proteínas normalizada pela β -actina. As barras de erro indicam o erro padrão (n=3). A análise estatística utilizada foi o teste *t-student* (* $p < 0.05$). O LPA aumentou a expressão de ROCK após 72 horas de tratamento em relação ao grupo controle. D.O.:Densidade Óptica.

Para verificar se ativação da via de sinalização Rho-ROCK estaria modulando o aumento da proliferação das células HCT-116 induzido pelo LPA, foram feitos os ensaios de proliferação e análise da progressão do ciclo celular utilizando um inibidor farmacológico de ROCK (Y27632). Como visto na Figura 5.9 A, a inibição de ROCK preveniu o aumento no número relativo de células em 48 horas de tratamento com LPA. Além disso, na Figura 5.9 B, foi observado que o inibidor Y27632 foi capaz de prevenir a progressão do ciclo celular induzida após 12 horas de tratamento com LPA. Em conjunto, esses resultados confirmam os dados da Figura 5.8, que indicava a ativação da via Rho-ROCK, e demonstram que o LPA induz proliferação em HCT-116 através da ativação desta via.

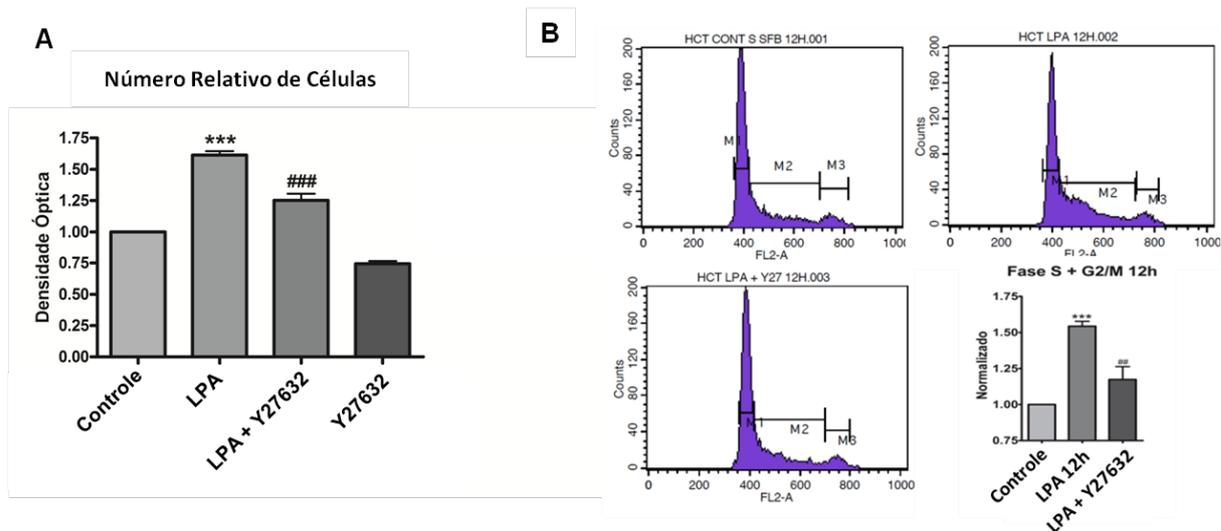


Figura 5.9: A inibição de ROCK previne o aumento na proliferação de células HCT-116 e a progressão do ciclo celular promovido pelo LPA. A) A linhagem HCT-116 foi tratada como indicado e a proliferação celular foi avaliada pela técnica de cristal violeta após 48 horas. Os valores foram normalizados para 1 (controle) e plotados no gráfico. A inibição de ROCK preveniu o aumento no número de células mediado pelo LPA. A análise estatística utilizada foi o teste *two-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni. (***) $p < 0.001$ em relação ao controle; ### $p < 0.001$, em relação ao tratamento com LPA). B) Análise de ciclo celular por citometria de fluxo utilizando PI como marcador. As células foram pré-tratadas ou não com Y27632 por 1 hora, e então tratadas como indicado por 12 horas. A porcentagem de células presentes na fase S-G2/M foi normalizado para 1 (controle) e plotada no gráfico. A inibição de ROCK diminuiu o número de células na fase S e na fase G2/M do ciclo celular após o tratamento com LPA. A análise estatística usada foi o teste *one-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni (***) $p < 0.001$ em relação ao controle; ## $p < 0.01$, em relação ao tratamento com LPA).

5.5 O LPA não modula a atividade transcrricional de β -catenina

Sabe-se que o LPA é capaz de induzir a atividade transcrricional de β -catenina em alguns tipos celulares (YANG *et al.*, 2005). Além disso, foi mostrado que a ativação da via Rho-ROCK pode também promover tal efeito em queratinócitos (SAMUEL *et al.*, 2011). Sendo assim, decidimos verificar se a ativação da via Rho-ROCK induzida pelo LPA modulava a atividade transcrricional de β -catenina para mediar o aumento de proliferação celular em nosso modelo de estudo. Com esta finalidade, foi realizado o *western blotting* para avaliar a expressão de β -catenina, assim como os níveis de fosforilação de GSK-3 β , uma enzima que inibe a ação transcrricional de β -catenina. A Figura 5.10 A mostra que o tratamento com LPA por 24h aumentou significativamente os níveis proteicos de β -catenina, mas de forma reversível. Além disso, a proteína GSK-3 β teve os níveis de fosforilação de seu

resíduo de inibição (serina 9) aumentados a partir de 5 minutos até o tempo de 1h de tratamento com LPA (Fig. 5.10 B), sugerindo que o LPA poderia modular a inibição de GSK-3 β permitindo assim a indução da atividade nuclear de β -catenina.

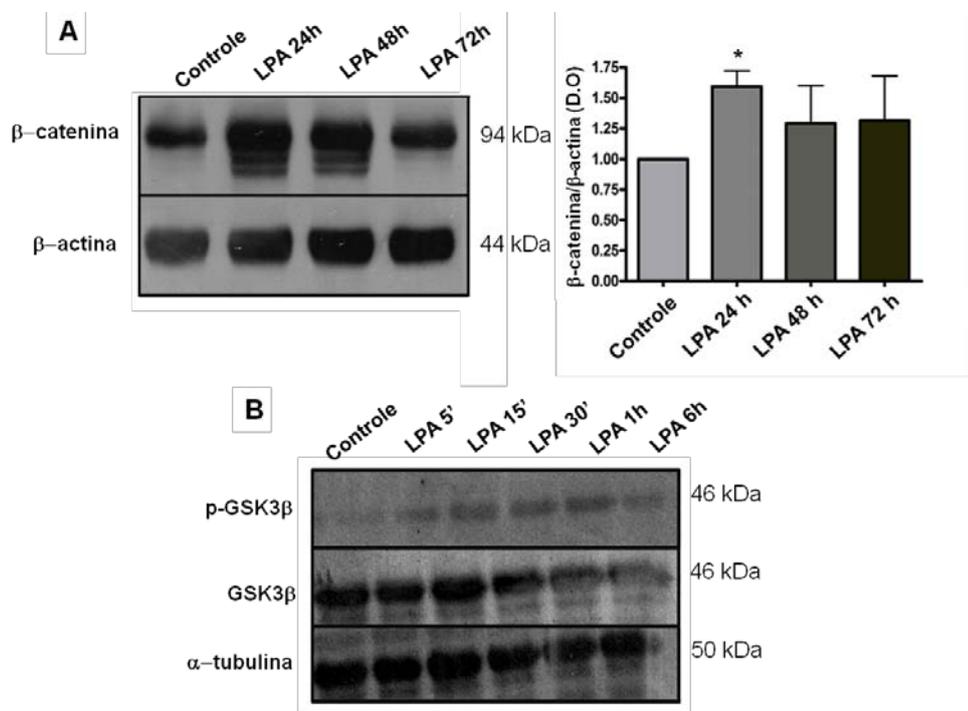


Figura 5.10: O LPA aumenta a expressão de β -catenina e a fosforilação de GSK-3 β . Células HCT-116 foram tratadas com LPA nos tempos indicados. Os lisados celulares foram analisados por *western blotting* para determinar a expressão de β -catenina (A), em três experimentos independentes, e para fosforilação no resíduo serina 9 de GSK-3 β (B), em experimento único. Os gráficos de barras mostram a quantidade relativa das proteínas normalizada pela β -actina. As barras de erro indicam o erro padrão (n=3). O LPA aumentou a expressão de β -catenina após 24 horas de tratamento e aumentou os níveis de fosforilação de GSK-3 β , sugerindo ativação da via de β -catenina. A análise estatística utilizada foi o teste *t-student* (* $p < 0.05$).

Para confirmar a ativação transcricional de β -catenina, foi feita uma imunofluorescência em culturas confluentes de HCT-116 a fim de avaliar se o tratamento com LPA alterava a localização desta proteína. A Figura 5.11 mostra que a β -catenina se localiza predominantemente na região de contato célula-célula no grupo controle. O tratamento com LPA não alterou a localização de β -catenina em nenhum dos tempos analisados (6, 24, 48 e 72 horas) (Fig. 5.11), não sendo possível observar translocação nuclear desta proteína. Ainda, foi feita uma análise da atividade transcricional de β -catenina utilizando um plasmídeo contendo uma região de reconhecimento por parte do TCF/Lef, conjugado à luciferase. Não foi observada nenhuma alteração na atividade transcricional de β -catenina após 6 e 24

horas de tratamento com LPA (Fig. 5.12). Juntos, esses resultados indicam que, embora o LPA medeie o aumento nos níveis proteicos de β -catenina e de fosforilação de GSK-3 β , esse fosfolípídeo não modula a ativação transcricional de β -catenina, uma vez que não foi observada sua localização nuclear nem um aumento na atividade de TCF/Lef.

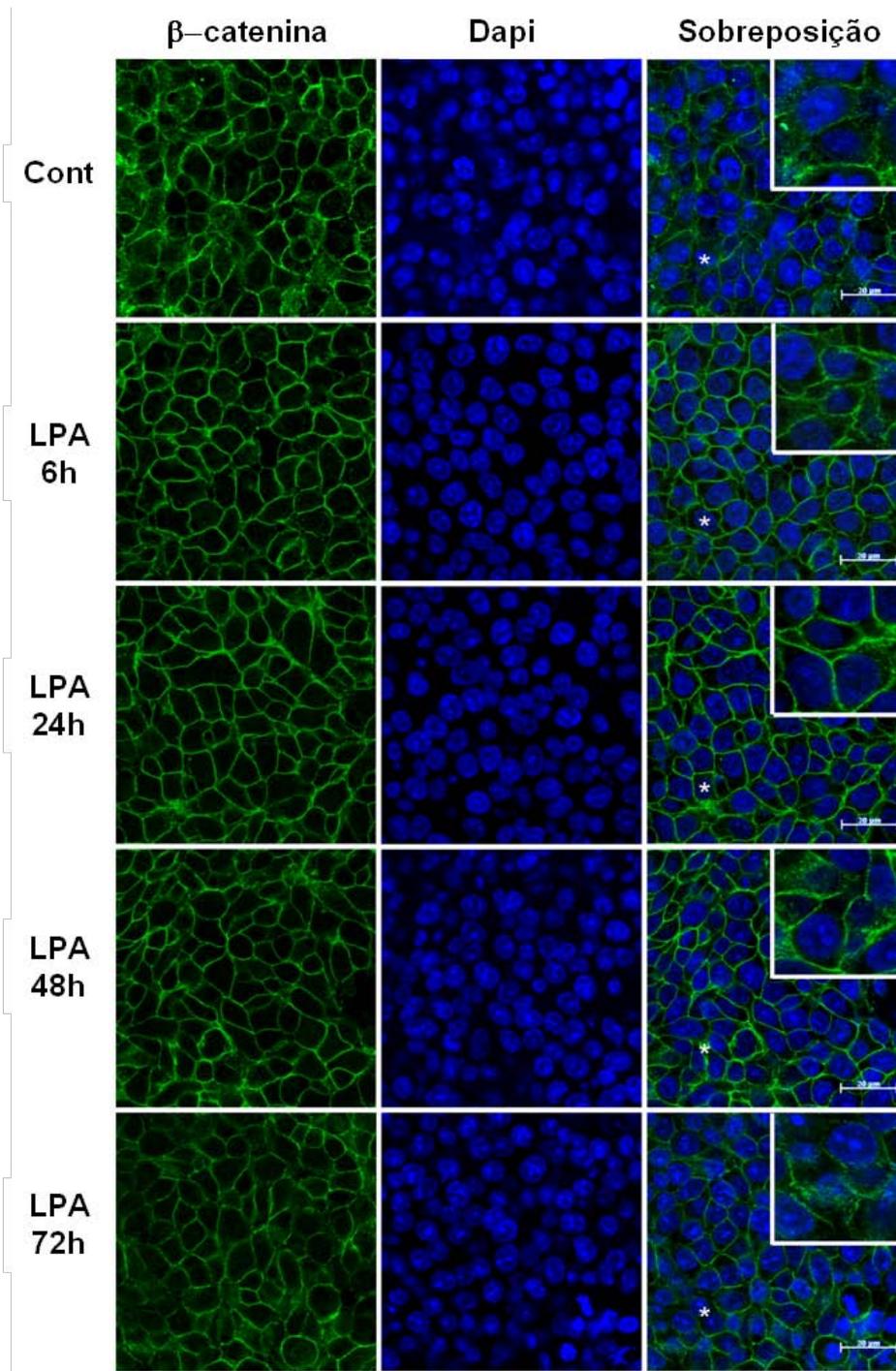


Figura 5.11: O LPA não medeia a translocação nuclear de β -catenina em HCT-116. Células HCT-116 foram crescidas em lâminulas até a confluência, depletadas de SFB por 24 horas e tratadas com LPA (10 μ M) por 6, 24, 48 e 72 horas. As células foram processadas para imunofluorescência com anticorpos específicos para detecção de β -catenina (Verde) e com DAPI para coloração nuclear (Azul), e observadas em microscópio confocal. O LPA não causou a translocação nuclear de β -catenina, mantida predominantemente nos contatos célula-célula em todos os tempos analisados. Cont: Controle. Barra: 20 μ m. Insertos localizados no canto direito superior representam um aumento de 4 X do local demarcado com *.

