

**ESTUDO FUNCIONAL DA PROTEÍNA
MRCK-B EM ADENOCARCINOMAS
COLORRETAIS METASTÁTICOS OU NÃO**

JULIO CIRULLO NETO

**Tese apresentada á fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de doutor em
ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Rafael Malagoli Rocha

São Paulo

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Cirullo Neto, Julio

Estudo funcional da proteína MRCK- β em adenocarcinomas colorretais metastáticos ou não / Julio Cirullo Neto – São Paulo, 2018. 57p.

Tese(Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Rafael Malagoli Rocha

Descritores: 1. Adenocarcinoma/Adenocarcinoma. 2. Neoplasias Colorretais/Colorectal Neoplasms. 3. Proteínas/Proteins. 4. Imuno-Histoquímica/ Immunohistochemistry. 5. Expressão Gênica/Gene Expression. 6. Proteínas rho de Ligação ao GTP/rho GTP-Binding Proteins. 7. Prognóstico/ Prognosis. 8. Metástase Neoplásica/Neoplasm Metastasis

“Algumas batalhas são vencidas com espadas e lanças,
outras com papel e caneta.”
(George R. R. Martin)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Julio Cirullo Junior
E Marcia De Cia Cirullo

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Rafael Malagoli Rocha, pelo incentivo, paciência e confiança.

À minha família, pelo apoio, incentivo e a tranquilidade para que pudesse continuar a estudar sem grandes preocupações.

Ao Dr José Vassallo, pelo incentivo, confiança e amizade.

Aos meus amigos, pela motivação, apoio e incentivo.

Aos meus colegas e amigos do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino, pela ajuda direta ou indireta na realização desse trabalho.

Ao Centro Internacional de Pesquisa e Ensino, pelo suporte e infraestrutura que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, Instituto do Coração, em nome do Dr. José Eduardo Krieger, pelo suporte e infraestrutura que possibilitaram a realização deste trabalho.

À equipe da Pós-Graduação e à Biblioteca pelo suporte durante o desenvolvimento deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização, desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

A FAPESP, pelo apoio financeiro, processo 2013/21232-7.

RESUMO

Cirullo Neto J. **Estudo funcional da proteína MRCK- β em adenocarcinomas colorretais metastáticos ou não**. São Paulo; 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O câncer colorretal (CCR) é uma neoplasia de origem epitelial e abrange tumores de cólon e reto em homens e mulheres. É uma doença tratável e frequentemente curável quando na ausência de extensão para outros órgãos. No entanto, aproximadamente 50% a 60% dos pacientes diagnosticados com CCR irão desenvolver metástases que são mais comumente encontradas em fígado e pulmão. MRCK- β mediada por Cdc42 tem um papel importante na migração e metástase devido a sua capacidade de promover rearranjos do citoesqueleto. E ROCK2, mediada por RhoA também está relacionado à capacidade de invasão e migração. **Objetivo:** Avaliar a importância das proteínas MRCK- β e Cdc42 no processo de migração celular e formação de metástases em adenocarcinomas colorretais através estudos de expressão gênica, expressão proteína e estudos funcionais em linhagens celulares. **Materiais e Métodos:** 60 casos com CCR que desenvolveram metástases e 48 casos que não desenvolveram metástase foram selecionados e seu material parafinado foi resgatado para avaliação proteica. Imunoistoquímica foi realizada para os marcadores anti-MRCK- β , anti-Cdc42 e anti-ROCK2, as reações foram analisadas de forma manual através do sistema Envision FLEX/HRP (DAKO®). A partir de amostras do banco de tumores, presentes no Biobanco da Patologia Investigativa do AC Camargo Cancer Center, foram extraídos RNAs para avaliar a expressão gênica de Cdc42 e MRCK- β . A superexpressão proteica de MRCK- β foi avaliada através da linhagem celular SW480 e foram realizados ensaios de migração por transwell e a inibição da expressão foi realizada na linhagem HCT116. **Resultados:** Cdc42 e ROCK2 mostraram maior expressão nos tumores não metastáticos e MRCK- β nos tumores

metastáticos, todos com um valor $p < 0,001$. Entre os tumores primários e suas metástases, ROCK2 mostrou estar mais expresso no tumor primário ($p = 0,042$). Os marcadores também foram avaliados através do qRT-PCR e não mostram correlação com a expressão imunohistoquímica. Os ensaios de migração mostraram que quando ocorre a superexpressão de MRCK- β as células apresentam maior capacidade de migração ($p = 0,017$).

Conclusões: MRCK- β mostrou expressão apenas entre os tumores metastáticos e maior expressão na linhagem HCT116, que possui um maior potencial metastático. Quando a superexpressão de MRCK- β foi ampliada na linhagem SW480, foi avaliado que a capacidade de migração celular é aumentada indicando ser um potencial marcador de metástase em câncer colorretal.

SUMMARY

Cirullo Neto J. **Functional study of the MRCK- β protein in metastatic or non-metastatic colorectal adenocarcinoma.** São Paulo; 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Colorectal cancer (CRC) is a neoplasia of epithelial origin and covers tumors of the colon and rectum tumors in men and women. It is a treatable and often curable disease when in the absence of extension to other organs. However, approximately 50% to 60% of patients diagnosed with CRC will develop metastases that are most commonly found in the liver and lung. MRCK- β mediated by Cdc42 plays a role in migration and metastasis due to its ability to rearrangements of the cytoskeleton. And ROCK2, mediated by RhoA is also related to the capacity of invasion and migration **Aim:** To evaluate the importance of MRCK- β and Cdc42 proteins in the process of cell migration and formation of metastases in colorectal adenocarcinomas through studies of gene expression, protein expression and functional studies in cell lines. **Materials and Methods:** 60 cases of CRC that developed metastases and 48 cases that did not develop metastasis were selected and their paraffin material was rescued. Immunohistochemistry was performed for the anti-MRCK- β , anti-Cdc42 and anti-ROCK2 markers, reactions were analyzed manually using the Envision FLEX / HRP (DAKO®) protocol. RNAs samples from the tumor bank, presents on Biobank of Investigative Pathology of AC Camargo Cancer Center, were extracted to evaluate the gene expression of Cdc42 and MRCK- β . The overexpression of the protein of MRCK- β was evaluated through the SW480 cell line and transwell migration assays were performed and the inhibition of expression was performed in the HCT116 **Results:** Cdc42 and ROCK2 showed higher expression in non-metastatic tumors and MRCK- β in metastatic tumors, all with a p-value of <0.001. Among primary tumors and their metastases, ROCK2 showed to be more expressed in the

primary tumor ($p = 0.042$). The markers were also evaluated through qRT-PCR and did not show correlation with immunohistochemical expression. The migration assays showed that when MRCK- β overexpression occurs the cells have a higher migration capacity ($p = 0.017$). **Conclusions:** MRCK- β showed expression only among metastatic tumors and greater expression in the HCT116 cell line, which has a higher metastatic potential. When overexpression of MRCK- β was amplified in the SW480 cell line, it was evaluated that the cell migration capacity was increased indicating to be a potential marker of metastasis in colorectal cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diferentes estágios de acometimento de tumores colorretais primários	2
Figura 2	As diferentes subfamílias das Rho GTPases separadas pela sua similaridade e a porcentagem de semelhança com a principal proteína de cada grupo	9
Figura 3	Curva de sobrevida entre tumores metastáticos e não metastáticos	28
Figura 4	Imunoistoquímica (10x), (A) Tumor colorretal primário não metastático, mostrando ausência da marcação de MRCK- β e (B) tumor colorretal primário metastático, mostrando a marcação de MRCK- β	29
Figura 5	Imunoistoquímica (10x), (A) Tumor colorretal primário metastático mostrando uma expressão fraca de ROCK2 e (B) Tumor colorretal primário não metastático, mostrando uma forte expressão de ROCK2	30
Figura 6	Imunoistoquímica (10x), (A) Tumor colorretal primário metastático mostrando uma expressão fraca de CDC42 e (B) Tumor colorretal primário não metastático, mostrando uma forte expressão de CDC42	31
Figura 7	A ausência da expressão de MRCK- β , avaliada pela imunoistoquímica, mostrou maior sobrevida	34
Figura 8	Diferença de expressão de MRCK- β entre a linhagem celular HCT116 e a linhagem SW480. MRCK- β mostrou maior expressão na linhagem com maior capacidade de migração	36

Figura 9	Células Sw480 transfectadas contendo o gene de resistência a antibiótico sobrevivem ao G418	37
Figura 10	Western-Blot da linhagem SW480 com o plasmídeo de superexpressão, após o tratamento com antibiótico.....	38
Figura 11	Western-Blot da linhagem SW480 com o plasmídeo de superexpressão	38
Figura 12	Diferença da expressão em todas as condições realizadas pelo Western-Blot	39
Figura 13	Ensaio de cicatrização não mostra eficiência com a baixa quantidade de células transfectadas	41
Figura 14	Expressão do GFP apenas em poucas células, por meio do microscópio de fluorescência	41
Figura 15	Ensaio de Western-Blot, com a linhagem HCT116, após a transfecção com shRNA.....	42

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1	Marcadores imunistoquímicos, diluições, clones, fabricantes e padrão de marcação.....	21
Tabela 1	Caracterização dos pacientes nos dois grupos avaliados	27
Tabela 2	Avaliação entre a expressão dos marcadores imunistoquímicos e os CCR metastáticos e não metastáticos...	32
Tabela 3	Avaliação entre a expressão dos marcadores imunistoquímicos e os CCR primários e suas respectivas metástases	32
Tabela 4	Correlação entre os marcadores nos diferentes grupos tumorais	33
Tabela 5	Correlação da expressão imunistoquímica e RT-PCR.....	35
Tabela 6	Comparação da migração por transwell entre as diferentes condições de transfecção.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-fluorouracil
5-FU/LV	5-fluorouracil / leucovorin
<i>Arp2/3</i>	<i>Actin-Related Protein 2/3</i>
ATCC	American Type Culture Collection
CCR	Câncer Colorretal
<i>Cdc42</i>	<i>Cell Cycle Division 42</i>
cDNA	DNA complementar
<i>CHP</i>	<i>Calcium Binding Protein p22</i>
DAB	Diaminobenzidina
DHR1	Diapause Hormone Receptor-1
DHR2	Diapause Hormone Receptor-2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMPK	Myotonic Dystrophy Protein Kinase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOCK1	Dedicator of Cytokinesis 1
<i>EGF</i>	<i>Fator de Crescimento Epidérmico</i>
<i>EGFR</i>	<i>Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico</i>
EMT	Transição Epitélio-Mesênquima
FAP	Polipose Adenomatosa Familiar
FOLFIRI	5-fluorouracil / leucovorin/irotecano
FOLFOX	Ácido folínico (Leucovorin) / 5-fluorouracil / Oxaliplatin (Eloxatin)
GAP	GTPase-Activating Protein
GAPDH	Gliceraldeído Fosfato Desidrogenase
GDI	GDP Dissociation Inhibitor
GDP	Guanosina Difosfato
GEF	Guanine Nucleotide Exchange Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GTP	Guanosina Trifosfato
<i>HER2</i>	<i>Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico</i>

HNPCC	Câncer Colorretal Hereditário Não Polipoide
ID4	<i>Inhibitor of DNA Binding 4</i>
KRAS	<i>v-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
miR-224	Micro RNA 224
MLC2	Myosin Light Chain 2
MMP	Metaloproteinase
MMP-13	Metaloproteinase 13
MMP-2	Metaloproteinase 2
MRCK-α	<i>Myotonic Dystrophy Kinase-Related Cdc42-Binding Kinases Alpha</i>
MRCK-β	<i>Myotonic Dystrophy Kinase-Related Cdc42-Binding Kinases Beta</i>
N-WASP	Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
PAK	<i>P21 Protein (Cdc42/Rac)-Activated Kinase</i>
PAK2	<i>P21 Protein (Cdc42/Rac)-Activated Kinase 2</i>
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase</i>
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
qRT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Quantitative Real Time
Rac1	<i>Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1</i>
Rac2	<i>Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 2</i>
Rac3	<i>Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 3</i>
RAS	<i>Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
Rho	<i>Ras Homolog Family Member</i>
RhoA	<i>Ras Homolog Family Member A</i>
RIN	RNA Integrity Number
RhoB	<i>Ras Homolog Family Member B</i>
RhoBTB1	<i>Rho-related BTB Domain Containing 1</i>
RhoBTB2	<i>Rho-related BTB Domain Containing 2</i>
RhoC	<i>Ras Homolog Family Member C</i>
RhoD	<i>Ras Homolog Family Member D</i>
RhoF	<i>Ras Homolog Family Member F</i>
RhoG	<i>Ras Homolog Family Member G</i>

RhoH	<i>Ras Homolog Family Member H</i>
RhoJ	<i>Ras Homolog Family Member J</i>
RhoQ	<i>Ras Homolog Family Member Q</i>
RhoU	<i>Ras Homolog Family Member U</i>
Rif	<i>Ras Homolog Family Member F (in filopódia)</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAi	RNA de Interferência
RND1	<i>Rho family GTPase 1</i>
RND2	<i>Rho family GTPase 2</i>
RND3	<i>Rho family GTPase 3</i>
ROCK2	<i>Rho-Associated Coiled Coil-Containing Protein Kinase 2</i>
ROKC1	<i>Rho-Associated Coiled Coil-Containing Protein Kinase 1</i>
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
shRNA	Short Hairpin RNA
Tiam1	<i>T-lymphoma invasion and metastasis</i>
VEGF	<i>Fator de Crescimento Endotelial Vascular</i>
ZO-1	Zônula de oclusão 1

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O câncer colorretal	1
1.2	O câncer colorretal e a doença metastática	6
1.3	Rho gtpases e o câncer.....	8
1.4	Cdc42	12
1.5	MRCK- β	16
1.6	ROCK2	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivos específicos.....	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	Casuística.....	20
3.2	Imunoistoquímica.	20
3.3	qRT-PCR.....	22
3.4	Linhagens e cultura celular	23
3.5	Western-blot	23
3.6	Transfecção.....	24
3.7	Ensaio de cicatrização.....	25
3.8	Transwell	25
3.9	Análise estatística.....	26
4	RESULTADOS	27
4.1	Caracterização dos pacientes	27
4.2	Achados imunoistoquímicos	28
4.3	Expressão de MRCK- β e as características clínicas	34
4.4	Correlação da expressão imunoistoquímica com rt-PCR	35
4.5	Comparação das linhagens celulares por western-blot	35

