FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDE...
ANA MARIA R. A. KUMMARI
Coordenadora de Pós-Graduação

CARACTERIZAÇÃO DE DUAS NOVAS SUBLINHAGENS DE CARCINOMA COLO-RETAL HUMANO COMO MODELOS DE ESTUDO DO FENÓTIPO METASTÁTICO

ANA CRISTINA ESPINDOLA CAMPOS SOLIMENE

Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Oncologia

ORIENTADORA: PROFª. DRA.
CÉLIA REGINA WHITAKER CARNEIRO

São Paulo
1999

EXEMPLAR ESPECIAL

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE BIBLIOTECA

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa

Hospital do Câncer A.C. Camargo

Solimene, Ana Cristina Espindola Campos

Caracterização de duas novas sublinhagens de carcinoma colo-retal humano como modelos de estudos do fenótipo metastático / Ana Cristina Espindola Campos Solimene. -- São Paulo, 1999.

xi 64 p.

Dissertação(mestrado)–Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Célia Regina Whitaker Carneiro.

Descritores: 1.NEOPLASIAS COLO-RETAIS/humano 2. CÉLULAS CULTIVADAS 3. LAMININA. 4. FIBRONECTINA 5. ANTÍGENO CARCINOEMBRIONÁRIO 6. NEOPLASIAS METASTÁTICAS.

Dedico este trabalho ao meu companheiro Mário, cujo incentivo tem sido imprescindível na minha caminhada.

EXEMPLAR
ESPECIAL

A meus pais, pelos valores de vida ensinados.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer as seguintes pessoas por haverem possibilitado este trabalho:

à **Profa. Dra. Célia Regina Whitaker Carneiro**, pela amizade, confiança e pelos valiosos ensinamentos não só científicos, mas também de vida;

ao **Prof. Dr. José Daniel Lopes** por ter me recebido com carinho na Disciplina de Imunologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Biologia Celular da Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, por seu auxílio e interesse;

aos membros titulares da Banca de Qualificação, **Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani**, **Prof. Dr. Luiz Rodolpho R. G. Travassos** e **Prof. Dr. Gregório Santiago Montes**, por terem sido sempre muito solícitos e interessados;

aos meus pais, **Sr. Evandro Bittencourt de Mendonça Campos** e **Sra. Léa Espindola Campos**, pela leitura desta dissertação, por terem ajudado na parte editorial de algumas figuras e, principalmente, por terem ensinado o valor de qualquer trabalho realizado com dedicação e amor;

ao meu companheiro **Mário Solimene Filho** e à minha amiga **Celi Rodrigues C. Dominguez**, por serem meus exemplos de persistência e grandes incentivadores;

às minhas queridas amigas de laboratório, **Ivone Martins Cipriano**, **Maria Angela Amorim Dias**, **Icléia Melati**, **Luciana Doria Guarniello**, **Andréa Quintal Portas**, **Nair Mota**, **Maria Alice P. de Castro**, **Vanessa de Oliveira** por termos tido ótimos momentos de profundo aprendizado existencial e científico juntas;

ao **Dr. Luis Eduardo Coelho Andrade**, por ter dirigido com muita dedicação e competência a Comissão de Pós-Graduação nos períodos iniciais de sua implantação;

à eficiente Coordenação de Pós Graduação, comandada por **Ana Maria Kuninari**, por ser a base imprescindível ao funcionamento do Departamento de Pós Graduação da Fundação Antônio Prudente;

ao **Dr. Roger Chammas**, por ser um grande cientista e ter sempre me ajudado de forma muito solícita e compartilhado comigo algumas de suas idéias;

à **Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis**, por ter ensinado os pequenos truques dos protocolos, por todo o apoio técnico com o FACS e por ser sempre muito gentil e amável;

ao caro **Sílvio Zanatta**, por ter me ajudado com experimentos de eletroforese e por ter me ensinado a purificar laminina;

à **Dra. Vilma Regina Martins**, da Fundação Antônio Prudente, por ter cedido laminina purificada e outros materiais de consumo importantes na realização de alguns dos experimentos;

à **Profa. Dra. Edna Haapalainen** do Centro de Microscopia Eletrônica da EPM/UNIFESP por ter permitido a realização de parte deste trabalho em seu laboratório e aos seus colaboradores **Flávio**, **Márcia**, **André**, **Patrícia** e **Isabel**, por terem sido tão prestativos e amáveis;

à **Angelita Ramos** por ter ensinado os procedimentos de irradiação de animais e por sempre ter se colocado à disposição para me ajudar;

ao **Prof. Dr. Sívio Sanches Veiga**, da UFPR, por ter sido sempre muito solícito e amigável na resolução de alguns problemas técnicos que tive com a purificação da fibronectina;

aos professores da Disciplina de Imunologia da EPM, **Profa. Dra. Ieda Longo Maugeri**, **Profa. Dra. Zulma Peixinho**, **Prof. Dr. Mário Mariano** pelas calorosas discussões nas reuniões semanais daquela Disciplina;

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE BIBLIOTECA

à **Eleni Braga**, que sempre me socorreu prontamente quando enfrentei problemas com a eletroforese e com a coloração de gel pela prata, bem como pelo respeito e amizade;

aos demais colegas de pós graduação da Disciplina de Imunologia da EPM **Meire**, **Ângela, Luis Cláudio**, **Daniela**, **Cristina**, **Sandro**, **Renata** pela convivência harmoniosa;

à **Emília Oda**, do Hospital A. C. Camargo, pela dosagem de CEA.

ao **Geová,** à **Guimiko** e ao **Ailton**, por terem cuidado de forma tão meticulosa dos animais nos biotérios;

aos funcionários da Disciplina de Imunologia da EPM, **Aparecido**, **Creuza Rosa**, **Gisélia, Dina**, **Zélia**, **Laura**, **Ivone**, **Creuza Marina**, por terem direta ou indiretamente possibilitado a concretização deste trabalho.

RESUMO

A linhagem de adenocarcinoma colo-retal LISP-I foi isolada de metástase hepática no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo, Brasil. Desde então, vários grupos de pesquisa utilizaram-na como instrumento de investigação em diversos campos e caracterizaram-na como uma linhagem pobremente diferenciada.

O presente trabalho objetivou caracterizar LISP-I quanto a alguns aspectos, após o isolamento de subpopulações de diferentes morfologias. Uma vez que estas foram isoladas, foram comparadas quanto à expressão de moléculas de adesão intercelular, à tumorigenicidade *in vitro* e em animais e quanto à adesão e à migração a componentes de matriz extracelular, como laminina e fibronectina, fundamentais nos processos de invasão e metastatização.

Duas subpopulações morfologicamente distintas foram isoladas: LISP-A10 e LISP-E11. LISP-A10 apresenta morfotipo epitelial, indicando um padrão mais diferenciado, enquanto que LISP-E11 apresenta morfotipo fibroblastóide, indicando um padrão menos diferenciado. LISP-A10 expressa as moléculas de adesão testadas, CEA e desmogleína, enquanto que LISP-E11 expressa somente CEA e em menor quantidade. Por outro lado, a adesão à laminina e à fibronectina, bem como a migração em direção a estes componentes de matriz extracelular foram maiores em LISP-E11, de acordo com o seu fenótipo menos diferenciado. Infelizmente, não foi possível demonstrar qualquer atividade colagenolítica, nem qualquer atividade de digestão enzimática específica de laminina e fibronectina. Ambas as subpopulações apresentaram proliferação independente de ancoragem em meio semi-sólido e foram tumorigênicas em animais irradiados.

Os dados obtidos permitem a especulação de que a heterogeneidade encontrada em LISP-I e que provavelmente contribuiu para o sucesso como metástase proveio de pelo menos duas populações morfológica e funcionalmente diferentes, que foram no presente estudo estabelecidas e caracterizadas.

SUMMARY

LISP-I colorectal adenocarcinoma cell line was isolated from an hepatic metastasis at the Ludwig Institute São Paulo, Brasil. Several groups have already used it as a model in different studies and have characterized it as a poorly differentiated cell line.

The purpose of the present investigation was to further characterize LISP-I in some aspects, after isolation of subpopulations with different morphologies. Once these subpopulations were isolated, they were compared in terms of expression of intercellular adhesion molecules, tumorigenicity *in vitro* and *in vivo*, and adhesion to and migration towards extracellular matrix components, such as laminin and fibronectin, which are crucial to mechanisms of invasion and metastasis.

Two morphologically different subpopulations were isolated: LISP-A10 and LISP-E11. LISP-A10 presents an epithelial morphotype, indicating a more differentiated pattern, and LISP-E11 is fibroblastoid, indicating a poorly differentiated pattern. LISP-A10 was shown to express the two intercellular adhesion molecules tested, CEA and desmoglein, while LISP-E11 expressed only low amounts of CEA. On the other hand, adhesion to laminin and fibronectin as well as migration towards these extracellular matrix proteins were higher for LISP-E11, according to its poorly differentiated phenotype. Unfortunately, it was not possible to demonstrate any collagenolitic activity, neither specific enzymatic activity against laminin and fibronectin. Both subpopulations showed anchorage-independent growth in semi-solid substratum and were tumorigenic in irradiated mice.

These results rise the possibility that the heterogeneity found in LISP-I cell line, which could have contributed to its ability to metastasize, were due to at least two different cell subpopulations herein identified and characterized.

LISTA DE ABREVIAÇÕES

µg..... micrograma

µl..... microlitro

BSA..... *Bovine Serum Albumin*

CEA..... *Carcinoembryonic Antigen*

DMEM..... *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO..... Dimetil Sulfóxido

DNA..... Ácido desoxirribonucléico

DO..... densidade óptica

EDTA..... Ácido etileno diaminotetraacético

ELISA..... *Enzyme-Linked Immunosorbant Assay*

FACS..... *Fluorescence Activated Cell Sorter*

FITC..... fluoresceína

h..... horas

HEPES..... Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etano-sulfônico

kDa..... quilo Daltons

M..... Molar

mg..... miligrama

min..... minutos

mM..... milimolar

PBS..... *Phosphate Buffer Saline*

RNA..... Ácido ribonucléico

SDS..... Dodecil Sulfato de Sódio

Td..... tempo de duplicação

Tris..... hidroximetil amino metano

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
BIBLIOTECA

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

Esquema 1 5
Esquema 2 10
Esquema 3 12
Esquema 4 15
Esquema 5 16
Esquema 6 17
Esquema 7 19
Figura 1 34
Figura 2 35
Figura 3 36
Figura 4 38
Figura 5 39
Figura 6 40
Figura 7 41
Figura 8 42
Figura 9 43
Gráfico 1 4
Tabela I 44
Tabela II 44

ÍNDICE

Introdução..... 1

Objetivos..... 24

Material e Métodos

1. Cultura celular..... 25

2. Clonagem celular..... 25

3. Análise morfológica

3.1. Microscopia óptica..... 26

3.2. Microscopia eletrônica de varredura..... 26

3.3. Microscopia eletrônica de transmissão..... 26

4. Curvas de crescimento..... 27

4.1. Curvas de crescimento sobre substrato protéico..... 27

5. Dosagem de CEA nos sobrenadantes de culturas..... 27

6. Expressão de moléculas de adesão intercelular

6.1. Imunocitoquímica..... 28

6.2. Citometria de fluxo..... 29

7. Obtenção de laminina e de fibronectina..... 29

8. Ensaios de adesão celular..... 30

9. Ensaios de migração..... 30

10. Proliferação independente de ancoragem..... 31

11. Tumorigenicidade *in vivo*..... 32

Resultados

1. Cultura celular..... 33

2. Clonagem celular e análise morfológica..... 33

3. Curvas de crescimento..... 37

4. Expressão de moléculas de adesão intercelular..... 37

5. Ensaios de adesão celular..... 41

6. Ensaios de migração..... 42

7. Proliferação independente de ancoragem..... 43

8. Tumorigenicidade *in vivo*..... 44

Discussão..... 45

Conclusões..... 55

Referências..... 56

INTRODUÇÃO

Nenhuma raça humana ou área geográfica do planeta está totalmente isenta de manifestar algum tipo de câncer, doença que anualmente mata milhares de pessoas (LEVIN *et al.* 1974). Desta forma, estima-se que 11,38% da população brasileira venha a morrer por câncer, enquanto que a estimativa de morte por doença cardíaca é de 27,46% para o ano de 1999 (MINISTÉRIO DA SAÚDE 1999).

A história das neoplasias é tão antiga quanto a da própria humanidade, pois o câncer já era conhecido desde os primeiros registros gráficos deixados pelo homem (FRANKS 1990). Os antigos egípcios e as civilizações subseqüentes também já o mencionavam. O primeiro a lhe atribuir a denominação *carcinos* foi Hipócrates, na Grécia, numa alusão ao fato do câncer se espalhar radialmente pelo organismo, tal qual a disposição das patas nos caranguejos (COELHO 1998). Uma vez que a maioria dos tumores surge tardiamente na vida de um ser humano, foi somente a partir do século XIX, junto com o progressivo aumento de expectativa de vida, que a quantidade de registros de casos de câncer aumentou (FRANKS 1990).

Particularmente com maior freqüência entre idosos, muitos dos tumores que surgem em humanos são localizados, sendo considerados tumores benignos. Os cânceres, ou tumores malignos, são diferentes dos benignos por apresentarem a habilidade de invadir tecidos adjacentes e de se espalhar por todo o organismo, fenômeno conhecido por metástase (DARNELL *et al.* 1990b).

O câncer é definido como uma doença proliferativa que pode acometer qualquer organismo pluricelular, bem como todos os tecidos de um indivíduo (FRANKS 1990). A regulação da proliferação de tecidos normais envolve mecanismos bastante complexos, sendo vasta a literatura que visa elucidá-los. Apesar de ser resultante de várias alterações na regulação da proliferação celular, é importante salientar que a transformação neoplásica deve ser vista como um processo evolutivo contínuo, em que cada geração de células sofre

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
BIBLIOTECA

pressão seletiva (BREIVIK e GAUDERNACK 1999). A história natural das neoplasias tem sido discutida há décadas e abrange conceitos de iniciação, promoção e progressão dos tumores. Um dos vários modelos experimentais que surgiram na tentativa de explicar a carcinogênese presume a existência de dois estágios mutuamente dependentes (iniciação e promoção, nesta ordem) e imprescindíveis à ocorrência de um terceiro estágio, o da progressão tumoral (TENNANT e ZEIGER 1993). O agente iniciador, ou genotóxico, atua diretamente sobre o DNA, danificando-o ou modificando-o. Por outro lado, o agente promotor não atua necessariamente sobre o DNA, tendo ação não-genotóxica. Estima-se que 80% a 90% das neoplasias humanas sejam causadas por fatores ambientais, os quais seriam os principais agentes iniciadores ou carcinógenos (COELHO 1998). Os carcinógenos podem ser químicos (como o fumo e aminas heterocíclicas), físicos (como a radiação ultravioleta), biológicos (como vírus e bactérias) e, ainda, relacionados à dieta (CAIRNS 1981). Estes fatores exercem seus efeitos ao nível genético, ocasionando mutações, deleções e amplificações no DNA, ou então, ao nível epigenético, como é o exemplo das metilações aberrantes do DNA e das modificações pós traducionais que alteram proteínas (STONER *et al.* 1997).

Conforme já mencionado, as alterações no DNA ocorrem também de maneira espontânea ao longo da vida de um indivíduo como um processo evolutivo natural (CAIRNS 1981). O acúmulo destas alterações explica o aumento da incidência de tumores em pessoas mais idosas (CABALLERO *et al.* 1998). O alvo das mutações que levam à carcinogênese são os oncogenes e os genes supressores de tumor que codificam proteínas importantes na regulação da proliferação dos tecidos, diferenciação e desenvolvimento. Os oncogenes foram primeiramente identificados como genes carregados por vírus que causam transformação maligna em suas células-alvo (LEWIN 1997). São versões alteradas de genes celulares normais — chamados proto-oncogenes — e têm sua origem em infecções virais passadas. As mutações em genes supressores de tumor, por sua vez, levam a alterações genéticas que agem de modo recessivo. Desta forma, se um gene em heterozigose no tecido normal perde o alelo selvagem (*wild type*), passa a ser expresso

somente o alelo mutado. Este fenômeno é conhecido por perda de heterozigose (CABALLERO *et al.* 1998).

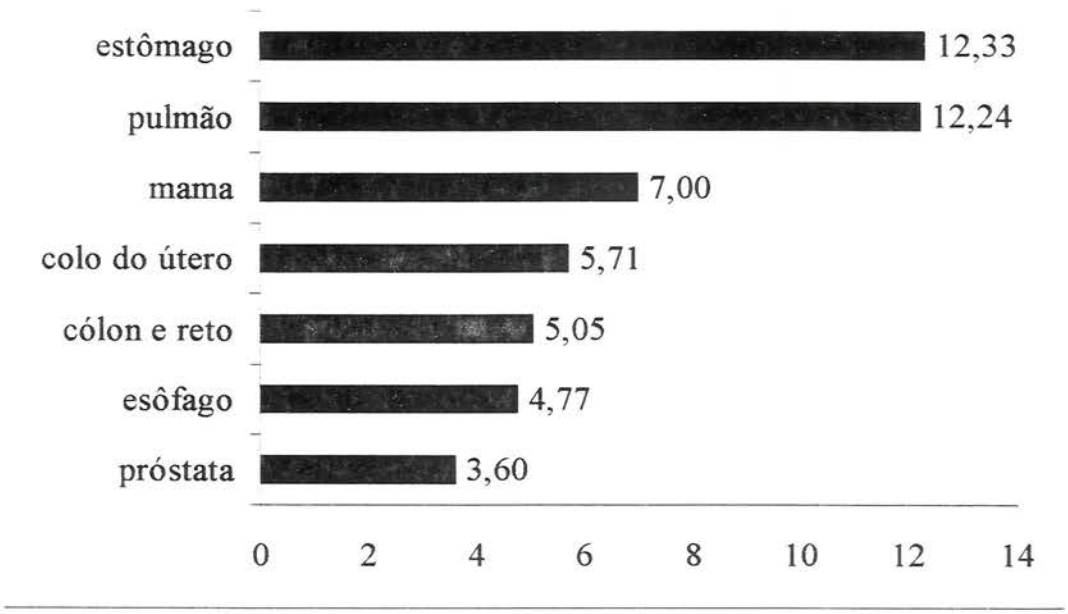
Aproximadamente 5% dos cânceres têm suas causas atribuídas a mutações na linhagem germinativa, sendo passíveis de transmissão a gerações subseqüentes. Nas últimas décadas, a pesquisa básica avançou consideravelmente na investigação das neoplasias hereditárias. Uma grande quantidade de genes foi identificada e associada à predisposição a diferentes tipos de tumores (KOPPER *et al.* 1997). Estes avanços contribuíram bastante para a modificação do comportamento de oncologistas clínicos, que passaram a organizar programas de diagnóstico precoce e prevenção do câncer.

O câncer de cólon é o segundo tipo de câncer que mais mata nos países desenvolvidos, como os Estados Unidos da América, Canadá e os da Europa Ocidental, estando este fato relacionado à influência de hábitos alimentares (SHERMAN JR 1993). No Brasil, é o quinto tipo mais freqüente de câncer, incluindo homens e mulheres. Estima-se que será o responsável por 5,05% dos óbitos por câncer em 1999 (MINISTÉRIO DA SAÚDE 1999), conforme mostrado no gráfico 1. Por estarem intimamente relacionados, os cânceres de cólon e de reto encontram-se agrupados na literatura corrente.