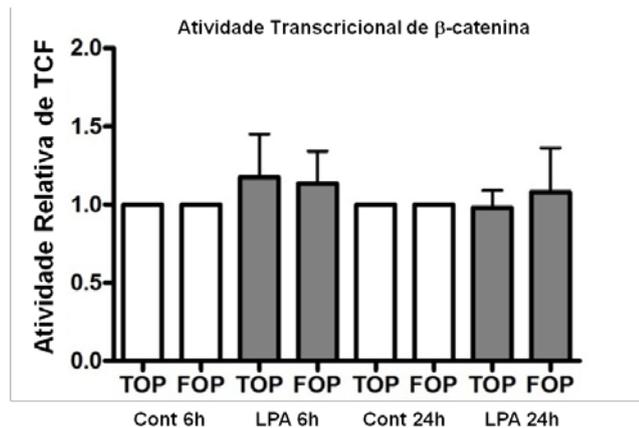


Figura 5.12: O LPA não aumenta a atividade transcricional de β-catenina. Células HCT-116 foram crescidas até a subconfluência (70%), depletadas de SFB por 24 horas e tratadas com LPA nos tempos indicados. As células foram transfectadas usando o gene repórter com a sequência selvagem de TCF (TOP) e com a sequência mutada de TCF (FOP), ambos conjugados à sequência da luciferase. A atividade da luciferase foi normalizada pela atividade da Renila luciferase. O LPA não aumentou a atividade nuclear de β-catenina nos tempos indicados. O gráfico é representativo de três experimentos independentes. A análise estatística utilizada foi o teste *t-student*.

5.6 O LPA é capaz de ativar o fator transcricional STAT 3

Uma vez que o LPA não ativou a via de β-catenina, buscamos outro fator transcricional capaz de regular o aumento de proliferação nas células HCT-116, induzido por esse agente lipídico. É conhecido que o LPA é capaz de ativar STAT 3 em diversos tipos celulares (SIVASHANMUGAM *et al.*, 2004; SEO *et al.*, 2010), tornando-se assim, uma possível via participante na modulação da proliferação aqui observada. Para investigar essa possibilidade foi feita uma análise por *western blotting* dos níveis de fosforilação do resíduo de ativação de STAT 3 (tirosina 705), após o tratamento com LPA. Foi observado um aumento nos níveis de fosforilação de STAT 3 após 5, 15 e 30 minutos de tratamento com LPA, indicando ativação desta proteína (Fig. 5.13 A). Sabendo que STAT 3 é um fator transcricional, e que por isso, quando ativado é translocado ao núcleo onde se liga na região promotora de seus genes alvos, resolvemos analisar a localização de sua forma fosforilada (ativa) através da técnica de imunofluorescência usando microscopia confocal. O tempo escolhido foi o de 15 minutos após o tratamento com LPA por ter sido o pico de fosforilação de STAT 3 mediado por esse lipídeo. As imagens obtidas mostram discretas marcações pontuais de STAT 3 dispersas nas células do grupo controle, e uma evidente e intensa localização nuclear de STAT 3 após o tratamento com LPA por 15 minutos (Fig. 5.13 B).

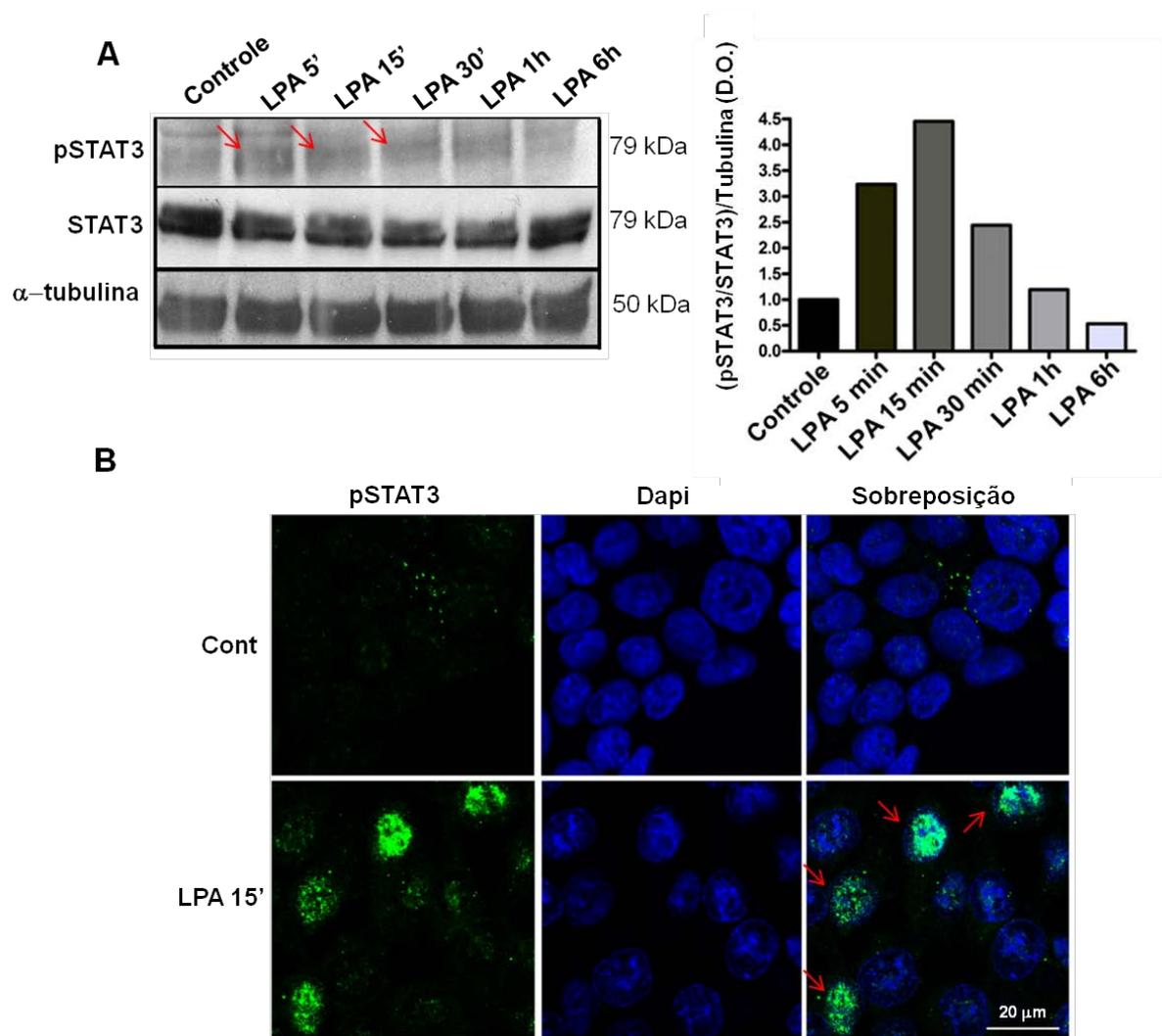


Figura 5.13: O LPA induz ativação do fator transcricional STAT 3. A) *Western blotting* em células HCT-116 para análise de fosforilação do resíduo tirosina 705 de STAT3. Os gráficos de barras mostram a quantidade relativa das proteínas normalizada pela tubulina, em experimento único. O tratamento com LPA parece aumentar a atividade de STAT3 após 5, 15 e 30 minutos. B) Imunofluorescência de células HCT-116, depletadas de SFB por 24 horas e tratadas com LPA (10 μM) por 15 minutos. O tratamento com LPA aumentou os níveis de pSTAT3 (verde; setas) no núcleo (azul), como observado na sobreposição. Barra: 20 μm. A seta indica a banda correspondente a pSTAT3. D.O.: Densidade Óptica.

Após ter sido observado a ativação de STAT 3 em resposta ao LPA (Fig. 5.13), verificamos a participação deste fator transcricional na proliferação induzida por esse fosfolípídeo. Para tal, usamos um inibidor específico de STAT 3, STA 21, que impede a dimerização dessa proteína e então inibe sua translocação nuclear e consequentemente sua atividade. Através da coloração com cristal violeta e da marcação com PI seguida por análise em citometria de fluxo, observamos que este inibidor preveniu o aumento do número relativo de células (Fig. 5.14 A), assim como

a progressão do ciclo celular (Fig. 5.14 B), induzidos pelo LPA. Esses resultados em conjunto indicam que o LPA ativa o fator transcricional STAT 3 nas células HCT-116, induzindo aumento de proliferação celular.

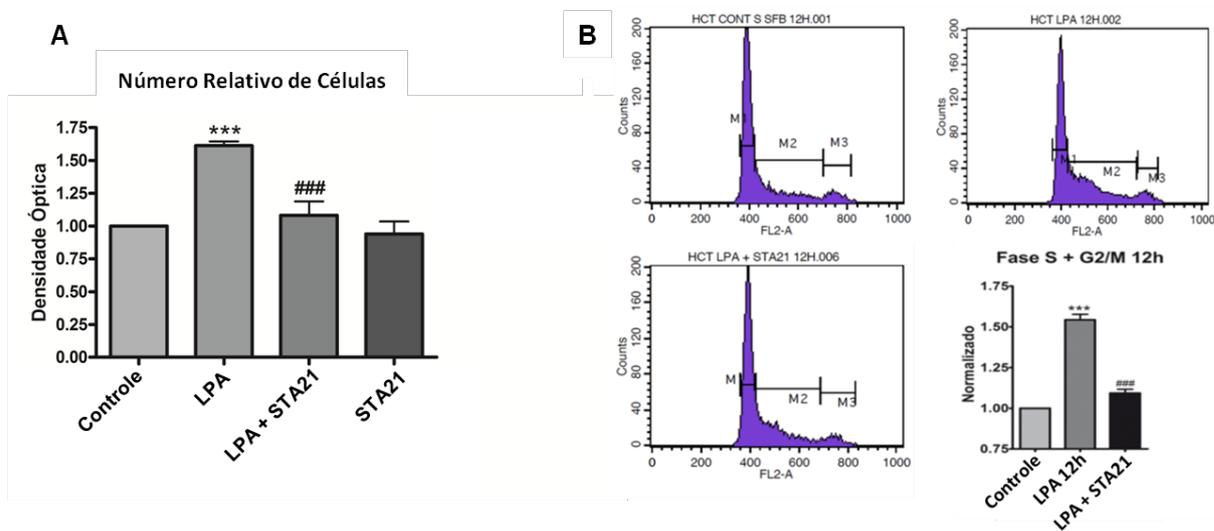


Figura 5.14: O fator transcricional STAT 3 participa do aumento de proliferação induzido pelo LPA. A) A linhagem HCT-116 foi tratada como indicado durante 48 horas e a proliferação foi avaliada pela técnica de cristal violeta. A inibição de STAT 3 preveniu o aumento no número de células mediado pelo LPA. A análise estatística utilizada foi o teste *two-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni (***) $p < 0.001$, em relação ao controle; ### $p < 0.001$, em relação ao tratamento com LPA). B) As células foram pré-tratadas ou não com STA21, e então tratadas como indicado por 12 horas para análise do ciclo celular por citometria de fluxo. A inibição de STAT3 diminuiu o número de células na fase S e na fase G2/M do ciclo celular após o tratamento com LPA. A análise estatística usada foi o teste *one-way* ANOVA (***) $p < 0.001$, em relação ao controle; ### $p < 0.001$, em relação ao tratamento com LPA).

5.7 A ativação de STAT 3 induzida pelo LPA em células HCT-116 é independente da ativação de ROCK

Uma vez que os nossos resultados anteriores indicaram que o tratamento com LPA ocasionava ativação de RhoA-ROCK (Fig. 5.8) e de STAT 3 (Fig. 5.13), foi investigado se a inibição farmacológica de ROCK com o inibidor Y27632 prevenia a ativação de STAT3 nas células HCT-116. Para obter essa resposta, foi feita uma análise por *western blotting* dos níveis de fosforilação do resíduo tirosina 705 de STAT 3 em células HCT-116 previamente tratadas ou não com o Y27632, e então tratadas com LPA ou LPA+Y27632. Como observado na Figura 5.15, o inibidor de ROCK não foi capaz de prevenir a fosforilação do resíduo de ativação de STAT 3, sugerindo que a ativação dessas vias de sinalização ocorram de forma independente.

