

ESTUDO DE PROTEÍNAS DA FAMÍLIA DAS RHO GTPASES E SEU VALOR PROGNÓSTICO EM CARCINOMAS COLORRETAIS

JULIO CIRULLO NETO

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de mestre em
ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Rafael Malagoli Rocha

São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Cirullo Neto, Julio

Estudo de proteínas da família das Rho GTPases e seu valor prognóstico em carcinomas colorretais / Julio Cirullo Neto – São Paulo, 2013.

63p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Rafael Malagoli Rocha

Descritores: 1. PROTEÍNAS. 2. PROTEÍNAS RHO DE LIGAÇÃO AO GTP. 3. NEOPLASIAS COLORRETAIS. 4. PROGNÓSTICO.

“Daqui a alguns anos você estará mais arrependido pelas coisas que não fez do que pelas que fez. Então solte suas amarras. Afaste-se do porto seguro.

Agarre o vento em suas velas. Explore. Sonhe. Descubra.”

(Mark Twain)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Julio Cirullo Junior
e Márcia De Cia Cirullo

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Rafael Malagoli Rocha, que foi mais que um simples orientador, foi um amigo, pelo seu incentivo, paciência e confiança.

À minha família, especialmente minha mãe Márcia De Cia Cirullo e meu pai Julio Cirullo Junior pelo apoio, incentivo e a tranquilidade para que pudesse continuar a estudar sem grandes preocupações.

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

Ao Departamento de Anatomia Patológica em nome do Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, pelo suporte e infraestrutura que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Cirurgia Pélvica em nome do Dr. Samuel Aguiar Junior, pela colaboração do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Departamento de Cirurgia Abdominal em nome do Dr. Felipe José Fernández Coimbra, pela colaboração do desenvolvimento deste trabalho.

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

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

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

RESUMO

Cirullo Neto J. **Estudo de proteínas da família das Rho GTPases e seu valor prognóstico em carcinomas colorretais.** São Paulo; 2013. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O câncer colorretal (CCR) é uma neoplasia de origem epitelial e abrange tumores de cólon e reto em homens e mulheres. É uma doença tratável e frequentemente curável quando na ausência de extensão para outros órgãos. No entanto, aproximadamente 50% a 60% dos pacientes diagnosticados com CCR irão desenvolver metástases que são mais comumente encontradas em fígado e pulmão. As Rho GTPases são proteínas com a capacidade de regular uma grande variedade de processos celulares, e juntamente com suas proteínas efetoras possuem um papel crucial para os rearranjos do citoesqueleto necessários para motilidade e migração celular. **Objetivo:** Identificar proteínas diferencialmente expressas da família das Rho GTPases em tumores colorretais primários com e sem metástases e validar sua expressão e localização em culturas celulares com potencial metastático ou não. **Materiais e Métodos:** 40 casos de CCR que desenvolveram metástases e 40 casos que não desenvolveram metástases foram selecionados e seu material parafinado foi resgatado para realização da técnica de imunoistoquímica (IIQ), com os seguintes marcadores: Rho, Rac1, Tiam1, Pak1 e Mrck- β . Todas as reações foram analisadas de forma automatizada no equipamento Pannoramic (3DHistech). A técnica de imunofluorescência (IFL) foi realizada em cultura de células para mostrar a especificidade de cada marcador. O western-blot foi elaborado para confirmação e quantificação de Mrck- β em culturas celulares, a análise estatística foi realizada no programa Prism 5.2.1 e a significância foi considerada quando $p < 0.05$. **Conclusão:** Entre as proteínas estudadas, Rac1, Rho e Pak1 não se mostraram diferencialmente expressas entre os tumores primários metastáticos e não metastáticos, Tiam1 estava mais

expressa nos tumores primários não metastáticos e Mrck- β está mais expressa nos tumores primários metastáticos. Mrck- β também mostrou estar mais expressa na linhagem com perfil metastático em culturas celulares, validando a expressão encontrada na imunoistoquímica.