Os tumores colo-retais se apresentam como um ótimo modelo para o estudo de alterações genéticas envolvidas na origem e progressão de tumores, uma vez que podem ser obtidos em vários estágios de desenvolvimento, que vão desde pequenos adenomas até carcinomas metastáticos. São agrupados clinica e didaticamente em quatro categorias definidas pelo tamanho da massa celular e características histológicas: adenomas iniciais, intermediários, tardios e carcinomas.

GRÁFICO 1

Estimativa dos percentuais de óbitos por câncer para 1999 no Brasil, de acordo com a localização primária, para ambos os sexos, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), Ministério da Saúde (1999).

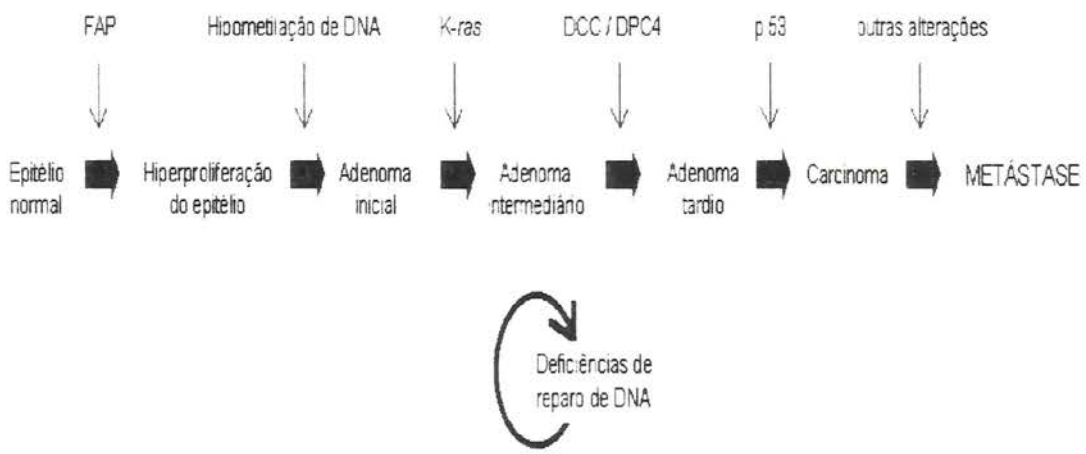


A nomenclatura usada para definir o tipo de tumor se baseia nas características histológicas e funcionais do mesmo. Carcinoma é o nome genérico dado a um tumor maligno de origem epitelial que, ao apresentar estrutura glandular, recebe a denominação de adenocarcinoma. É importante salientar que a enorme maioria dos tumores é heterogênea principalmente no que se refere ao comportamento funcional, estadiamento e padrão de crescimento (FRANKS 1990).

A progressão tumoral de uma categoria para outra requer anos e até mesmo décadas para se manifestar clinicamente, e se deve ao acúmulo de alterações cromossômicas e genéticas, conforme representado no esquema 1 (FEARON e VOGELSTEIN 1990).

ESQUEMA 1

Modelo das alterações genéticas envolvidas na progressão tumoral do câncer colo-retal, segundo Fearon e Vogelstein (1990), modificado por Kinzler e Vogelstein (1996).



Os adenomas iniciais se desenvolvem a partir de uma lesão precursora chamada pólipo adenomatoso, resultado de uma hiperproliferação das células epiteliais (WINAWER 1999). A progressão para tumor a partir desta lesão é um processo que envolve vários eventos bastante complexos. Entretanto, nem todos os pólipos adenomatosos evoluem para cânceres. Apenas 1 a cada 1 milhão de células epiteliais primordiais darão origem a carcinomas colo-retais (KINZLER e VOGELSTEIN 1996). Além disto, carcinomas originados de pólipos com componente viloso são 10 vezes mais freqüentes do que aqueles provenientes de pólipos tubulares (CHURCH et al. 1996). As lesões hiperplásicas, que são reversíveis, raramente dão origem a cânceres (WILLSON *et al.* 1987).

Como já foi abordado, o aparecimento de tumores é justificado por alterações genéticas e epigenéticas. As alterações genéticas envolvidas no surgimento de tumores incluem basicamente três classes de genes: os genes supressores de tumor, os oncogenes e os de reparo de DNA.

A ativação de oncogenes e a desativação de genes supressores de tumor, ambas por mutação, conferem vantagens proliferativas às células de várias maneiras (GRYFE et al 1998). Um dos eventos responsáveis pela

hiperproliferação do epitélio colônico é a inativação de ambos os alelos do gene *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), um gene supressor de tumor presente no cromossomo 5. Este gene codifica uma proteína de mesmo nome que controla a estabilidade de pelo menos duas proteínas relacionadas à adesão célula-célula, a β-catenina e a placoglobina (γ-catenina) (BEN-ZE'EV 1997). A mutação na linhagem germinativa de um alelo do gene *APC* seguida da mutação somática ou perda do segundo alelo causa a síndrome denominada polipose adenomatosa familiar (FAP, de *Familial Adenomatous Polyps*). Esta síndrome é caracterizada pela presença de centenas de milhares de pólipos adenomatosos no cólon que, se permanecerem não tratados, originam o carcinoma. Pólipos menores do que 1 cm de tamanho raramente são malignos. De 50% a 60% dos pólipos apresentam componente viloso (SHERMAN JR 1993), o que aumenta a probabilidade de progressão para carcinoma, conforme já mencionado. Além desta alteração genética, a mutação que leva à perda da regulação de proliferação pelo proto-oncogene K-*ras* também é um evento inicial no processo, sendo comum a 50% dos adenomas maiores que 1 cm (VOGELSTEIN *et al.* 1988). *K-ras* codifica uma proteína de 21 kDa responsável pela transformação morfológica das células e pela indução da síntese de DNA, estando relacionada com a transdução de sinais mediada por fatores de crescimento (GOUSTIN *et al.* 1986). A partir daí, um evento subseqüente, a perda de heterozigose no braço longo do cromossomo 18 (18q21), está relacionada a piores prognósticos. A região cromossômica perdida compreende o *locus* gênico do gene supressor de tumor *DCC* (*Deleted in Colorectal Cancer*) que codifica uma proteína significativamente homóloga à família de moléculas de adesão celular. A perda desta proteína altera as propriedades de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular (FEARON *et al.* 1990), a serem discutidas adiante.

O gene supressor de tumor mais mutado em tumores humanos é o *p53*. Em cânceres colo-retais, por exemplo, alterações em *p53* são encontradas em 70 % dos tumores (BREIVIK e GAUDERNACK 1999). Uma vez que a proteína codificada por este gene tem a função de manter a integridade do genoma, sua ação é impedir a proliferação celular onde houver dano no DNA. Na progressão dos tumores colo-retais, a mutação de *p53* no

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
BIBLIOTECA

cromossomo 17p é um evento tardio que permite que células com alterações genéticas múltiplas progridam no ciclo celular, entrando em mitose ao invés de sofrerem apoptose (FUJIMORI *et al.* 1998). A apoptose é um mecanismo que aniquila células com excesso de danos no DNA de organismos multicelulares, de maneira programada (BREIVIK e GAUDERNACK 1999). Escapar da apoptose é uma das vantagens adaptativas das células tumorais que as permite proliferar irrefreavelmente.

Mais recentemente, foram identificados dois outros genes supressores de tumor, o *DPC4* (*Deleted in Pancreas Cancer* 4), também chamado *Smad 4*, e o *MADR2* (*MAD-related protein*), que estão inativados por perda alélica no cromossomo 18p21 (EPPERT *et al.* 1996). Ambos os produtos gênicos estão relacionados com a via de sinalização disparada pela ligação do fator de crescimento transformante-β1 (TGF-β1, de *Transforming Growth Factor*-β1) aos seus receptores na superfície celular (DUFF e CLARKE 1998). O peptídeo TGF-β1 é um fator de crescimento que regula a proliferação e a diferenciação em muitos tipos celulares, mediando sua ação por uma família de receptores transmembranares do tipo serina/treonina quinase (CHAKRABARTY *et al.* 1998). Este fator é bastante conhecido por sua atividade antiproliferativa sobre a maioria das células epiteliais de mamíferos. A perda de função de *DPC4* tem sido associada a tumores de vários tecidos, e foi encontrada em 16% das neoplasias colo-retais (DUFF e CLARKE 1998). Por outro lado, a perda de *MADR2* está mais associada a tumores colo-retais esporádicos, tendo sido encontrada em 6% destas neoplasias (EPPERT *et al.* 1996).

Perdas alélicas nos cromossomos 1q, 4p, 6p, 8p, 9q e 22q têm sido relatadas em 25% a 50% dos cânceres colo-retais, indicando que ainda há muitos eventos genéticos a serem elucidados (GRYFE *et al.* 1998).

Além dos genes supressores de tumor e oncogenes, os genes de reparo de DNA, como *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1* e *hPMS2*, quando mutados na linhagem germinativa, podem estar associados ao desenvolvimento dos tumores colo-retais hereditários não polipóides (HNPCC, de *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*). Os tumores colo-retais também compartilham de outras alterações genéticas comuns a vários tipos de câncer, como o aumento

da atividade da enzima telomerase. Esta enzima possui atividade de transcriptase reversa e propicia a estabilidade do genoma em células com alta taxa proliferativa pela manutenção da integridade dos telômeros, que são as extremidades dos cromossomos. O aumento da atividade da telomerase está associada à maioria dos tumores humanos (HOLT e SHAY 1999).

Como exemplo de alterações epigenéticas envolvidas na progressão do carcinoma colo-retal, encontra-se a metilação de seqüências repetidas de dinucleotídeos de CpG no DNA. A metilação regula a expressão de genes, ao mesmo tempo em que promove mutações por processos de deaminação, conferindo a este fenômeno um caráter intermediário entre as interações genéticas e epigenéticas. A hipermetilação e a hipometilação estão relacionadas, respectivamente, com a não transcrição de genes supressores de tumor e a super-expressão de oncogenes (BREIVIK e GAUDERNACK 1999).

O último e mais agressivo estágio da tumorigênese é a metástase, que constitui o crescimento tumoral em local diferente daquele no qual o tumor se originou. Além de contribuir para a morbidade da doença, as metástases constituem a principal causa de mortalidade entre pacientes com câncer. A maioria dos tumores metastatiza tanto por via linfática quanto venosa, indicando que a presença de metástases em nódulos linfáticos deve ser um sinal de disseminação generalizada, uma vez que ambas as vias ocorrem paralelamente. A localização de metástases é determinada não só pela disposição anatômica dos vasos sangüíneos, como também por interações entre as células tumorais e o órgão hospedeiro, entre outros fatores (HAIER *et al.* 1999). Os sítios primordiais da disseminação hematogênica dos tumores colo-retais são o fígado, os pulmões e as vértebras lombares (SCHREINER *et al.* 1991). A adesão preferencial de células metastáticas a órgãos específicos é devida à resposta positiva aos fatores de crescimento locais, à adesão preferencial à superfície endotelial do órgão-alvo e também à atração química por moléculas solúveis produzidas pelo órgão-alvo (LIOTTA e KOHN 1990).

Em linhas gerais, o processo metastático é composto por múltiplas etapas que incluem o desprendimento da massa tumoral, a migração pelo

tecido conjuntivo, a formação de êmbolos e a penetração nos vasos sangüíneos, a sobrevivência das células à corrente circulatória e aos mecanismos de defesa do organismo, o extravasamento, a posterior invasão em local a ser colonizado e a angiogênese (ver esquema 2).

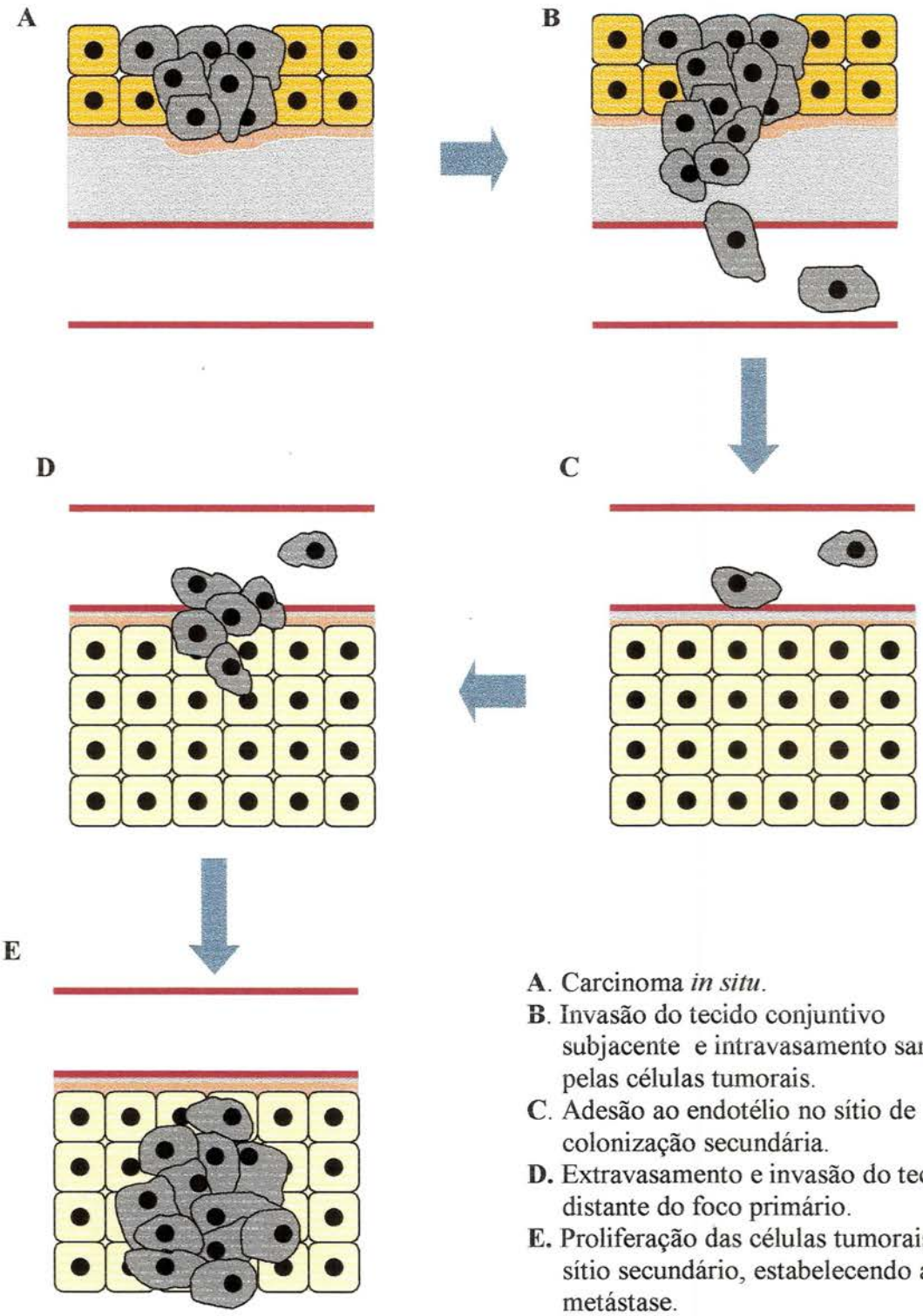
A capacidade da célula metastática de invadir e de colonizar outros órgãos depende do rompimento físico com as células vizinhas (perda de adesão célula-célula), da eficiência em aderir à lâmina basal, de efetuar proteólise dos componentes da matriz extracelular e de migrar através desta última, degradada.

A adesão entre as células é de extrema importância para a manutenção da arquitetura e da integridade dos tecidos epiteliais, sendo que o contato célula-célula é um sinal inibitório de proliferação celular (BEN-ZE'EV 1997). A perda desta função está associada, portanto, à facilitação de eventos metastáticos.

As células podem ligar-se umas às outras por meio de unidades funcionais de adesão. Estas unidades são complexos multiprotéicos que podem ser separados em três categorias, segundo GUMBINER (1996): moléculas de adesão celular (CAMs, de *Cell Adhesion Molecules*) e integrinas; proteínas periféricas à membrana plasmática que formam a placa citoplasmática; e proteínas da matriz extracelular (GUMBINER 1996).

As CAMs são geralmente glicoproteínas transmembranares que incluem membros das superfamílias das caderinas e das imunoglobulinas. Caderinas são as principais moléculas Ca^{2+}-dependentes envolvidas na adesão, diferenciação e estrutura dos tecidos, através de ligação homofílica. E-caderina (E, de epitelial) é uma glicoproteína integral de membrana que possui entre 120 e 130 kDa de peso molecular. É o principal membro da família de moléculas que é expresso em tecidos epiteliais formando o componente funcional das junções aderentes. A perda da função de E-caderina em tumores leva à progressão rápida de adenomas benignos a carcinomas metastáticos (GUILFORD 1999), o que inclui o gene da E-caderina à classe de genes supressores de tumor (JAWHARI *et al.* 1999).

Representação do processo metastático.



A. Carcinoma *in situ*.
B. Invasão do tecido conjuntivo subjacente e intravasamento sangüíneo pelas células tumorais.
C. Adesão ao endotélio no sítio de colonização secundária.
D. Extravasamento e invasão do tecido distante do foco primário.
E. Proliferação das células tumorais no sítio secundário, estabelecendo a metástase.

As moléculas de E-caderina se associam a moléculas de cateninas citoplasmáticas, divididas em α-, β- e γ-cateninas. As cateninas, por sua vez, estão conectadas a muitas proteínas estruturais do citoesqueleto, regulando eventos de sinalização citoplasmática que levam à transcrição de genes relacionados à proliferação celular (HUGH *et al.* 1999). Além de estarem conectadas às moléculas de E-caderina, as cateninas também são encontradas livres, em *pools*, ou em complexos α/β-catenina e α/γ catenina no citoplasma. Os níveis citoplasmáticos de β-catenina são controlados pela proteína APC. Uma mutação no gene *APC* que leve à formação de uma proteína truncada altera os níveis citoplasmáticos de β-catenina, que se liga a fatores de transcrição de vários genes (SHTUTMAN *et al.* 1999), entre eles o proto-oncogene *c-myc* (JAWHARI *et al.* 1999). O produto primário de *c-myc* é um polipeptídeo de 64 kDa que age como um fator transcricional quando forma heterodímeros com outra proteína (FEARON e DANG, 1999). A associação entre o gene *APC* e o complexo E-caderina/β-catenina explica como alterações nestes genes estão envolvidas nas etapas iniciais da carcinogênese colo-retal.