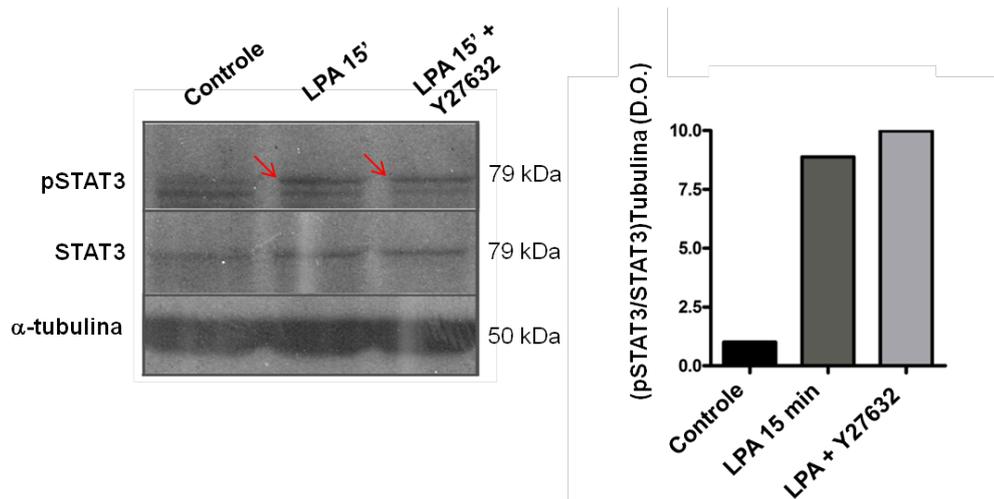


Figura 5.15: A inibição de ROCK não previne a fosforilação de STAT 3 mediada pelo LPA. As células HCT-116 foram pré-tratadas ou não com inibidor de ROCK por 1 hora, e então tratadas como indicado. Observe que a inibição de ROCK não previne a fosforilação de STAR 3 causada pelo LPA. Os gráficos de barras mostram a quantidade relativa das proteínas normalizada pela tubulina, em experimento único. A seta indica a banda correspondente a pSTAT 3. D.O.: Densidade Óptica.

Para confirmar que a ativação de STAT 3 ocorria de forma independente da ativação da via Rho-ROCK , foi feita a análise da localização da forma ativa de STAT 3 através de imunofluorescência e microscopia confocal. As células HCT-116 foram previamente tratadas ou não com o Y27632, e então tratadas com LPA ou LPA+Y27632. Além disso, foi utilizado o inibidor farmacológico de STAT 3 (STA 21), como controle. Como esperado, o STA 21 foi capaz de impedir a translocação de STAT 3 ao núcleo. No entanto, o inibidor de ROCK não foi capaz de prevenir a fosforilação deste fator de transcrição (Fig. 5.15) e conseqüentemente de impedir sua translocação ao núcleo (Fig. 5.16). Juntos esses resultados mostram que a ativação de STAT 3 induzida pelo LPA não ocorria via Rho-ROCK.

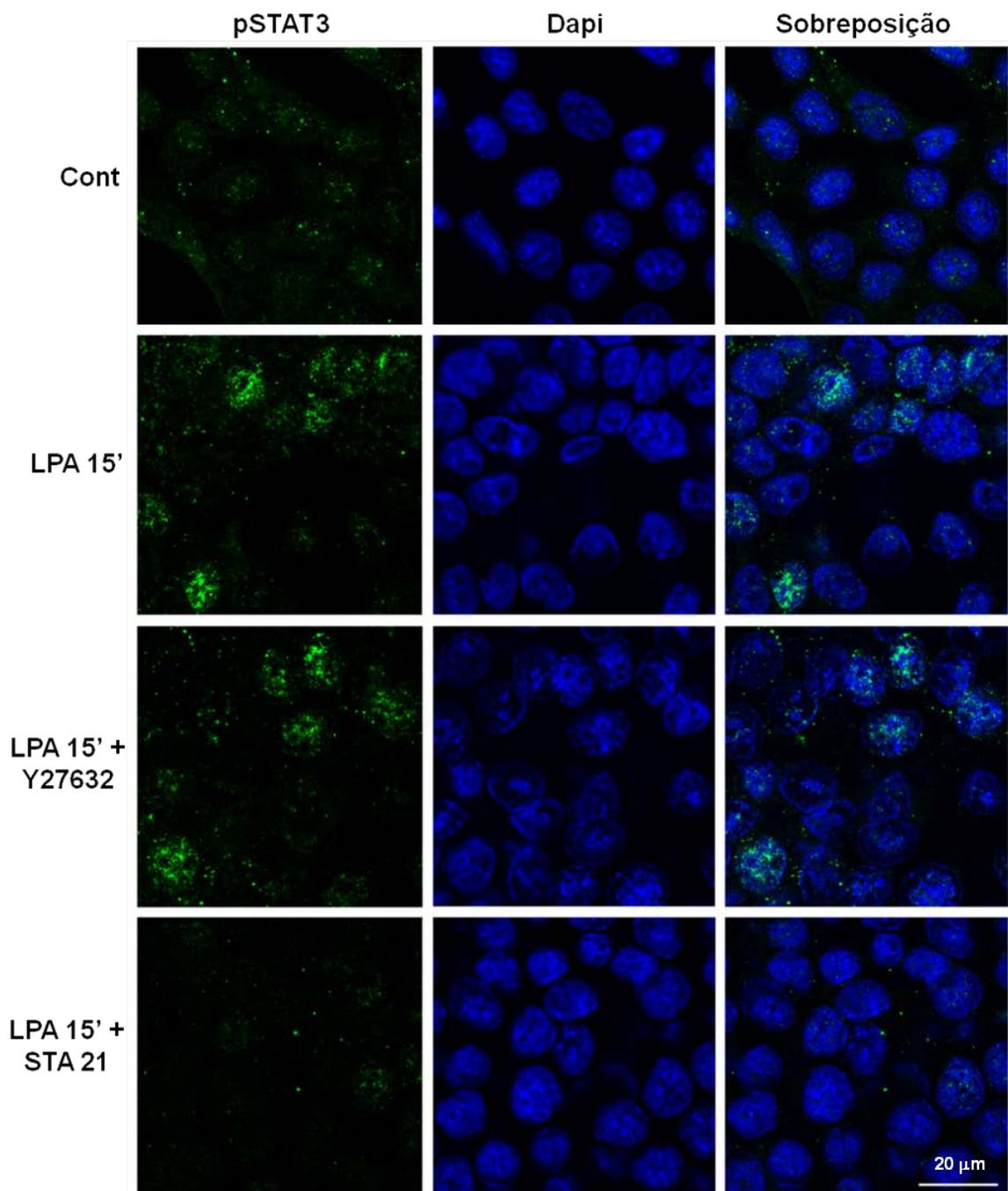


Figura 5.16: O inibidor de ROCK não previne a translocação nuclear de STAT 3 induzida pelo LPA. Células HCT-116 pré-tratadas ou não com inibidor de ROCK por 1 hora, e então tratadas com LPA+Y27637 ou apenas LPA por 15 minutos foram processadas para imunofluorescência e as imagens representativas foram obtidas por microscopia confocal. A inibição de ROCK não reverteu a translocação de pSTAT3 (verde) para o núcleo (azul). O inibidor de STAT3, STA21, foi utilizado como controle positivo. Cont: controle. Barra: 20 μ m.

5.8 O co-tratamento com os inibidores de ROCK e de STAT 3 potencializa a prevenção no número de células na fase S-G2/M induzido pelo LPA

Após ter sido observada a participação de STAT 3 e de ROCK na proliferação induzida pelo LPA (Figs. 5.9 e 5.14), questionamos a existência de uma cooperação entre essas vias para regular este evento, uma vez que essas proteínas pareciam ser ativadas em vias paralelas. Para isso, tanto ROCK quanto STAT 3 foram inibidas de forma isolada e em conjunto, e a progressão do ciclo celular foi analisada. Conforme mostrado anteriormente, a inibição isolada de ROCK e de STAT 3, preveniram a passagem da fase G1 para as fase S-G2/M do ciclo. De forma interessante, a inibição conjunta dessas duas proteínas preveniu ainda mais a progressão do ciclo celular promovida pelo LPA (Fig. 5.17). Dessa maneira, ficou claro que as vias de Rho-ROCK e de STAT 3 cooperam para mediar a proliferação induzida pelo LPA nas células HCT-116.

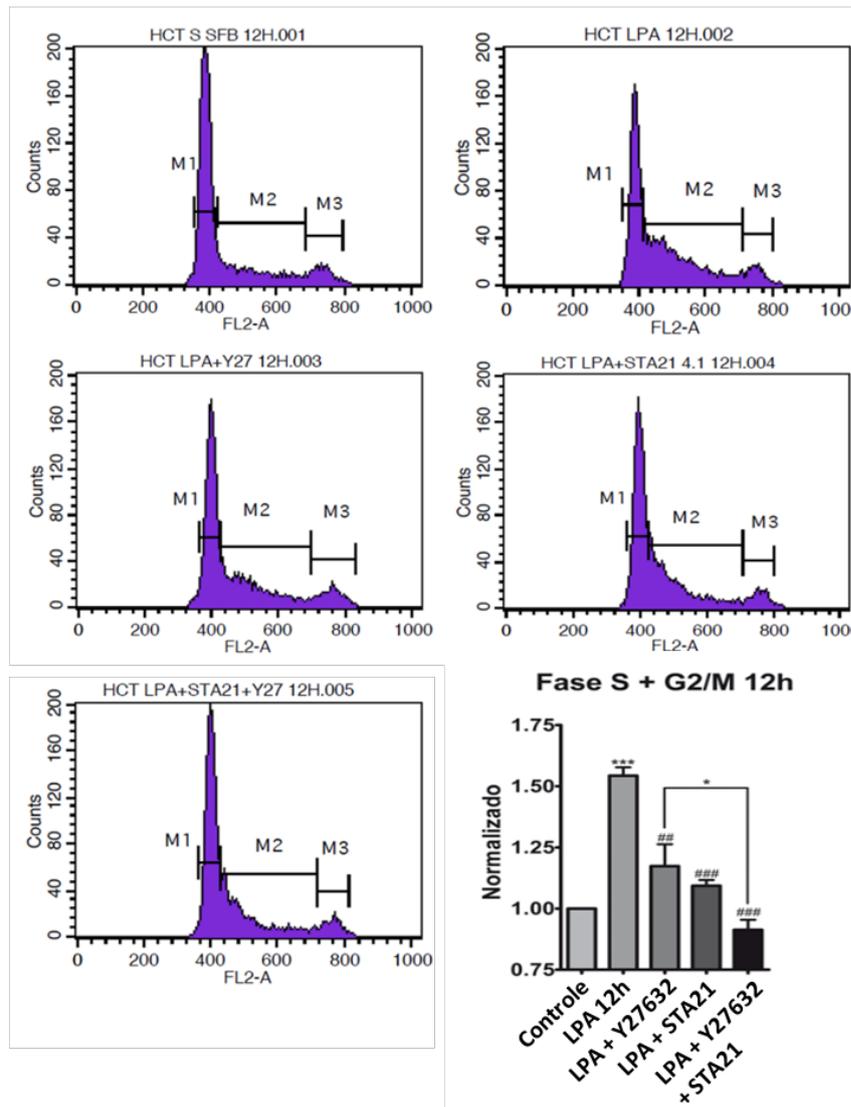


Figura 5.17: As vias de Rho-ROCK e de STAT 3 cooperam no controle da proliferação induzida pelo LPA em células HCT-116. Análise do ciclo celular em células pré-tratadas ou não (controle) com os respectivos inibidores, e subsequentemente tratadas como indicado por 12 horas. A inibição conjunta de STAT3 e de ROCK diminuiu drasticamente o número de células na fase S e na fase G2/M do ciclo celular após o tratamento com LPA, sugerindo que essas proteínas atuam em vias distintas. A análise estatística utilizada foi o teste *one-way* ANOVA (** $p < 0.001$ em relação ao controle, ### $p < 0.001$; ## $p < 0.01$ em relação ao LPA; * $p < 0.05$ em relação ao LPA+Y27632+STA21).