4.6	Ensaio funcionais.....	36
4.6.1	Transwell	39
4.6.2	Ensaio de cicatrização.....	40
5	DISCUSSÃO	43
6	CONCLUSÃO	48
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

1 INTRODUÇÃO

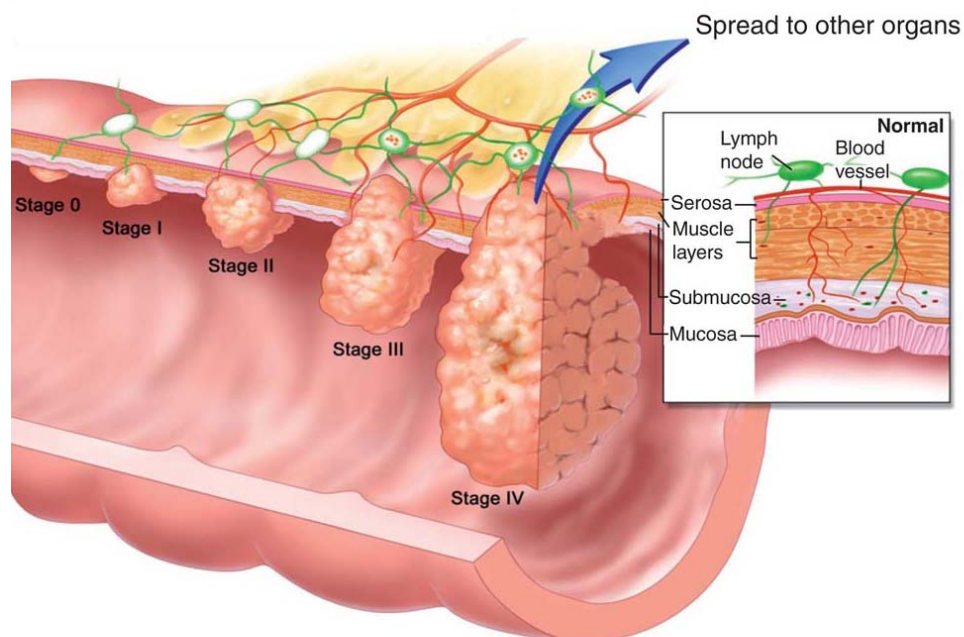
1.1 O CÂNCER COLORRETAL

O câncer é uma doença heterogênea, tanto quanto aos distintos tipos de neoplasia, quanto às possíveis populações celulares diferentes dentro do mesmo tumor. Por conseguinte, a identificação de eficazes alvos terapêuticos para a doença avançada e novos marcadores prognósticos para cada paciente, é ainda um desafio (CHAMBERS et al. 2002; KAPLAN et al. 2006).

O câncer colorretal (CCR) é uma neoplasia de origem epitelial e abrange tumores de cólon [o apêndice (vermiforme), ceco, cólon ascendente, ângulo hepático do cólon, cólon transversal, ângulo esplênico do cólon, cólon descendente e cólon sigmoide], junção retossigmoide e reto em homens e mulheres (AMIN et al. 2018). É uma doença tratável e frequentemente curável quando na ausência de extensão para outros órgãos (AMIN et al. 2018).

A classificação TNM define o nível de agressividade dos tumores colorretais e é usada para uma melhor abordagem terapêutica. Sua classificação é definida em: T é referente ao tumor primário e seu nível de acometimento (T0 - sem evidencia de tumor; Tis - carcinoma in situ: intraepitelial ou intramucosa; T1 - submucosa; T2 - muscular própria; T3 - subserosa; T4a - peritônio víscera T4b - outros órgãos.) (Figura 1), N é

referente ao acometimento linfonodal (N0 – ausência de linfonodos regionais acometidos; N1a - 1 linfonodo regional; N1B 2 ou 3 linfonodos regionais; N1c - depósitos tumorais na subserosa, mesentério ou tecidos não peritoneais, pericólicos ou perirretais / mesorretais sem metástase nodal regional; N2a- de 4 a 6 linfonodos regionais; N2b > 7 linfonodos regionais) e M a presença de metástase a distância (M0 - ausência de metástase M1a -presença de metástase confinada a 1 órgão sem metástase peritoneal; M1b – presença em 2 ou mais órgãos sem metástase peritoneal; M1c – metástase na superfície peritoneal com ou sem acometimento a outros órgãos) (AMIN et al. 2018).



Fonte: NIBBE e CHANCE (2009).

Figura 1 - Diferentes estágios de acometimento de tumores colorretais primários.

As estimativas indicam que o câncer colorretal será o segundo maior tipo tumoral em relação a causa de mortes em todo o mundo com 862.000 casos, ficando apenas atrás de câncer de pulmão (1.76 milhões) (World Health Organization-WHO 2018). As estimativas no Brasil em 2018 são de 36.360 novos casos, sendo 17.380 homens e 18.980 mulheres (Ministério da Saúde 2018), sendo o terceiro tipo de câncer mais frequente para homens e o segundo entre as mulheres (Ministério da Saúde 2018).

Os principais fatores de risco são: idade acima de 50 anos; história familiar de câncer de cólon e reto; história pessoal de câncer de ovário, endométrio ou mama; obesidade e sedentarismo. Também são fatores de risco, doenças inflamatórias do cólon como retocolite ulcerativa crônica e doença de Crohn e algumas condições hereditárias como Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) e Câncer Colorretal Hereditário Não Polipoide (HNPCC) (Ministério da Saúde 2018). A dieta com alto conteúdo de gordura e baixo teor de cálcio também estão relacionadas ao maior risco (Ministério da Saúde 2018), mas o consumo de carne vermelha e processada tem sido descrita como o principal fator da dieta em relação ao alto risco de câncer de cólon, a relação com o câncer na porção do reto não foi relacionada a esse consumo de carne (MAGALHÃES et al. 2012).

Os fatores convencionais para prognóstico de sobrevida do paciente são: grau histológico (diferenciação) (PUPPA et al. 2010) e o estágio do tumor, que é baseado no nível de invasão, acometimento de linfonodos regionais e metástase para outros órgãos (COMPTON 2003). Com a ocorrência de metástase a sobrevida dos pacientes em cinco anos após a

cirurgia, cai drasticamente de 90% a menos de 10% (O'CONNELL et al. 2004; BELOV et al. 2010).

Exames de pesquisa de sangue oculto nas fezes, retossigmoidoscopia e colonoscopia são recomendados em vários países em pessoas com mais de 50 anos. Pólipos adenomatosos são considerados precursores do câncer colorretal, e a sua retirada reduz consideravelmente a chance de desenvolver a doença (SABBAGH et al. 2011).

Apesar dos tumores colorretais terem essa denominação, o cólon e o reto possuem diferenças significativas, começando pela escolha do tratamento como terapias adjuvantes para cólon e reto e assim como neoadjuvantes como radio/quimioterapia para reto são substancialmente diferentes (ANDREONI et al. 2007).

O tratamento principal do CCR ainda é a cirurgia, porém ao longo do tempo houve uma evolução do tratamento quimioterápico, com alvo nos pacientes metastáticos, inicialmente constituído apenas pelo uso isolado do 5-fluorouracil (5-FU) e, ao longo do tempo, foi modificado sendo incluídos outros agentes, promovendo uma resposta clínica mais eficiente para os pacientes (TONON et al. 2007).

Outros quimioterápicos adicionados à terapia com o 5-FU foram o leucovorin (5-FU/LV), irotecano (FOLFIRI) e oxaliplatina (FOLFOX), essas terapias mostraram uma melhora nas taxas de sobrevida em relação à terapia padrão (SALTZ et al. 2000; DE GRAMONT et al. 2000). Outra forma de tratamento desenvolvida foi a terapia com o uso de anticorpos monoclonais, que se ligam à antígenos tumorais específicos e

desencadeiam respostas imunológicas devido à sua especificidade, evitando que as células normais sejam afetadas, mostrando ainda uma toxicidade menor que a quimioterapia tradicional. Três anticorpos monoclonais (Cetuximabe, Bevacizumabe e Panitumumabe) são usados no tratamento do CCR e muitos outros estão sendo validados em testes clínicos. O potencial da terapia com o uso de anticorpos monoclonais é associado a vários mecanismos incluindo as interferências vias de sinalização vital através da imuno-citotoxicidade seletiva, a porção Fc do anticorpo que está especificamente ligado ao tumor, reconhecida pela resposta imune e morte celular (NOGUCHI et al. 2013).

O Cetuximabe (Erbix®), por exemplo, é um anticorpo quimérico, que atua no domínio extracelular do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), como antagonista competitivo, impedindo o crescimento e proliferação celular. Apesar dos resultados clínicos significativos melhores, as respostas terapêuticas ao cetuximab permanecem amplamente variadas (YU et al. 2018).

O Bevacizumabe (Avastin®) é um anticorpo monoclonal humanizado que atua inibindo de forma específica o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), impedindo sua ligação com seu receptor, e conseqüentemente diminuindo a angiogênese e a capacidade de VEGF de regular a permeabilidade vascular, participando, assim, da hemostasia fisiológica (ALEKSHUN e GARRETT 2005).

Panitumumabe é um anticorpo humanizado que atua de forma semelhante ao cetuximabe, inibindo EGFR, porém nos tumores colorretais

com mutações nos genes da família *RAS* (*rat sarcoma viral oncogene homolog*) a eficiência de panitumumabe é afetada (AMADO et al. 2008), assim como a do Cetuximabe. As mutações principalmente no gene *KRAS* tipicamente ocorrem em lesões precursoras como nos adenomas de alto grau e são encontradas em 40% de todos os tumores colorretais, com predomínio de alterações nos códons 12 (82%) e 13 (17%) da sequência gênica. (KARAPETIS et al. 2008)

Nenhuma característica histopatológica referente ao câncer colorretal, quando isolada, é confiável para prever metástases e a avaliação de vários fatores de risco associados à doença não são utilizados como rotina padrão (GLASGOW et al. 2012). Algumas características moleculares como a hiperexpressão de HER2 e EGFR já foram associadas à doença metastática linfonodal (LU et al. 2012), mostrando a importância da busca de novos marcadores moleculares associados às metástases tanto linfonodais como em órgãos à distância.

1.2 O CÂNCER COLORRETAL E A DOENÇA METASTÁTICA

O mecanismo de metástase é constituído por uma cascata de eventos moleculares e celulares, que envolve a invasão celular, transporte e evasão tumoral da resposta imune no sistema circulatório, estabelecimento em um local secundário, extravasamento e, finalmente, colonização e crescimento (CHAMBERS et al. 2002; KAPLAN et al. 2006), tornando-se a principal

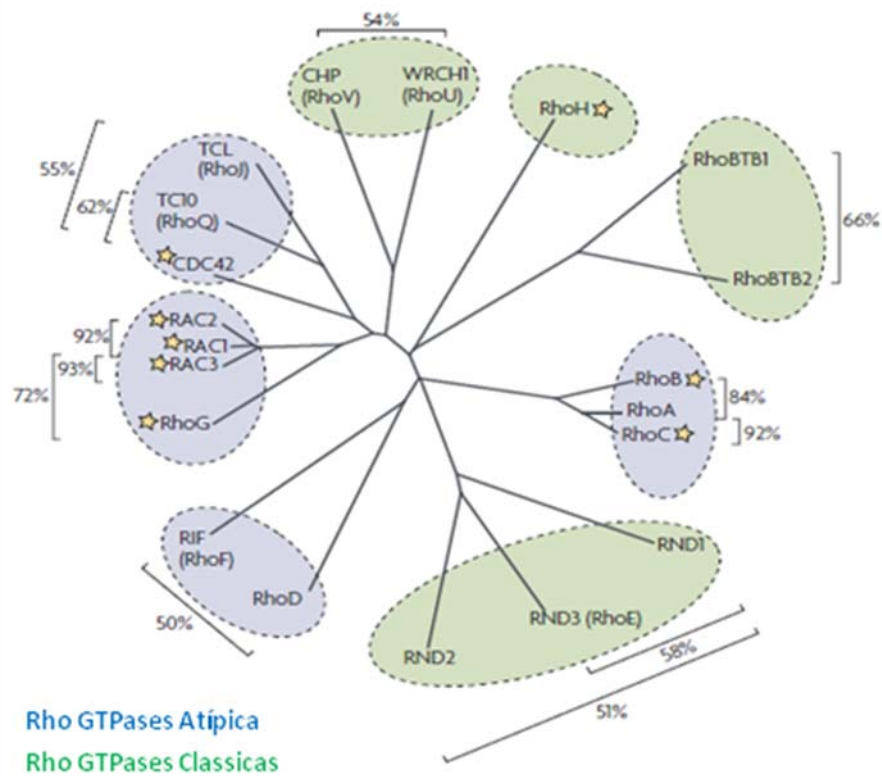
causa de morte dos pacientes com câncer. Melhorar os meios de prever o seu desenvolvimento é o principal objetivo da pesquisa clínica.

Quase 50% dos pacientes com CCR irão desenvolver metástases no fígado, enquanto que cerca de 10-15% dos pacientes desenvolverão metástases pulmonares. Geralmente, as metástases de CCR ocorrem inicialmente no fígado e, posteriormente, aparecem de forma sistêmica devido à drenagem venosa. Diferente do que ocorre no fígado, as metástases pulmonares são mais propensas à disseminação bilateral, tornando a taxa de ressecção menor que a de metástases hepáticas (LI et al. 2010). Em média a sobrevida de pacientes com câncer colorretal metastático é de 30 meses (VENOOK et al. 2017). Já foi demonstrado que a ressecção cirúrgica de metástases pulmonares isoladas é capaz de aumentar as taxas de sobrevivência destes pacientes para 40% em cinco anos (VILLENEUVE e SUNDARESAN 2009).

Compreender as diferenças entre o tumor primário e sua metástase é essencial para melhor foco terapêutico, há relatos da alta concordância genômica entre carcinoma colorretal primário e suas metástases, que indicam que mutações somáticas podem se acumular no microambiente de um câncer primário antes de se disseminar para seus locais metastáticos (CHEN et al. 2017; OUZOUNOVA et al. 2017).