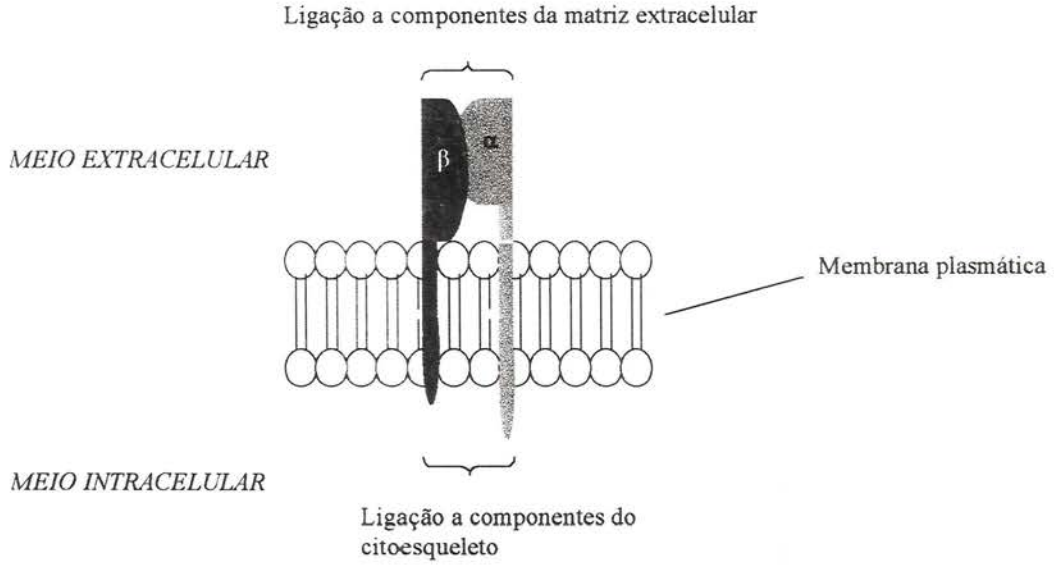
Dentre os componentes da superfamília das imunoglobulinas que conferem adesividade intercelular, destaca-se o antígeno carcinoembrionário (CEA). CEA é uma glicoproteína de superfície celular de aproximadamente 180 kDa, dos quais 60% são cadeias de açúcar. Em neoplasias avançadas, esta glicoproteína é encontrada em altas concentrações no soro de pacientes, sendo considerada um importante marcador tumoral (ZBAR *et al.* 1998), principalmente de carcinomas colo-retais. CEA é um antígeno oncofetal cuja expressão em tecidos adultos é resultado da não-repressão de genes por mecanismos desconhecidos (ABBAS *et al.* 1997). A superfamília das imunoglobulinas inclui anticorpos, receptores de células T, receptores de fatores de crescimento e moléculas de adesão celular. Considerando este aspecto, BENCHIMOL e colaboradores (1989) demonstraram que CEA também medeia interações adesivas entre células, funcionando como molécula de adesão homofílica Ca^{2+}-independente.

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
ANA MARIA ... KUNINARI
Coordenadoria de Pós-Graduação

Ainda conferindo adesão, as integrinas constituem o grupo de moléculas mais notáveis no que concerne a ancorar as células às proteínas da matriz extracelular, conectando o meio extracelular (matriz) ao meio intracelular (componentes do citoesqueleto), conforme representado no esquema 3.

ESQUEMA 3

Representação estrutural das integrinas, segundo Heino (1993) com modificações.



As integrinas são uma família de glicoproteínas transmembranares receptoras que se arranjam de forma heterodimérica na membrana celular, mediando interações heterofílicas (HEINO 1993). Possuem papel na transmissão de informações entre as células, proliferação, diferenciação, migração, transdução de sinais citoplasmáticos e expressão de genes específicos. Cada molécula de integrina é formada por uma subunidade α e outra β, cada uma com um peso molecular que varia entre 100 e 200 kDa (RUOSLAHTI 1999). Considerando-se que são conhecidos pelo menos 15 tipos de cadeias α e 8 tipos de cadeias β, existe um número bem elevado de possíveis combinações para a formação de heterodímeros (VARNER e

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE

CHERESH 1996). Várias integrinas reconhecem o tripeptídeo arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) nas proteínas de matriz extracelular, por onde fazem a ligação que é dependente de Ca^{2+}. Algumas integrinas são totalmente específicas para um só ligante, enquanto outras reconhecem duas ou mais proteínas diferentes. A sinalização intracelular via integrinas pode ser direta ou indireta. Na sinalização direta, a adesão com o ligante causa um *clustering* de moléculas de integrinas e dispara a ativação de proteínas quinases por autofosforilação das FAK (*Focal Adhesion Kinases*, quinases de adesão focal). As FAK são as principais proteínas tirosina-quinase das adesões focais. Por sua vez, as adesões focais são contatos célula-substrato especializados em que são encontradas grandes concentrações de integrinas ligadas a filamentos de actina e nos quais se observam as maiores concentrações de proteínas fosforiladas nos seus resíduos de tirosina do citoplasma (RUOSLAHTI 1999). Na sinalização indireta, a ancoragem de células à matriz extracelular por integrinas estimula as vias de sinalização ativadas por fatores de crescimento. A distribuição polar das integrinas observadas no epitélio normal é freqüentemente perdida nos carcinomas (KEELY *et al.* 1998). De modo geral, a expressão das integrinas na superfície celular tende a ser reduzida em tumores. Entretanto, existem vários exemplos contrários em que determinados tipos de integrinas aparecem super expressos nos tumores (YAMADA e MIYAMOTO 1995). É possível então que a regulação das integrinas nas neoplasias seja variável ao longo do processo maligno, dependendo da fase da carcinogênese.

Outra unidade adesiva extremamente complexa é representada pela placa citoplasmática, cujas proteínas conectam os sistemas adesivos ao citoesqueleto, regulam as funções das moléculas adesivas e transduzem sinais citoplasmáticos iniciados nas superfícies das células pelas integrinas. Dentre os complexos estruturais envolvidos na adesão intercelular destacam-se os desmossomos e hemidesmossomos. Os desmossomos são junções intercelulares responsáveis pela adesão célula a célula, enquanto que os hemidesmossomos medeiam a adesão da célula com a lâmina basal (definida adiante) em alguns epitélios. São estruturas análogas, sendo que os componentes de suas placas e as glicoproteínas de adesão são distintos. Os

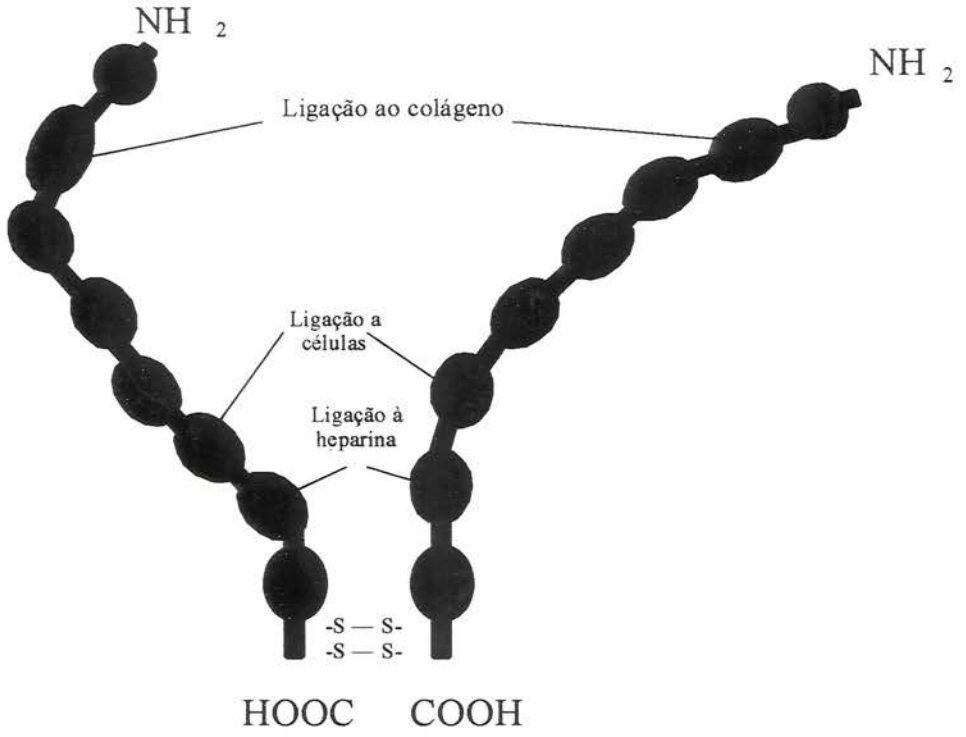
desmossomos contêm principalmente dois subtipos de proteínas, ambos pertencentes à superfamília das caderinas: as desmogleínas e as desmocolinas (SMITH e FUCHS 1998). Na porção citoplasmática, os desmossomos têm a função de ancorar os filamentos intermediários, cuja função é propiciar a estrutura espacial das células e tecidos (KOCH e FRANKE 1994). As citoqueratinas constituem o tipo mais freqüente de filamento intermediário presente nas células epiteliais, sendo até consideradas marcadores tumorais (KYZER e GORDON 1997). O componente mais importante dos hemidesmossomos é a integrina $\alpha 6\beta 4$, que é a integrina mais abundante da superfície basal das células epidermais (GARROD 1993).

O espaço intercelular de um tecido é denominado matriz extracelular e apresenta organização em rede. A matriz extracelular é composta basicamente por proteínas fibrosas, como colágeno e elastina, imersas em uma solução hidrofílica formada por polissacarídeos associados ou não a proteínas. As diferentes combinações destas proteínas resultam em uma grande diversidade de funções das matrizes extracelulares de diferentes tecidos, que incluem a regulação de alguns comportamentos celulares, como adesão, motilidade, proliferação e diferenciação. Dentre os constituintes que se agregam sem formar fibrilas estão as glicoproteínas alongadas, como fibronectina e laminina, e também os glicosaminoglicanos e os proteoglicanos (JUNQUEIRA e CARNEIRO 1997b). A principal função de fibronectinas e lamininas é fazer a ligação entre as células e o restante da matriz extracelular. Contudo, estas moléculas também regulam a expressão de diversos genes em função do tecido em que se encontram.

Os componentes da matriz extracelular são secretados pelas células do próprio tecido ou do tecido conjuntivo subjacente. Conforme está representado no esquema 4, no limite entre o tecido epitelial e o tecido conjuntivo, a matriz extracelular recebe a denominação especial de membrana basal e consiste em uma camada delgada muito importante para a função e delimitação espacial das células.

ESQUEMA 5

Representação estrutural da molécula de fibronectina, segundo Bergman *et al.*, 1996a.



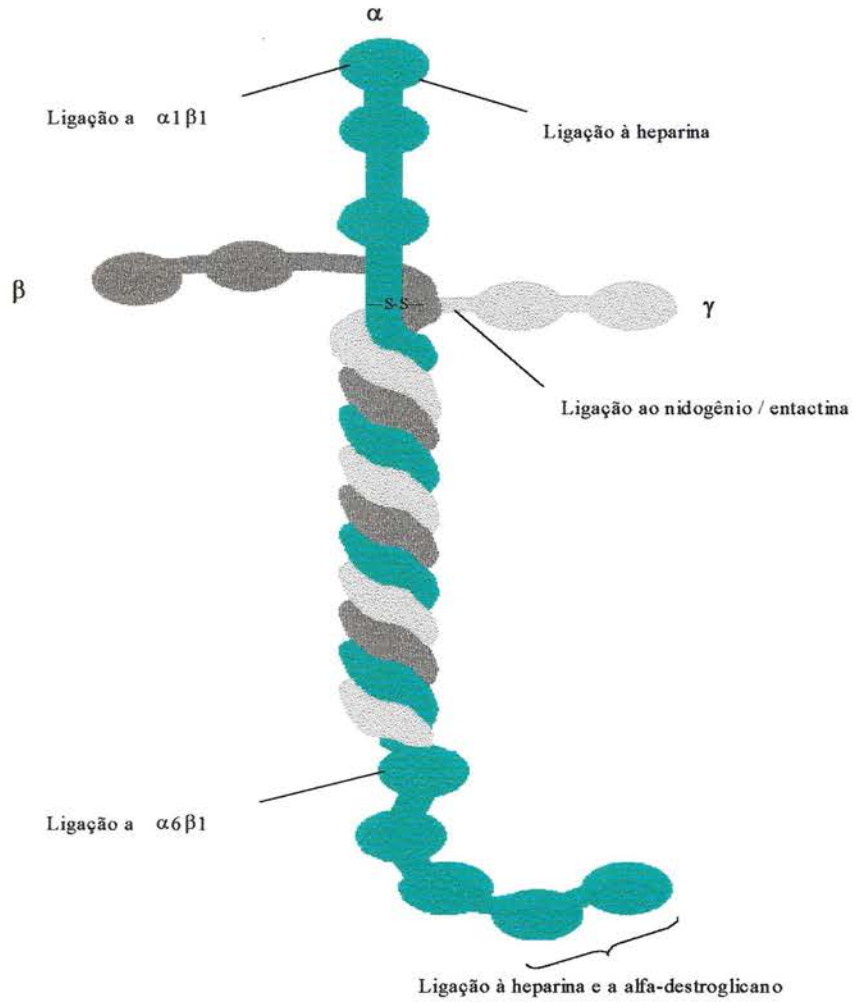
Linhagens celulares com fenótipo maligno apresentam uma expressão reduzida de fibronectina, indicando que esta molécula participa de alguma forma da manutenção das características normais dos tecidos sãos (HUANG e CHAKRABARTY 1994). Recentemente, foi postulada a hipótese de que tanto a fibronectina plasmática quanto o seu sítio de ligação às integrinas, o peptídeo RGD, possuem atividade anti-metastática (RUOSLAHTI 1999).

As lamininas são glicoproteínas heterotriméricas grandes, de aproximadamente 820 kDa, formadas por cadeias *alfa*, *beta* e *gama* que se enovelam em forma de cruz, sendo que cada uma destas cadeias apresenta vários subtipos. Assim, as muitas combinações destas diferentes unidades de cadeias α, β e γ fornecem um grande número de isoformas de laminina que são hoje reunidas em uma família de moléculas multifuncionais (AUMAILLEY e SMYTH 1998). O tamanho da família tende a aumentar conforme novas

moléculas e novos subtipos de cadeias vão sendo identificados (MERCURIO 1995). As principais lamininas epiteliais são a laminina 1 (constituída pelas cadeias α1, β1 e γ1), laminina 5 (α3, β3 e γ2) e laminina 10 (α5, β1 e γ1). As lamininas contendo as cadeias α1 e α3 são praticamente restritas aos epitélios, enquanto que as que possuem α5 também são encontradas no endotélio e em membranas basais dos músculos (EKBLOM *et al.* 1998). O esquema 6 traz uma representação da estrutura da molécula de laminina 1.

ESQUEMA 6

Representação estrutural da molécula de laminina 1, segundo Mercurio, 1995, com modificações.

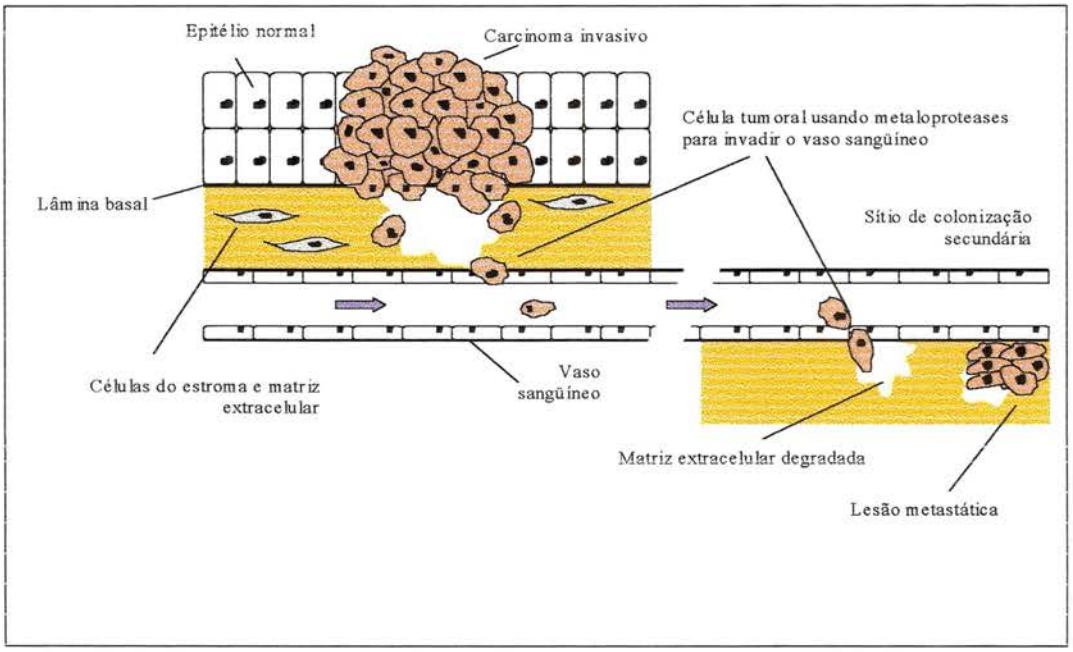


A conexão entre as lamininas e a rede de colágeno IV e outras proteínas das membranas basais é mediada por nidogênio, ou entactina. Nidogênio é uma molécula que se associa com grande afinidade à laminina, sendo importante para o arranjo e estabilização final da membrana basal. Esta ligação de alta afinidade é devida à presença de um único sítio de ligação na cadeia $\gamma 1$ da laminina, sendo portanto uma característica presente na maioria das suas isoformas (MAYER *et al.* 1998). Além das integrinas, distroglicanos também são receptores transmembranares de laminina, ligando a membrana basal ao citoesqueleto (SCHWARZBAUER 1999).

Algumas das etapas do processo metastático — como a migração e a invasão tanto dos vasos sangüíneos como dos órgãos de colonização secundária — envolvem a proteólise da matriz extracelular. Esta função é feita por enzimas específicas, dentre as quais se destacam as metaloproteases de matriz extracelular (MMP, de *Matrix Metalloproteinases)*. Estas enzimas aparecem super-expressas nos tumores quando comparadas aos níveis dos tecidos normais adjacentes. As metaloproteases fazem parte de uma família de endopeptidases que possuem um sítio altamente conservado de um átomo de Zn^{2+} e possuem como substratos vários componentes da matriz extracelular, incluindo fibronectina, laminina, colágenos I a V, elastina e proteoglicanos. A maioria das enzimas é secretada na forma inativa de pró-enzima e a ativação advém de mudanças conformacionais e clivagem proteolítica do pró-domínio (BROWN, 1998). Tanto as células tumorais quanto as células do próprio estroma invadido, principalmente fibroblastos, sintetizam metaloproteases. A regulação dos efeitos destas enzimas é feita por inibidores de metaloproteases, as TIMPs (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*), cuja atividade foi associada à inibição da progressão tumoral em alguns modelos *in vivo* (TOI *et al.* 1998). Nos tumores, o balanço entre as enzimas e seus inibidores parece pender para as primeiras, resultando em invasão, colonização de órgãos secundários e metástases, como representado no esquema 7.

ESQUEMA 7

Representação esquemática de algumas das fases dos processos de invasão tumoral e metástase em que as metaloproteases têm atuação. Modificado de Brown, 1998.



Outro processo fisiológico essencial na disseminação tumoral é a angiogênese, uma vez que vasos neoformados são a principal via de acesso de células tumorais à circulação. A sobrevivência da massa tumoral, tanto primária quanto em sítios secundários, também depende da vascularização regional, a fim de serem supridas as necessidades nutricionais e de trocas gasosas. O grau de vascularização de um tumor resulta de interações entre as células tumorais, células endoteliais e células do sistema imunológico. O controle deste processo é feito pelo balanço entre fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos (SOLIMENE *et al.* 1999). De modo geral, os fatores pró-angiogênicos estimulam a rápida proliferação das células endoteliais e inibem os fatores anti-angiogênicos. Dentre os primeiros, destaca-se o VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*, fator de crescimento vascular endotelial), que tem sido alvo de estudos visando terapias contra tumores sólidos (AUGUSTIN 1998).

Grande parte do conhecimento que se tem hoje sobre a fisiopatologia tumoral não seria possível sem os estudos *in vitro*, porque estudos em animais possuem a desvantagem de não possibilitar o controle das variáveis intrínsecas de um organismo. Por este motivo, células em cultura são uma grande e valiosa ferramenta na investigação científica (DARNELL *et al.* 1990b).