5.9 O LPA altera a expressão de diversos genes reguladores do ciclo celular

Os resultados apresentados até aqui, indicaram que a indução de proliferação nas células HCT-116 causada pelo LPA ocorre de forma dependente das vias Rho-ROCK e STAT 3. No entanto, faltava saber quais eram os principais genes alterados por esse fosfolípido. Para definir os responsáveis por essas alterações, células HCT-116 tratadas ou não com LPA por 10 horas (tempo anterior ao pico no número de células na fase S-G2/M induzido pelo LPA) tiveram seu RNA mensageiro total extraído e processado para análise de expressão gênica global usando um *Chiparray*. Após, a expressão dos genes envolvidos diretamente com o ciclo celular, como as ciclinas e CDKs/CDCs, foram analisadas. A tabela 1.5 mostra as principais alterações nesses genes. Pode-se observar que diversas ciclinas, tais como a E2, A2, B2, B1 e E1, e as CDKs/CDCs tiveram suas expressões aumentadas. Para confirmar esses dados encontrados, células HCT-116 foram tratadas com LPA e a expressão proteica de três ciclinas diferentes, cada uma correspondente a uma fase do ciclo celular: ciclina E1, responsável pela transição G1-S; ciclina A2, pela transição S-G2/M; e ciclina B1, pela transição G2-M, foi analisada por *western blotting*. A figura 5.18 mostra que após o tratamento com LPA, é possível observar um aumento na expressão da ciclina E1, principalmente, após 8 horas de tratamento com LPA; da ciclina A2 com 12 horas de tratamento; e da ciclina B1 com 16 horas de tratamento. Em conjunto, esses dados mostram que o aumento na proliferação de células HCT-116 mediado pelo LPA ocorre através da estimulação da expressão dessas ciclinas, responsáveis pela progressão do ciclo celular.

Tabela 5.1: Principais alterações mediadas pelo LPA nos genes envolvidos diretamente com ciclo celular

Gene	Código	Função	Alteração
Cyclin E2	CCNE2	Transição G1/S	+ 2,37
Cell division cycle 6 homolog	CDC6	Início da replicação do DNA	+ 2,08
Cell division cycle 45 homolog	CDC45	Início da replicação do DNA	+ 1,90
Cyclin A2	CCNA2	Transição G1/S e G2/M	+ 1,87
Cyclin-dependent kinase 1	CDK1	Transição G1/S e G2/M	+ 1,73
CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B	CKS1B	Interage com CDKs	+ 1,56
Cyclin B2	CCNB2	Transição G2/M	+ 1,47
Cell division cycle 25 homolog A	CDC25A	Transição G1/S	+ 1,45
Cell division cycle 7 homolog	CDC7	Transição G1/S	+ 1,40
Cell division cycle 37 homolog	CDC37L1	Transdução de sinal celular	+ 1,35
CDC5 cell division cycle 5-like	CDC5L	Transição G2/M	+ 1,32
Cyclin T2	CCNT2	Ciclo Celular	+ 1,32
Cyclin B1	CCNB1	Transição G2/M	+ 1,28
CDC14 cell division cycle 14 homolog A	CDC14A	Início da replicação do DNA	+ 1,26
Cyclin-dependent kinase 10	CDK10	Fase G2/M	+ 1,25
Cell division cycle 20 homolog B	CDC20B	Ativação de APC - Anáfase	+ 1,24
Cyclin E1	CCNE1	Transição G1/S	+ 1,23

Os valores representados no lado direito da tabela (alteração) indicam quantas vezes esses genes, nas células tratadas com LPA, estavam com a expressão aumentada em relação às células controle. Em vermelho estão destacados os genes que tiveram o aumento de sua expressão proteica confirmado por *western blotting*.

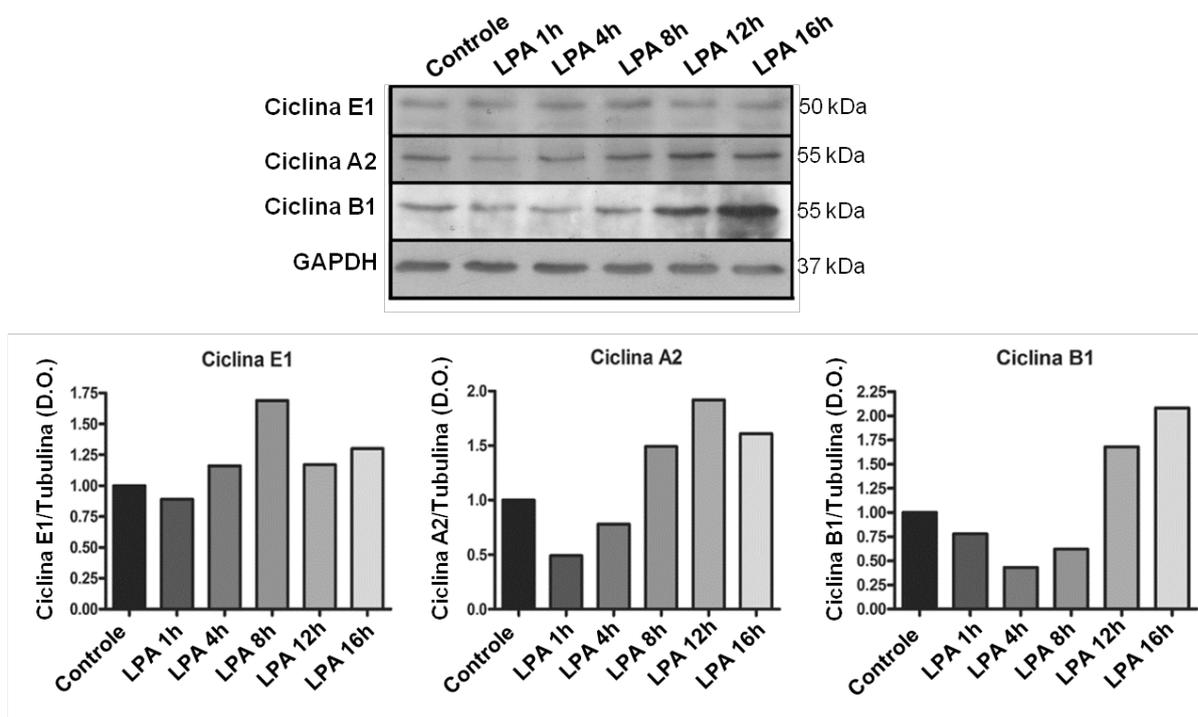


Figura 5.18: O LPA aumenta a expressão proteica das ciclinas E1, A2 e B1. Células HCT-116 foram tratadas com LPA nos tempos indicados e os lisados proteicos foram obtidos e analisados por *western blotting*. O LPA aumentou a expressão das ciclinas E1, A2 e B1. Os gráficos de barras mostram a quantidade relativa das proteínas normalizada pelo GAPDH, em experimento único. D.O.: Densidade Óptica.

5.10 As vias de Rho-ROCK e de STAT 3 cooperam na prevenção da expressão das ciclinas E1, A2 e B1 promovida pelo LPA

Tendo sido confirmado o aumento de expressão das ciclinas E1, A2 e B1 promovido pelo LPA, o passo seguinte foi investigar se as proteínas ROCK e STAT 3 estariam participando desse processo. Para isso, células HCT-116, foram pré-tratadas ou não com o inibidor de ROCK (Y27632), de STAT 3 (STA21) ou com ambos, e logo tratadas com LPA. O tempo de tratamento para a investigação de cada ciclina foi corresponde àquele onde ocorreu um pico de expressão promovido pelo LPA (Fig. 5.18). Sendo assim, para analisar a ciclina E1 o tempo escolhido foi o de 8 horas, para ciclina A2 o de 12 horas e a ciclina B1 o de 16 horas. Como observado na Figura 5.19, a inibição conjunta de ROCK e de STAT 3 preveniu o aumento de expressão causado pelo LPA das três ciclinas analisadas. Vale ressaltar que o efeito mais evidente foi observado sobre a ciclina A2, cuja expressão foi significativamente reduzida, não apenas com o tratamento conjunto de Y27632 e

STA21, mas também com a inibição individual de ROCK e STAT 3. Esses resultados confirmam que as duas vias, Rho-ROCK e STAT 3, cooperam para promover a proliferação mediada pelo LPA nas células HCT-116, através do aumento de expressão das ciclinas E1, A2 e B1.

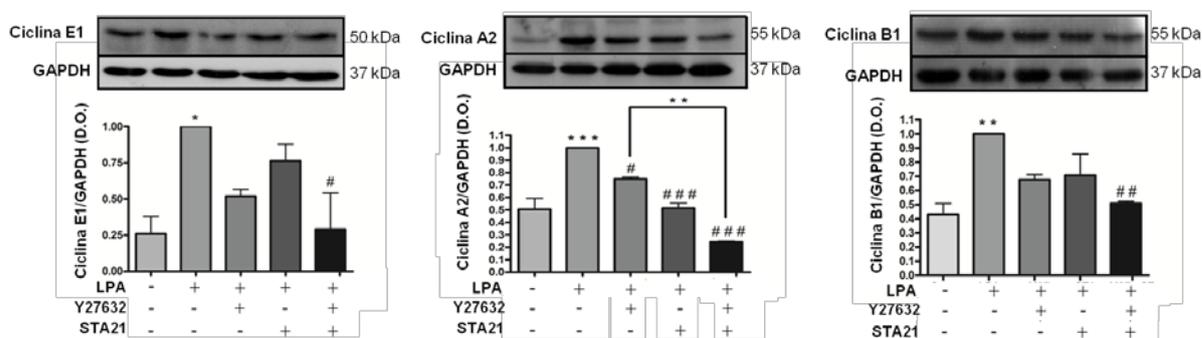


Figura 5.19: A inibição das vias Rho-ROCK e STAT 3 previnem o aumento da expressão das ciclinas E1, A2 e B1 induzido pelo LPA. Células HCT-116 foram pré-tratadas ou não com os respectivos inibidores por 1 hora, e então tratadas como indicado nos respectivos tempos. Os lisados celulares foram obtidos e a expressão das ciclinas E1, A2 e B1 foi analisada por *western blotting*. A inibição, tanto de ROCK quanto de STAT3, reverteu o aumento de expressão destas proteínas induzido pelo LPA. O tratamento em conjunto dos dois inibidores teve um efeito ainda maior na reversão da expressão das três ciclinas, quando comparado com o uso dos inibidores em separado. Os gráficos de barras mostram a quantidade relativa das proteínas normalizada pelo GAPDH. As barras de erro indicam o erro padrão (n=3). A análise estatística utilizada foi o teste *one-way ANOVA* (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ em relação ao controle; ### $p < 0,001$, ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ em relação ao LPA; ** $p < 0,01$ em relação ao LPA+Y27632+STA21). D.O.: Densidade Óptica.

6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, tem crescido muito o número de trabalhos abordando moléculas presentes no microambiente tumoral a fim de se entender melhor o papel destas na progressão do câncer. Neste contexto, uma importante molécula é o LPA. Alguns estudos têm relatado a participação do LPA em eventos da progressão tumoral tais como, migração, invasão, sobrevivência e proliferação em vários tipos de câncer (LIN *et al.*, 2010). Recentemente, nosso grupo contribuiu nessa área abordando a função do LPA no processo migratório de células derivadas de câncer de cólon, Caco-2 (LEVE *et al.*, 2011). Entretanto, mais estudos são necessários para entender o papel deste fosfolípido durante a progressão do CCR. O presente trabalho foi desenvolvido a fim de dar continuidade a esses estudos bem como entender melhor os efeitos causados pelo LPA em células derivadas de tumores de cólon e sua contribuição na progressão do câncer.

Num primeiro momento, foi analisada se as linhagens de câncer de cólon Caco-2, HT-29 e HCT-116 expressavam os três principais receptores de LPA (LPA1-3). Foi encontrado um perfil diferenciado de expressão dos receptores entre as linhagens, o que pode ser justificado por suas diferenças genéticas e fenotípicas. As linhagens mais invasivas (HT-29 e HCT-116) foram aquelas onde houve maior expressão dos receptores. A HCT-116 apresentou uma expressão elevada de LPA 2 e 3, e a HT-29 dos três receptores. Já na linhagem menos invasiva, Caco-2, houve uma expressão alta apenas do receptor LPA 2 (Fig. 5.1). De maneira interessante, esses resultados se correlacionam com dados da literatura, obtidos de amostras de tumores de pacientes com CCR. SHIDA *et al.*, 2004 mostrou uma alta expressão do receptor LPA 2 em amostras tumorais de pacientes com CCR. Além disso, o LPA 1 foi encontrado com baixos níveis de expressão nessas amostras, fato esse encontrado em duas das células estudadas (Caco-2 e HCT-116). O LPA 3 por sua vez não teve diferenças entre os níveis de expressão das amostras tumorais e normais desses pacientes. É importante ressaltar que nesse estudo, o número de amostras utilizadas foi baixo (26 amostras) e não foram caracterizadas o grau de diferenciação e invasividade dos tumores nas análises, o que poderia explicar a ausência da diferença entre amostras normais e tumorais para o receptor LPA 3. Embora no nosso trabalho não tenham sido utilizadas linhagens normais para efeito de comparação, os dados obtidos, de maneira geral, estão de acordo com aqueles

encontrados em amostras de pacientes com CCR, além de relacionar a expressão dos receptores em linhagens tumorais representativas da progressão do CCR.