1.3 RHO GTPASES E O CÂNCER

Algumas características aberrantes dos tumores como aumento da migração, proliferação, invasão e interações célula-célula associadas, que podem levar ao perfil metastático, podem estar relacionados às alterações da subfamília das proteínas Rho GTPases. Essas proteínas são de baixo peso molecular (21-25kDa) e constituem mais de 20 membros que são classificadas de acordo com sua similaridade em subfamílias: Rac (Rac1, Rac2, Rac3 e RhoG); Cdc42 (Cdc42, RhoQ e RhoJ); CHP e RhoU; RhoH; Rho BTB (RhoBTB1, RhoBTB2); Rho (RhoA, RhoB e RhoC); RND (RND1, RND2 e RND3); e Rif (RhoF e RhoD) (CHI et al. 2013). Dentre elas, são melhor caracterizadas: RhoA (*Ras homolog family member A*), Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) e Cdc42 (*Cell cycle division 42*) (Figura 2). Estas proteínas têm a capacidade de regular uma grande variedade de processos celulares e possuem um papel crucial para os rearranjos do citoesqueleto necessários para a motilidade celular. Estão envolvidas na progressão do ciclo celular e regulam a transcrição de genes. É cada vez mais claro que elas desempenham um papel importante na tumorigênese (SAHAI e MARSHALL 2002; MERTENS et al. 2003).



Fonte adaptado de: HEASMAN e RIDLEY (2008)

Figura 2 - As diferentes subfamílias das Rho GTPases separadas pela sua similaridade e a porcentagem de semelhança com a principal proteína de cada grupo.

Rac1, uma das principais proteínas da família da Rho GTPases, induz a polimerização da actina e a montagem do complexo de adesão de integrinas na periferia das células, levando à protrusão da membrana, o que é essencial para a migração das células. Os mecanismos bioquímicos pelos quais Rac1 catalisa a polimerização de actina são de grande interesse. Um exemplo é o complexo Arp2/3, que catalisa a polimerização de actina e a formação de novos filamentos (CONDEELIS 2001). Além desse mecanismo com o complexo Arp2/3, Rac1 pode regular a formação de lamellipodia

afetando a viabilidade da actina livre e bloqueando proteínas ou rompendo a actina através da confilina ou gelsolina¹, e de uma terceira forma, Rac1 pode aumentar a viabilidade dos monômeros de actina para incorporação dos filamentos através da regulação da confilina (HEASMAN e RIDLEY 2008). Além da função de formação de lamellipodia, Rac1 também foi identificado atuando na ativação de células fagocitárias, gerando superóxidos, o que coordena um mecanismo de defesa antibacteriano (MOREL et al. 1991).

O gene *Rho* foi identificado em 1985, mas foram as observações relatadas em 1992 que forneceram a inspiração inicial para identificar a função celular de Rho GTPases. Foi observado que Rho, juntamente com *Rac1*, induz a contração da actina e dos filamentos de miosina (lamellipodia), e posteriormente foi demonstrado que o Cdc42 também promove alterações na contração interagindo com actina (filopódia) (ETIENNE-MANNEVILLE e HALL 2002). Durante a formação do epitélio, o contato célula-célula controlado pelas Caderinas leva ao desenvolvimento de junções aderentes, porém não se tem certeza como isso ocorre. No primeiro momento *Cdc42* e *Rac1* são ativados e recrutados, devido ao contato das Caderinas entre células vizinhas, levando a formação de lamellipodia e/ou filopódia que penetra nessas células vizinhas isso parece gerar uma força motriz propiciando o contato próximo entre as células. A inibição da *Rho* também impede a aderência das células, aparentemente contribuindo para estabilizar as junções através do conjunto de filamentos de actina, (NOBES e HALL 1995; KOZMA et al. 1995; ETIENNE-MANNEVILLE e HALL 2002).

Já foi relatado que a inibição de *RhoA* promove progressão tumoral e metástase em câncer colorretal (RODRIGUES et al. 2014).

As Rho GTPases são mediadas por uma grande quantidade de proteínas que estão divididas em fatores de troca GDP/GTP (GEFs), proteínas ativadoras de GTPases (GAPs) e inibidores de dissociação da guanina (GDIs). As GEFs se ligam as GTPases no estado GDP e aceleram a troca por GTP, o que faz com que as GTPases fiquem na sua forma ativa, enquanto as GAPs fazem o papel inverso, levando do estado ativo GTP para o inativo GDP. As GDIs permitem a translocação entre membrana e citosol, e mantêm as proteínas na forma inativa no citoplasma (BOS et al. 2007; XU et al. 2010; DAVID et al. 2012; CHI et al. 2013).

As GEFs podem ser as principais responsáveis pelas diferentes funções e estímulos que controlam as Rho GTPases. Entre elas está Tiam1 (*T-lymphoma invasion and metastasis*) que é específica de Rac1, e originalmente foi identificada em uma tela de proteínas cuja superexpressão mostrou que pode causar um fenótipo invasivo em células de linfoma T (ADAMS et al. 2010). Estudos posteriores identificaram papéis para Tiam1 na regulação da polaridade apical-basal em células epiteliais, crescimento e diferenciação de neurônios e motilidade celular (MERTENS et al. 2006; ADAMS et al. 2010).

1.4 CDC42

A proteína humana Cdc42 foi primeiramente purificada a partir de membranas de placentas e inicialmente nomeada como GP, analogia as heterotriméricas proteínas Gs e Gi (CHEN et al. 2012). Cdc42 surgiu como um ponto de convergência de transdução de sinal em redes de sinalização intracelular, e medeia várias vias de sinalização, incluindo os receptores da tirosina quinase, receptores de citocinas e integrinas (SINHA e YANG 2008).

Assim como as outras GTPases, Cdc42 também é mediada por GEFs em resposta a estímulos celulares, convertendo da sua forma inativa GDP para sua forma ativa GTP. Duas famílias de GEFs que atuam em Cdc42 foram identificadas até o momento, uma delas, possui o domínio DH/PH, chamada família Dbl, e a outra contendo domínios homólogos a DOCK1 (DHR1 e DHR2) chamada família Dock (ZHENG 2001; DEL POZO et al. 2002). Entre as GEFs mais estudadas estão a intersectina-I (família Dbl), β -Pix (Arhgef7, família Dbl), Zizimin1 (DOCK9), ACG (DOCK11) e colibistina (Arhgef9, família Dbl) (CHEN et al. 2012).

Quando ativado, Cdc42 medeia uma cascata de sinalização que conduz à ativação de vários efetores, resultando em muitas atividades celulares, tais como a adesão celular, motilidade, polaridade, citocinese e crescimento. Os efeitos da ativação de Cdc42 levam a regulação da estrutura do citoesqueleto, incluindo estruturas de actina e tubulina, e tráfico de membrana, pela interação e ativação de mais de uma dúzia de efetores, incluindo PAKs e MRCKs (VAN AELST e D'SOUZA-SCHOREY 1997).

A perda ou o ganho de Cdc42, em certos tipos de células de tecidos em ratos, pode manifestar fenótipos patológicos imitando estados de doença, tais como doença proliferativa mieloide, linfopenia, anemia, e envelhecimento prematuro. Tem sido mostrado que a desregulação da atividade de Cdc42 na transformação celular pode levar ao desenvolvimento de câncer e metástase. (STENGEL et al. 2011).

Várias mutações proteicas de Cdc42, incluindo Cdc42Q61L e Cdc42G12V, representam mutações constitutivamente ativadas, e Cdc42F28L, que exhibe ciclagem espontânea e acelerada entre os estados e GDP-GTP, são capazes de induzir a formação de focos e crescimento independente de ancoragem em fibroblastos imortalizados (FIDYK et al. 2003), porém essas mutações não foram descritas em tumores em humanos (STENGEL et al. 2011). Mas a superexpressão de Cdc42 já foi relatada em diversos tipos de tumores como câncer não pequenas células de pulmão (LIU et al. 2009), adenocarcinoma colorretal (GÓMEZ DEL PULGAR et al. 2008), melanoma (TUCCI et al. 2007), câncer de mama (FRITZ et al. 2002) e câncer testicular (KAMAI et al. 2004).

Enquanto o aumento da ativação de Cdc42 tem mostrado provocar a transformação celular, e também modificar a capacidade de outras oncoproteínas, incluindo Ras e EGFR, a perda de Cdc42 impede a transformação oncogênica por Ras, possivelmente pela sua capacidade de aumentar a atividade de PI3K e Raf, duas bem caracterizadas vias efetoras de Ras. Além disso, Cdc42 é necessário para a transformação celular mediada pelo EGFR, através da regulação da ubiquitina ligase c-Cbl, que é

necessária para a endocitose, degradação e/ou reciclagem do receptor EGFR. Na ausência de Cdc42, EGFR é rapidamente degradado, suprimindo a transformação mediada pelo EGFR (WU et al. 2003; ZENONOS e KYPRIANOU 2013).

Devido a essas interações Cdc42 pode estar relacionado à metástase (BOUZAHZAH et al. 2001; JOHNSON et al. 2010). Há evidências que sugerem que Cdc42 esteja envolvido na formação de estruturas invadopodia, assim como na produção e a ativação de metaloproteinases (MMPs) responsáveis pela digestão necessária para a invasão da matriz extracelular (ECM). Em células de adenocarcinoma mamário de rato, a ativação de Cdc42 após estimulação EGF é necessária para a formação da invadopodia. Ativação de Cdc42 leva a polimerização das actinas mediadas por N-WASP e Arp2/3 resultando na formação invadopodia na matriz. Além disso, a estabilização da estrutura de invadopodia requer a atividade da cofilina, que pode também ser modulada pela sinalização Cdc42 (YAMAGUCHI et al. 2005).

Durante a movimentação de células mesenquimais CDC42 gera a contração actomiosina na ausência da sinalização Rho-ROCK, nesse caso o efetor de Cdc42 chamado MRCK é necessário para a fosforilação de MLC2 e pode estar relacionado à invasão celular (WILKINSON et al. 2005). Essa função em células mesenquimais é importante no contexto da metástase, uma vez que a transição epitélio-mesênquima (EMT) é um importante mecanismo que as células tumorais podem desenvolver e formar metástases.

Os estudos em células de melanoma indicam que, além do movimento das células mesenquimais, a atividade Cdc42 é também crucial para movimento celular amebóide, através da ativação de Cdc42 pela GEF DOCK10 e subsequente ativação dos efetores PAK2 e N-WASP. A inativação de DOCK10, PAK2 ou N-WASP resulta em uma transição de uma morfologia amebóide a uma morfologia mesenquimal. No entanto, o bloqueio de Cdc42 inibe tanto o movimento amebóide e mesenquimal e a invasão das células tumorais em geral, mostrando a importância de Cdc42 no contexto tumoral (GADEA et al. 2008).

Em relação a migração coletiva já foi relatado que fibroblastos, também podem funcionar como células iniciadoras da migração das células tumorais, nesse caso os fibroblastos requerem a ativação de MRCK mediada por Cdc42 (GAGGIOLI et al. 2006). Já foi mostrado que o miR-224 atua em Cdc42 e reduz a migração celular (KE et al. 2014).

Cdc42 tem um papel importante no câncer e compreender suas funções celulares juntamente com seus efetores, pode ser de grande valia para o prognóstico de carcinomas colorretais. Essa importância na migração e metástase tem sido muito discutida na literatura, e alguns autores têm demonstrado a interação de algumas proteínas, como por exemplo, Cdc42 induz o silenciamento de ID4 que é considerado um supressor tumoral (GÓMEZ DEL PULGAR et al. 2008), e que Cdc42 pode ser induzido por VEGF, atuando na formação de novos vasos (LAMALICE et al. 2004). Todos esses estímulos e funções se devem a diferentes moléculas que atuam nas

Rho GTPases como as GEFs ou moléculas efetoras como a MRCK- β (WILKINSON et al. 2005).

1.5 MRCK-B

MRCK- α e MRCK- β (*myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinases*) são proteínas que possuem sítios de ligação de Cdc42 e Rac1 e têm um papel importante na organização do citoesqueleto. São classificadas dentro da subfamília DMPK (*myotonic dystrophy protein kinase*). Ambas são proteínas de 190 kDa com múltiplos domínios e são expressas em uma grande diversidade de tecidos. MRCK possui uma região idêntica a ROCK, uma proteína efetora de Rho da mesma subfamília DMPK, e possui a capacidade de fosforilar grupos similares de substratos, como a miosina de cadeia leve. Tem sido observado que a contração da actomiosina requerida para invasão das células com uma morfologia mesenquimal é dependente da sinalização Cdc42-MRCK (WILKINSON et al. 2005).

Apenas a inibição de MRCK por RNA de interferência não tem efeito significativo na invasão celular. O mesmo acontece com o silenciamento de ROCK, mas quando silenciados ao mesmo tempo são muito mais efetivos na inibição da invasão. A morfologia da célula tende a ter um formato espiral e não alongada, mostrando que durante invasão mesenquimal, ROCK e MRCK regulam vias de forma independente e cooperativa, não compensatória. Juntas as proteínas devem regular a capacidade da célula de mudar a morfologia, respondendo a diferentes estímulos causados na

invasão celular (HEIKKILA et al. 2011). Uma importante contribuição da MRCK é aparentemente na invasão coletiva, promovendo a contração da actomiosina que ajuda na manutenção da co-adesão das células (HEIKKILA et al. 2011).

Rac1 não possui uma forte interação com MRCK mesmo possuindo um sítio de ligação (SCHWARZ et al. 2012). Esses dados juntos mostram que a inibição de MRCK e ROCK, que são regulados principalmente por Cdc42 e Rho respectivamente, poderiam interferir e diminuir diferentes processos de invasão tumoral (HEIKKILA et al. 2011).

MRCK- β durante o processo de migração celular possui uma co-expressão com Zônula de oclusão 1 (ZO-1 é um tipo de junção intercelular que estabelece a adesão célula-célula e mantém a estrutura, ancorando e gerando grupos de moléculas transmembranais e proteínas do citoesqueleto), esta interação requer que Cdc42 module MRCK- β na membrana das células que estão no processo de migração. A interrupção do complexo ZO-1/MRCK- β inibe a migração celular, o que mostra a importância de MRCK- β durante esse processo (HUO et al. 2011).

1.6 ROCK2

Outras proteínas efetoras que podem ter um papel crucial na metástase em câncer colorretal são as ROCKs (Rho-associated coiled-coil containing protein kinases). São proteínas bem descritas como efetoras de RhoA e estão presentes em duas similares isoformas: ROCK1 e ROCK2

(MATSUI et al. 1996), ambas possuem funções diferentes na regulação do citoesqueleto de actina, através de fosforilação de diferentes proteínas (SHI et al. 2013). ROCK2 é ativada através da interação com RhoA e modula a adesão e motilidade celular, devido a essa capacidade também esta diretamente relacionada a invasão tumoral (VISHNUBHOTLA et al. 2007).