O estudo de linhagens de adenocarcinomas humanos como modelos experimentais pode ser de grande valia para a compreensão dos eventos envolvidos na progressão tumoral (PARASKEVA *et al.* 1989). As descrições de linhagens de carcinomas colo-retais são baseadas em vários critérios, como morfologia, cariótipo, produção de antígeno carcinoembrionário (CEA), crescimento *in vitro,* tumorigenicidade e características genéticas (FEARON *et al.* 1990).

Há alguns anos foi isolada no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (São Paulo, Brasil) uma linhagem humana de adenocarcinoma de cólon a partir de metástase hepática. Esta linhagem foi denominada LISP-I e tem sido estudada sob diferentes aspectos no Brasil e no exterior, isoladamente.

Usando a linhagem LISP-I em comparação com outras linhagens de adenocarcinoma colo-retal, PRADO e colaboradores (1995) demonstraram a susceptibilidade de LISP-I à lise por células *natural killer* (NK). A lise celular mediada por células NK é considerada um mecanismo importante na resposta imune anti-tumoral, particularmente para metástases. É bastante instigante o fato de LISP-I ser sensível, *in vitro*, a um mecanismo anti-tumoral e ter origem metastática. Apesar desta sensibilidade detectada *in vitro*, a linhagem LISP-I foi bem sucedida no processo de metastatização, sugerindo a existência de possíveis mecanismos de escape à resposta imune, que merecem ser estudados.

LISP-I também serviu como modelo celular *in vitro* em estudos sobre responsividade a fatores de crescimento. Uma das peças mais importantes em biologia tumoral é o envolvimento de fatores de crescimento na

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE

transcrição de proto-oncogenes (GOUSTIN *et al.* 1986). A evidência deste envolvimento reside no decréscimo da necessidade de fatores de crescimento do soro para a proliferação de algumas células transformadas. Fatores de crescimento são definidos como polipeptídeos que estimulam a proliferação celular pela ligação a receptores de alta afinidade. Sugere-se que IGFs (*Insuline-like-Growth-Factors*, fatores de crescimento semelhante a insulina) são importantes na regulação da proliferação de carcinomas colo-retais (LAHM *et al.* 1994). Tanto IGF-I como IGF-II estimulam a proliferação celular de maneira autócrina, tendo sido purificados de sobrenadantes de cultura de HT29, uma linhagem celular de carcinoma colo-retal bem estabelecida (LAHM *et al.* 1994). Os efeitos de IGF-I e -II são exercidos por meio da interação com receptores específicos. Uma das cadeias destes receptores possui homologia com o produto do oncogene *ros* (GOUSTIN *et al.* 1986) que tem atividade tirosina quinase relacionada ao receptor de insulina (DARNELL *et al.* 1990b).

Estudos usando LISP-I mostraram que a linhagem não responde a IGF-I e -II exógenos (LAHM *et al.* 1992b). Mais tarde, LAHM e colaboradores (1994) mostraram que LISP-I possui receptor de IGF-I, mas o fato desta linhagem não responder a IGF-I e -II exógenos pode ser devido à presença de um receptor não funcional graças a alterações intrínsecas ou a deficiências na via de sinalização em eventos subseqüentes à ativação do receptor.

Outros fatores biológicos importantes na regulação do comportamento e da proliferação celulares são as citocinas. Citocinas são um grupo bastante diversificado de proteínas produzidas por células imunocompetentes que agem como moduladores nas respostas inflamatória, imune e hematopoiética. Agem em vários tipos celulares, de maneira pleiotrópica, pela ligação a receptores específicos presentes na superfície da célula alvo. Interleucina 1 (IL-1) é uma citocina produzida por muitos tipos celulares, principalmente fagócitos mononucleares. Seus efeitos biológicos dependem da quantidade liberada, e podem ser proliferativos ou anti-proliferativos em células de carcinoma colo-retal em cultura (RAITANO e KORC 1993; LAHM *et al.* 1992a). Uma outra citocina secretada por macrófagos sob influência inclusive de IL-1 é a interleucina-6 (IL-6), que possui ação principalmente sob

hepatócitos e linfócitos B, agindo como fator de crescimento em muitos tipos de tumores (ABBAS *et al.* 1997). Neste contexto, LAHM e colaboradores (1992a) compararam a capacidade de LISP-I responder à IL-1 e à IL-6 com outras linhagens de carcinoma colo-retal já estabelecidas, e verificaram sua não-responsividade a estas duas citocinas. Concluíram que diferentes citocinas fornecem sinais distintos para a regulação da proliferação *in vitro* de linhagens celulares de carcinomas colo-retais.

LISP-I também foi empregada com o propósito de se investigar o efeito potenciador de interferon α (IFN-α) sobre 5-fluororacil (5-FU). 5-FU tem sido usado há mais de 40 anos como adjuvante no tratamento de câncer colo-retal em estádio avançado (MEROPOL 1998). A citocina IFN-α é conhecida pela ativação das funções líticas de células NK, além de já ser amplamente utilizada na clínica como um agente anti-viral (ABBAS *et al.* 1997). A combinação de 5-FU com IFN-α se mostrou um importante agente anti-tumoral em ensaios clínicos realizados em pacientes com carcinoma colo-retal em estágio avançado (WADLER *et al.* 1989; WADLER e WIERNIK 1990). TEVAEARAI e colaboradores (1992) investigaram os efeitos *in vitro* de IFN-α sobre a citotoxicidade de 5-FU em linhagens de adenocarcinoma de cólon, inclusive LISP-I. Novamente, os dados obtidos revelaram que LISP-I é insensível ao efeito potenciador de IFN-α sobre a ação de 5-FU.

ROELA (1998) utilizou a linhagem LISP-I sob efeito do tratamento com DMSO (dimetil-sulfóxido) para verificar a influência da capacidade diferenciadora do último na expressão de integrinas do tipo β1 e na conseqüente adesão à laminina-1. O DMSO é um solvente polar que age como importante agente diferenciador em alguns tipos celulares humanos. Foi demonstrado que LISP-I responde à ação diferenciadora do DMSO melhor do que a linhagem celular usada comparativamente. As propriedades adesivas à laminina-1 não foram alteradas pela ação de DMSO, indicando que outras integrinas, além das da família β1, podem exercer a função de adesão à laminina-1 em células pobre e parcialmente diferenciadas.

Outro estudo que utilizou LISP-I teve como objetivo relacionar a expressão de receptores de ácido retinóico, um agente anti-proliferativo, e a

do oncogene *c-myc* (dos REIS, 1993). Já que a ligação de vitamina D ao seu receptor provoca uma redução da expressão de *c-myc* em células de uma linhagem promielocítica humana, foi proposto que o mesmo poderia se dar em células colônicas, que são o principal alvo de ação da vitamina D. Entretanto, apesar de LISP-I apresentar o receptor de vitamina D normal, a expressão de *c-myc* não foi inibida por 1,25-dihidroxi-vitamina D_3. Curiosamente, também não foi observado o aumento na expressão de *c-myc* em células tratadas com altas concentrações de vitamina D, efeito esperado e obtido em outra linhagem de carcinoma colo-retal usada no mesmo estudo.

Como pode ser notado, os trabalhos que utilizaram a linhagem LISP-I identificaram-na como uma linhagem não-responsiva a fatores exógenos, como fatores de crescimento e vitamina D_3, e à droga 5-FU, mesmo na presença de IFN-α. Este comportamento sugere certa auto-suficiência, a qual pode ter contribuído para seu fenótipo metastático, apesar de ser alvo de lise por células NK. Reunidos, os achados acima descritos instigam o interesse em estudar algumas características biológicas de LISP-I que possam ter contribuído para o estabelecimento de seu fenótipo metastático.

OBJETIVOS

1. Obtenção de subpopulações celulares de morfologias distintas entre si a partir da linhagem de adenocarcinoma colo-retal humano LISP-I.

2. Avaliação estrutural e funcional *in vitro* e *in vivo* das sublinhagens de LISP-I obtidas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. CULTURA CELULAR

A linhagem celular LISP-I foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Ricardo R. Brentani, do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo. Células de LISP-I foram cultivadas em meio de cultura DMEM enriquecido com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP), acrescido de 40 mg/l de gentamicina (Schering, São Paulo,SP), tamponado com 10 mM de HEPES (Inlab, São Paulo, SP) e 24 mM de bicarbonato de sódio (Reagen, Rio de Janeiro, RJ). Esta solução foi denominada meio completo e, na ausência de SFB, meio incompleto. As passagens e os subcultivos foram realizados por tripsinização, sempre que as células atingissem 80% de confluência, com uma solução de 0,2% (p/v) de tripsina e 0,02% (p/v) de EDTA, provenientes do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, SP). Os frascos de cultura (Costar, Cambridge, EUA) foram mantidos em estufa úmida (Forma Scientific, Ohio, EUA) a 37°C sob atmosfera úmida de 5% de CO_2 em ar.

2. CLONAGEM CELULAR

Clonagens celulares da linhagem LISP-I foram feitas a fim de se obter subpopulações homogêneas com morfologias distintas. Cultivos apresentando 80% de confluência foram utilizados. Para tal, células aderidas foram lavadas uma vez com PBS e removidas com solução de tripsina/EDTA. Suspensões de células individualizadas (*single cell suspensions*) foram submetidas à diluição limitante de forma que em cada 50 µl de meio de cultura houvesse uma única célula. Esta suspensão foi então distribuída em placa de cultura de 96 orifícios e incubada em estufa úmida a 37°C sob atmosfera de 5% de CO_2 em ar até que aparecessem colônias de células oriundas de uma única célula (clones celulares). Populações que apresentavam morfologia homogênea e que eram notadamente provenientes de clones isolados foram cultivadas nas

mesmas condições da linhagem parental até atingirem a semi-confluência, expandidas e congeladas.

3. ANÁLISE MORFOLÓGICA

3.1. MICROSCOPIA ÓPTICA

A seleção de duas subpopulações com morfologias bastante distintas a serem expandidas foi realizada sob visualização em microscópio óptico invertido equipado com contraste de fase (Axiovert S100, Zeiss, Alemanha).

3.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A superfície das células foi analisada por microscopia eletrônica de varredura. Para tal, as células foram fixadas em solução de glutaraldeído (Sigma, St.Louis, EUA) a 2% (v/v), paraformaldeído a 4% (v/v), cloreto de cálcio a 5 mM em tampão cacodilato de sódio (Sigma, St.Louis, EUA) a 0,1 M pH 7,2, durante uma hora. As células foram pós fixadas em tetróxido de ósmio (Sigma, St.Louis, EUA) a 1% (p/v) no mesmo tampão, desidratadas adequadamente e metalizadas para observação microscópica (Jeol, Brasil).

3.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para análise ultraestrutural das células, as células foram cultivadas em lamínulas de vidro e fixadas conforme o item anterior. Após este passo, as células foram pós fixadas em tetróxido de ósmio a 1% (p/v), ferrocianeto de potássio a 0,8% (p/v) e cloreto de cálcio a 5 mM em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M pH 7,2. O material foi então, incluido em *epon* e submetido à microtomia. Os cortes foram contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo, observados e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol, Brasil).

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
BIBLIOTECA

4. CURVAS DE CRESCIMENTO

1×10^4 células e 3×10^4 células da linhagem LISP-I e das sublinhagens LISP-A10 e LISP-E11 foram plaqueadas em placas de cultura de 24 orifícios, em duplicatas, em meio completo. Após 24 horas, as células aderidas foram lavadas com PBS, removidas com tripsina/EDTA e submetidas à contagem em hemocitômetro (Câmara de Neubauer) usando 0,4% (p/v) do corante vital Trypan Blue (Sigma, St. Louis, EUA). As contagens foram feitas diariamente até o 6°. dia. Os valores foram analisados em gráficos em escala logarítmica e os tempos de duplicação populacional (Td) foram calculados considerando-se o intervalo de tempo em que o número de células viáveis duplicou na população em cultura.

4.1. CURVA DE CRESCIMENTO SOBRE SUBSTRATO PROTÉICO

As curvas de crescimento sobre proteínas da matriz extracelular foram realizadas apenas com a linhagem mãe LISP-I, sensibilizando-se placas de 24 orifícios com 5 $\mu g/cm^2$ de laminina ou fibronectina por 2 horas a 37°C e plaqueando-se 5×10^3 células (dia 0). Contagens do número de células foram feitas até o 8° dia, conforme acima exposto. Como controle foi usado o crescimento obtido sobre placa sem qualquer substrato protéico. Os experimentos foram realizados em triplicatas. OS sobrenadantes de cultura de todos os orifícios foram recolhidos e mantidos a -20°C para posterior dosagem de CEA.

5. DOSAGEM DE CEA NOS SOBRENADANTES DA CULTURA

CEA foi dosado em 500 µl do meio de cultura (sobrenadante) contido em placas de 24 orifícios em que foram realizadas as curvas de crescimento de LISP-I em substrato protéico (acima). A dosagem foi feita por *kit* de quimioluminescência LIA-MAT CEA (BYK Sangtest Diagnóstica), no laboratório de Imunodiagnóstico da Hospital A. C. Camargo, Fundação Antônio Prudente, São Paulo.

6. EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO INTERCELULAR

6.1. IMUNOCITOQUÍMICA

LISP-A10 e LISP-E11 foram cultivadas em lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro (GlassTécnica, São Paulo, SP) até 70% de confluência. Foram então fixadas com 1% (p/v) de paraformaldeído (Hoechst do Brasil, Suzano, SP) em PBS por 1 hora à temperatura ambiente. Após este período, as células foram re-hidratadas com três lavagens de 10 minutos com PBS. A peroxidase endógena das células foi então bloqueada por cinco incubações de 10 minutos com 30% (v/v) de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Merck, Darmstadt, Alemanha), em PBS. As lamínulas contendo as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com soro bovino diluído 1:10 (v/v) em PBS por 1 hora à temperatura ambiente para bloquear ligações inespecíficas. O soro foi desprezado e, imediatamente após, o anticorpo monoclonal (AcMc) anti-CEA 5D11 (CARNEIRO *et al.*, 1987) foi adicionado a cada lamínula, a uma concentração de 50 μg/ml em PBS. O tempo de incubação foi de 16 horas a 4°C. Em seguida, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com o anticorpo secundário anti-imunoglobulina G de camundongo conjugado com biotina (Sigma, St. Louis, EUA) em uma diluição de 1:200 (v/v) em PBS por 1 hora a 37°C. Em seguida, após três lavagens com PBS, o conjugado Extravidina®-peroxidase (Sigma, St.Louis, EUA) diluído a 1:1000 (v/v) em PBS foi adicionado e as lamínulas foram mais uma vez incubadas por 1h a 37°C. Depois deste período, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS e a reação foi revelada com diaminobenzidina (Sigma, St. Louis, EUA), na concentração de 0,66 mg/ml de tampão TRIS 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 contendo 0,03 % (v/v) de H_2O_2. A reação foi interrompida com água e as lamínulas foram então coradas com hematoxilina para contrastar o núcleo, lavadas e desidratadas seqüencialmente em álcool 70%, álcool 90%, álcool 100%, álcool 100%, xilol 100% e xilol 100%. Após montagem das lamínulas em lâminas, usando Entelan (Merck, Darmstadt, Alemanha), as mesmas foram observadas ao microscópio óptico comum.

6.2. CITOMETRIA DE FLUXO

A expressão de desmogleína e do antígeno carcinoembrionário (CEA) foi investigada por imunofluorescência indireta e medida por citometria de fluxo (FACS, de *Fluorescence Activated Cell Sorter*). As células das sublinhagens LISP-A10 e LISP-E11 foram removidas mecanicamente dos frascos de cultura por *cell scrapper*, fixadas com 1% (p/v) de paraformaldeído (Reagen, Rio de Janeiro, RJ) em PBS e lavadas antes da incubação com anticorpos. Foram utilizados os anticorpos monoclonais anti-desmogleína (Boehringer, Mannheim, Alemanha) a 10 μg/ml, anti-CEA (CARNEIRO *et al.*, 1987) a 60 μg/ml e, como controle negativo, a fração de IgGs purificada de soro de camundongos pré-imunes a 60 μg/ml. Os mesmos foram incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Após duas lavagens com 1% de BSA (p/v) em PBS, as células foram suspensas em 200 μl de uma solução do conjugado fluoresceinado anti-IgG de camundongo (Sigma, St. Louis, EUA) numa diluição de 1:50 (v/v) em PBS e incubadas por 45 minutos a temperatura ambiente. As células foram então lavadas duas vezes com 1% (p/v) de BSA em PBS, suspensas em 500 μl de PBS e contadas em FACS (Becton Dickinson, San Jose, EUA). As células mortas nas populações de células analisadas foram excluídas da contagem.

7. OBTENÇÃO DE LAMININA E DE FIBRONECTINA

Laminina purificada do tumor murino EHS (*Engelbreth-Holm-Swarm*) foi gentilmente cedida por Dra. Vilma Regina Martins, do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo.

Fibronectina foi purificada de plasma fresco humano aplicado em coluna de gelatina-Sepharose, conforme descrito por AKIYAMA e colaboradores (1985).

8. ENSAIOS DE ADESÃO CELULAR

Os ensaios de adesão celular foram realizados de acordo com TARABOLETTI *et al.* (1993), com modificações. Placas de cultura de 96 orifícios (Costar, Cambridge, EUA) foram sensibilizadas com 40 µl / orifício com diferentes concentrações de laminina ou fibronectina por 2 horas a 37°C. Após este período, os sítios ativos remanescentes do plástico foram bloqueados com 1% (p/v) de BSA em PBS por 1 hora a 37°C. Para este experimento, as células foram removidas com solução de 0,6 mM de EDTA e suspensas em meio incompleto. 5 x 10^4 células das linhagens em estudo foram distribuídas nas placas sensibilizadas logo após o período de bloqueio e a lavagem dos orifícios. Seguiu-se incubação de 3 horas a 37°C. Foram então feitas 3 lavagens com PBS para remoção das células não aderidas, e as remanescentes foram fixadas no plástico com metanol 100% (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 5 minutos. Na seqüência, as mesmas foram lavadas novamente e coradas com solução filtrada de 0,2% (p/v) de cristal violeta (Synth, São Paulo, SP) em etanol 2% (v/v) (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 5 minutos. A remoção do excesso de corante foi realizada por lavagens exaustivas dos orifícios com PBS. O corante em fase sólida foi eluído com uma solução de 50% de etanol (v/v) em solução de 0,1 M de citrato de sódio, num volume de 100 µl por orifício, sob agitação suave, por 5 minutos. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 550 nm de comprimento de onda.