Após ter sido confirmada a presença dos três principais receptores de LPA, o passo seguinte foi tratar as células com esse fosfolípídeo e avaliar sua contribuição em eventos relacionados com a progressão tumoral. A migração e a invasão celular são eventos importantes no processo metastático e na progressão do câncer. A migração celular foi avaliada nas linhagens HT-29 e HCT-116 apenas, já que, como mencionado, nosso Grupo publicou recentemente o aumento de migração nas células Caco-2 em resposta ao LPA (LEVE *et al.*, 2011). Já a invasão celular foi investigada nas três linhagens. Em ambos os ensaios, foram utilizadas células Ovar-3 como controle positivo, por serem conhecidamente responsivas ao LPA nesses ensaios (SAWADA *et al.*, 2002). Surpreendentemente, não foram observadas alterações nas taxas de migração e de invasão em nenhuma das células derivadas de câncer de cólon usadas (Figs. 5.2 e 5.3). A indução da migração e invasão pelo LPA tem sido observada em outros tipos celulares, tais como células ES-2, derivadas de câncer de ovário, células MDA-MB-231, derivada de câncer de mama, dentre outros (HARRISON *et al.*, 2013; KORKINA *et al.*, 2013; WILLIER *et al.*, 2013). Uma possível explicação para os resultados encontrados é o perfil de expressão do receptor de LPA3. Recentemente, foi publicado um trabalho onde se observou que a presença do LPA3 em células HCT-116 regulava negativamente a motilidade e a invasividade celular mediada pelo LPA. Quando as células tinham a expressão desse receptor inibida, passavam a responder à migração e à invasão induzida pelo LPA (FUKUI *et al.*, 2012). Analisando a expressão dos três receptores nas células usadas nesse estudo, podemos observar que apenas a linhagem Caco-2, a única que teve seus níveis de migração alterados pelo LPA (LEVE *et al.*, 2011), possui níveis baixos de LPA3, enquanto HT-29 e HCT-116 possuem níveis elevados (Fig. 5.1). Esses dados estão em acordo com os encontrados por FUKUI *et al.*, 2012. Vale ressaltar também que as sinalizações desencadeadas pelos receptores de LPA são célula específica, logo, dependendo do tipo celular, um mesmo receptor pode ativar uma via distinta acarretando em uma resposta biológica diferente (ANLIKER & CHUN, 2004). Por outro lado, as células Caco-2, mesmo tendo uma baixa expressão do LPA3 não tiveram suas taxas de invasão alteradas, o que pode ser explicado por outros fatores não avaliados, como a expressão de metaloproteases (MMPs), proteínas que participam desse evento. Vale destacar

ainda que existem dois mecanismos distintos de invasão. O primeiro mecanismo é o dependente de MMPs, e o outro está associado ao movimento celular do tipo ameboide, independente de MMPs e degradação de matriz extracelular, e que é mediado por Rho-ROCK (SAHAI & MARSHALL, 2003), via essa encontrada ativada pelo LPA em nosso estudo (Fig. 5.8). Foi observada a participação de RhoA na invasão celular do tipo ameboide, independente de MMPs, em células derivadas de câncer de mama (FAGAN-SOLIS *et al.*, 2013). Nesse sentido, quando utilizamos o Matrigel®, temos por objetivo avaliar a capacidade de ativação de MMPs e consequente degradação de matriz. Sabendo que a ativação de RhoA, encontrada no nosso estudo e por LEVE *et al.* (2011), é um forte indício de indução de invasão do tipo amebóide, o uso de um modelo utilizando uma matriz extracelular mais frouxa ou composta apenas por colágeno, possibilitaria talvez a observação de um estímulo de invasão por parte do LPA, uma vez que analisaríamos outros tipos de invasão celular, e não aquele dependente de MMPs.

Outro evento analisado foi a capacidade de formação de colônias independente de ancoragem. Embora não existam trabalhos correlacionando diretamente o papel do LPA com a formação de colônias independentes de ancoragem em CCR, recentemente, um estudo correlacionou o papel do LPA, através da ativação de LPA 2, com a secreção de IL-6 e IL-8, e que estas eram responsáveis pela formação de colônias independentes de ancoragem em células de câncer de mama (HARTMAN *et al.*, 2013). Entretanto, pouco ainda se sabe sobre o efeito desse fosfolípídeo nesse evento. De forma inesperada, não foi observado, em nenhuma das linhagens invasivas usadas (HT-29 e HCT-116), aumento no número de colônias formadas. Por outro lado, um aparente aumento foi visto nas células Caco-2, porém não estatisticamente significativo (Fig. 5.4). Limitações da técnica podem ter contribuído para a ausência do efeito esperado. Isso porque em todos os ensaios as células eram tratadas apenas com LPA, com ausência de SFB, para que a indução dos eventos analisados por parte do LPA pudesse ser avaliada. Nesse ensaio em especial, não havia possibilidade de tratar as células na ausência de SFB já que as células usadas morriam ou paravam de crescer na ausência de SFB após 72 horas de experimento (dados não mostrados), e como esse ensaio dura em média 14 dias não seria possível dar continuidade ao experimento, sendo utilizado 5% de SFB, o mínimo possível. Dessa maneira, a presença de SFB pode ter estimulado a formação de colônias, e a presença do LPA em conjunto com o SFB não provocou

assim, um efeito aditivo ao SFB, não gerando uma diferença no número de colônias formadas. Vale ressaltar que todas as linhagens são tumorigênicas e por isso possuem uma alta capacidade de formação de colônias. Além disso, o crescimento independente de ancoragem requer a ativação de vias envolvidas não só com a proliferação, mas também com a sobrevivência, como escape da apoptose e da morte por *anoikis*, e o LPA nesse contexto pode não ter sido capaz de ativar tais eventos numa taxa maior que o SFB.

A proliferação desregulada é uma importante etapa do processo tumorigênico. A formação da cripta aberrante ocorre por uma perda do controle desse evento, e é uma das etapas iniciais do processo de formação do tumor e na sequência adenoma-carcinoma do CCR (PAN *et al.*, 2011). Além disso, o evento proliferativo ocorre também na progressão tumoral, aumentando a massa tumoral, sendo importante também no estabelecimento do sítio secundário formado no fim do processo metastático. O LPA como componente do microambiente tumoral pode contribuir para a manutenção desse evento. Assim, decidimos analisar as taxas de proliferação após o tratamento com LPA. Observamos que o tratamento com LPA aumentou a proliferação apenas na linhagem mais invasiva, HCT-116. Não foram observadas diferenças entre as populações controle e tratadas das linhagens Caco-2 e HT-29 (Fig. 5.5). Embora alguns trabalhos tenham demonstrado a indução de proliferação nas células de CCR, HCT-116 e LS174T (YANG *et al.*, 2005), HT-29 (SHIDA *et al.*, 2003), e Caco-2 (ZHANG *et al.*, 2007), as doses e os tempos de tratamento com LPA utilizados foram diferentes dos usados no nosso estudo. No estudo utilizando HCT-116, os resultados foram semelhantes, porém algumas das vias de sinalização avaliadas foram diferentes das que avaliamos no presente trabalho. Já em relação ao trabalho com HT-29, o aumento de proliferação só foi visto após 120 horas de tratamento com LPA, e nós avaliamos até 72 horas apenas, e talvez por isso o efeito não tenha sido observado nessa linhagem. Por fim, o estudo com Caco-2 avaliou a proliferação através de contagem de células usando um hematocitômetro, podendo ser observado diferenças mais sutis no número de células, fato esse mais difícil de ser observado na técnica de cristal violeta. Por outro lado, esse trabalho não avaliou se essa diferença era mediada por uma diminuição de morte celular, uma vez que já foi observada uma evasão de apoptose mediada pelo LPA em células Caco-2 (RUSOVICI *et al.*, 2007). Conforme mencionado anteriormente, o LPA ativa diferentes receptores, e dependendo da expressão

gênica constitutiva de cada tipo celular, diferentes vias podem ser ativadas, podendo então ser encontrados resultados distintos entre as linhagens.

Após ter sido observado o aumento de proliferação causado pelo LPA nas células HCT-116 (Fig. 5.5) e isso ter sido confirmado por meio da análise da morte celular (Fig. 5.6) e da progressão do ciclo celular (Fig. 5.7), o passo seguinte foi investigar as possíveis vias que estariam participando desse processo. O LPA é um clássico ativador da GTPase RhoA (WILLIER *et al.*, 2013), e por isso essa via foi a primeira a ser estudada. Como esperado, o LPA aumentou a atividade desta GTPase nos tempos iniciais de tratamento (Fig. 5.8). Na sequência foi avaliada a capacidade do LPA aumentar a expressão da proteína ROCK2, uma das principais efetoras de RhoA, sendo visto um aumento após 72 horas de tratamento (Fig. 5.8). Esses resultados indicaram uma ativação da via Rho-ROCK pelo LPA. Tendo sido confirmada a ativação desta via, foi avaliada a participação desta na proliferação através de sua inibição farmacológica. Observamos que o inibidor de ROCK preveniu a proliferação e a progressão do ciclo celular causadas pelo LPA, indicando que a via Rho-ROCK possui um importante papel no evento mencionado (Fig. 5.9). Diversos estudos abordam a importância desta via na proliferação celular. Foi visto a participação da via Rho-ROCK na expressão e na atividade da CDK4 e da CDK6, controlando assim a passagem das fases G1-S do ciclo celular em células derivadas de câncer gástrico (ZHANG *et al.*, 2009). Além disso, a ativação de ROCK mediou a expressão das ciclinas A e D1, controlando também a passagem G1-S em fibroblastos (CROFT & OLSON, 2006). Ainda, sabe-se que a GTPase Rho é importante no fim do ciclo celular, durante a formação do anel contrátil de actina-miosina (HALL, 1998). Esses dados em conjunto demonstram a participação desta via tanto em etapas iniciais do ciclo celular quanto em etapas tardias. Por outro lado, apenas um estudo investigou e encontrou uma participação da via Rho-ROCK na proliferação celular induzida pelo LPA, em astrócitos (SORENSEN *et al.*, 2003). Nenhum trabalho abordou a via Rho-ROCK nesse evento mediado pelo LPA em células tumorais, incluindo o CCR, o que demonstra a importância de nossos achados.

Uma vez tendo sido encontrada a participação de Rho-ROCK, a sequência foi avaliar quais os possíveis alvos dessa via no evento proliferativo. Nesse contexto, os fatores transcricionais β -catenina e STAT 3 foram cogitados por terem conhecida participação nesse evento, e por serem regulados, dentre outros, pela via Rho-

ROCK, como abordado na introdução. O LPA não foi capaz de induzir a atividade transcricional de β -catenina (Fig. 5.12), mesmo tendo aumentado a expressão desta proteína após 24 horas de tratamento e tendo promovido a inibição de GSK-3 β , um repressor desta via (Fig. 5.10). Recentemente, foi publicado um estudo onde se encontrou a presença de duas classes de β -catenina em epitélio intestinal. Uma classe, em maior quantidade, exercia seu papel canônico quando acumulada no citoplasma: translocar-se ao núcleo e se ligar ao TCF/LEF induzindo a expressão de seus genes alvos. A outra classe, desvendada nesse trabalho, de forma inesperada, tinha uma baixa afinidade por TCF/LEF, não tendo ainda uma função definida (SCHUIJERS *et al.*, 2014). Dessa forma, o fato de não termos observado aumento de ativação do TCF/LEF pelo LPA poderia ser explicado por um acúmulo dessa classe de β -catenina com baixa afinidade por este fator transcricional. Outra possibilidade seria a estimulação da degradação de β -catenina mediada pelo LPA, já que a linhagem HCT-116 possui uma mutação em β -catenina que dificulta sua degradação (BRATTAIN *et al.*, 1981). Nesse contexto, o LPA poderia estar estimulando sua degradação, mas devido a essa mutação, o processo de degradação teria ficado sobrecarregado ocasionando um acúmulo dessa proteína. Mesmo tendo sido observado uma inibição de GSK-3 β (Fig. 5.10), indicando que o complexo fosfo-destrutivo para degradação da β -catenina não estaria sendo formado, os tempos investigados foram curtos (até 6 horas de tratamento) em comparação com os tempos de aumento dos níveis de β -catenina (24 horas). Dessa forma, mais experimentos seriam necessários para desvendar tais achados. Além disso, foi observada uma normalização nos níveis de β -catenina a partir de 48 horas de tratamento e uma localização predominantemente nos contatos celulares em todos os tempos de tratamentos avaliados (6, 24, 48 e 72 horas) indicando que esta via não estava realmente sendo ativada (Fig. 5.11). Vale ressaltar também que a proteína GSK-3 β possui outras funções além de somente regular essa via de sinalização, e o LPA poderia estar agindo nessas outras funções, não investigadas nesse trabalho. Esse dado contradiz resultados encontrados na literatura. YANG *et al.* (2005) encontrou uma ativação de β -catenina por meio do LPA e esta regulando a proliferação em células HCT-116, a mesma utilizada nesse modelo de estudo. Metodologias experimentais diferentes podem ter contribuído para os resultados encontrados no presente estudo. No trabalho mencionado foi feita uma depleção de

SFB com duração maior que o presente estudo. Além disso, a dose usada (1 μ M) também foi diferente da utilizada no nosso trabalho (10 μ M), dose que nosso grupo já descreveu por ativar a GTPase RhoA, em células Caco-2 (LEVE *et al.*, 2011). Esses fatos podem ter gerado resultados diferentes, uma vez que a dose e o tempo de ausência de SFB diferentes podem induzir também efeitos e ativação de vias distintas.