Estudos mostraram que polimorfismos de ROCK2 estão associados com o desenvolvimento de tumores, a alteração Thr431Asn na proteína ROCK2 pode ser um alto risco para metástases em câncer de mama (KALENDER et al. 2009). No caso do câncer colorretal estudos, in vitro, mostraram a capacidade de invasão através da ação de ROCK2 em MMP-2 e MMP-13 (VISHNUBHOTLA et al. 2007).

A via da família Rho GTPases e as proteínas relacionadas diretamente, como MRCK- β e ROCK2, e sua capacidade de regular diversos processos celulares, principalmente a motilidade e migração celular, estão cada vez mais relacionadas a tumorigênese e formação de metástases. Estudos das Rho GTPases e suas proteínas relacionadas em câncer colorretal, não conseguem estabelecer com precisão padrões de expressão que possam servir como fator preditivo ou prognóstico do câncer. Desta forma, a identificação e validação dessas proteínas expressas em tumores com características e evoluções diferentes, pode ter um papel muito importante para o diagnóstico e prevenção do câncer colorretal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a importância das proteínas MRCK- β e Cdc42 no processo de migração celular e formação de metástases em adenocarcinomas colorretais, através estudos de expressão gênica, expressão proteína e estudos funcionais em linhagens celulares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a expressão de MRCK- β e Cdc42 através de imunohistoquímica entre tumores colorretais metastáticos ou não;
- Comparar a expressão das proteínas que mostrarem diferença na imunohistoquímica, em linhagens celulares de câncer colorretal metastáticas ou não;
- Ampliar a expressão das proteínas que mostrarem diferença na imunohistoquímica nas diferentes linhagens celulares e avaliar as possíveis alterações migração e invasão celular.

3 MATERIAIS E METODOS

3.1 CASUÍSTICA

Foram selecionados 60 casos de CCR (30 adenocarcinomas de reto e 30 adenocarcinomas de cólon) metastáticos, as respectivas metástases (54 hepáticas, 3 pulmonares e 3 hepáticos e pulmonares) e 48 casos de CCR que não desenvolveram metástases retrospectivamente dos arquivos do departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center entre 1990 e 2011. Entre os casos selecionados 2µl de RNA de 44 amostras de CCR (18 primários metastáticos 10 primários não metastáticos e 16 metástases) disponíveis no banco de tumores foram extraídos para realização dos qRT-PCR. Os critérios de inclusão foram casos que o tumor primário e a metástase foram tratados no A.C.Camargo Cancer Center e cinco anos de acompanhamento para os casos não metastáticos. Critérios de exclusão: ausência de material suficiente ou baixa qualidade da amostra mensurada por RIN (RNA integrity number).

3.2 IMUNOISTOQUÍMICA

Foram realizados cortes de quatro micrômetros de espessura postos em lâminas com carga elétrica (StarFrost) e mantidas em estufa a 60°C *overnight*. As lâminas foram identificadas e desparafinadas em xilol (2 trocas

de 10 minutos cada); então, passadas em álcool etílico em concentração decrescente (100%, 85% e 75%) e lavadas em água corrente por 5 minutos. A Recuperação antigênica foi realizada em banho Maria 96°C por 40 minutos, em solução FLEX pH alto. A peroxidase endógena foi bloqueada com reagente do mesmo fabricante por 5 minutos. Em seguida os cortes foram incubados com bloqueador de proteínas endógenas (DAKO®) por 5 minutos, à temperatura ambiente e em câmara úmida. Os cortes foram incubados com os seguintes anticorpos primários anti-Cdc42, anti-ROCK2 e anti-MRCK- β (Quadro 1) por 20 minutos à temperatura ambiente e posteriormente incubados com o anticorpo secundário Envision FLEX/HRP (DAKO®) durante 20 minutos cada à temperatura ambiente. Após lavagem em PBS, os cortes foram incubados com o cromógeno Diaminobenzidina (DAB – DAKO®) por 5 minutos e então lavados em água corrente e contracorados com hematoxilina de Harris por 10 segundos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, xilol, e montadas em equipamento automatizado (Tissue-Tek film).

Quadro 1 - Marcadores imunoistoquímicos, diluições, clones, fabricantes e padrão de marcação.

Marcador	Diluição	Clone	Fabricante	Padrão de marcação
Cdc42	1/200	26E11	AbFrontier®	Citoplasmático
MRCK- β	1/200	2F4	LifeSpan BioSciences®	Citoplasmático
ROCK2	1/100	Policlonal	Sigma-Aldrich®	Citoplasmático

Para a análise da imunohistoquímica, as lâminas foram digitalizadas (3DHISTECH's®) e a intensidade de marcação bem como a contagem de células de cada caso (dependendo do marcador), foram analisadas de forma automatizada pelo programa analisador de imagens (Pannoramic viewer, 3DHISTECH's®) utilizando o algoritmo DesitoQuant.

3.3 qRT-PCR

Material congelado disponível dos casos avaliados pela imunohistoquímica foi solicitado para o biobanco da instituição (18 primários metastáticos, 16 metástases e 10 primários não metastáticos) e o Departamento Anatomia Investigativa realizou a extração dos RNAs. Os cDNAs foram sintetizados a partir de 2 µg do RNA total, utilizando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), seguindo especificações do fabricante. As reações de qRT-PCR foram realizadas no aparelho Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem). Os ensaios foram realizados utilizando o sistema TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), seguindo as especificações do fabricante. Como iniciadores da reação de polimerização foram obtidos Assays (conjunto de primers e sondas) inventoriados pela Applied Biosystems do Brasil, para *CDC42* e *MRCK-β*. Como controle endógeno foi usado GAPDH (gliceraldeído fosfato desidrogenase).

3.4 LINHAGENS E CULTURA CELULAR

As linhagens celulares humanas de câncer colorretal HCT116 (perfil metastático) e SW480 (perfil não metastático) foram obtidas da ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA) e foram mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) com uma alta concentração de glicose, suplementado com 10% soro fetal bovino (LGC, São Paulo, SP, BR) 100 unidades/ml penicilina e 100 µg/ml estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 2mM L-glutamina (Invitrogen, CA, USA), e 1.0 mM piruvato de sódio (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

3.5 WESTERN-BLOT

A expressão do MRCK-β, que mostrou estar diferencialmente expressa nos diferentes tumores, foi quantificada e comparada entre as diferentes culturas por meio de western-blot. Resumidamente, as células foram lisadas em um tampão de lise contendo 10% SDS (*sodium dodecyl sulfate*) e inibidores de protease (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA). Após 10 minutos no gelo, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos a fim de remover os restos celulares. Em seguida, os lisados celulares (40 µg) foram corridos em um gel SDS-PAGE composto por 10% poliacrilamida. Após a eletroforese, as respectivas proteínas foram eletrotransferidas para membranas de PVDF (GE Healthcare, Little Chalfont,

Buckinghamshire, UK), sendo que a eficiência da transferência foi monitorada por meio do corante Ponceau (0,5%). Posteriormente, as membranas foram incubadas no tampão de bloqueio contendo 10% BSA 10 mM Tris-HCl, pH 7.6 150 mM NaCl, e 0.1% Tween 20 por 2 horas à temperatura ambiente e, então, incubadas *por toda a noite* à temperatura de 4°C com o anticorpo primário anti-MRCK- β . Após incubação com os anticorpos conjugados com a peroxidase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), a detecção foi realizada por meio de reagentes quimioluminescentes de alta performance (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

3.6 TRANSFECCÃO

As linhagens celulares SW480 e HCT116 foram cultivadas em placas de 6 poços até uma confluência de 70%, e, em seguida, a linhagem SW480 foi transfectada com o plasmídeo de superexpressão de MRCK- β (origene) e a linhagem HCT116 foi transfectada com shRNA contra MRCK- β (Sigma Aldrich, USA). Os plasmídeos (um vetor vazio e outro contendo a sequência para superexpressão/shRNA) foram diluídos com meio Opti-MEM sem soro (Invitrogen Corp.) por 5 min e foram misturados com Lipofectamine® 2000 Reagent (Invitrogen) por 20 min, para formar o complexo siRNA-Lipofectamine® 2000 Reagent (Invitrogen). Após 24 horas, as células foram lavadas com PBS e um novo meio foi adicionado.

3.7 ENSAIOS DE MIGRAÇÃO POR CICATRIZAÇÃO

Após a transfecção, as células atingiram a confluência, foram mantidas na condição de “starving” (células sem meio adequado para proliferação) e foi adicionada a mitomicina (0,2ug/ml) por uma hora. Foi realizado um risco com uma ponteira de 10 µl no meio da cultura e lavada com PBS para retirar as células suspensas. Marcas foram criadas na placa de cultura para ser possível avaliar a mesma região, e as fotos dos campos marcados foram tiradas no tempo 0 24h, 48h com o aumento de 200x e luminosidade 60 a análise das imagens foi feita pelo programa ImageJ, no qual tempo 0 h foi considerado 0% de migração.

3.8 ENSAIO DE INVASÃO POR TRANSWELL

As células transfectadas foram lavadas em PBS para retirada do meio e a tripsina foi usada para liberar as células da adesão com a placa, foram colocadas em um tubo falcon junto com meio com soro para desativar a tripsina e centrifugadas a 12000 rpm durante 3 minutos as células foram ressuspendidas em meio sem soro e 10µl foram usados na câmara de Newbawer, quatro campos foram contados para quantificar o número de células de cada cultura. 5×10^5 células em *starving* foram adicionados na câmara superior do transwell que possui filtros com poros de 8µm e meio de cultura com soro foi adicionado no compartimento abaixo dos filtros. As células ficaram a 37°C por 24 h a 5% de CO₂, em seguida foram lavadas em

PBS, fixadas através de metanol por 15 min, outra lavagem de PBS foi realizada, e foram coradas por hematoxilina. As células que não migraram foram retiradas com um swab e as células que migraram foram contadas no aumento de 200X em 5 campos aleatórios por filtro.

3.9 A ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa Prisma 5 para Windows, versão 5.02, foi utilizado para a análise estatística. O teste de Wilcoxon foi usado para comparar os diferentes grupos de variáveis categóricas dependentes. O teste Kappa foi usado para avaliar a concordância entre os diferentes grupos de variáveis categóricas. O teste do Qui quadrado foi usado para avaliar as frequências de escores aplicados aos diferentes grupos. A curva de sobrevivência de Kaplan Meier foi utilizada para tal avaliação. O teste *t* de Student foi utilizado para avaliar as diferenças entre dois grupos de variáveis numéricas de distribuição normal e o teste ANOVA para acima de dois grupos. O teste de Mann Witney foi utilizado para avaliar as diferenças entre dois grupos de distribuição não normal e o teste de Kruskal Wallis para acima de dois grupos. A normalidade das distribuições foi avaliada pelo teste de Kolmogorov Smirnov. O valor de significância considerado foi $p = 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÕES DOS PACIENTES

A descrição dos pacientes avaliados no estudo está representada na Tabela 1, comparando o grupo de pacientes metastáticos e os que não apresentaram metástase em pelo menos cinco anos de acompanhamento. Os pacientes metastáticos apresentam pior sobrevida quando comparado aos não metastáticos ($p= 0,001$) (Figura 3).

Tabela 1 - Caracterização dos pacientes nos dois grupos avaliados.

Caracterização	Categoria	Número de pacientes não metastáticos (%)	Número de pacientes metastáticos (%)
Idade diagnostico	ao < 50	13 (27%)	19 (33%)
	> 50	35 (73%)	38 (67%)
Gênero	Homem	15 (31%)	37 (64%)
	Mulher	33 (69%)	21 (36%)
Local da doença	Reto	18 (37,5%)	27(47%)
	Cólon	30 (63,5%)	31(53%)
Status final	Com Doença	10 (22%)	21 (39%)
	Sem Doença	33 (72%)	13 (24%)
	Morte pela Doença	3 (6%)	20 (37%)

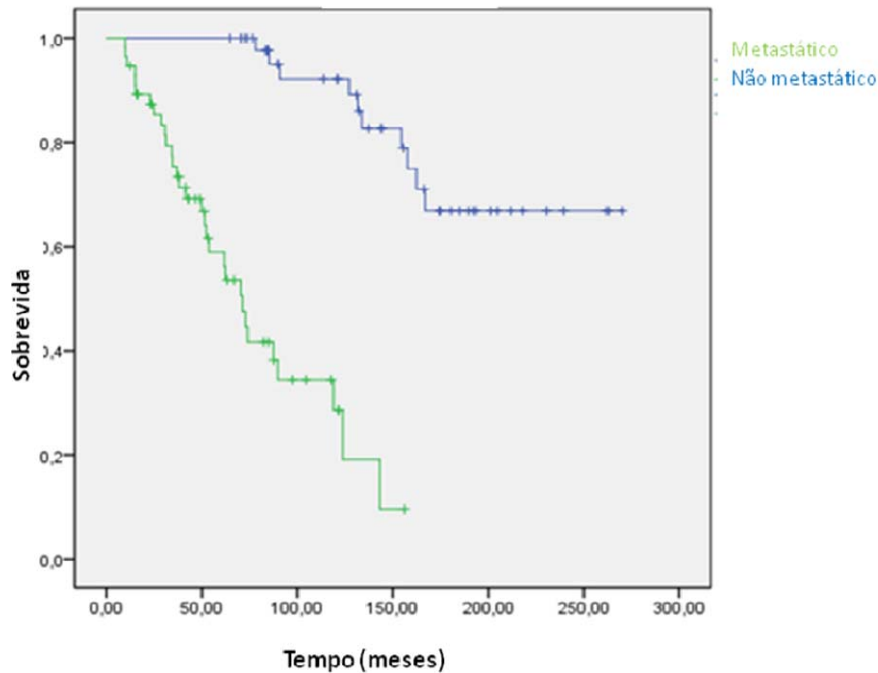


Figura 3 - Curva de sobrevivência entre tumores metastáticos e não metastáticos.

4.2 ACHADOS IMUNOISTOQUÍMICOS

MRCK- β mostrou maior expressão nos tumores colorretais primários com metástases (Figura 4) enquanto Cdc42 e ROCK2 mostraram maior expressão nos tumores primários colorretais não metastáticos (Figura 5 e 6), todos com um valor de p menor que 0,001 (Tabela 2).