9. ENSAIOS DE MIGRAÇÃO

A fim de comparar a habilidade das duas sublinhagens em migrar em direção a componentes de matriz extracelular, as células foram submetidas a ensaios de migração de acordo com JASIULIONIS e colaboradores (1996), com pequenas modificações. Câmaras de Boyden modificadas Transwell® (Costar, Cambridge, EUA) com membranas de policarbonato contendo poros de 8 µm de diâmetro foram sensibilizadas nas suas porções externas com 20 µg de laminina e de fibronectina, separadamente, por 2 horas a 37°C. Após

este período, os sítios ativos remanescentes da membrana foram bloqueados com 1% de BSA (p/v) em PBS por 1 hora a 37°C. As porções internas das câmaras foram então preenchidas com 200 µl de suspensões de 2 x 10^5 células das linhagens em estudo em meio completo sem soro fetal bovino e incubadas por 16 horas a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO_2. Em seguida, as membranas foram lavadas cuidadosamente com PBS, fixadas por 5 minutos em metanol 100% (Merck, Darmstadt, Alemanha), lavadas com água e coradas com 1% (p/v) de azul de toluidina (Merck, Darmstadt, Alemanha) em 1% (p/v) de tetraborato de sódio (bórax) (Sigma, St. Louis, EUA) por 5 minutos. Após lavagem exaustiva em água, a coloração das porções internas foi cuidadosamente removida com algodão, restando apenas a coloração da porção externa da câmara, onde se espera encontrar as células que migraram. A eluição do corante foi feita com 1% (p/v) de SDS em água, aplicando-se 200 µl por câmara e incubando-se por 30 minutos a 37°C. A densidade óptica foi obtida por leitura da absorbância em espectrofotômetro a 570 nm de comprimento de onda. O controle foi feito pela análise da migração em direção a 1% (p/v) de BSA em PBS. Todos os experimentos foram feitos em duplicatas.

10. PROLIFERAÇÃO INDEPENDENTE DE ANCORAGEM

Placas de cultura de 6 orifícios (Costar, Cambridge, EUA) foram preenchidas com uma camada de 1% (p/v) de agarose (Gibco BRL, Gaithesburg, EUA) em meio completo, em volume de 2 ml por orifício. A esta camada foi dada a denominação de ágar base. A fim de se verificar a sobrevivência e a proliferação das células de forma independente de ancoragem, 5 x 10^5 células de cada uma das sublinhagens foram suspensas em uma solução de meio completo com 0,6% (p/v) de agarose e colocadas sobre a camada de ágar base já gelificada. Sobre as duas camadas, foi acrescentado meio completo, o qual foi substituído a cada 7 dias (SACKS *et al.*, 1988).

11. TUMORIGENICIDADE *IN VIVO*

Camundongos BALB/c machos de 2 meses de idade tiveram o dorso depilado e foram irradiados com 600 rads 24 horas antes do xenotransplante de células das sublinhagens LISP-A10 e LISP-E11. 1×10^6 ou 1×10^7 células em PBS de cada um dos clones celulares foram injetadas subcutaneamente no dorso dos animais supracitados.

RESULTADOS

1. CULTURA CELULAR

A linhagem de adenocarcinoma de cólon LISP-I foi cultivada em garrafas e placas de cultura, sempre formando monocamadas (figura 1A).

2. CLONAGEM CELULAR E ANÁLISE MORFOLÓGICA

Como pode ser observado na figura 1A, a linhagem LISP-I apresenta heteroge-neidade intrapopulacional quanto à morfologia celular, com células arredondadas, alongadas ou ainda arranjadas como um tecido coeso. Para isolar populações com diferentes morfologias celulares, foi realizada a clonagem celular. Foram obtidos dois clones celulares com morfologias distintas entre si, denominados de LISP-A10 (figura 1B) e LISP-E11 (figura 1C). A sublinhagem LISP-A10 possui morfotipo epitelial, com suas células fortemente aderidas umas às outras, formando agregados celulares de difícil rompimento em suspensão. Por outro lado, a linhagem LISP-E11 apresenta morfotipo fibroblastóide, com células alongadas e baixo grau de adesão intercelular. Ambos os clones apresentam populações homogêneas intralinhagem, confirmando sua origem monoclonal.

As sublinhagens LISP-A10 e LISP-E11 foram observadas sob microscopia eletrônica de varredura (figura 2) e de transmissão (figura 3), a fim de identificar características ultraestruturais. Conforme está mostrado na figura 2A, LISP-A10 apresenta longas projeções de membrana plasmática e alto grau de contato intercelular. LISP-E11, por sua vez, apresenta projeções de membrana semelhantes a vesículas secretórias (*blebs*, figura 2B), características do clone até a 7ª passagem.

Sob microscopia eletrônica de transmissão, as sublinhagens LISP-A10 (figura 3A) e LISP-E11 (figura 3B) apresentam característicos feixes de filamentos intermediários, indicados pelas setas, além de muitos ribossomos no citoplasma.

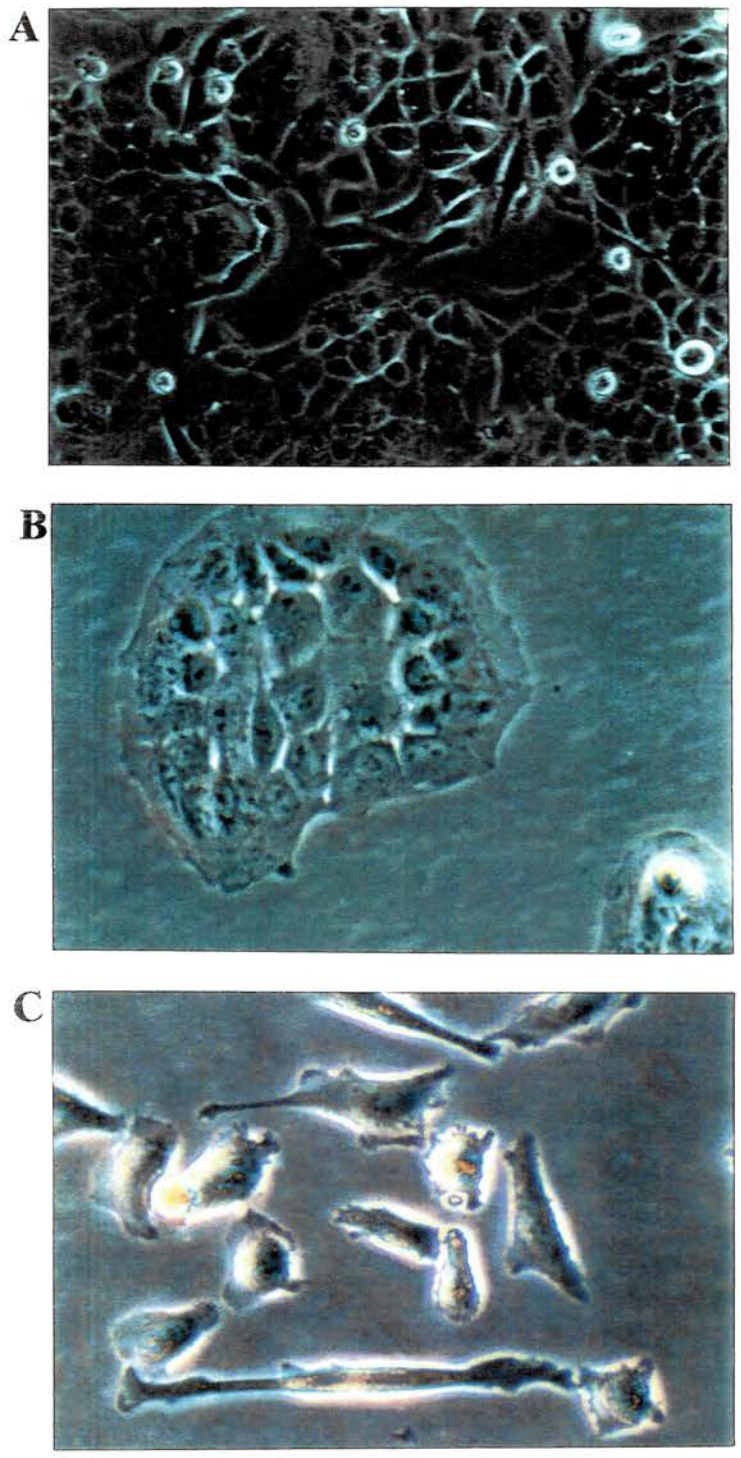


FIGURA 1: Fotomicrografia das linhagens de adenocarcinoma de cólon em cultura sob microscopia óptica invertida com contraste de fase. (A) LISP-I, linhagem parental, morfotipo misto. (B) LISP-A10, morfotipo epitelial; (C) LISP-E11, morfotipo fibroblastóide. Aumento original: 320 x.

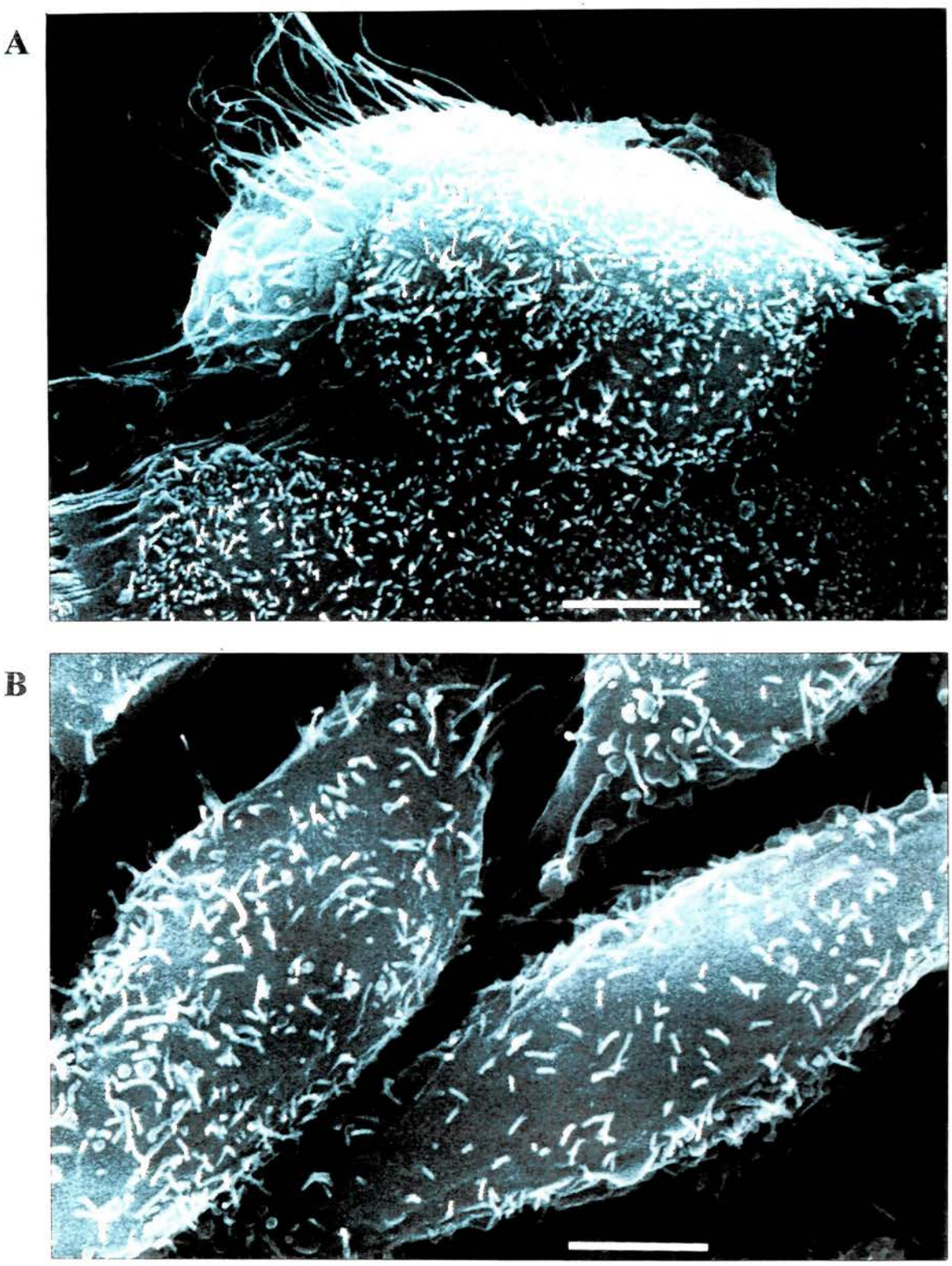


FIGURA 2: Fotomicrografia eletrônica de varredura de (A) LISP-A10 e (B) LISP-E11. Barras: 5 μm. Aumento: 2000 x.

FUNDAÇÃO ANTONIO
PRUDENTE

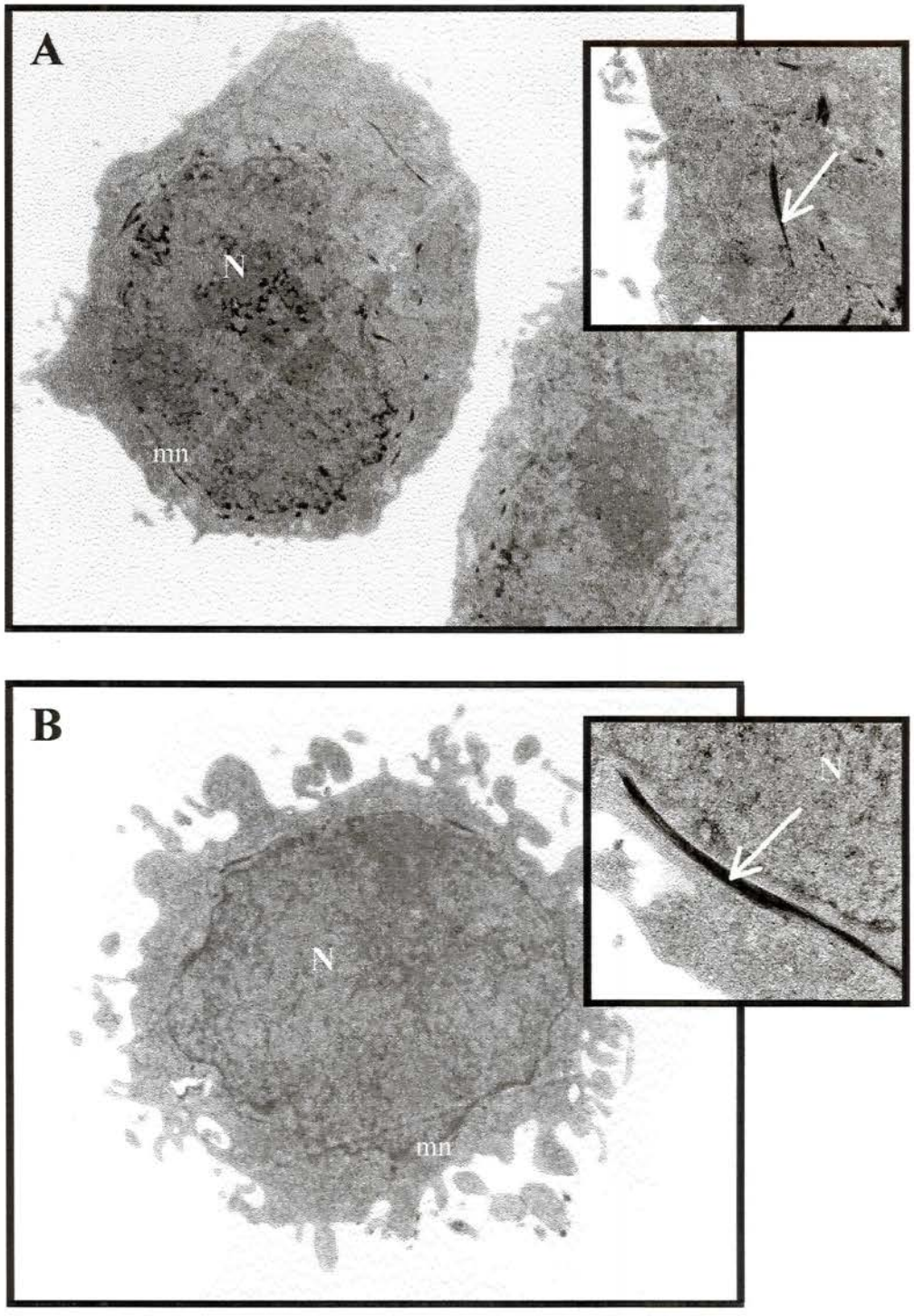


FIGURA 3: Fotomicrografia eletrônica de transmissão de (A) LISP-A10 e (B) LISP-E11. As setas indicam os filamentos intermediários; **N**, núcleo; **mn**, membrana nuclear. Aumento:20000 x; insertos: 40000 x.

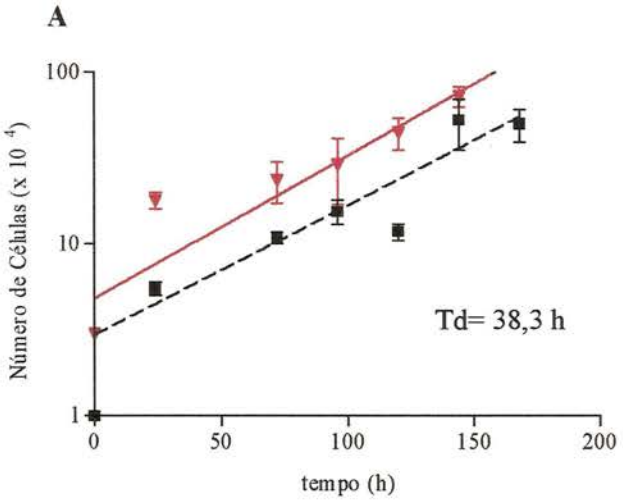
3. CURVAS DE CRESCIMENTO

Para avaliar a cinética de proliferação das sublinhagems LISP-A10 e LISP-E11, foram analisadas curvas de crescimento. A figura 4 representa um resultado de curva de crescimento das populações celulares dentre vários experimentos realizados. A sublinhagem LISP-A10 possui tempo de duplicação em cultura de 38,3 horas e a LISP-E11, de 30,4 horas.

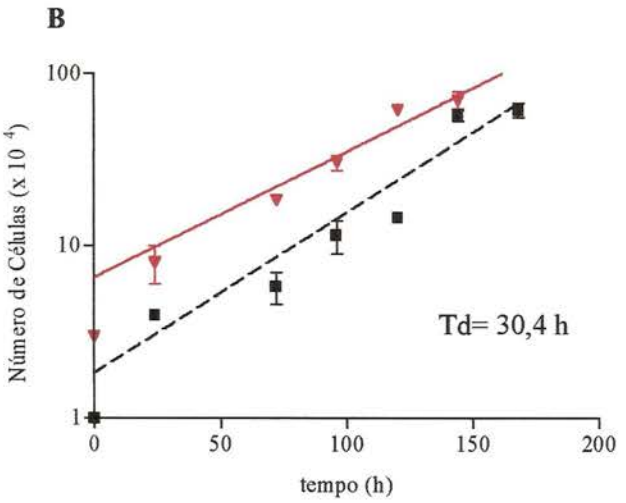
Levando-se em consideração que proteínas de matriz extracelular estão envolvidas em processos de diferenciação, morfogênese e proliferação, investigou-se a habilidade de laminina ou de fibronectina interferirem na proliferação da linhagem LISP-I. Por não haver sido identificada qualquer diferença significativa entre o crescimento populacional de LISP-I cultivada sobre laminina, fibronectina ou sem substrato protéico (dados não mostrados), não foram realizados estes experimentos com os clones celulares.

4. EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO INTERCELULAR

As sublinhagens LISP-A10 e LISP-E11 apresentam heterogeneidade intrapopulacional quanto à expressão de CEA na superfície celular (figura 5). Algumas células são bastante positivas, enquanto outras reagem em menor intensidade com anticorpo monoclonal anti-CEA. Esta observação pode ser feita tanto para LISP-A10 (figura 5A), quanto para LISP-E11 (figura 5C). A citometria de fluxo mostrada na figura 6 confirma os dados obtidos para a expressão de CEA por LISP-A10 (figura 6A) e por LISP-E11 (figura 6B). Os resultados demonstram a menor expressão de CEA pela linhagem LISP-E11.