Por outro lado, observamos que o LPA foi capaz de ativar o fator transcricional STAT 3, uma vez que esse teve seus níveis de fosforilação aumentados e uma localização nuclear da forma fosforilada (ativada) após o tratamento com esse fosfolípido (Fig. 5.13). Ainda, foi vista a participação de STAT 3 na proliferação e na progressão do ciclo celular induzidas pelo LPA (Fig. 5.14). Alguns trabalhos já encontraram a ativação de STAT 3 diretamente ou indiretamente pelo LPA (SIVASHANMUGAM *et al.*, 2004; SEO *et al.*, 2010), porém em nenhum deles foi investigado esse efeito em células derivadas de câncer de cólon. Esse é, portanto, o primeiro trabalho que mostra a participação de STAT 3 no evento de proliferação mediado pelo LPA em CCR. É importante destacar que a proteína STAT 3 foi encontrada aumentada tanto na sua forma inativa quanto na sua forma ativa em amostras de tumores colorretais invasivos, estando associada com aumento da proliferação e com a metástase linfonodal (LASSMANN *et al.*, 2007). Além disso, foi observado que, subpopulações derivadas de câncer de cólon que possuíam um maior potencial de formação de tumor num modelo xenográfico, tinham altos níveis de STAT 3 ativo, e quando essa ativação era bloqueada, a formação do tumor nesse modelo era inibida (LIN *et al.*, 2011). De forma interessante, foi visto que células com alta atividade de STAT 3 derivadas de tumores colorretais malignos perdiam essa atividade persistente em cultura. Ainda, quando essas mesmas células eram implantadas num camundongo tinham a atividade de STAT 3 restaurada (CORVINUS *et al.*, 2005), sugerindo uma necessidade do microambiente nesse evento. Lembrando que o LPA é um importante componente do microambiente tumoral, esse agente poderia então contribuir para a ativação de STAT 3 e assim induzir a progressão do CCR.

Em seguida, correlacionamos as vias Rho-ROCK e de STAT 3, já que ambas estavam sendo ativadas pelo LPA e estavam também regulando a proliferação promovida por esse lipídeo. Sabendo que a via Rho-ROCK podia controlar a ativação de STAT 3, como visto em fibroblastos associados a carcinoma oral,

estimulando a migração celular (SANZ-MORENO *et al.*, 2011), e em células de hipotálamo imortalizadas (HUANG *et al.*, 2012), foi verificado se a inibição de ROCK iria interferir na ativação desse fator transcricional induzida pelo LPA. Essa relação não foi encontrada, uma vez que a inibição de ROCK não alterou o perfil de fosforilação e de localização nuclear de STAT 3 (Figs. 5.15 e 5.16). Mesmo não tendo sido observada essa relação, ambas as vias estavam participando da proliferação causada pelo LPA. Investigamos então, se existia uma cooperação entre as vias. Nossos resultados mostraram que a inibição conjunta de ROCK e de STAT 3 preveniu a progressão do ciclo celular estimulada pelo LPA, numa taxa maior que aquelas encontradas quando cada via era inibida em separado (Fig. 5.17). Esse resultado, não só confirmou que essas vias atuavam de forma distinta e não numa mesma sequência, como também demonstrou haver uma cooperação entre elas, sendo as duas muito importantes na indução de proliferação mediada por LPA. Como já mencionado aqui, as vias Rho-ROCK e de STAT 3 estão intimamente ligadas com a progressão do CCR e com o processo proliferativo. Não existem dados na literatura abordando a cooperação dessas duas importantes vias, demonstrando mais uma vez a importância do presente estudo.

Na literatura não existem dados de expressão gênica global de células derivadas de câncer de cólon tratadas com LPA. Por isso, buscamos os principais genes que tinham sua expressão alterada após o tratamento com LPA. Realizando uma análise em larga escala por meio do *Chiparray*, encontramos dezenas de genes com sua expressão aumentada ou diminuída. Além disso, usamos dois *softwares* diferentes na investigação das vias alteradas pelo tratamento. Como esperado, as vias envolvendo a proliferação e o ciclo celular estavam muito alteradas, confirmando assim os resultados previamente encontrados. Através de uma análise mais profunda dos genes alterados, observamos uma ampla diferença naqueles cuja função era expressar proteínas reguladoras do ciclo celular, como as CDKs/CDCs e as ciclinas. Com isso, separamos os principais reguladores, de acordo com a literatura, para observar as diferenças na expressão desses. Mesmo não tendo visto um aumento muito grande na expressão dessas CDKs/CDCs e ciclinas (por volta de duas vezes maior), ficou claro que essa via de proliferação e controle do ciclo celular estava alterada, uma vez que diversos componentes da mesma estavam com sua expressão aumentada (Tabela 5.1), amplificando assim, a sinalização pró-proliferação ao longo da via. Além disso, vale ressaltar que as principais ciclinas, E1,

A2 e B1, responsáveis majoritariamente pelo controle de todo o ciclo celular estavam com sua expressão proteica aumentada (Fig. 5.18), como visto por *western blotting*, confirmando e validando os dados encontrados na análise global. Embora a amplificação gênica da ciclina E tenha sido observada em apenas 10% dos pacientes com CCR e sua expressão proteica não ser maior em amostras tumorais comparadas com o tecido adjacente, sua acumulação parece crescer gradualmente ao longo da sequência adenoma-carcinoma (DONNELLAN & CHETTY, 1999). A superexpressão da ciclina A foi encontrada em amostra de pacientes com CCR e isso foi correlacionado com um pior prognóstico (HANDA *et al.*, 1999) e com uma sobrevida global reduzida (BAHNASSY *et al.*, 2004). A expressão da ciclina B também foi encontrada aumentada em amostras de CCR (WANG *et al.*, 1997). Juntos esses dados reforçam a importância do LPA no contexto do CCR, mediando a proliferação.

Por fim, foi investigada a participação das proteínas ROCK e STAT 3 no aumento de expressão das ciclinas E1, A2 e B1 induzido pelo LPA. Como esperado, a inibição farmacológica dessas proteínas preveniu o aumento de expressão dessas ciclinas (Fig. 5.19). Embora todas as ciclinas analisadas tenham tido seu aumento de expressão prevenido, apenas a ciclina A2 teve uma prevenção significativa quando ROCK e STAT 3 era inibidas de forma isolada. De forma interessante, a inibição conjunta dessas duas proteínas preveniu significativamente o aumento de expressão das três ciclinas, corroborando os dados encontrados na análise da progressão do ciclo celular, onde foi observada uma cooperação dessas vias. Ambas as vias já possuem correlação com a expressão de diversas ciclinas. Foi visto a participação de ROCK 1 e 2 na proliferação induzida pelo fator de crescimento derivado de plaquetas em células de músculo liso vascular. As duas isoformas de ROCK induziam a expressão de ciclina D1 nesse processo (ZHAO *et al.*, 2013). Além disso, a proteína ROCK na forma constitutivamente ativa foi capaz de induzir a progressão da fase G1 para S do ciclo celular em fibroblastos de camundongo (NIH 3T3) através da regulação das ciclinas D1 e A2 (CROFT & OLSON, 2006). Em relação a STAT 3, foi observada sua participação no aumento de expressão da ciclina D1 em células derivadas de câncer de mama (MDA-MB-468). Ainda, a inibição de STAT 3 induziu parada de ciclo celular e regulou negativamente a expressão da ciclina D1 em células derivadas de mielomas múltiplos (LEE *et al.*, 2013). Por outro lado, não existem trabalhos relatando a relação

entre o LPA e as vias de Rho-ROCK e de STAT 3 no aumento de expressão dessas ciclinas. Além disso, não se sabia da cooperação entre essas vias no processo proliferativo e na regulação da expressão das ciclinas E1, A2 e B1. Dessa forma, o trabalho ganha grande importância, contribuindo para um melhor entendimento dos processos e das sinalizações ativadas por esse fosfolipídeo.

No entanto, algumas questões ainda ficaram por ser respondidas, como qual via estaria ativando STAT 3 e qual via estaria sendo ativada por ROCK. Sabe-se que STAT 3 pode ser ativado principalmente pelas proteínas *janus kinase* (JAK), quinases da família Src e por receptores do tipo tirosina quinase (MIKLOSSY *et al.*, 2013). Nesse estudo não houve correlação de SRC e do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) com a fosforilação de STAT 3 induzida pelo LPA, uma vez que dados iniciais da inibição farmacológica dessas duas proteínas não foram capazes de prevenir essa fosforilação (dados não mostrados, experimento único). Dessa forma, proteínas JAKs e outros receptores tirosina quinase poderiam estar sendo ativados pelo LPA estimulando a ativação de STAT 3. Já ROCK poderia estar ativando a proteína LIMK, uma vez que essa via já foi relacionada com o aumento da ciclina A2 (CROFT & OLSON, 2006). Porém, estudos mais aprofundados devem ser feitos para que essas perguntas sejam respondidas e os componentes da via LPA-Rho-ROCK e LPA-STAT3 possam ser elucidados.

Mesmo com essas questões em aberto, o trabalho contribui não só para o entendimento do LPA na progressão do CCR, como demonstra a participação e a cooperação das vias Rho-ROCK e STAT 3 na proliferação celular. Dessa forma, tratamentos para CCR que visem a inibição de apenas uma via de sinalização podem ser ineficazes ao longo do tempo, já que outros mecanismos estão em conjunto atuando na promoção tumoral. Sendo assim, essas duas proteínas (ROCK e STAT 3) são potenciais alvos terapêuticos dessa doença, sendo sugerida a inibição em conjunto para uma maior eficácia do tratamento.

7. CONCLUSÕES

Este estudo nos permite concluir que o ácido lisofosfatídico (LPA), um fosfolípido presente no microambiente tumoral, foi capaz de estimular a proliferação celular na linhagem celular mais invasiva de câncer de cólon, HCT-116. Além disso, mostramos que essa estimulação ocorreu através de duas importantes vias de sinalização que se encontram alteradas em CCR, a via de Rho-ROCK e de STAT 3. Adicionalmente, mostramos que existe uma cooperação entre estas duas vias para promover a expressão das ciclinas E1, A2 e B1, estimulando assim a progressão do ciclo celular e consequente proliferação. Dessa forma, nosso trabalho contribui para um melhor entendimento do papel do LPA na progressão do câncer colorretal, além de demonstrar a cooperação entre duas importantes vias de sinalização ativadas por esse lipídeo, sugerindo que a inibição de ambas as vias poderia ser um potencial alvo terapêutico no controle deste tipo de tumor.

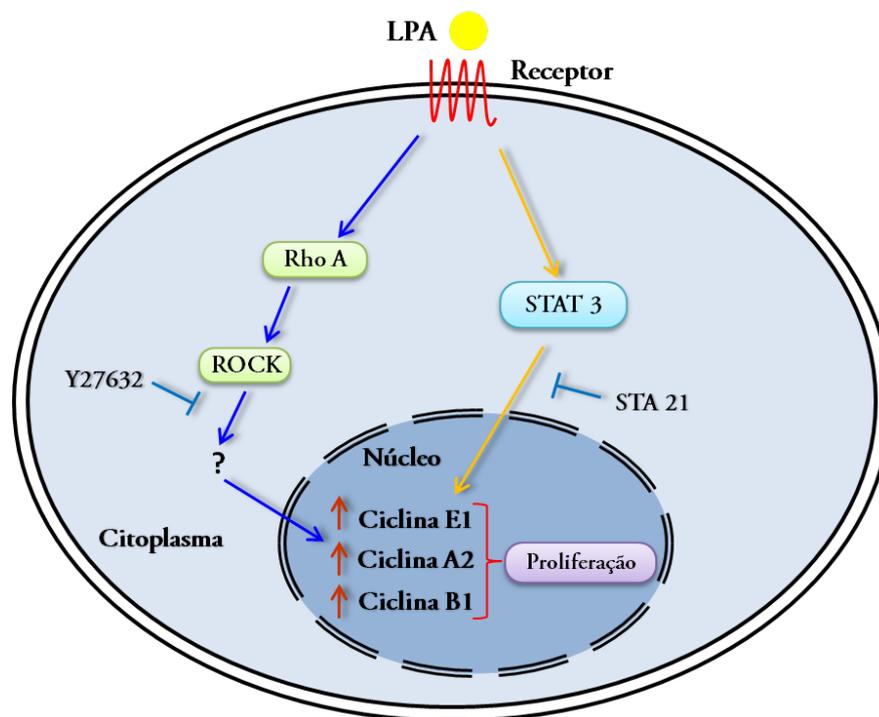


Figura 7.1: Modelo das vias ativadas pelo LPA na indução da proliferação na linhagem HCT-116. O LPA ativa as vias Rho-ROCK e STAT 3, mediando o aumento de expressão das ciclinas E1, A2 e B1, promovendo a passagem pelo ciclo celular e consequente proliferação. A inibição conjunta de ROCK, com Y27632, e de STAT 3, com STA 21, previne o aumento de expressão dessas ciclinas e a proliferação induzida pelo LPA.

8. REFERÊNCIAS

AHMED D, EIDE PW, EILERTSEN IA, DANIELSEN SA, EKNÆS M, et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. **Oncogenesis**; 2: e71, 2013.