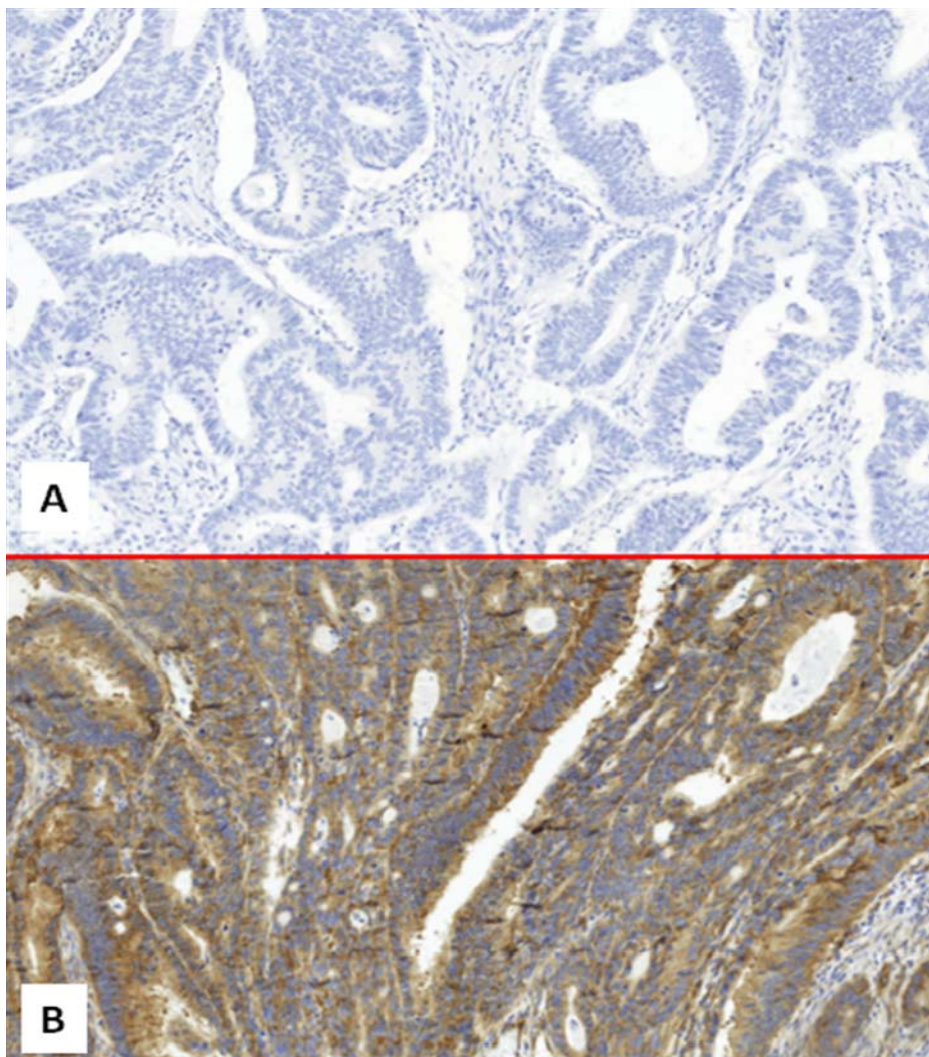


Figura 4 - Imunoistoquímica (10x), (A) Tumor colorretal primário não metastático, mostrando ausência da marcação de MRCK- β e (B) tumor colorretal primário metastático, mostrando a marcação de MRCK- β ($p = 0,001$).

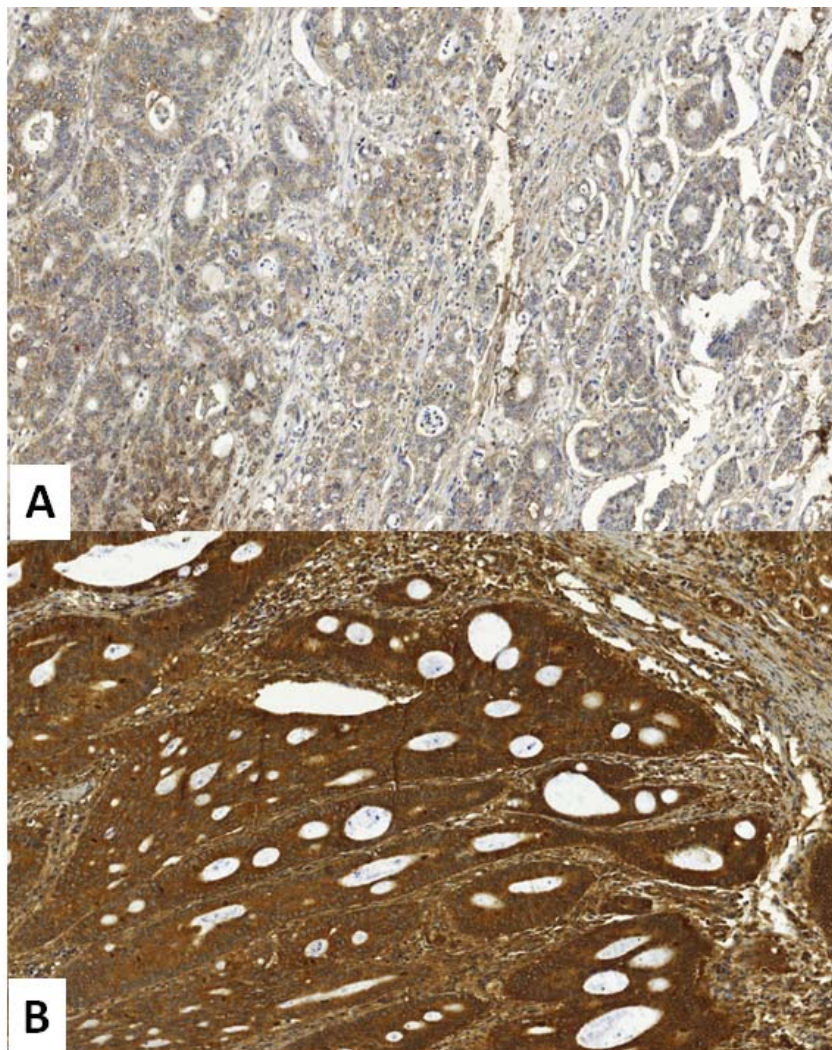


Figura 5 - Imunoistoquímica (10x), (A) Tumor colorretal primário metastático mostrando uma expressão fraca de ROCK2 e (B) Tumor colorretal primário não metastático, mostrando uma forte expressão de ROCK2 ($p = 0,001$).

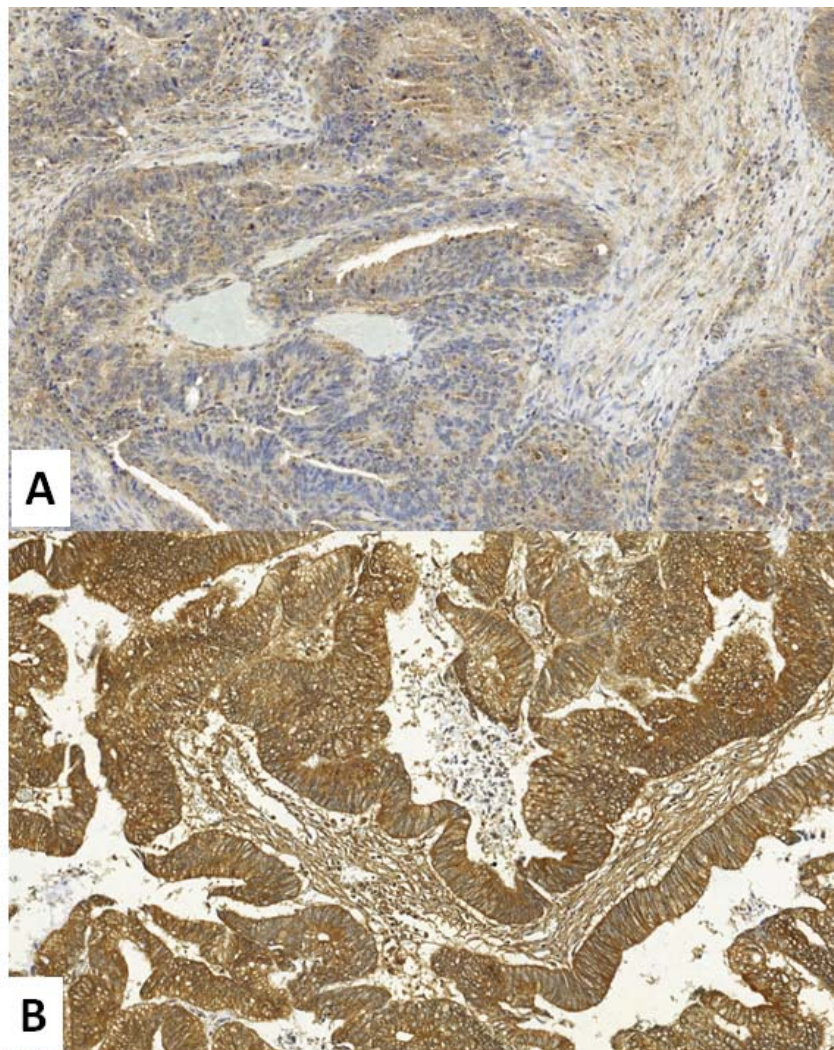


Figura 6 - Imunoistoquímica (10x), (A) Tumor colorretal primário metastático mostrando uma expressão fraca de CDC42 e (B) Tumor colorretal primário não metastático, mostrando uma forte expressão de CDC42 ($p = 0,001$).

Tabela 2 - Avaliação entre a expressão dos marcadores imunoistoquímicos e os CCR metastáticos e não metastáticos.

Marcador	Tecido	n	Média	Desvio				p
				padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	
Cdc42	PM	60	144,93	66,78	24,70	155,11	256,53	<0,001
	PNM	45	219,20	42,31	90,57	227,08	273,76	
ROCK2	PM	60	193,99	43,16	58,56	203,42	259,41	<0,001
	PNM	47	225,64	33,66	100,04	231,9	274,13	
MRCK- β	PM	60	36,38	50,99	0,00	6,29	212,82	<0,001
	PNM	47	1,96	8,79	0,00	0,02	57,17	

PNM: tumor primário não metastático; PM tumor primário metastático.

Quando comparado os tumores primários e suas respectivas metástases, ROCK2 mostrou maior expressão no tumor primário (0,042) (Tabela 3).

Tabela 3 - Avaliação entre a expressão dos marcadores imunoistoquímicos e os CCR primários e suas respectivas metástases.

Marcador	Tecido	n	Média	Desvio				p
				padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	
Cdc42	PM	60	144,93	66,78	24,70	155,11	256,53	0,477
	Meta	50	141,54	57,24	15,52	151,61	231,77	
ROCK2	PM	60	193,99	43,16	58,56	203,42	259,41	0,042
	Meta	51	178,13	45,68	22,01	185,49	268,44	
MRCK- β	PM	60	36,38	50,99	0,00	6,29	212,82	0.723
	Meta	56	26,41	40,23	0,00	6,45	164,45	

PM: tumor primário metastático; Meta : metástase, correspondente ao tumor primário

As correlações das expressões entre todos os marcadores também foram realizadas e foram incluídos outros marcadores, referentes a um estudo preliminar intitulado “Estudo de proteínas da família das rho gtpases e seu valor prognóstico em carcinomas colorretais”, devido a relevância de se avaliar de uma forma mais ampla as expressões de várias proteínas que participam da mesma via de sinalização (Tabela 4).

Tabela 4 – Correlação entre os marcadores nos diferentes grupos tumorais.

		Primário metastático		Primário não metastático		Metástases	
Correlação		r	p	r	p	r	p
MRCK-β	Pak1	0,336	<u>0,03</u>	NS	NS	NS	NS
MRCK-β	Tiam1	NS	NS	NS	NS	NS	NS
MRCK-β	Cdc42	NS	NS	NS	NS	0.364	<u>0,006</u>
MRCK-β	Rho	NS	NS	NS	NS	NS	NS
MRCK-β	Rac1	NS	NS	NS	NS	NS	NS
MRCK-β	Rock2	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cdc42	Rock2	0,410	<u>0,001</u>	0,776	<u><0,001</u>	0,557	<u><0,001</u>
Cdc42	Tiam1	0,447	<u>0,003</u>	0,335	0,061	NS	NS
Cdc42	Rho	0,343	<u>0,023</u>	NS	NS	NS	NS
Cdc42	Pak1	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cdc42	Rac1	0,343	<u>0,023</u>	0,674	<u><0,001</u>	NS	NS
Rock2	Pak1	0,425	<u>0,006</u>	0,486	<u>0,004</u>	NS	NS
Rock2	Tiam1	0,472	<u>0,002</u>	0,525	<u>0,001</u>	NS	NS
Rock2	Rho	0,408	<u>0,008</u>	0,366	<u>0,033</u>	NS	NS
Rock2	Rac1	0,329	<u>0,014</u>	0,763	<u><0,001</u>	NS	NS

NS: Não significativo.

4.3 EXPRESSÃO DE MRCK- β E AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

A expressão imunohistoquímica de MRCK- β foi comparada com as características clínicas dos pacientes e mostrou pior sobrevida quando positiva ($P= 0,024$) (Figura 7). Quando comparado com sexo, idade, local da doença e tratamento, MRCK- β não mostrou ser uma variável independente.

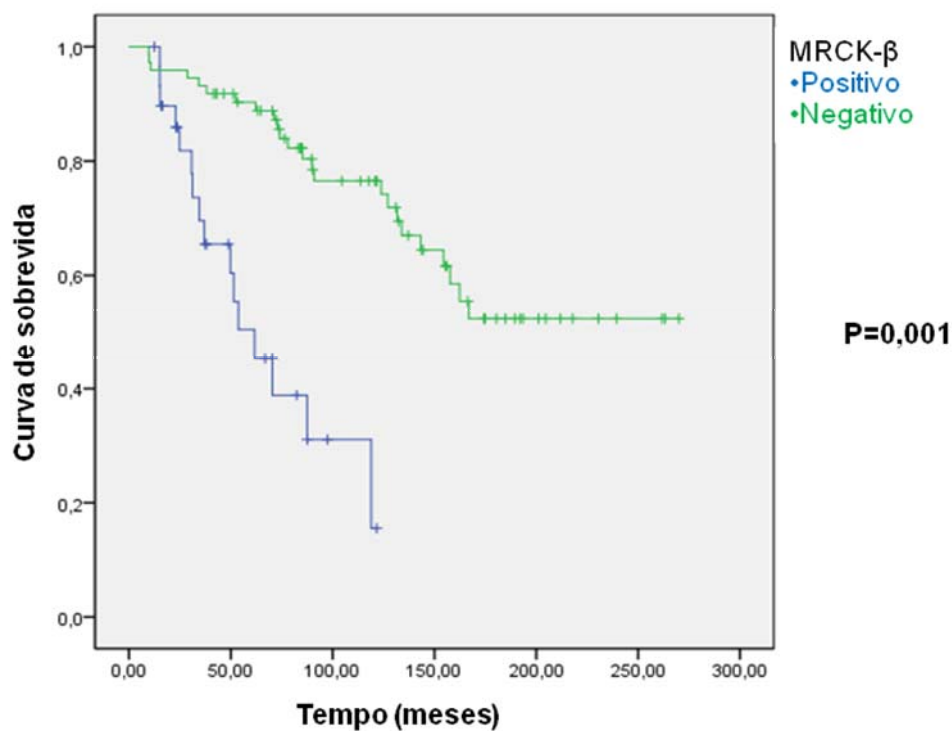


Figura 7 - A ausência de expressão de MRCK- β , avaliada pela imunohistoquímica, mostrou maior sobrevida ($p= 0,001$).