Tempo (h)	Média do Número de Células (x 10^4)	
0	1,0	3,0
24	5,5	18,0
72	10,8	23,6
96	15,5	29,0
120	11,8	44,5
144	52,0	72,0
168	49,5	123,0



Tempo (h)	Média do Número de Células (x 10^4)	
0	1,0	3,0
24	4,0	8,0
72	5,8	18,5
96	11,5	30,6
120	14,5	61,5
144	57,0	70,0
168	61,5	111,0

FIGURA 4: Curvas de crescimento das linhagens (A) LISP-A10 e (B) LISP-E11 obtidas conforme a descrição em "Material e Métodos". Os gráficos representam um único experimento realizado em duplicatas. Td, tempo de duplicação.

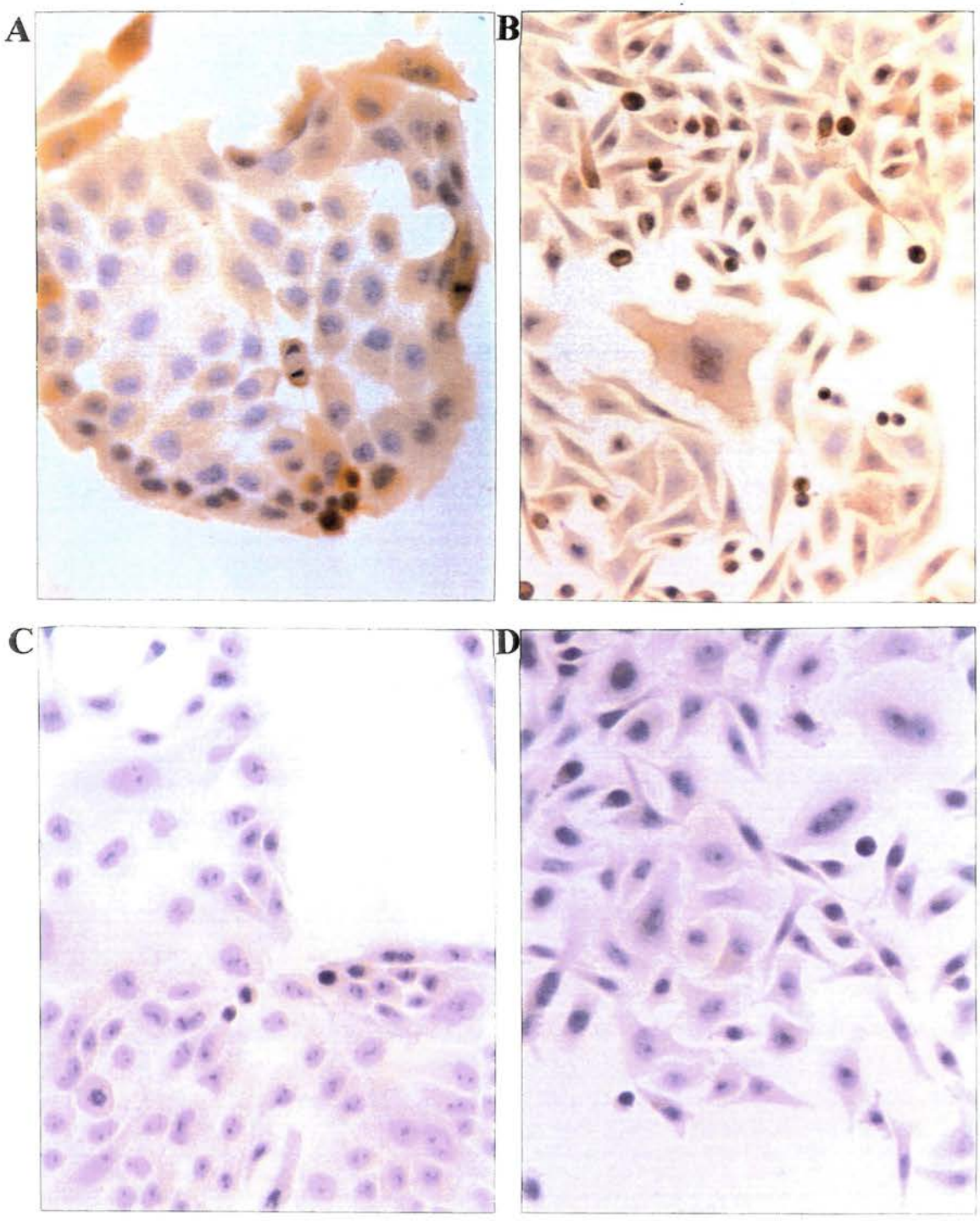


FIGURA 5: Imunocitoquímica para detecção de CEA em LISP-A10 e LISP-E11. (A) AcMc anti-CEA em LISP-A10; (B) AcMc anti-CEA em LISP-E11; (C) controle de LISP-A10; (D) controle de LISP-E11. Controles: omissão do anticorpo primário. Aumento original: 200 x.

A expressão de desmogleína foi investigada usando a marcação pelo anticorpo monoclonal anti-desmogleína em ensaios de imunofluorescência indireta. A fluorescência pode ser notada nas células da sublinhagem LISP-A10 (figura 6C), enquanto valores de fluorescência inferiores aos do controle negativo são encontrados na linhagem LISP-E11 (figura 6D).

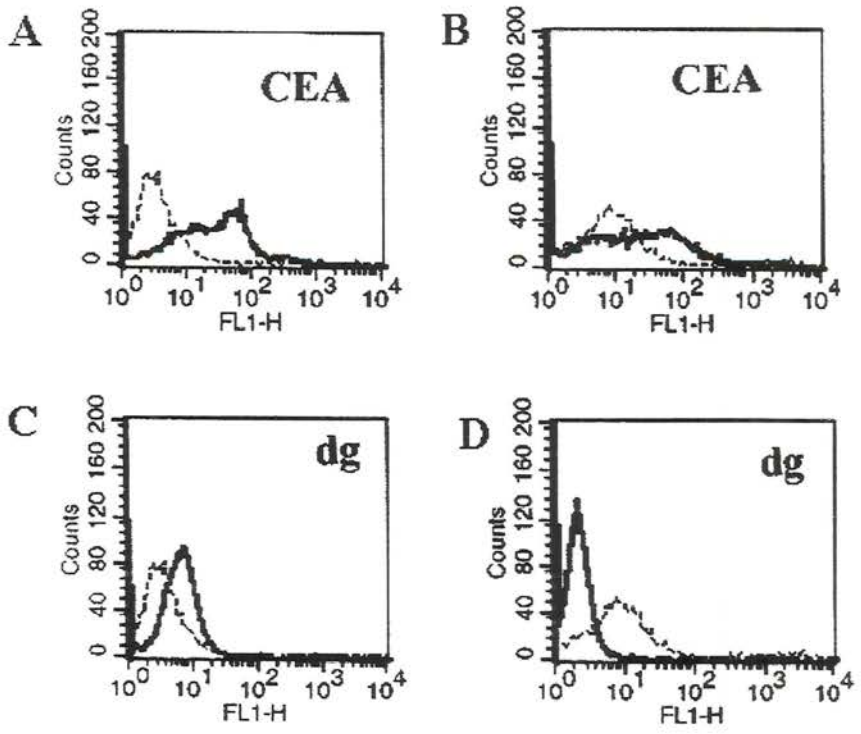


FIGURA 6: Análise por FACS da expressão de desmogleína (dg) e de CEA pelas sublinhagens (A e C) LISP-A10 e (B e D) LISP-E11 em reação de imunofluorescência indireta. Linhas inteiras: AcMc anti-desmogleína e AcMc anti-CEA; linhas interrompidas: IgG normal de camundongo (controle).

5. ENSAIOS DE ADESÃO CELULAR

A adesão aos componentes de matriz extracelular laminina e fibronectina foi medida por ensaios colorimétricos utilizando concentrações crescentes das mencionadas proteínas em fase sólida. Os gráficos representados na figura 7 mostram a adesão das sublinhagens à laminina (figura 7A) e à fibronectina (figura 7B), mas não ao controle negativo, albumina sérica bovina (BSA 1%). É relevante salientar que a adesão aumenta com o aumento da concentração das proteínas de matriz extracelular.

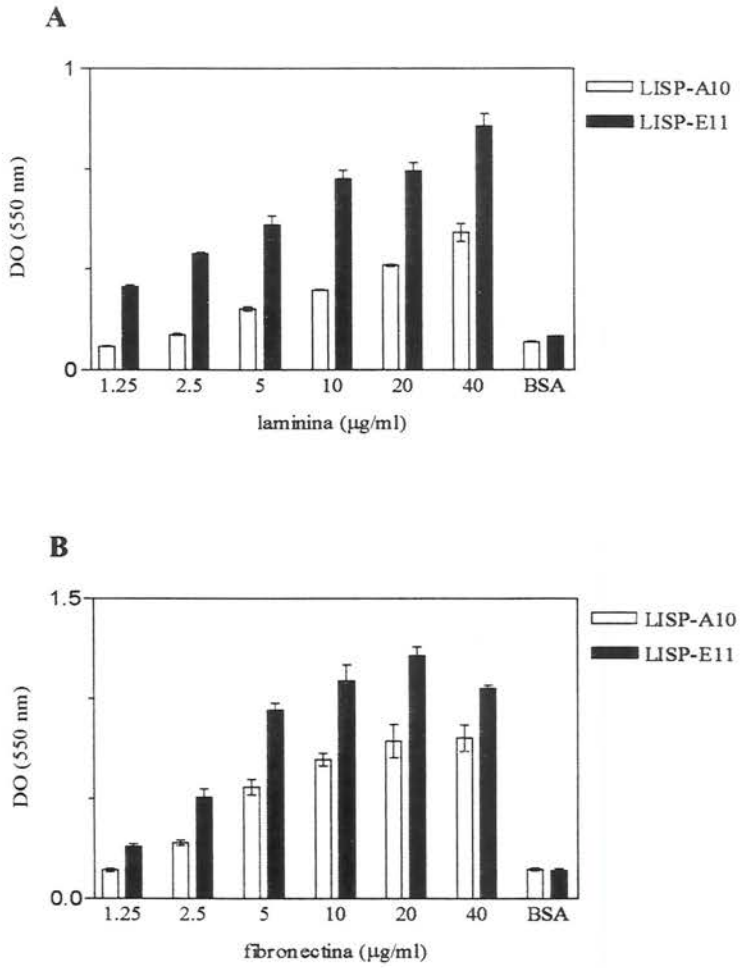


FIGURA 7: Adesão das sublinhagens LISP-A10 e LISP-E11 a componentes de matriz extracelular adsorvidos em concentrações crescentes à fase sólida. As células foram plaqueadas na concentração fixa de 5 x 10^4/50 µl sobre laminina (A) e fibronectina (B). Os gráficos são representativos de três experimentos realizados em triplicatas. As barras representam o erro padrão.

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
Pós-Graduação

6. ENSAIOS DE MIGRAÇÃO

A fim de verificar e comparar a capacidade migratória das duas sublinhagens, foram realizados ensaios colorimétricos de migração *in vitro*. Conforme está mostrado na figura 8, ocorre migração preferencial das sublinhagens LISP-A10 e LISP-E11 em direção às proteínas de matriz extracelular, em comparação à migração ao BSA 1% (controle negativo).

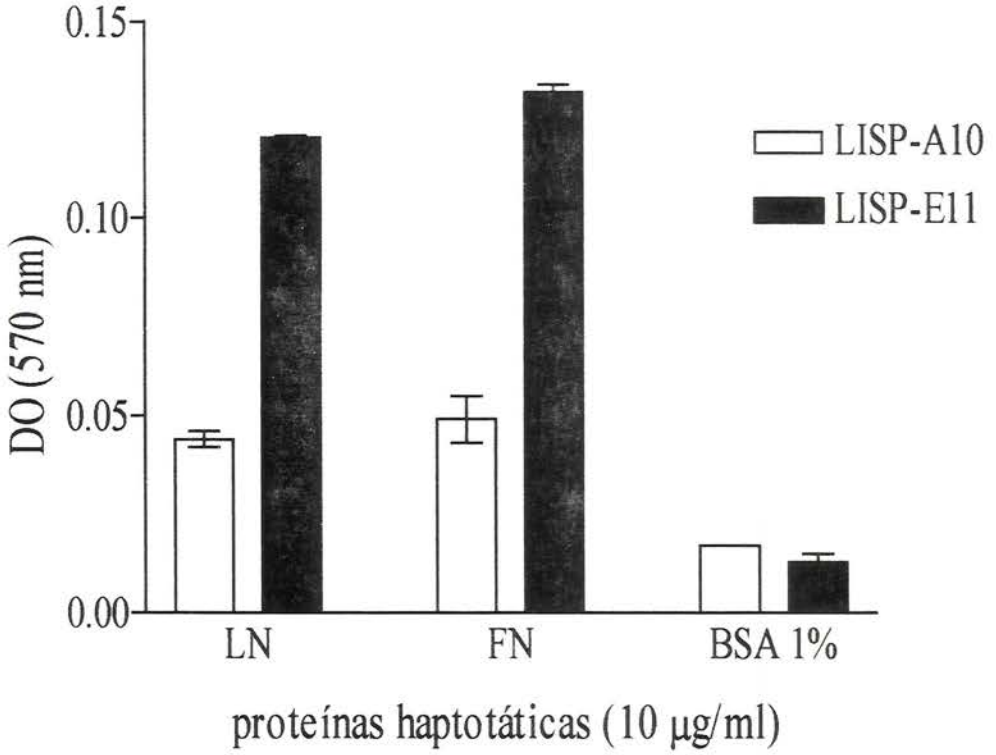


FIGURA 8: Comparação entre as propriedades migratórias das duas sublinhagens em direção à laminina (LN) e à fibronectina (FN) adsorvidas em fase sólida, por meio de ensaio colorimétrico. A migração em direção a BSA foi empregada como controle. O resultado é representativo de três experimentos realizados em duplicatas. As barras representam o erro padrão.

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE

8. PROLIFERAÇÃO INDEPENDENTE DE ANCORAGEM

A tumorigenicidade das duas sublinhagens foi verificada *in vitro* por proliferação independente de ancoragem, conforme apresentado na figura 9. A sublinhagem LISP-A10 (figura 9A) prolifera independentemente de ancoragem, formando estruturas semelhantes a esferóides, enquanto que a sublinhagem LISP-E11 (figura 9B), embora sobreviva sem adesão a substrato sólido, não forma estruturas semelhantes a esferóides.

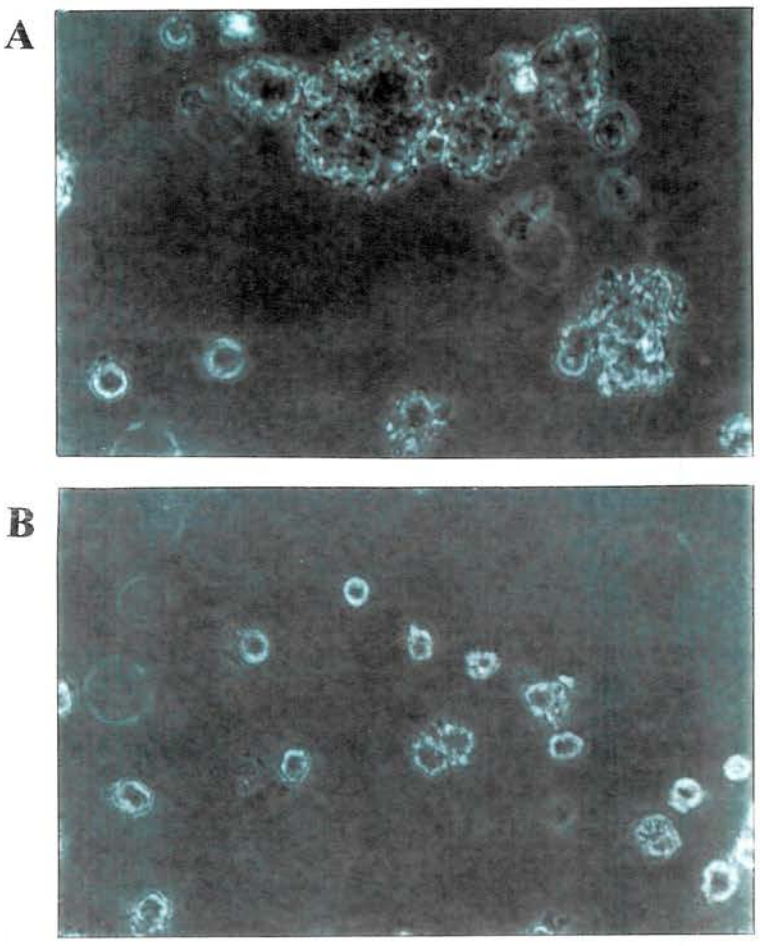


FIGURA 9: Proliferação independente de ancoragem em ágar mole. (A) LISP-A10; (B) LISP-E11. Aumento original: 320 x.

8. TUMORIGENICIDADE *IN VIVO*

A tabela I resume as observações feitas nos camundongos xenotransplantados com células das sublinhagens LISP-A10 e LISP-E11 após oito (8) dias da inoculação. A tabela II traz uma comparação entre o comportamento *in vitro* das duas sublinhagens.

Tabela I: Xenotransplante de células de LISP-A10 e LISP-E11 em camundongos BALB/c irradiados.

	Lote	Nº. de animais	Sexo▲	Quantidade de células injetadas	Sobreviventes sem tumor *	Sobreviventes com tumor *
LISP-A10	1	4	F	1×10^6	3	1
	2	5	F	1×10^7	0	1
	3	4	M	1×10^7	0	1
LISP-E11	1	4	F	1×10^6	4	0
	2	5	F	1×10^7	1	2
	3	4	M	1×10^7	0	4

* Após 8 dias do transplante.
▲F, fêmea; M, macho.

Tabela II: Resumo das observações feitas *in vitro* para as sublinhagens obtidas.

	Morfotipo	Tempo de duplicação (h)	Esferóides
LISP-A10	epitelial	38,3	Sim
LISP-E11	fibroblastóide	30,4	Não

DISCUSSÃO

Considerando-se que a disseminação metastática é a principal causa de morte entre pacientes com carcinoma colo-retal, a compreensão de sua fisiologia é um importante alvo de estudo na atualidade. O desenvolvimento de modelos experimentais *in vitro* tem contribuído bastante para a elucidação de questões relativas ao comportamento de células tumorais e suas metástases, já que o estudo em humanos possui inúmeras limitações.

A heterogeneidade dos tumores é um conceito bem estabelecido em biologia tumoral. Apesar de serem provenientes da expansão clonal de uma única célula, os tumores diferem em morfologia, taxa de proliferação, sensibilidade à drogas e potencial metastático. O microambiente no qual o tumor primário cresce e progride pode influenciar a seleção de subpopulações dominantes de células, que seriam precursoras da metástase. Numa interpretação interessante, Isaiah Fidler expressa que "tumores são ecossistemas celulares complexos de diferentes subpopulações de células com propriedades genotípicas e fenotípicas diferentes" (SINGH *et al.* 1997). O comportamento dos tumores é, em última instância, determinado por fatores que afetam a sobrevivência das subpopulações que resistiram às pressões ambientais e que compõem as massas tumorais (SINGH *et al.* 1997).

Da mesma forma, as metástases constituem um processo seletivo e também podem ter origem monoclonal mesmo sendo heterogêneas, já que esta diversidade é atribuída tanto a fatores genéticos como a epigenéticos (MORIKAWA et al. 1988; BRENTANI 1989). Esta heterogeneidade confere à massa tumoral, como um todo, vantagens adaptativas às várias etapas do processo metastático. Além disto, fatores presentes no microambiente do órgão hospedeiro também podem contribuir para a diversidade de fenótipos em metástases provenientes de um mesmo tumor.