AKIRA, S. Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. **Stem Cells**, 17: 138–146, 1999.

ANASTAS JN and MOON RT. Wnt signalling pathways as therapeutic targets in cancer. **Nat Rev Cancer**, 13: 11-26, 2013.

ANLIKER B, CHUN J. Lysophospholipid G Protein-coupled Receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, 279:20555-20558, 2004.

AOKI, J., INOUE, A. & OKUDAIRA, S. Two pathways for lysophosphatidic acid production. **Biochim Biophys Acta**, 1781: 513–518, 2008.

BADRI L and LAMA VN. Lysophosphatidic acid induces migration of human lung-resident mesenchymal stem cells through the β -catenin pathway. **Stem Cells**; 30(9):2010-9, 2012.

BAHNASSY AA, ZEKRI AR, EL-HOUSSINI S, EL-SHEHABY AM, MAHMOUD MR, ABDALLAH S, EL-SERAFI M. Cyclin A and cyclin D1 as significant prognostic markers in colorectal cancer patients. **BMC Gastroenterol**, 4: 22, 2004.

BARKER N and CLEVERS H. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**, 5(12):997-1014, 2006.

BARKER N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. **Molecular Cell Biology**, 15: 19-33, 2014.

BEHERA R, KUMAR V, LOHITE K, KARNIK S, KUNDU GC. Activation of JAK2/STAT3 signaling by osteopontin promotes tumor growth in human breast cancer cells. **Carcinogenesis**, 31(2):192-200, 2010.

BENITAH, S.A., VALERÓN, P.F., VAN AELST, L., MARSHALL, C.J. & LACAL, J.C. Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation. **Biochim Biophys Acta**, 1705: 121-132, 2004.

BOKU S, NAKAGAWA S, TODA H, KATO A, TAKAMURA N, OMIYA Y, INOUE T, KOYAMA T. ROCK2 regulates bFGF-induced proliferation of SH-SY5Y cells through GSK-3b and b-catenin pathway. **Brain Res**, 1492:7-17, 2013.

BRATTAIN MG, FINE WD, KHALED FM, THOMPSON J, BRATTAIN DE. Heterogeneity of 756 malignant cells from a human colonic carcinoma, **Cancer Res**, 41: 1751-1756, 1981.

BROMBERG J and DARNELL J E Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. **Oncogene**, 19: 2468-2473, 2000.

CHAN AT and GIOVANNUCCI EL. Primary prevention of colorectal cancer. **Gastroenterology**, 138: 2029-2043, 2010.

CHANTRET I, BARBAT A, DUSSAULX E, BRATTAIN MG, ZWEIBAUM A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: A survey of twenty cell lines. **Cancer Res**, 48:1936-1942, 1988.

CLEVERS H and NUSSE R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. **Cell**, 149: 1192-205, 2012.

CORVINUS FM, ORTH C, MORIGGL R, TSAREVA SA, WAGNER S, PFITZNER EB, BAUS D, KAUFMANN R, HUBERB LA, ZATLOUKAL K, BEUG H, ÖHLSCHLÄGER P, SCHÜTZ A, HALBHUBER KJ, FRIEDRICH K. Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth. **Neoplasia**, 7(6): 545–555, 2005.

CROFT DR and OLSON MF. The Rho GTPase effector ROCK regulates cyclin A, cyclin D1, and p27Kip1 levels by distinct mechanisms. **Mol Cell Biol**, 26(12):4612-27, 2006.

DARNELL J E Jr. STAs and gene regulation. **Science**, 277: 1630-1635, 1997.

DERMARDIROSSIAN, C., ROCKLIN, G., SEO, J.Y. & BOKOCH, G.M. Phosphorylation of RhoGDI by Src regulates Rho GTPase binding and cytosol-membrane cycling. **Mol Biol Cell**, 17: 4760-4768, 2006.

DOHI T, BELTRAMI E, WALL NR, PLESCIA J, ALTIERI DC. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. **J Clin Invest**, 114: 1117-1127, 2004.

DONNELLAN R and CHETTY R. Cyclin E in human cancers. **The FASEB Journal**, 13: 773-780, 1999.

FAGAN-SOLIS KD, SCHNEIDER SS, PENTECOST BT, BENTLEY BA, OTIS CN, GIERTHY JF, ARCARO KF. The RhoA pathway mediates MMP-2 and MMP-9-independent invasive behavior in a triple-negative breast cancer cell line. **J Cell Biochem**, 114(6):1385-94, 2013.

FLATMARK K, MAELANDSMO GM, MARTINSEN M, RASMUSSEN H, FODSTAD Ø. Twelve colorectal cancer cell lines exhibit highly variable growth and metastatic capacities in an orthotopic model in nude mice. **Eur J Cancer**, 40: 1593-1598, 2004.

FUKUI R, TANABE E, KITAYOSHI M, YOSHIKAWA K, FUKUSHIMA N, TSUJIUCHI T. Negative regulation of cell motile and invasive activities by lysophosphatidic acid receptor-3 in colon cancer HCT116 cells. **Tumour Biol**, 33(6):1899-905, 2012.

GIEPMANS BN and VAN IJZENDOORN SC. Epithelial cell–cell junctions and plasma membrane domains. **Biochim Biophys Acta**, 1788: 820-31, 2009.

HALL, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. **Science**, 279: 509-514, 1998.

HANAHAN D and WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144(5):646-74, 2011.

HANDA K, YAMAKAWA M, TAKEDA H, KIMURA S, TAKAHASHI T. Expression of cell cycle markers in colorectal carcinoma: superiority of cyclin a as an indicator of poor prognosis. **Int. J. Cancer**, 84, 225–233, 1999.

HARPER K, ARSENAULT, D., BOULAY-JEAN, S., LAUZIER, A., LUCIEN, F & DUBOIS, C.M. Autotaxin Promotes Cancer Invasion via the Lysophosphatidic Acid Receptor 4: Participation of the Cyclic AMP/EPAC/Rac1 Signaling Pathway in Invadopodia Formation. **Cancer Res**, 70: 4634-4643, 2010.

HARRISON SMW, KNIFLEY T, CHEN M, O'CONNOR KL. LPA, HGF, and EGF utilize distinct combinations of signaling pathways to promote migration and invasion of MDA-MB-231 breast carcinoma cells. **BMC Cancer**, 13: 501, 2013.

HARTMAN ZC, POAGE GM, den HOLLANDER P, et al. Growth of triple-negative breast cancer cells relies upon coordinate autocrine expression of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8. **Cancer Research**, 73: 3470-3480, 2013.

HUANG H, KONG D, BYUN KH, YE C, KODA S, LEE DH, OH BC, LEE SW, LEE B, ZABOLOTNY JM, KIM MS, BJØRBÆK C, LOWELL BB, KIM YB. Rho-kinase regulates energy balance by targeting hypothalamic leptin receptor signaling. **Nat Neurosci**, 15(10):1391-8, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Ministério da Saúde. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, INCA**, Rio de Janeiro, 2014.

ISHII I, FUKUSHIMA N, YE X, CHUN J. Lysophosphatidic receptors: Signalin and Biology. **Annu Rev Biochem**, 73:321-54, 2004.

JIRICNY J and NYSTRÖM-LATHI M. Mismatch repair defects in cancer. **Curr Opin Genet Dev**, 10: 157-61, 2000.

KIMURA, K., ITO, M., AMANO, M., CHIHARA, K., FUKATA, Y., NAKAFUKU, M., YAMAMORI, B., FENG, J., NAKANO, T., OKAWA, K., IWAMATSU, A. & KAIBUCHI, K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). **Science**, 273: 245-248, 1996.

KORKINA O, DONG Z, MARULLO A, WARSHAW G, SYMONS M, RUGGIERI R. The MLK-related Kinase (MRK) is a novel RhoC effector that mediates lysophosphatidic acid (LPA)-stimulated tumor cell invasion. **J. Biol. Chem**, 288: 5364-5373, 2013.

KOSINSKI C, LI VSW, CHAN ASY, ZHANG J, HO C, TSUI WY, CHAN TL, MIFFLIN RC, POWELL DW, YUEN ST, LEUNG SY, CHEN X. Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. **PNAS**, 104 (39): 15418–15423, 2007.

KUWADA SK and BYRT RW. The clinical features of the hereditary and nonhereditary polyposis syndromes. **Surg Oncol Clin N Am**, 5(3): 553-567, 1996.

LASSMANN S, SCHUSTER I, WALCH A, GÖBEL H, JÜTTING U, MAKOWIEC F, HOPT U, WERNER M. STAT3 mRNA and protein expression in colorectal cancer: effects on STAT3-inducible targets linked to cell survival and proliferation. **J Clin Pathol**, 60:173-179, 2007.

LEE JH, CHIANG SY, NAM D, CHUNG WS, LEE J, NA YS, SETHI G, AHN KS. Capillarisin inhibits constitutive and inducible STAT3 activation through induction of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases. **Cancer Lett**, pii: S0304-3835(13)00824-0, 2013.

LEVE F and MORGADO-DÍAZ JA. Rho GTPase signaling in the development of colorectal cancer. **J Cell Biochem**, 113(8): 2549-59, 2012.

LEVE F, DE SOUZA W, MORGADO-DÍAZ JA. A cross-link between protein kinase A and Rho-family GTPases signaling mediates cell-cell adhesion and actin cytoskeleton organization in epithelial cancer cells. **J Pharmacol Exp Ther**, 327(3):777-88, 2008.

LEVE F, MARCONDES TG, BASTOS LG, RABELLO SV, TANAKA MN, MORGADO-DÍAZ JA. Lysophosphatidic acid induces a migratory phenotype through a crosstalk between RhoA-Rock and Src-FAK signalling in colon cancer cells. **Eur J Pharmacol**, 671(1-3): 7-17, 2011.

LI LIN L, LIU A, PENG Z, et al. STAT3 Is Necessary for Proliferation and Survival in Colon Cancer-Initiating Cells. **Cancer Res**, 71:7226-7237, 2011.

LI N, TANG A, HUANG S, LI Z, LI X, SHEN S, MA J, WANG X. MiR-126 suppresses colon cancer cell proliferation and invasion via inhibiting RhoA/ROCK signaling pathway. **Mol Cell Biochem**, 380(1-2): 107-19, 2013.

LIN MU-EN, HERR D, CHUN J. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors: signaling properties and disease relevance. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, 91(3-4): 130-138, 2010.

LYNCH HT and SMYRK T. Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome). An update review. **Cancer**, 78: 1149-67, 1996.

MACRAE F, DU SART D and NASIOULAS S. Familial adenomatous polyposis. Best Pract Res **Clin Gastroenterol**, 23: 197-207, 2009.

MALUMBRES M and BARBACID M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nat Rev Cancer**, 9(3):153-66, 2009.

MALUMBRES M and BARBACID M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Nat Rev Cancer**, 1(3):222-31, 2001.

MIKLOSSY G, HILLIARD TS, TURKSON J. Therapeutic modulators of STAT signalling for human diseases. **Nat Rev Drug Discov**, 12(8):611-29, 2013.

MILLS, G.B. & MOOLENAAR, W.H. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. **Nat Rev Cancer**, 3: 582-591, 2003.

MUELLER, B.K., MACK, H. and TEUSCH, N. Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. **Nat Rev Drug Disc**, 4: 387-398, 2005.

NOGUCHI, K., HERR, D., MUTOH, T. & JEROLD, C. Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. **Curr Op Pharmacol**, 9: 15-23, 2009.

NOMANBHOY, T.K. & CERIONE, R. Characterization of the interaction between RhoGDI and Cdc42Hs using fluorescence spectroscopy. **J Biol Chem**, 271: 10004-9, 1996.

OBO Y, YAMADA T, FURUKAWA M, HOTTA M, HNOKI K, FUKUSHIMA N, TSUJIUCHI T. Frequent mutations of lysophosphatidic acid receptor-1 gene in rat liver tumors. **Mutat Res**, 660(1-2): 47-50, 2009.

PAGÈS C, SIMON MF, VALET P, SAULNIER-BLACHE JS. Lysophosphatidic acid synthesis and release. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, 64(1-4):1-10, 2001.

PAN MH, LAI CS, WU JC, HO CT. Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. **Mol Nutr Food Res**, 55(1):32-45, 2011.

QIAO, J., HOLIAN, O., LEE, B.S., HUANG, F., ZHANG, J. & LUM, H. PHOSPHORYLATION OF GTP dissociation inhibitor by PKA negatively regulates RhoA. **Am J Physiol Cell Physiol**, 295: C1161-1168, 2008.

RADTKE F and CLEVERS H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. **Science**, 307:1904-1909, 2005.

REIPSCHLÄGER S, KUBATZKY K, TAROMI S, BURGER M, ORTH J, AKTORIES K, SCHMIDT G. Toxin-induced RhoA activity mediates CCL1-triggered signal transducers and activators of transcription protein signaling. **J Biol Chem**, 287(14):11183-94, 2012.

ROWAN AJ, LAMLUM H, ILYAS M, WHEELER J, STRAUB J, et al. APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits". **Proc Natl Acad Sci**, 97: 3352-3357, 2000.