4.4 CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA COM RT-PCR

A expressão dos marcadores MRCK- β e Cdc42 também foram avaliados através de qRT-PCR e não mostram correlação com a expressão imunoistoquímica (Tabela 5).

Tabela 5 - Correlação da expressão imunoistoquímica e RT-PCR.

Marcadores		r	p
MRCK- β	qRT-PCR	0,028	0,858
Cdc42	qRT-PCR	- 0,002	0,990

4.5 COMPARAÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES POR WESTERN-BLOT

A partir dos resultados encontrados na imunoistoquímica, foi realizado um Western-blot para a expressão de MRCK- β em cultura de células, utilizando as linhagens HCT116 que possui um perfil metastático e a linhagem SW480 que possui um perfil não metastático. A expressão da beta-actina foi usada como normalizador por estar expressa de forma endógena. MRCK- β apresentou uma maior expressão na linhagem metastática (HCT116) em comparação à linhagem não metastática (SW480), corroborando com os achados imunoistoquímicos dos pacientes (Figura 8).

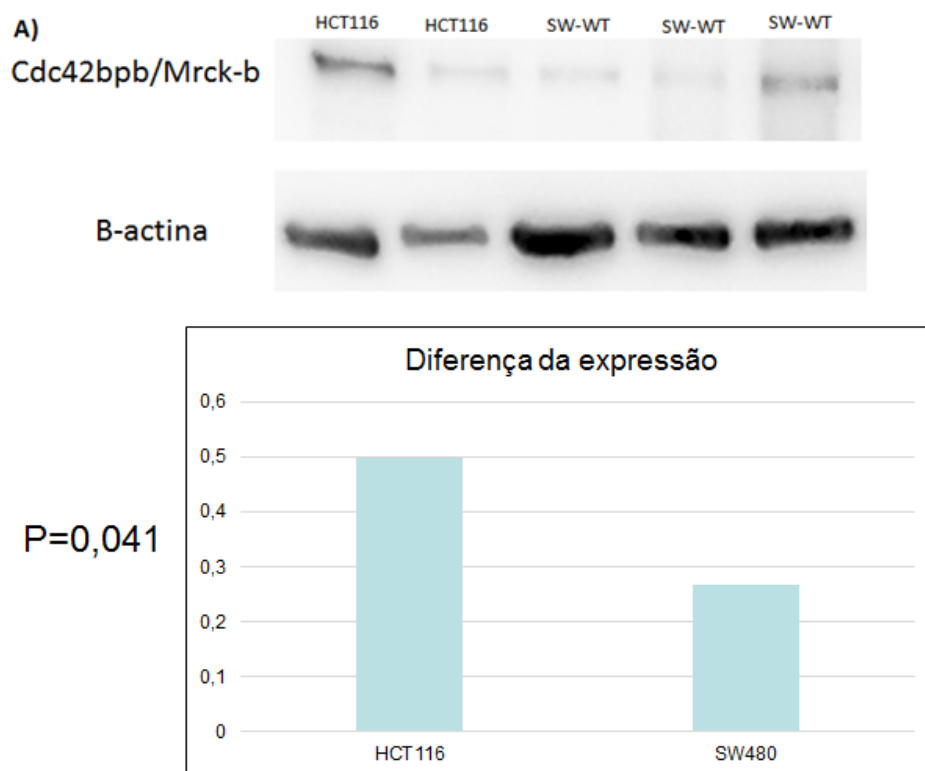


Figura 8 - Diferença de expressão de MRCK- β entre a linhagem celular HCT116 e a linhagem SW480. MRCK- β mostrou maior expressão na linhagem com maior capacidade de migração.

4.6 ENSAIOS FUNCIONAIS

Os plasmídeos de superexpressão e shRNA, e seus respectivos controles, foram inseridos em bactérias competentes através de choque térmico, em seguida as bactérias foram incubadas a 37°C e selecionadas com ampicilina. Após o crescimento das colônias resistentes devido aos plasmídeos possuírem gene de resistência a antibiótico, o DNA foi extraído para realização das transfecções e uma alíquota de bactérias transformadas foi armazenada.

As duas linhagens foram transfectadas e selecionadas por antibióticos (G418 1,4ug/ml para o plasmídeo de superexpressão na linhagem SW480 e puromicina a 0,4ug/ml para a o shRNA na linhagem HCT116), porém apesar das linhagens transfectadas resistirem ao antibiótico (Figura 9) foi visto que a expressão de MRCK- β a longo prazo é perdida, como podemos ver na figura 10 com o plasmídeo de superexpressão. Uma vez que não foi possível estabelecer uma linhagem permanente, foram impossibilitados os ensaios “in vivo”.

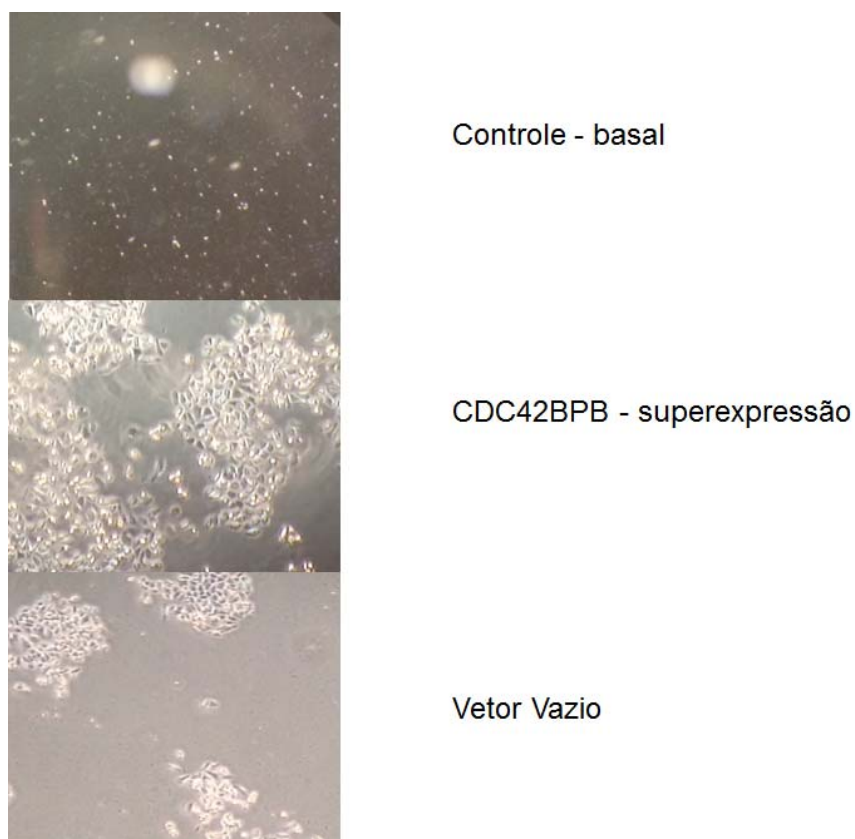


Figura 9 - Células SW480 transfectadas contendo o gene de resistência a antibiótico sobrevivem ao G418.

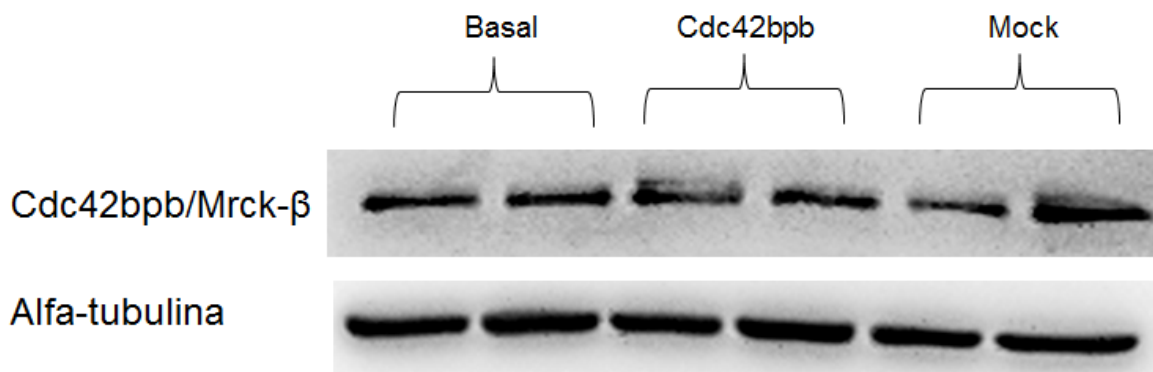


Figura 10 - Western-Blot da linhagem SW480 com o plasmídeo de superexpressão, após o tratamento com antibiótico. A superexpressão após os dias de tratamento com antibiótico é perdida.

Desta forma foram realizadas transfecções transientes, e os ensaios de Western-blot mostraram a superexpressão de MRCK- β . Essa superexpressão aparece com duas bandas devido ao GFP presente no plasmídeo, que é lido junto com a proteína avaliada (Figuras 11 e 12).

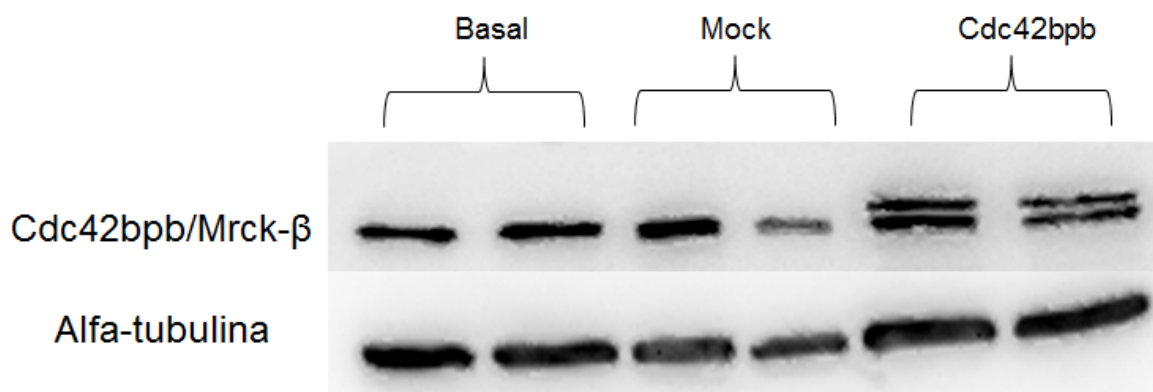


Figura 11 - Western-Blot da linhagem SW480 com o plasmídeo de superexpressão. Resultado de transfecção transiente.

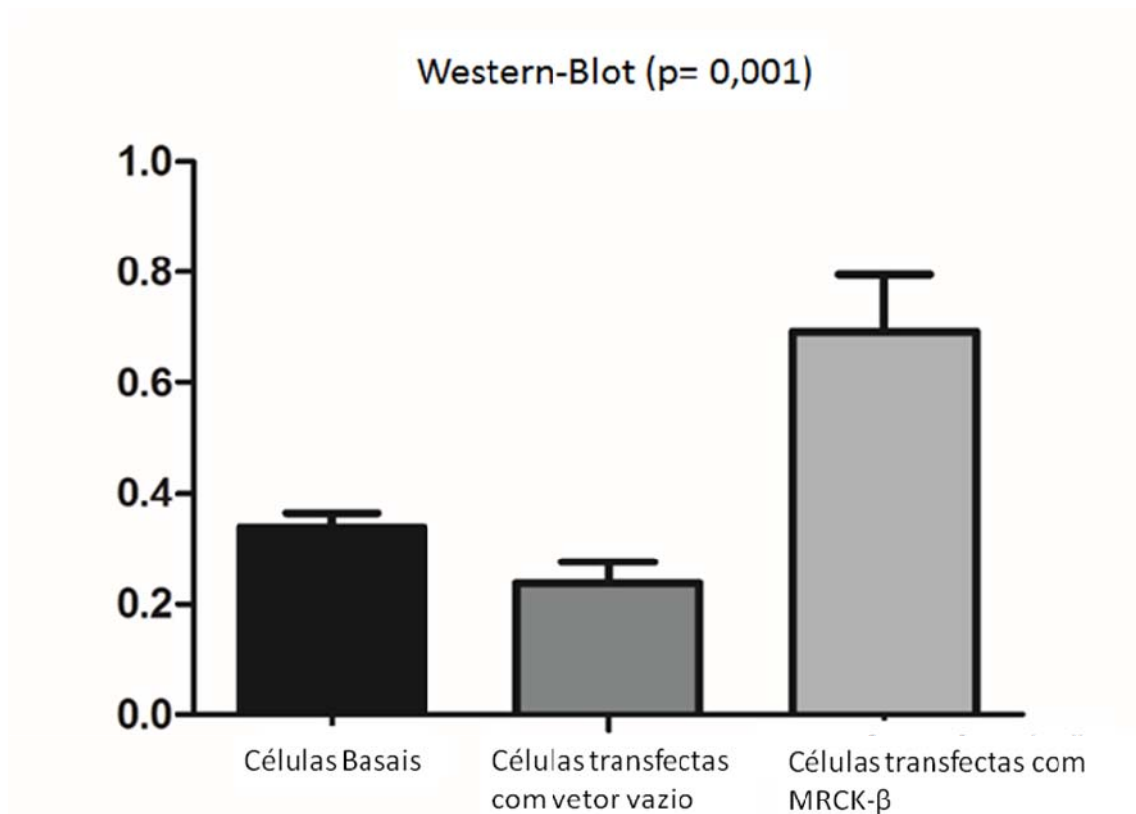


Figura 12 - Diferença da expressão em todas as condições realizadas pelo Western-Blot ($p= 0,001$).