No presente trabalho, foram caracterizados a morfologia e o comportamento de uma linhagem celular de carcinoma colo-retal que já tem sido usada como modelo de estudo por vários grupos de pesquisa em câncer.

Os aspectos comportamentais escolhidos para esta investigação foram os de interação com os componentes de matriz extracelular laminina e fibronectina, e a tumorigenicidade *in vivo* e *in vitro*.

A metástase é um processo que envolve muitas etapas. Para que este evento seja bem sucedido, as células tumorais devem vencer as pressões seletivas em todas as etapas do processo. Assim, uma célula (ou um pequeno grupo delas) tem que se destacar do tumor primário por alterações na adesividade intercelular, interagir com a membrana basal e efetuar sua proteólise para migrar através da matriz intersticial. A partir daí, deve alcançar o endotélio e também atravessá-lo, sobreviver ao fluxo sangüíneo graças à interação com plaquetas que auxiliam na formação de êmbolos e, novamente, interagir com o endotélio no órgão de colonização. Ainda, a célula precisa atravessar a matriz extracelular deste último e sobreviver no novo microambiente, sendo necessária a interação com o tecido do órgão secundário. Desta forma, é perceptível que a metástase é um evento bastante difícil de ser estabelecido. Segundo LIOTTA (1992), menos de uma em cada 10000 células tumorais que saem do tumor primário sobrevivem para formar novas colônias.

A linhagem de adenocarcinoma colo-retal LISP-I é proveniente de metástase hepática. As células que a compõem foram, portanto, selecionadas adaptativamente por mecanismos de evolução molecular. LISP-I é morfologicamente heterogênea em cultura (figura 1A) e pouco diferenciada (PRADO *et al.* 1995). A fim de atribuir os comportamentos apresentados por LISP-I aos diferentes morfotipos observados em cultura, foi realizada a clonagem celular neste trabalho.

Dois clones celulares obtidos do procedimento de clonagem foram escolhidos, o LISP-A10 e o LISP-E11, por apresentarem notáveis diferenças morfológicas sob microscopia óptica (figura 1; tabela II) e microscopia eletrônica (figuras 2 e 3). Apresentando organização em epitélio, LISP-A10 foi caracterizada como o morfotipo mais diferenciado. O grau de diferenciação é um fator bastante significante na predição do comportamento de carcinomas colo-retais (DANEKER *et al.* 1989). Sabe-se que os carcinomas de cólon pouco

diferenciados são extremamente agressivos e normalmente estão relacionados a uma pequena taxa de sobrevivência dos pacientes e a um pior prognóstico (STEINBERG *et al.* 1986). Uma vez estabelecidos, os clones celulares foram comparados quanto à taxa de proliferação em cultura (figura 4; tabela II). LISP-A10 apresentou um tempo de duplicação em cultura um pouco maior do que o de LISP-E11, condizente com seu caráter mais diferenciado.

Um dos mecanismos iniciais do processo metastático é a perda da adesividade entre as células que constituem o tecido, caracterizada pela perda da função de proteínas de adesão intercelular. Em um tecido epitelial normal diferenciado, as células se mantém unidas por vários complexos protéicos adesivos, e a sua morfologia e disposição dependem destes para a manutenção das funções do citoesqueleto. Uma das proteínas envolvidas em adesão é a desmogleína, da família das caderinas, presente nos desmossomos e que exerce importante função adesiva (BEN-ZE'EV 1997). A identificação da expressão de desmogleína pela sublinhagem LISP-A10, mas não por LISP-E11, corrobora o padrão epitelial e mais diferenciado da primeira (figura 6). Além disto, a expressão de desmogleína foi inversamente proporcional à motilidade de LISP-A10, concordante com as observações feitas em células de carcinoma de bexiga por BOYER e colaboradores (1989). Os aspectos de migração e motilidade dos clones celulares de LISP-I serão discutidos adiante.

A adesão intercelular é também importante para a manutenção de êmbolos de células tumorais na circulação. A formação destes agregados celulares foi evolutivamente selecionada para a conquista de órgãos secundários porque facilita a sobrevivência da massa tumoral no fluxo sangüíneo. Além disto, células metastáticas na circulação também podem interagir com plaquetas e, assim, adquirir vantagens na adesão ao endotélio no sítio de colonização secundária (BRENTANI 1989). É importante salientar que comparando-se as sublinhagens sob este ponto de vista, o clone LISP-A10 deve ter contribuído muito para esta fase do processo metastático, já que suas células em suspensão formam rígidos agregados (grumos) e que expressam moléculas de adesão intercelular.

Ainda considerando adesão intercelular, a expressão de CEA por LISP-A10 foi maior do que em LISP-E11, conforme mostrado por imunocitoquímica (figura 5) e confirmado por imunofluorescência indireta (figura 6). Tais observações são também concordantes com o fenótipo mais diferenciado de LISP-A10. CEA foi postulado como molécula de adesão por BENCHIMOL e colaboradores (1989) e muitos trabalhos o correlacionam diretamente com o grau de diferenciação celular (CHAKRABARTY *et al.* 1992; PRADO *et al.* 1995). CEA, como uma molécula de adesão homotípica, favoreceria o processo metastático provavelmente por propiciar a sobrevivência de agregados celulares na corrente sangüínea.

A função precisa de CEA no epitélio gastrointestinal ou na carcinogênese não é conhecida. Já foi demonstrado, por exemplo, que quando células de tumores colo-retais humanos são induzidas a diferenciar em um fenótipo mais normal e benigno, ocorre o aumento de expressão de laminina, fibronectina e CEA, sendo que a de fibronectina seria necessária para a expressão de CEA (CHAKRABARTY *et al.* 1998). A adesão a estes componentes de matriz extracelular seria um sinal de parada na proliferação celular (GENG *et al.* 1998). No presente trabalho, a linhagem parental LISP-I foi submetida ao cultivo sobre laminina e fibronectina com a finalidade de verificar possíveis variações na quantidade de CEA secretado para o sobrenadante. As curvas de crescimento e a dosagem de CEA no sobrenadante destas culturas não mostraram qualquer diferença entre o cultivo sobre os diferentes substratos e o cultivo convencional sem proteína adsorvida (dados não mostrados).

Alguns trabalhos têm demonstrado a importância biológica das interações entre as células tumorais e laminina e fibronectina (McCARTY e FURCHT 1984; TYSNES *et al.* 1997; KAMMERER *et al.* 1998). As interações com laminina, a principal glicoproteína das membranas basais, devem contribuir para a habilidade de certas populações celulares invadirem e metastatizarem. Da mesma forma, interações com fibronectina propiciam a migração através das matrizes estromais tanto do tecido primário quanto do tecido do órgão de colonização secundária.

A adesão de células epiteliais normais a componentes da membrana basal de um órgão é uma propriedade que as mantém em estado estacionário. Quando estas células, por algum motivo, são deslocadas da matriz extracelular, entram em apoptose. Este mecanismo que desencadeia a morte celular quando é perdido o contato com a matriz é chamado anoiquia (RUOSLAHTI 1999). Entretanto, as células epiteliais tumorais sobrevivem mesmo sem o contato com a matriz extracelular de origem. As fases de adesão à laminina da membrana basal e à fibronectina da matriz intersticial são cruciais na iniciação da invasão tumoral e do processo metastático, uma vez que estas adesões não significam a sinalização para parada de proliferação, como acontece no tecido normal. A transformação neoplásica provavelmente reduz a adesividade a componentes da matriz por vias de sinalização intracelular diferentes das vias que são ativadas em condições normais.

Contraditoriamente, no modelo usado no presente estudo, foi observada menor adesividade à laminina e à fibronectina na sublinhagem LISP-A10, que foi aqui classificada como mais diferenciada por apresentar fenótipo epitelial, quando comparada à LISP-E11 (figura 7). Este resultado poderia ser explicado pela maior adesividade intercelular da sublinhagem LISP-A10, que propiciaria a manutenção de grumos de difícil desagregação. Assim, nos ensaios de adesão celular, somente uma pequena porcentagem das células estaria apta fisicamente para interagir com as proteínas de matriz em fase sólida. Se esta adesividade fosse verificada *in vivo* ou em um modelo que permitisse a tri-dimensionalidade, poderia ser observado um resultado diferente. LISP-E11, por sua vez, é composta por células que se mantém isoladas umas das outras, sem contato intercelular perceptível inclusive sob microscopia eletrônica de varredura. Assim, é possível que os resultados observados tenham sido devidos à maior disponibilidade física das células de LISP-E11 para aderir aos substratos sólidos.

DANEKER e colaboradores (1989) propuseram que a habilidade de células de linhagens colo-retais tumorais em aderir à laminina se correlaciona diretamente com seu espalhamento neste substrato e indiretamente com o

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE

grau de diferenciação celular. Assim, linhagens pouco diferenciadas apresentariam extenso grau de espraiamento sobre laminina, sendo maior a adesão quanto menor o grau de diferenciação. Os resultados aqui obtidos mostram a mesma correlação, quando são comparados os dois clones isolados de LISP-I (dados não mostrados). A sublinhagem LISP-A10, de morfologia diferenciada e conformação epitelial, apresenta menor adesividade à laminina e à fibronectina quando comparada à LISP-E11. Um resultado interessante é que LISP-E11 apresentou, após 30 minutos de contato com as proteínas de matriz, espraiamento somente sobre fibronectina. A adesão à laminina também foi observada, porém não o espraiamento (dados não mostrados). Este curioso fato poderia ser explicado por possíveis diferenças na sinalização intracelular feita pela ligação da célula a ambas as proteínas. Uma vez que não há laminina nos espaços de Disse no fígado, é possível que o clone do qual se originou LISP-E11 tenha sido selecionado por sua habilidade em rapidamente espraiar sobre a fibronectina do novo sítio de colonização metastática.

Mesmo que células tumorais possam aderir à matriz extracelular, o processo de invasão só é bem sucedido quando existe a capacidade de migrar sobre esta última (LIOTTA e KOHN 1990). Uma vez que a haptotaxia é definida como o movimento celular determinado por um gradiente de força de adesão, a capacidade migratória está intimamente relacionada com a de adesão (GRIMSTAD 1987). Laminina e fibronectina têm sido descritas como fatores haptotáticos para linhagens celulares de vários tipos de tumores, como melanomas, carcinomas de cólon, carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, adenocarcinomas do pulmão e adenocarcinomas de mama, entre outros (VEIGA *et al.* 1995; HAIER *et al.* 1999; TOMSON *et al.* 1996; CLARKE *et al.* 1997; COOPMAN *et al.* 1991). A migração é uma das atividades de células invasivas que melhor podem ser observadas *in vitro*. O presente trabalho mostra que LISP-A10 migrou tanto em direção à laminina quanto à fibronectina de maneira bem menos intensa do que LISP-E11 (figura 8). O aspecto fibroblastóide, a capacidade adesiva e o caráter menos diferenciado de LISP-E11 devem ter contribuído para a sua maior habilidade migratória em direção às proteínas de matriz extracelular estudadas.

A migração celular participa de vários fenômenos biológicos, como embriogênese, inflamação, cicatrização e metastatização. Para migrar, as células precisam modificar sua disposição espacial e adquirir morfologia polarizada na direção do movimento. Um dos eventos iniciais na polarização é a modificação no citoesqueleto (LAUFFENBURGER e HORWITZ 1996). Filamentos intermediários são um dos principais componentes do citoesqueleto (JUNQUEIRA e CARNEIRO 1997a). Já foi descrito que a organização de filamentos intermediários em células tumorais é diferente das normais (BROWN *et al.* 1983), numa relação direta entre o grau de diferenciação do tumor e o de organização de tais filamentos. Por meio de microscopia eletrônica de transmissão, foi observado que ambos os clones celulares LISP-A10 e LISP-E11 apresentam, no citoplasma, espessos feixes fibrosos com aparência de filamentos intermediários reunidos. Grandes acúmulos de filamentos intermediários foram descritos na região perinuclear de células colônicas tumorais (BROWN *et al.* 1983), tal como acontece com os clones em estudo. Além disto, se for levado em consideração o grau de diferenciação, a sublinhagem LISP-A10 possui maior organização destes feixes, também de acordo com estudos anteriores.

A proteína vimentina é um tipo de filamento intermediário normalmente associado a células de origem mesenquimal, como fibroblastos, enquanto que as células epiteliais normais apresentam citoqueratina como proteína característica dos filamentos intermediários. A expressão anormal de vimentina em células epiteliais foi associada com o crescimento independente de ancoragem em células de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço (TOMSON *et al.* 1996), com a diminuição de adesão célula-célula (LANE *et al.* 1983), com a morfologia fibroblastóide (STOLER *et al.*, 1993) e com rápida proliferação (DOMAGALA *et al.* 1990). A co-expressão de citoqueratinas (marcador epitelial) e vimentina (marcador mesotelial) está associada a fenótipos menos diferenciados, já que foi encontrada em embriões de camundongos (LANE *et al.* 1983). Apesar de não ter sido comprovada a identidade dos feixes fibrosos, o clone LISP-E11, de morfologia fibroblastóide, cresce independentemente de ancoragem em gel de agarose (figura 9), apesar de não formar esferóides, e também apresenta fenótipo menos

diferenciado. Estes argumentos apenas sugerem que os feixes fibrosos encontrados em maior quantidade em LISP-E11 do que em LISP-A10 possam ser filamentos intermediários, sendo necessária a confirmação deste dado.

Com relação ao crescimento independente de ancoragem, é interessante salientar que ambas as sublinhagens celulares sobrevivem e proliferam em gel de agarose. Este procedimento experimental correlaciona-se com a verificação da tumorigenicidade *in vivo* (RUOSLAHTI 1999). A sublinhagem LISP-A10 deve conseguí-lo por meio da forte adesão intercelular por ela apresentada, que propiciaria que possíveis fatores de crescimento liberados agissem de forma parácrina. O crescimento em agarose de LISP-E11 pode representar a síntese de fatores de crescimento autócrinos, uma vez que não são observados agregados celulares. As alterações que levam as células ao fenótipo transformado incluem a perda da necessidade dos sinais mediados por integrinas (contatos célula-matriz) para a sobrevivência, possibilitando-as de se esquivarem da anoiquia.

In vivo, ambos os clones celulares são tumorigênicos em camundongos BALB/c depletados de medula óssea, por irradiação, o que corrobora os ensaios *in vitro*, pela observação da proliferação independente de ancoragem em meio semi-sólido (tabela II). Entretanto, a morte de camundongos após 3 dias do transplante do tumor (em média) de causa desconhecida não permitiu que os dados fossem analisados estatisticamente.

Uma vez que as células tumorais tenham vencido as fases iniciais do processo metastático, as mesmas devem vencer os desafios representados pelo rápido fluxo da circulação para completá-lo. O mecanismo mais simples pelo qual células tumorais circulantes aderem ao endotélio é o de ficar fisicamente presas em vasos sangüíneos menores do que o diâmetro do agregado celular. Entretanto, somente este mecanismo não explica todas as metástases sítio-específicas (RUOSLAHTI 1999). PAGET, em 1889, propôs uma hipótese amplamente conhecida por *Seed and Soil*, pela qual células tumorais de determinada origem (as "sementes") apresentariam preferência por determinado órgão (o "solo") na sua colonização metastática. Vários trabalhos são compatíveis com esta hipótese, pois tem-se sugerido as

existência de proteínas específicas da superfície de células tumorais que interagem com proteínas órgano-específicas das células endoteliais de diferentes órgãos (HART 1990).

O fígado é o principal sítio de colonização metastática de tumores colo-retais, sugerindo que possui um microambiente propício ao aparecimento de metástases (YOONG *et al.* 1999). A unidade estrutural clássica do parênquima do fígado é o lóbulo hepático, composta de várias séries de hepatócitos arranjados em fileiras simples ou duplas de células que se anastomosam e que são separadas por sinusóides. Os espaços de Disse estão entre a superfície dos hepatócitos e do endotélio das paredes dos sinusóides e contêm uma matriz extracelular descontínua, formada por colágenos tipo I e IV e fibronectina, mas não laminina (JESSUP e THOMAS 1989; BERGMAN *et al.* 1996b).

O sucesso de colonização do fígado por células tumorais deve envolver, portanto, a capacidade de interagir com fibronectina e também, de digerí-la. Por não ter laminina como constituinte da matriz dos sinusóides, o fígado se apresenta como um órgão que possibilita a colonização metastática por células que não expressem proteases cujos substratos são laminina. Tal fato torna o fígado um facilitador de colonização por estas supostas células, já que os requisitos para sua colonização seriam mais brandos. Desta forma, células com este fenótipo poderiam ser seletivamente bem sucedidas ao colonizá-lo. Pode-se esperar também que mesmo células que não apresentem a capacidade de aderir e digerir laminina possam invadir e colonizar o fígado se possuírem enzimas que digiram fibronectina e outras proteínas de matriz extracelular.

Interessantemente, YOONG e colaboradores (1999) sugeriram um mecanismo de destruição de hepatócitos por células tumorais pelo desencadeamento do processo apoptótico via sistema Fas para a facilitação do crescimento de células tumorais colônicas no fígado. Neste modelo, o tumor subverteria a resposta inflamatória desencadeada pela ativação de células imunocompetentes no fígado, como as células de Küpffer, para promover invasão local. A adesão e a migração de clones de LISP-I à

fibronectina podem indicar que estes mecanismos possam ter sido utilizados na formação de metástase(s) hepática(s) no paciente do qual a linhagem foi isolada.

Infelizmente, apesar dos esforços empregados, não foi possível identificar atividade enzimática dirigida à laminina e à fibronectina neste trabalho (dados não mostrados). Várias tentativas de verificar a atividade colagenolítica por zimogramas contendo gelatina também foram feitas, não se obtendo qualquer sucesso.

A colonização preferencial do fígado por células colônicas tumorais parece envolver também o importante marcador tumoral CEA. Alguns estudos demonstram uma relação direta entre CEA sérico e o potencial metastático de linhagens celulares de tumores colo-retais em animais atímicos (HOSTETTER *et al.*, 1990; WAGNER *et al.*, 1992) por mecanismos ainda obscuros. Na tentativa de elucidá-los, GANGOPADHYAY e colaboradores (1996) demonstraram experimentalmente que a ligação de CEA sérico a um receptor de 80 kDa na superfície das células de Küpffer, no fígado, induz a produção de várias citocinas. De acordo com o modelo proposto naquele trabalho, as citocinas ativariam o endotélio dos sinusóides, o que resultaria no aumento da expressão de moléculas de adesão para as células tumorais circulantes. Além disto, CEA favorece a retenção de células tumorais no fígado, uma vez que CEA sérico se liga às células de Küpffer e aos hepatócitos, permanecendo na superficie destas células. As porções livres da molécula se ligam, então, às células tumorais que estiverem no órgão (JESSUP e THOMAS 1989). A participação de CEA no fenômeno metastático ainda possui muitas lacunas, sendo uma delas a regulação da transcrição do gene de CEA. Neste vasto campo de investigação, a linhagem LISP-I e seus subclones celulares constituem modelos de estudos bem atraentes.

Concluindo, o isolamento de sublinhagens celulares de LISP-I contribuiu para o aumento do número de opções de modelos de estudo de biologia tumoral e do fenômeno metastático.