ROWLEY PT. Inherited susceptibility to colorectal cancer. **Annu Rev Medicine**, 56:539-554, 2005.

RUSOVICI R, GHALEB A, SHIM H, YANG VW, YUN CC. Lysophosphatidic acid prevents apoptosis of Caco-2 colon cancer cells via activation of mitogen-activated protein kinase and phosphorylation of Bad. **Biochim Biophys Acta**, 1770(8):1194-203, 2007.

SAHAI E, MARSHALL CJ. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. **Nat Cell Biol**, 5(8):711-9, 2003.

SAMUEL MS, LOPEZ JI, MCGHEE EJ, CROFT DR, STRACHAN D, TIMPSON P, MUNRO J, SCHRÖDER E, ZHOU J, BRUNTON VG, BARKER N, CLEVERS H, SANSOM OJ, ANDERSON KI, WEAVER VM, and OLSON MF. Actomyosin-mediated cellular tension drives increased tissue stiffness and β -catenin activation to induce interfollicular epidermal hyperplasia and tumor growth. **Cancer Cell**, 19(6): 776–791, 2011.

SANCHO E, BATLLE E and CLEVERS H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 20:695-723, 2004.

SANO S, ITAMI S, TAKEDA K, TARUTANI M, YAMAGUCHI Y, MIURA H, YOSHIKAWA K, AKIRA S, TAKEDA J. Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. **EMBO J**, 18: 4657–4668, 1999.

SANZ-MORENO V, GAGGIOLI C, YEO M, ALBRENGUES J, WALLBERG F, VIROS A, HOOPER S, MITTER R, FÉRAL CC, COOK M, LARKIN J, MARAIS R, MENEGUZZI G, SAHAI E, MARSHALL CJ. ROCK and JAK1 Signaling Cooperate to Control Actomyosin Contractility in Tumor Cells and Stroma. **Cancer Cell**, 20, 229–245, 2011.

SAWADA K, MORISHIGE K-I, TAHARA M, IKEBUCHI Y, KAWAGISHI R, TASAKA K & MURATA Y. Lysophosphatidic Acid Induces Focal Adhesion Assembly through Rho/Rho-Associated Kinase Pathway in Human Ovarian Cancer Cells. **Gynecologic Oncology**, 8: 252–259, 2002.

SCHMIDT A and HALL A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. **Genes Dev**, 13:1587-609, 2002.

SCHOFIELD AV, GAMELL C, BERNARD O. Tubulin polymerization promoting protein 1 (TPPP1) increases β -catenin expression through inhibition of HDAC6 activity in U2OS osteosarcoma cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 436(4): 571-7, 2013.

SCHUIJERS J, MOKRY M, HATZIS P, CUPPEN E, CLEVERS H. Wnt-induced transcriptional activation is exclusively mediated by TCF/LEF. **The EMBO Journal**, 33: 146-156, 2014.

SEO JH, JEONG KJ, OH WJ, SUL HJ, SOHN JS, KIM YK, CHO DO Y, KANG JK, PARK CG, LEE HY. Lysophosphatidic acid induces STAT3 phosphorylation and ovarian cancer cell motility: their inhibition by curcumin. **Cancer Lett**, 288(1):50-6, 2010.

SHIDA D, KITAYAMA J, YAMAGUCHI H, OKAJI Y, TSUNO NH, WATANABE T, TAKUWA Y, NAGAWA H. Lysophosphatidic acid (LPA) enhances the metastatic potential of human colon carcinoma DLD1 cells through LPA1. **Cancer Res**, 63(7):1706-11, 2003.

SHIDA D, WATANABE T, AOKI J, HAMA K, KITAYAMA J, SONODA H, KISHI Y, YAMAGUCHI H, SASAKI S, SAKO A, KONISHI T, ARAI H, NAGAWA H. Aberrant expression of lysophosphatidic acid (LPA) receptors in human colorectal cancer. **Lab Invest**, 84(10):1352-62, 2004.

SIVASHANMUGAM P, TANG L and DAAKA Y. Interleukin 6 Mediates the Lysophosphatidic Acid-regulated Cross-talk between Stromal and Epithelial Prostate Cancer Cells. **J. Biol. Chem**, 279:21154-21159, 2004.

SORENSEN SD, NICOLE O, PEAVY RD, MONTOYA LM, LEE CJ, MURPHY TJ, TRAYNELIS SF, HEPLER JR. Common signaling pathways link activation of murine PAR-1, LPA, and S1P receptors to proliferation of astrocytes. **Molecular Pharmacology**, 64: 1199-1209, 2003.

TRIANAFILLIDIS JK, NASIOULAS G, KOSMIDIS PA. Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. **Anticancer Res**, 29(7): 2727-37, 2009.

TSUKAHARA T, HANAZAWA S, KOBAYASHI T, IWAMOTO Y & MURAKAMI-MUROFUSHI K. Cyclic phosphatidic acid decreases proliferation and survival of colon cancer cells by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor γ . **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, 93: 126-33, 2010.

VALENTINE, W.J., FUJIWARA, Y., TSUKAHARA, R. & TIGYI, G. Lysophospholipid signaling: Beyond the EDGs. **Biochim Biophys Acta**, 1780: 597-605, 2008.

van de WETERING M, SANCHO E, VERWEIJ C, DE LAU W, OIVING I, HURLSTONE A, VAN DER HORN K, BATLLE E, COUDREUSE D, HARAMIS AP, TJON-PON-FONG M, MOERER P, VAN DEN BORN M, SOETE G, PALS S, EILERS M, MEDEMA R, CLEVERS H. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. **Cell**, 111(2):241-50, 2002.

VAN ES JH and CLEVERS H. Notch and Wnt inhibitors as potential new drugs for intestinal neoplastic disease. **Trends Mol Med**, 11:496–502, 2005.

VEGA, F.M. and RIDLEY, A.J. Rho GTPases in cancer cell biology. **FEBS Letters**, 582: 2093-2101, 2008.

WANG A, YOSHIMI N, INO N, TANAKA T, MORI H. Overexpression of cyclin B1 in human colorectal cancers. **J Cancer Res Clin Oncol**, 123(2):124-7, 1997.

WILLIER S, BUTT E, GRUNEWALD TG. Lysophosphatidic acid (LPA) signalling in cell migration and cancer invasion: a focussed review and analysis of LPAreceptor gene expression on the basis of more than 1700 cancer microarrays. **Biol Cell**, 105(8):317-33, 2013.

XIONG H, HONG J, DU W, LIN YW, REN LL, WANG YC, SU WY, WANG JL, CUI Y, WANG ZH and FANG JY. Roles of STAT3 and ZEB1 Proteins in E-cadherin Down-regulation and Human Colorectal Cancer Epithelial-Mesenchymal Transition. **J. Biol. Chem**, 287:5819-5832, 2012.

YAMADA T, OBO Y, FURUKAWA M, HOTTA M, YAMAZAKI A, HONOKI K, FUKUSHIMA N, TSUJIUCHI T. Mutations os lysophosphatidic acid receptor-1 gene during progression of lung tumors in rats. **Biochem Biophys Res Commun**, 378 (3): 424-7, 2009.

YANG M, ZHONG WW, SRIVASTAVA N, SLAVIN A, YANG J, HOEY T, AN S. G protein-coupled lysophosphatidic acid receptors stimulate proliferation of colon cancer cells through the {beta}-catenin pathway. **Proc Natl Acad Sci**, 102(17): 6027-32, 2005.

ZHANG H, BIALKOWSKA A, RUSOVICI R, CHANCHEVALAP S, SHIM H, KATZ JP, YANG VW, YUN CC. Lysophosphatidic acid facilitates proliferation of colon cancer cells via induction of Krüppel-like factor 5. **J Biol Chem**, 282(21): 15541-9, 2007.

ZHANG S, TANG Q, XU F, XUE Y, ZHEN Z, DENG Y, LIU M, CHEN J, LIU S, QIU M, LIAO Z, LI Z, LUO D, SHI F, ZHENG Y, BI F. RhoA regulates G1-S progression of gastric cancer cells by modulation of multiple INK4 family tumor suppressors. **Mol Cancer Res**, 7(4):570-80, 2009.

ZHAO Y, LV M, LIN H, CUI Y, WEI X, QIN Y, KOHAMA K, GAO Y. Rho-associated protein kinase isoforms stimulate proliferation of vascular smooth muscle cells through ERK and induction of cyclin D1 and PCNA. **Biochem Biophys Res Commun**, 432(3): 488-93, 2013.

9. ANEXO

9.1 Lista de genes com expressão alterada pelo tratamento com LPA

Gene Symbol	RefSeq	Fold-Change(LPA vs. S/SFB)
SNORD115-11	NR_003303	5,70016
SNORD115-26	NR_003343	5,70016
SNORD115-12	NR_003304	5,5514
USP17L6P	NR_027279	4,7943
SNORD115-42	NR_003357	4,34311
SNORD115-20	NR_003312	4,30491
SNORD115-6	NR_003298	3,90293
SNORD115-1	NR_001291	3,64886
SNORD115-44	NR_003359	3,16345
RFC1	L23320	2,82375
REXO1L1	AF495523	2,73936
GK3P	NR_026575	2,66405
SNORD115-17	NR_003309	2,6075
ORC6	NM_014321	2,54809
ADI1	NM_018269	2,51291
FUNDC2	NM_023934	2,50694
USP17L2	NM_201402	2,50644
LOC100288884	AK124122	2,49593
DTL	NM_016448	2,42924
FAM111B	NM_198947	2,412
REXO1L1	NM_172239	2,39803
CCNE2	NM_057749	2,37967
SNORD116-15	NR_003330	2,33433
MCM5	NM_006739	2,33055
DUSP5P	AK055963	2,31682
REXO1L2P	NR_003594	2,31463
CENPQ	NM_018132	2,3076
HIST1H2AB	NM_003513	2,28886
LOC100508181	XM_003120300	2,28748
ACAT2	NM_005891	2,28522
LOC349196	NR_027000	2,281
IGKC	BC073772	2,24189
USP17	NM_001105662	2,20904
GPAM	AK172782	2,17058
CLSPN	NM_022111	2,16854
HSD17B7P2	NR_003086	2,16651
ZBTB2	NM_020861	2,14739
MAD2L1	NM_002358	2,14101
PSMC3IP	NM_016556	2,14033
SKA3	NM_145061	2,12388

DSCC1	NM_024094	2,11163
ORC1	NM_004153	2,0966
RBM8A	BC017770	2,0928
CDC6	NM_001254	2,08617
FANCI	NM_001113378	2,07922
RRM2	NM_001165931	2,0695
MND1	NM_032117	2,0556
MCM4	NM_005914	2,04682
GINS2	NM_016095	2,03689
NMI	NM_004688	2,02869
TRIP13	NM_004237	2,02401
MARVELD2	NM_001038603	2,0229
HIST1H2BM	NM_003521	2,00863
EXO1	NM_130398	2,00558
NSMAF	NM_003580	2,00153
TSHZ2	NM_173485	-2,00939
FAM114A1	NM_138389	-2,02148
ANXA6	NM_001155	-2,03451
BBS9	NM_198428	-2,03474
SNORA23	NR_002962	-2,03998
ANO4	NM_178826	-2,04089
OR51M1	NM_001004756	-2,04648
C7orf54	NR_027330	-2,05071
LIFR	NM_002310	-2,05843
NBEA	NM_015678	-2,06086
GPR183	NM_004951	-2,06162
MIR181A2	NR_029611	-2,06407
CECR2	NM_031413	-2,0642
NOTCH3	NM_000435	-2,07152
SGPP2	NM_152386	-2,08341
LOC440993	AK128346	-2,09111
C6orf99	NM_001195032	-2,09302
ARRDC4	NM_183376	-2,09663
GM2A	NM_000405	-2,10344
GLRX	NM_002064	-2,10358
UTRN	NM_007124	-2,10379
ARSI	NM_001012301	-2,11696
LEMD1	NM_001001552	-2,11696
SPARC	NM_003118	-2,12343
SNORA64	NR_002326	-2,14612
RNU1-1	NR_004430	-2,16785
AHNAK2	NM_138420	-2,17287
RCAN2	NM_005822	-2,17443
NDRG1	NM_001135242	-2,21937
SH3BGRL2	NM_031469	-2,2235

SAT1	NR_027783	-2,23265
C17orf61	BC030270	-2,2337
LOC100127886	AF090938	-2,23781
STAT3	NM_139276	-2,24438
ST3GAL5	NM_003896	-2,27582
SNORD13P2	X58060	-2,33476
FAM131C	NM_182623	-2,34151
OR51J1	ENST00000332043	-2,3938
SLC29A4	NM_001040661	-2,39628
EGR1	NM_001964	-2,45891
RASSF2	NM_014737	-2,51918
MAP1B	NM_005909	-2,63232
TAS2R4	NM_016944	-2,63755
TCP11L2	NM_152772	-2,66932
TMEM14E	NM_001123228	-2,68993
OR51I1	NM_001005288	-2,74514
LOC100130876	AK130278	-2,81024
SESN3	NM_144665	-2,88083
NGFR	NM_002507	-2,88655