4.6.1 Transwell

Em seguida foram realizados os ensaios de transwell que mostraram um aumento de migração de 45% a mais de células quando comparado com a linhagem não transfectada ($p= 0,017$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Comparação da migração por transwell entre as diferentes condições de transfecção.

Sw480	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3	
	Média de células	Razão	Média de células	Razão	Média de células	Razão
Basal	17	1	15	1	7,4	1
CDC42BPB / MRCK-β	31	1,81	20	1,33	9,2	1,20
Mock	25,5	1,49	14	0,89	6,3	0,78

4.6.2 Ensaio De Cicatrização

A quantidade de células eficientes após a transfecção transiente não foi suficiente para realização dos ensaios de cicatrização, uma vez que a baixa quantidade de células não foi suficiente para preencher a cicatriz criada e terá resultado igual à condição normal das células. O plasmídeo da superexpressão possui GFP, dessa forma é possível ver a quantidade de células transfectadas em um microscópio de fluorescência (Figuras 13 e 14). É importante lembrar que essa baixa quantidade de células transfectadas não interfere no ensaio de transwell.

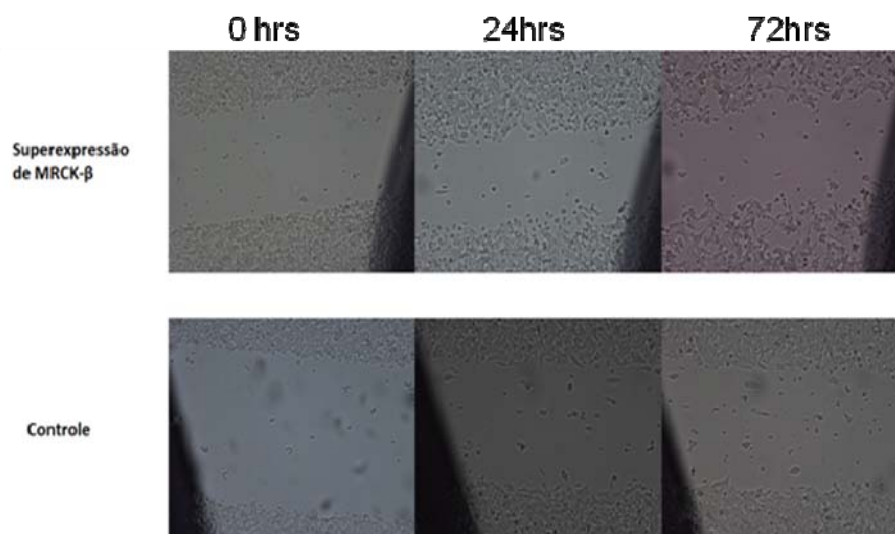


Figura 13 - Ensaio de cicatrização não mostra eficiência com a baixa quantidade de células transfectadas.

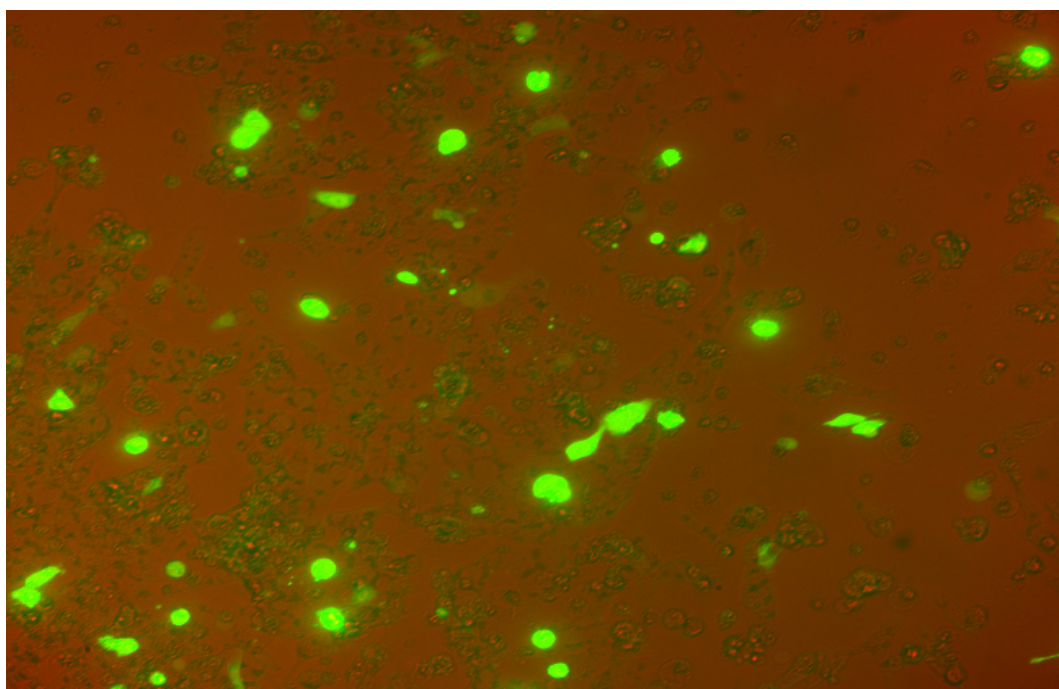


Figura 14 - Expressão do GFP apenas em poucas células, por meio do microscópio de fluorescência.

As transfecções utilizando o shRNA também mostraram dificuldades técnicas, e não foi possível reproduzir os ensaios com uma taxa aceitável para considerar a inibição proteica do alvo estudado, inviabilizando os ensaios de migração. Foram repetidas inúmeras transfecções procurando as melhores condições para uma maior eficiência, porem não foi obtida uma eficiência maior que 50 % (Figura 15).

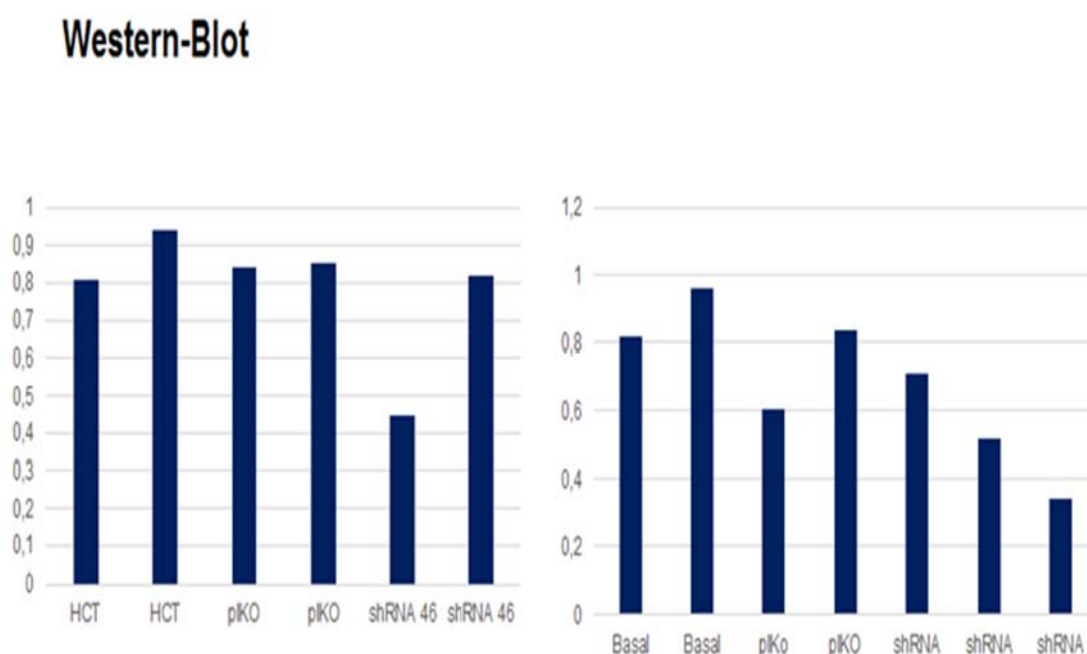


Figura 15 - Ensaios de Western-Blot, com a linhagem HCT116, após a transfecção com shRNA.

5 DISCUSSÃO

O câncer colorretal (CCR) é uma neoplasia de origem epitelial, tratável e frequentemente curável quando na ausência de extensão para outros órgãos. A estimativa é de 36.360 novos casos por ano no Brasil de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (Ministério da Saúde 2018).

No presente estudo foi avaliada a diferente expressão da proteína MRCK- β , juntamente, também foram avaliadas as proteínas Cdc42 e ROCK2, em carcinomas colorretais metastáticos, suas metástases pareadas e carcinomas colorretais não metastáticos, com pelo menos cinco anos de acompanhamento. E a possível relação entre MRCK- β e metástase foi avaliada através de ensaios de linhagens celulares.

Entre a casuística avaliada, como esperado, os pacientes metastáticos apresentaram menor tempo de sobrevida, quando comparados aos não metastáticos (Figura 3) (CHAMBERS et al. 2002). 51% eram do sexo feminino e 69% dos pacientes foram diagnosticados com câncer colorretal com idade superior a 50 anos, ambos os dados mostram acordo com a literatura existente (GOLAN et al. 2013).

Outro ponto avaliado foi o local da doença, sendo que 61 casos (58%) apresentaram doença no cólon e 45 casos (42%) apresentaram doença no reto. No estudo de GOLAN et al. em 2013, foram avaliados 42.347 pacientes e apenas 16% apresentavam doença no reto, uma porcentagem menor do que apresentada nessa casuística.

Uma vez que o câncer colorretal foi o terceiro tipo de câncer que mais levou a óbito em 2015, (774.000 mortes no mundo) (WHO 2018) e metástase sendo a principal causa de morte por câncer, a avaliação de marcadores relacionados à motilidade e migração celular, pode ser de grande importância para identificação de pacientes, que irão desenvolver essas metástases e conseqüentemente auxiliar no tratamento e prevenção.

Um desses marcadores é proteína MRCK- β . Ela é efetora de Cdc42 e tem um papel importante na organização do citoesqueleto (HUO et al. 2011). No presente estudo a avaliação de MRCK- β , pela imunohistoquímica, apresentou expressão na maioria dos tumores colorretais primários metastáticos, enquanto nos tumores não metastáticos, não houve expressão ($p=0001$). Este dado mostra que quando ausente não há grande relevância, uma vez que ambos os grupos possuem casos sem marcação, porém, quando presente é indicativo de pior prognóstico em tumores colorretais. Não existem estudos na literatura que mostram essa diferença.

A ausência de expressão de MRCK- β , avaliada pela imunohistoquímica, mostrou maior sobrevida ($p= 0,001$), seguindo o padrão esperado, uma vez que, esta diretamente relacionada aos tumores metastáticos (UNBEKANDT M et al 2014). Em relação às outras características clínicas, apenas a expressão de MRCK- β não mostrou ser um fator independente.

Outro marcador avaliado pela imunohistoquímica foi o Cdc42, que mostrou maior expressão nos tumores não metastáticos ($p=0,001$). Este dado entra em desacordo com a literatura sobre a relação de Cdc42 com

MRCK- β , uma vez que, já foi descrita que a co-expressão de MRCK- β com Zônula de oclusão 1 (ZO-1), é dependente de Cdc42 durante o processo de migração, mas quando as células estão confluentes e param de migrar, a co-expressão não é mais visualizada (HUO et al. 2011). Porém no presente estudo, a correlação de Cdc42 e MRCK- β , no grupo das metástases foi de $p=0,006$, indicando que nesse grupo a relação dessas proteínas esta vinculada a migração das células. A correlação de ambas as proteínas expressas por imunistoquímica e com o respectivo RNA de tecidos a fresco disponíveis, foi realizada, mas não mostrou significância.

Independente de todos os processos e estímulos que as células sofrem durante a migração como a invasão celular, transporte e evasão da resposta imune no sistema circulatório, parada em um local secundário, extravasamento e, finalmente, colonização e crescimento (KAPLAN et al. 2006), MRCK- β e CDC42 apresentaram, em suas metástases, o mesmo padrão de marcação observado nos respectivos tumores primários. Esta expressão entre primários e suas metástase reforça ainda mais a importância da avaliação dos tumores primários em câncer colorretal para identificar os tipos tumorais que virão a desenvolver metástases.

ROCK2 também foi avaliada entre os tumores primários e mostrou maior expressão nos tumores não metastáticos ($p= <0,001$), essa expressão elevada no grupo não metastático não corrobora com os dados da literatura, que mostram a associação de ROCK2 com a invasão tumoral uma vez que, em câncer colorretal, foi demonstrada uma expressão significativamente maior do que tecidos não cancerosos (VISHNUBHOTLA et al. 2007). Porém,

diferente dos outros marcadores avaliados, ROCK2 mostrou maior expressão nos tumores primários quando comparado às respectivas metástases ($p= 0,042$). Estudos mostram que ao inibir ROCK2, a invasão e capacidade metastática significativamente diminuem (ZHONG et al. 2018), isso não justifica essa diferença de expressão observada e deve ser melhor avaliada.

Dentre todos os resultados encontrados nas avaliações de imunistoquímica, MRCK- β mostrou significativa importância, uma vez que esta presente na maioria dos primários metastáticos e ausente em todos os não metastáticos, desta forma foi eleito para as análises em diferentes linhagens celulares, uma com características metastáticas (HCT116) (ISHIZU et al. 2007) e uma com características não metastáticas (SW480) (FLATMARK et al. 2004). O Western-Blot confirmou a especificidade do anticorpo anti-MRCK- β nas duas linhagens avaliadas, ambas reconheceram uma banda de 194kDa e não apresentaram bandas inespecíficas. MRCK- β apresentou uma maior expressão na linhagem metastática (HCT116) em comparação à linhagem não metastática (SW480), corroborando com os achados imunistoquímicos (Figura 5).

Após as fracassadas tentativas de criar transfecções permanentes, foram realizadas transfecções transientes tanto para a superexpressão como para a inibição de MRCK- β .

A superexpressão realizada na linhagem SW480, com perfil não metastático, juntamente com os ensaios transwell, mostraram aumento da migração celular em 45% quando comparado com a linhagem não

transfectada ($p= 0,017$), como esperado por HEIKKILA et al. (2011) MRCK- β esta envolvido na capacidade de invasão e migração no câncer, reforçando ainda mais os achados imunoistoquímicos e indicando o seu potencial prognóstico.