FUNDAÇÃO ANTONIO
AUDENTE

CONCLUSÕES

1. Foram isoladas duas sublinhagens celulares da linhagem de adenocarcinoma colo-retal humano LISP-I.

2. A sublinhagem LISP-10 apresenta morfotipo epitelial e expressa as moléculas de adesão intercelular CEA e desmogleína.

3. A sublinhagem LISP-E11 apresenta morfotipo fibroblastóide e atividade migratória em direção aos dois componentes de matriz extracelular estudados, laminina e fibronectina.

4. Ambas as sublinhagens são tumorigênicas em animais irradiados.

5. Aparentemente, o sucesso da metastatização das células do tumor primário do paciente do qual LISP-I foi isolada deve ter se dado graças à heterogeneidade morfológica e funcional de pelo menos duas subpopulações celulares:

   a) o morfotipo epitelial LISP-A10 teria contribuído para a manutenção de agregados celulares na corrente sangüínea e

   b) o morfotipo fibroblastóide LISP-E11 teria contribuído para os processos de invasão, inclusive do sítio de colonização secundário.

REFERÊNCIAS

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. **Cellular and Molecular Immunology.** 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1997. p. 249-77.

2. Akiyama SK; Yamada KM. The interaction of plasma fibronectin with fibroblastic cells in suspension. **J Biol Chem** 1985; 260: 4492-500.

3. Augustin HG. Antiangiogenic tumor therapy: will it work? **Trends Pharmacol Sci** 1998;19: 216-22.

4. Aumailley M, Smyth N. The role of laminins in basement membrane function. **J Anat** 1998; 193: 1-21.

5. Benchimol S, Fucks A, Jothy S, Beauchemin N, Shirota K, Stanners CP. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. **Cell** 1989; 57: 327-34.

6. Ben-Ze'ev A. Cytoskeletal and adhesion proteins as tumor suppressors. **Curr Opin Cell Biol** 1997; 9: 99-108.

7. Bergman RA, Afifi AK, Heidger Jr PM. **Histology** Philadelphia: W.B. Saunders; 1996a. Conective tissue; p.41-58.

8. Bergman RA, Afifi AK, Heidger Jr PM. **Histology** Philadelphia: W.B. Saunders; 1996b. The digestive system; p.177-212.

9. Boyer B, Tucker GC, Valles AM, Franke WW, Thiery JP. Rearrangements of desmosomal and cytoskeletal proteins during the transition from epithelial to fibroblastoid organization in cultured rat bladder carcinoma cells. **J Cell Biol** 1989;109:1495-509.

10. Breivik J, Gaudernack G. Carcinogenesis and natural selection: a new perspective to the genetics and epigenetics of colorectal cancer. **Adv Cancer Res** 1999; 76:187-211.

11. Brentani R. The molecular basis of the metastatic phenotype. **Crit Rev Oncogenesis** 1989; 1: 247-60.

12. Brown DT, Anderton BH, Wylie CC. The organization of intermediate filaments in normal human colonic epithelium and colonic carcinoma cells. **Int J Cancer** 1983; 32: 163-9.

13. Brown PD. Matrix metalloproteinases inhibitors. **Breast Cancer Res Treat** 1998; 52: 125-36.

14. Caballero OL, Dani SU, Simpson AJG. Oncogenes e genes supressores de tumor. In: Brentani MM et al., editores. **Bases da oncologia**. São Paulo: LEMAR; 1998. p. 53-70.

15. Cairns J. The origin of human cancers. **Nature** 1981; 289: 353-7.

16. Carbone PP. Progress in the systemic treatment of cancer. concepts, trials, drugs and biologics. **Cancer** 1990; 65: 625-33.

17. Carneiro CRW, Lopes JD, Brentani MM. Carcinoembryonic antigen (CEA): production of immunoprecipitating monoclonal antibodies and development of an enzyme immunoassay. **Hybridoma** 1987; 6: 689-92.

18. Chakrabarty S, Chen JWJ, Chen XY, Trujillo JM, Lin P-F. Modulation of differentiation-related responses in human colon carcinoma cells by protein kinase inhibitor H-7. **Anticancer Res** 1992; 12: 97-104.

19. Chakrabarty S, Rajagopal S, Moskal TL. Protein kinase Cα controls the adhesion but not the antiproliferative response of human colon carcinoma cells to transforming growth factor β1: identification of two distinct branches of post-protein kinase Cα adhesion signal pathway. **Lab Invest** 1998; 78: 413-21.

20. Church JM, Williams BRG, Casey G. **Molecular genetics and colorectal neoplasia: a primer for the clinician**. New York: Igaku-Shoin Medical; 1996. colorectal neoplasia: pathology; p. 38-42.

21. Clarke MR, Landreneau RJ, Finkelstein SD, Wu TT, Ohori P, Yousem SA. Extracellular matrix expression in metastasizing and nonmetastasizing adenocarcinomas of the lung. **Hum Pathol** 1997; 28: 54-9.

22. Coelho FRG. Controle do câncer. In: Brentani MM et al., editores. **Bases da oncologia**. São Paulo: LEMAR; 1998. p. 1-22.

23. Coopman PJ, Bracke ME, Lissitzky JC, de Bruyne GK, Van Roy FM, Foidart JM et al. Influence of basement membrane molecules on directional migration of human breast cell lines *in vitro*. **J Cell Sci** 1991; 98: 395-401.

24. Daneker Jr GW, Piazza AJ, Steele Jr GD, Mercurio AM. Relationship between extracellular matrix interactions and degree of differentiation in human colon carcinoma cell lines. **Cancer Res** 1989; 49: 681-6.

25. Darnell J, Lodish H, Baltimore D. **Molecular cell biology** 2nd. ed. New York: Scientific American Books; 1990a. Multicellularity: cell-cell and cell-matrix interactions; p. 924-8.

26. Darnell J, Lodish H, Baltimore D. **Molecular cell biology** 2nd. ed. New York: Scientific American Books; 1990b. Cancer; p. 984-90.

27. Domagala W, Lasota J, Dukowicz A, Markiewski M, Striker G, Weber K et al. Vimentin expression appears to be associated with poor prognosis in node-negative NOS breast carcinomas. **Am J Pathol** 1990; 137: 1299-304.

FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE
BIBLIOTECA

28. Dos Reis M. **Relação entre a expressão de receptores de ácido retinóico e proliferação em linhagens celulares de carcinomas de cólon em cultura**. São Paulo; 1993. [Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Biologia Molecular da Escola Paulista de Medicina - UNIFESP].

29. Duff EK, Clarke AR. Smad4 (DPC4)—a potent tumour suppressor? **Br J Cancer** 1998; 78: 1615-9.

30. Ekblom M, Falk M, Salmivirta K, Durbeej M, Ekblom P. Laminin isoforms and epithelial development. **Ann N Y Acad Sci** 1998; 857: 194-211.

31. Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pirone R, Hoodless P, Kim H et al. MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. **Cell** 1996; 86: 543-52.

32. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Rupert JM et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. **Science** 1990; 247: 49-56.

33. Fearon ER, Dang CV. Tumor suppressor meets oncogene. **Curr Biol** 1999; 9: R62-R5.

34. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell** 1990; 61: 759-76.

35. Franks, L. M. **Introdução à Biologia Celular e Molecular do Câncer**. Trad., revisão e organização de MM Brentani e R Chammas. São Paulo: Livraria Roca; 1990. O quê é câncer?; p. 1-22.

36. Fujimori T, Ono Y, Sakuma K, Ueda Y, Terano A. Genetic changes in colorectal adenoma and cancer in relation to various morphologic aspects. **J Gastroenterol** 1998; 33: 804-10.

37. Gangopadhyay A, Bajenova O, Kelly TM, Thomas P. Carcinoembryonic antigen induces cytokine expression in Küpffer cells: implications for hepatic metastasis from colorectal cancer. **Cancer Res** 1996; 56: 4805-810.

38. Garrod DR. Desmosomes and hemidesmosomes. **Curr Opin Cell Biol** 1993; 5: 30-40.

39. Geng L, Ali SA, Marshall JF, Mackay CL, Hart IR, Delcommence M et al. Fibronectin is chemotactic for CT 26 colon carcinoma cells: sub-lines selected for increased chemotaxis to fibronectin display decreased tumorigenicity and lung colonization. **Clin Exp Metastasis** 1998; 16: 683-91.

40. Goustin AS, Leof EB, Shipley GD, Moses HL. Growth factors and cancer. **Cancer Res** 1986; 46: 1015-29.

41. Grimstad IA. Direct evidence that cancer cell locomotion contributes importantly to invasion. **Exp Cell Res** 1987; 173: 515-23.

42. Gryfe R, Di Nicola N, Gallinger S, Redston M. Somatic instability of the APC I 1307K allele in colorectal neoplasia. **Cancer Res** 1998; 58: 4040-3.

43. Guilford P. E-cadherin downregulation in cancer: fuel on the fire? **Mol Med Today** 1999; 5: 172-7.

44. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell** 1996; 84: 345-57.

45. Haier J, Nasralla M, Nicolson GL. Different adhesion properties of high and poorly metastatic HT-29 colon carcinoma cells with extracellular matrix components: role of integrin expression and cytoskeletal components. **Br J Cancer** 1999; 80: 1867-74.

46. Hart IR. In: A propagação dos tumores. **Introdução à biologia celular e molecular do câncer**. Trad., revisão e organização de MM Brentani e R Chammas. São Paulo: Livraria Roca; 1990. p. 25-36.

47. Heino J. Integrin-type extracellular matrix receptors in cancer and inflamation. **Ann Med** 1993; 25: 335-42.

48. Holt SE, Shay JW. Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. **J Cell Physiol** 1999; 180: 10-8.

49. Hostetter RB, Augustus LB, Mankarious R, Chi K, Fan D, Toth CA et al. Carcinoembryonic antigen as a selective enhancer of colorectal cancer metastases. **J Natl Cancer Inst** 1990; 82: 380-5.

50. Huang S, Chakrabarty S. Expression of antisense fibronectin RNA in human colon carcinoma cells disrupts the regulation of carcinoembryonic antigen by transforming growth factor β1. **J Biol Chem** 1994; 269: 28764-8.

51. Hugh TJ, Dillon SA, O'Dowd G, Getty B, Pignatelli M, Poston GJ, Kinsella AR. beta-catenin expression in primary and metastatic colorectal carcinoma. **Int J Cancer** 1999; 82: 504-11.

52. Humphries MJ, Yasuda Y, Olden K, Yamada KM. The cell interaction sites of fibronectin in tumour metastasis. **Ciba Found Symp** 1988; 141: 75-93.

53. Jasiulionis MG, Chammas R, Ventura AM, Travassos LR, Brentani RR. alpha6beta1-Integrin, a major cell surface carrier of beta1-6-branched oligosaccharides, mediates migration of EJ-ras-transformed fibroblasts on laminin-1 independently of its glycosylation state. **Cancer Res** 1996; 56: 1682-9.

54. Jawhari AU, Noda M, Farthing MJ, Pignatelli M. Abnormal expression and function of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma cell lines. **Br J Cancer** 1999; 80: 322-30.

55. Jessup JM, Thomas P. Carcinoembryonic antigen: function in metastasis by human colorectal carcinoma. **Cancer Metast Rev** 1989; 8: 263-80.

56. Junqueira, L.C.; Carneiro, J. **Biologia celular e molecular.** 6ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997a. Bases moleculares do citoesqueleto e dos movimentos celulares; p. 117-140.

57. Junqueira, L.C.; Carneiro, J. **Biologia celular e molecular.** 6ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997b. Biologia da interação célula-matriz extracelular; p. 227-37.

58. Kammerer R, Ehret R, Von Kleist S. Isolated extracellular matrix-based three-dimensional in vitro models to study orthotopically cancer cell infiltration and invasion. **Eur J Cancer** 1998; 34: 1950-7.

59. Keely P, Parise L, Juliano R. Integrins and GTPases in tumour cell growth, motility and invasion. **Trends Cell Biol** 1998; 8: 101-6.

60. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. **Cell** 1996; 87: 159-70.

61. Koch PJ, Franke WW. Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules. **Curr Opin Cell Biol** 1994; 6: 682-7.

62. Kopper L, Petak I, Sebestyen A. Molecular genetic basis of cancer development. **Ann N Y Acad Sci** 1997; 824: 1-7.

63. Kyzer S, Gordon PH. Determination of proliferative activity in colorectal carcinoma using monoclonal antibody Ki 67. **Dis Colon Rectum** 1997; 40: 322-5.

64. Lahm H, Petral-Malec P, Yilmaz-Ceyhan A, Fischer JR, Lorenzoni M, Givel J.-C et al. Growth stimulation of a human colorectal carcinoma cell line by interleukin-1 and -6 and antagonistic effects of transforming growth factor β_1. **Eur J Cancer** 1992a; 28A: 1894-9.

65. Lahm H, Suardet L, Laurent PL, Fischer JR, Ceyhan A, Givel J.-C et al. Growth regulation and co-stimulation of human colorectal cancer cell lines by insuline-like growth-factor I, II and transforming growth factor α. **Brit J Cancer** 1992b; 65: 341-6.

66. Lahm H, Amstad P, Wyniger J, Yilmaz A, Fischer JR, Schreyer M. Blockade of the insuline-like growth-factor-I receptor inhibits growth of human colorectal cancer cells, evidence of a functional IGF-II-mediated autocrine loop. **Int J Cancer** 1994; 58: 452-9.

67. Lane EB, Hogan BLM, Kurkinen M, Garrels JI. Co-expression of vimentin and cytokeratins in parietal endoderm cells of early mouse embryo. **Nature** 1983; 303: 701-4.

68. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. **Cell** 1996; 84: 359-69.

69. Levin DL, Devesa SS, Godwin II JD, Silverman DT. **Cancer Rates and Risks**. 2nd ed. US Department of Health, Education and Welfare; 1974. International distribution of various forms of cancer; p. 25-46.

70. Lewin B. **Genes VI**. New York: Oxford University Press; 1997. Oncogenes and cancer; p.1131-72.

71. Liotta LA, Kohn E. Cancer invasion and metastasis. **JAMA** 1990; 263: 1123-6.

72. Liotta LA. Cancer cell invasion and metastasis. **Sci Am** 1992; 266: 34-41.

73. Mayer U, Kohfeldt E, Timpl R. Structural and genetic analysis of laminin-nidogen. **Ann N Y Acad Sci** 1998; 857: 130-42.

74. McCarty JB, Furcht LT. Laminin and fibronectin promote haptotactic migration of B16 mouse melanoma cells in vitro. **J Cell Biol** 1984; 98: 1474-80.

75. Mercurio AM. Laminin receptors, achieving specificity through cooperation. **Trends Cell Biol** 1995; 5: 419-23.

76. Meropol NJ. Oral flouropyrimidines in the treatment of colorectal cancer. **Eur J Cancer** 1998; 34: 1509-13.

77. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 1999**. Rio de Janeiro; 1999.

78. Morikawa K, Walker SM, Nakajima M, Pathak S, Jessup JM, Fidler IJ. Influence of organ environment on the growth, selection, and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice. **Cancer Res** 1988; 48: 6863-71.

79. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. **Lancet** 1889; 1: 571-3.

80. Paraskeva C, Finerty S, Mountford RA, Powell SC. Specific Cytogenetic abnormalities in two new numan colorectal adenoma-derived epithelial cell lines. **Cancer Res** 1989; 49: 1282-6.

81. Paulsson M, Aumailley M, Deutzmann R, Timpl R, Beck K, Engel J. Laminin-nidogen complex: extraction with chelating agents and structural characterization. **Eur J Biochem** 1987; 166: 11-9.

82. Prado IB, Laudanna AA, Carneiro CRW. Susceptibility of colorectal-carcinoma cells to natural killer-mediated lysis: relationship to CEA expression and degree of differentiation. **Int J Cancer** 1995; 61: 854-60.

83. Raitano AB, Korc M Growth inhibition of a human colorectal carcinoma cell line by interleukin 1 is associated with enhanced expression of gamma-interferon receptors. **Cancer Res** 1993; 53:636-40.

84. Roela RA. **Variação da expressão de receptores de adesão tipo integrina da família β1 e da adesão à laminina-1 em adenocarcinoma de cólon após exposição a dimetil-sulfóxido**. São Paulo; 1998. [Dissertação de Mestrado apresentada à Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo/Instituto Butantan/Instituto de Pesquisas Tecnológicas].

85. Ruoslahti E. Fibronectin and its integrin receptors in cancer. **Adv Cancer Res** 1999; 76: 1-20.

86. Sacks PG, Parnes SM, Gallick GE, Mansouri Z, Lichtner R, Satya-Prakash KL et al. Establishment and characterization of two new squamous cell carcinoma cell lines derived from tumors of the head and neck. **Cancer Res** 1988; 48: 2858-66.

87. Schreiner C, Bauer J, Margolis M, Juliano RJ. Expression and role of integrins in adhesion of human colonic carcinoma cells to extracellular matrix components. **Clin Exp Metastasis** 1991; 9: 163-78.

88. Schwartzbauer J. Basement membrane: putting up the barriers. **Curr Biol** 1999; 9: R242-R4.

89. Sherman Jr, C.D. Câncer do trato gastrointestinal. In: Zacharias DPM et al., editores. **Manual de oncologia clínica.** Trad. de ESP Bélaváry e MR Torloni. 2ª. ed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo; 1993. p. 233-58.

90. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R et al. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96: 5522-7.

91. Singh RK, Tsan R, Radinsky R. Influence of the host microenvironment on the clonal selection of human colon carcinoma cells during primary tumor growth and metastasis. **Clin Exp Metastasis** 1997; 15: 140-50.

92. Smith EA, Fuchs E. Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. **J Cell Biol** 1998; 141: 1229-41.

93. Solimene ACEC, Boscardin SB, Ferraz MGMC, Chammas R. Angiogênese em tumores sólidos. **Rev Soc Bras Oncol Clín** 1999; 1: 9-20.

106. Wadler S, Schwartz EL, Goldman M, Lyver A, Rader M, Zimmerman M et al. Fluorouracil and recombinant alpha-2a-interferon: an active regimen against advanced colorectal carcinoma. **J Clin Oncol** 1989; 7: 1769-75.

107. Wadler S, Wiernik PH. Clinical update on the role of fluorouracil and recombinant interferon alpha-2a in the treatment of colorectal carcinoma. **Semin Oncol** 1990; 17: 16-20.

108. Wagner HE, Toth CA, Steele GD, Thomas P. Invasive and metastatic potential of human colorectal cancer cell lines: relationship to cellular differentiation and carcinoembryonic antigen production. **Clin Exp Metastasis** 1992; 10: 25-31.

109. Willson JKV, Bittner GN, Oberley TD, Meisner LF, Weese JL. Cell culture of human colon adenomas and carcinomas. **Cancer Res** 1987; 47: 2704-13.

110. Winawer SJ. Natural history of colorectal cancer. **Am J Med** 1999; 106: (Suppl 1A) 3S-6S.

111. Yamada KM, Miyamoto S. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. **Curr Opin Cell Biol** 1995; 7: 681-9.

112. Yoong KF, Afford SC, Randhawa S, Hubscher SG, Adams DH. Fas/Fas ligand interaction in human colorectal hepatic metastases: a mechanism of hepatocyte destruction to facilitate local tumor invasion. **Am J Pathol** 1999; 154: 693-703.

113. Zbar AP, Lemoine NR, Wadhwa M, Thomas H, Snary D, Kmiot WA. Biologic therapy: approaches in colorectal cancer: strategies to enhance carcinoembryonic antigen (CEA) as an immunogenic target. **Br J Cancer** 1998; 77: 683-93.