Já os estudos com shRNA na linhagem HCT116, com o objetivo de silenciar a expressão de MRCK- β , mostraram uma taxa de no máximo 50% de eficiência da transfecção, uma possível explicação para a baixa eficiência é a interferência de mecanismos endógenos de RNAi criando uma competição entre eles (ROSSI et al. 2008). Devido à baixa eficiência não foi possível avaliar a migração celular, uma vez que não seria possível saber se a ausência da diferença de expressão entre os transfectados e os controles, seria por causa da baixa eficiência ou apenas a porque não existe diferença ao diminuir a expressão de MRCK- β .

A mesma dificuldade ocorreu nos ensaios de cicatrização (Figuras 13,14 e 15), a baixa taxa de transfecção impossibilitou a análise.

Esta diferença de expressão de MRCK- β nunca foi descrita e pode ter grande importância durante o processo metastático no câncer colorretal, devido a suas funções de motilidade e migração celular. Apesar das dificuldades relatadas, os achados imunoistoquímicos e os estudos celulares mostrando maior migração quando MRCK- β esta superexpressa já demonstram um alto valor prognóstico para a avaliação da metástase em câncer colorretal. É necessário que mais estudos sejam realizados para validação de MRCK- β em câncer colorretal e em outros tipos tumorais, incluindo o silenciamento do marcador e estudos experimentais.

6 CONCLUSÃO

MRCK- β mostrou expressão apenas entre os tumores metastáticos, indicando ser um potencial marcador de metástase em câncer colorretal. Cdc42 mostrou maior expressão em tumores não metastáticos.

MRCK- β mostrou em linhagens celulares uma maior expressão na linhagem HCT116, que possui um maior potencial metastático, e uma menor expressão na linhagem SW480, que possui menor potencial metastático.

A expressão de MRCK- β foi ampliada na linhagem SW480, e foi avaliado que o potencial de migração celular é aumentado, através de ensaios de transwell.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams HC 3rd, Chen R, Liu Z, Whitehead IP. Regulation of breast cancer cell motility by T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein. **Breast Cancer Res** 2010; 12:R69.

Alekshun T, Garrett C. Targeted therapies in the treatment of colorectal cancers. **Cancer Control** 2005; 12:105-10.

Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2008; 26:1626-34.

Amin MB, Edge S, Greene F, et al. **AJCC cancer staging manual**. 8th ed. New York: Springer-Verlag; 2018. Colon and rectum; p.251-74.

Andreoni B, Chiappa A, Bertani E, et al. Surgical outcomes for colon and rectal cancer over a decade: results from a consecutive monocentric experience in 902 unselected patients. **World J Surg Oncol** 2007; 5:73.

Belov L, Zhou J, Christopherson RI. Cell surface markers in colorectal cancer prognosis. **Int J Mol Sci** 2010; 12:78-113.

Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. **Cell** 2007; 129:865-77.

Bouzahzah B, Albanese C, Ahmed F, et al. Rho family GTPases regulate mammary epithelium cell growth and metastasis through distinguishable pathways. **Mol Med** 2001; 7:816-30.

Chambers AF, Groom AC, Macdonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:563-72.

Chen C, Wirth A, Ponimaskin E. Cdc42: an important regulator of neuronal morphology. **Int J Biochem Cell Biol** 2012; 44:447-51.

Chen LG, Xia YJ, Cui Y. Upregulation of miR-101 enhances the cytotoxic effect of anticancer drugs through inhibition of colon cancer cell proliferation. **Oncol Rep** 2017; 38:100-8.

Chi X, Wang S, Huang Y, et al. Roles of rho GTPases in intracellular transport and cellular transformation. **Int J Mol Sci** 2013; 14:7089-108.

Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic and molecular features. **Mod Pathol** 2003; 16:376-88.

Condeelis J. How is actin polymerization nucleated in vivo? **Trends Cell Biol** 2001; 11:288-93.

David M, Petit D, Bertoglio J. Cell cycle regulation of Rho signaling pathways. **Cell Cycle** 2012; 11:3003-10.

de Gramont A, Figer A, Seymour M, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2000; 18:2938-47.

Del Pozo MA, Kiosses WB, Alderson NB, et al. Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. **Nat Cell Biol.** 2002; 4:232-9.

Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. **Nature** 2002; 420:629-35.

Fidyk N, Wang JB, Cerione RA. Influencing cellular transformation by modulating the rates of GTP hydrolysis by Cdc42. **Biochemistry** 2006; 45:7750-62.

Flatmark K, Maelandsmo GM, Martinsen M, et al. Twelve colorectal cancer cell lines exhibit highly variable growth and metastatic capacities in an orthotopic model in nude mice. **Eur J Cancer** 2004; 40:1593-8.

Fritz G, Brchetti C, Bahlmann F, et al. Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. **Br J Cancer** 2002; 87:635-44.

Gadea G, Sanz-Moreno V, Self A, et al. DOCK10-mediated Cdc42 activation is necessary for amoeboid invasion of melanoma cells. **Curr Biol** 2008; 18:1456-65.

Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, et al. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. **Nat Cell Biol** 2007; 9:1392-400.

Glasgow SC, Bleier JI, Burgart LJ, et al. Meta-analysis of histopathological features of primary colorectal cancers that predict lymph node metastases. **J Gastrointest Surg** 2012; 16:1019-28.

Golan T, Urban D, Berger R, Lawrence YR. Changing prognosis of metastatic colorectal adenocarcinoma: differential improvement by age and tumor location. **Cancer** 2013; 19:3084-91.

Gómez Del Pulgar T, Valdés-Mora F, Bandrés E, et al. Cdc42 is highly expressed in colorectal adenocarcinoma and downregulates ID4 through an epigenetic mechanism. **Int J Oncol** 2008; 33:185-93.

Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2008; 9:690-701.

Heikkila T, Wheatley E, Crighton D, et al. Co-crystal structures of inhibitors with MRCK- β , a key regulator of tumor cell invasion. **PLoS One** 2011; 6:e24825.

Huo L, Wen W, Wang R, et al. Cdc42-dependent formation of the ZO-1/MRCK β complex at the leading edge controls cell migration. **EMBO J** 2011; 30:665-78.

Ishizu K, Sunose N, Yamazaki K, Development and characterization of a model of liver metastasis using human colon cancer HCT-116 cells. **Biol Pharm Bull** 2007; 30:1779-83.

Johnson E, Seachrist DD, DeLeon-Rodriguez CM, et al. HER2/ErbB2-induced breast cancer cell migration and invasion require p120 catenin activation of Rac1 and Cdc42. **J Biol Chem** 2010; 285:29491-501.

Kalender ME, Demiryürek S, Oztuzcu S, et al. Association between the Thr431Asn polymorphism of the ROCK2 gene and risk of developing metastases of breast cancer. **Oncol Res** 2009; 18:583–91.

Kamai T, Yamanishi T, Shirataki H, Takagi K et al. Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer. **Clin Cancer Res** 2004; 10:4799-805.

Kaplan RN, Psaila B, Lyden D. Bone marrow cells in the 'pre-metastatic niche': within bone and beyond. **Cancer Metastasis Rev** 2006; 25:521-9.

Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer **N Engl J Med** 2008; 359:1757-65.

Ke TW , Hsu HL , Wu YH , et al. MicroRNA-224 suppresses colorectal cancer cell migration by targeting Cdc42. **Dis Markers** 2014; 2014:617150.

Kozma R, Ahmed S, Best A, Lim L. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. **Mol Cell Biol** 1995; 15:1942-52.

Lamallice L, Houle F, Jourdan G, Huot J. Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. **Oncogene** 2004; 23:434-45.

Li WH, Peng JJ, Xiang JQ, et al. Oncological outcome of unresectable lung metastases without extrapulmonary metastases in colorectal cancer. **World J Gastroenterol** 2010; 16:3318-24.

Liu Y, Wang Y, Zhang Y, et al. Abnormal expression of p120-catenin, E-cadherin, and small GTPases is significantly associated with malignant phenotype of human lung cancer. **Lung Cancer** 2009; 63:375-82.

Lu Y, Jingyan G, Baorong S, et al. Expression of EGFR, Her2 predict lymph node metastasis (LNM)-associated metastasis in colorectal cancer. **Cancer Biomark** 2012; 11:219-26.

Magalhães B, Peleteiro B, Lunet N. Dietary patterns and colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. **Eur J Cancer Prev** 2012; 21:15-23.

Matsui T, Amano M, Yamamoto T, et al. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. **EMBO J** 1996; 15:2208-16.

Mertens AE, Roovers RC, Collard JG. Regulation of Tiam1-Rac signalling. **FEBS Lett** 2003; 546:11-6.

Mertens AE, Pegtel DM, Collard JG. Tiam1 takes PART in cell polarity. **Trends Cell Biol** 2006; 16:308-16.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2018 Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2018.

Morel F, Doussiere J, Vignais PV. The superoxide generating oxidase of phagocytic cells. **Eur J Biochem** 1991; 201:523-46.

Nibbe RK, Chance MR. Approaches to biomarkers in human colorectal cancer: looking back, to go forward. **Biomark Med** 2009; 3:385-96.

Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. **Cell** 1995; 81:53-62.

Noguchi T, Ritter G, Nishikawa H. Antibody-based therapy in colorectal cancer. **Immunotherapy** 2013; 5:533-45.

O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. **J Natl Cancer Inst** 2004; 96:1420-5.

Ouzounova M, Lee E, Piranlioglu R, et al. Monocytic and granulocytic myeloid derived suppressor cells differentially regulate spatiotemporal tumour plasticity during metastatic cascade. **Nat Commun** 2017; 8:14979.

Puppa G, Sonzogni A, Colombari R, Pelosi G. TNM staging system of colorectal carcinoma: a critical appraisal of challenging issues. **Arch Pathol Lab Med** 2010; 134:837-52.

Rodrigues P, Macaya I, Bazzocco S, et al. RHOA inactivation enhances Wnt signalling and promotes colorectal cancer. **Nat Commun** 2014; 5:5458.

Rossi JJ. Expression strategies for short hairpin RNA interference triggers. **Hum Gene Ther** 2008; 19:313-7.

Sabbagh LC, Reveiz L, Aponte D, Aguiar S. Narrow-band imaging does not improve detection of colorectal polyps when compared to conventional colonoscopy: a randomized controlled trial and meta-analysis of published studies. **BMC Gastroenterol** 2011; 11:100.

Sahai E, Marshall CJ. RHO-GTPases and cancer. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:133-42.

Saltz LB, Cox JV, Blanke C, et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. **N Engl J Med** 2000; 343:905-14.

Schwarz J, Proff J, Hävemeier A, Serine-71 phosphorylation of Rac1 modulates downstream signaling. **PLoS One** 2012; 7:e44358.

Shi J, Wu X, Surma M, et al. Distinct roles for ROCK1 and ROCK2 in the regulation of cell detachment. **Cell Death Dis** 2013; 4:e483.

Sinha S, Yang W. Cellular signaling for activation of Rho GTPase Cdc42. **Cell Signal** 2008; 20:1927-34.

Stengel K, Zheng Y. Cdc42 in oncogenic transformation, invasion, and tumorigenesis. **Cell Signal** 2011; 23:1415-23.

Tonon LM, Secoli SR, Caponero R. Câncer colorretal: uma revisão da abordagem terapêutica com bevacizumabe. **Rev Bras Cancerol** 2007; 53:173-82.

Tucci MG, Lucarini G, Brancorsini D, et al. Involvement of E-cadherin, beta-catenin, Cdc42 and CXCR4 in the progression and prognosis of cutaneous melanoma. **Br J Dermatol** 2007; 157:1212-6.

Unbekandt M, Croft DR, Crighton D, et al. A novel small-molecule MRCK inhibitor blocks cancer cell invasion. **Cell Commun Signal** 2014; 12:54.

Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. **Genes Dev** 1997; 11:2295-322.

Venook AP, Niedzwiecki D, Lenz HJ, et al. Effect of first-line chemotherapy combined with cetuximab or bevacizumab on overall survival in patients with KRAS wild-type advanced or metastatic colorectal cancer: a randomized clinical Trial. **JAMA** 2017; 317:2392-401.

Villeneuve PJ, Sundaresan RS. Surgical management of colorectal lung metastasis. **Clin Colon Rectal Surg** 2009; 22:233-41.

Vishnubhotla R, Sun S, Huq J, et al. ROCK-II mediates colon cancer invasion via regulation of MMP-2 and MMP-13 at the site of invadopodia as revealed by multiphoton imaging. **Lab Invest** 2007; 87:1149–58.

Wilkinson S, Paterson HF, Marshall CJ. Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. **Nat Cell Biol** 2005; 7:255-61.

[WHO] World Health Organization. **Cancer**. 12 September 2018. Available from: <URL:<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>> [2018 out 3]

Wu WJ, Tu S, Cerione RA. Activated Cdc42 sequesters c-Cbl and prevents EGF receptor degradation. **Cell** 2003; 114:715-25.

Xu K, Rajagopal S, Klebba I, et al. The role of fibroblast Tiam1 in tumor cell invasion and metastasis. **Oncogene** 2010; 29:6533-42.

Yamaguchi H, Lorenz M, Kempiak S, et al. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. **J Cell Biol** 2005; 168:441-52.

Yu C, Hong H, Lu J et al Prediction of target genes and pathways associated with cetuximab insensitivity in colorectal cancer. **Technol Cancer Res Treat** 2018; 17:153.

Zenonos K, Kyprianou K. RAS signaling pathways, mutations and their role in colorectal cancer. **World J Gastrointest Oncol** 2013; 5:97-101.

Zheng Y. Dbl family guanine nucleotide exchange factors. **Trends Biochem Sci** 2001; 26:724-32.

Zhong Y, Yang S, Wang W. The interaction of Lin28A/Rho associated coiled-coil containing protein kinase2 accelerates the malignancy of ovarian cancer. **Oncogene** 2018 Sep 28. [Epub ahead of print].

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 16 de dezembro de 2013.

Ao
Dr. Rafael Malagoli Rocha.

Aluno: Julio Cirullo Neto (Doutorado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1829/13
“Estudo funcional e experimental da proteína Mrck-β em adenocarcinomas colorretais metastáticos ou não”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 10/12/2013, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 22/10/2013, aprovaram a realização do projeto (datado de 18 de novembro de 2013) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando Amostras Fornecidas e Processadas pelo Biobanco do AC Camargo Cancer Center;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Cronograma do Estudo;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/2