SUMMARY

Cirullo Neto J. **[Study of proteins of Rho family GTPases and their prognostic value in colorectal carcinomas]**. São Paulo; 2013. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

Introduction: Colorectal cancer (CRC) is a neoplasia of epithelial origin and covers tumors of the colon and rectum in men and women. It is treatable and often curable when there is not extension to other organs. However, approximately 50% to 60% of patients diagnosed with CRC will develop metastases, which are most commonly found in liver and lung. The Rho GTPases are proteins with the ability to regulate a variety of cellular processes and together with its effector proteins have a critical role in cytoskeletal rearrangements required for cell motility and migration. **Aim:** To identify differentially expressed proteins of the Rho family GTPases in primary colorectal tumors with and without metastases and validate their expression and the location in cell cultures with metastatic potential or not. **Materials and Methods:** 40 cases of CRC in which patients developed metastases and 40 cases that did not develop metastases were selected and their paraffin material was recovered to perform immunohistochemistry, with the following markers: Rho, Rac1, Tiam1, Pak1 and Mrck- β . All the reactions were analyzed in automated equipment Panoramic (3DHistech). The immunofluorescence technique (IF) was performed in cell culture to show the specificity of each marker. The Western blot was elaborated for confirmation and quantification of Mrck- β in cell cultures. The statistical analysis was performed using the Prism 5.2.1 and significance was considered $p < 0,05$. **Conclusions:** Among the proteins evaluated, Rac1, Pak1 and Rho were not differentially expressed between metastatic primary tumors and non-metastatic, Tiam1 was more expressed in primary non-metastatic tumors and Mrck- β was more expressed in primary tumors metastatic. Mrck- β has also shown to be more expressed in cell line with metastatic profile, validating the immunohistochemistry expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diferentes estágios de acometimento de tumores colorretais primários.....	3
Figura 2	As diferentes subfamílias das Rho GTPases separados pela sua similaridade e a porcentagem de semelhança com a principal proteína de cada grupo.....	9
Figura 3	Ação de GDI, GEF e GAP na regulação das Rho GTPases.....	10
Figura 4	As principais Rho GTPases e suas funções mais bem descritas na literatura.....	15
Figura 5	Análise de sobrevida entre tumores primários metastáticos e não metastáticos.....	30
Figura 6	Marcação atípica de tiam1 no núcleo avaliada pela imunoistoquímica (20x).....	31
Figura 7	Marcação imunoistoquímica de Mrck- β nos diferentes grupos avaliados (10x).....	32
Figura 8	Marcação imunoistoquímica de Rac1 nos diferentes grupos avaliados (10x).....	33
Figura 9	Marcação imunoistoquímica de Rho nos diferentes grupos avaliados (10x).....	34
Figura 10	Marcação imunoistoquímica de Pak1 nos diferentes grupos avaliados (10x).....	35

Figura 11	Marcação imunoistoquímica de Tiam1 nos diferentes grupos avaliados (10x).....	36
Figura 12	Os cinco marcadores avaliados pela imunofluorescência.....	40
Figura 13	Especificidade do anticorpo contra Mrck- β , avaliado por Western-Blot com 40 μ g e 20 μ g de proteínas.....	41
Figura 14	Diferença da expressão de Mrck- β nas linhagens avaliadas.....	42

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1	Anticorpos, clones, clonalidades, fabricantes e diluições usados na imunoistoquímica	25
Tabela 1	Marcação nuclear de Tiam1 nos diferentes grupos avaliados.....	31
Tabela 2	Expressão dos marcadores entre os tumores primários metastáticos e não metastáticos.....	37
Tabela 3	Expressão dos marcadores entre os tumores primários metastáticos e metástases.....	38
Tabela 4	Correlação entre os marcadores nos diferentes grupos avaliados.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-fluorouracil
5-FU/LV	5-fluorouracil/Leucovorin
Arp2/3	<i>Actin-Related Protein 2/3</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
CCR	Câncer Colorretal
CDC42	<i>Cell Cycle Division 42</i>
CHP	<i>Calcium Binding Protein p22</i>
CRC	<i>Colorectal Cancer</i>
DAB	3,3' – diaminobenzidina tetrahydrocloroeto
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindole
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMPK	<i>Myotonic Dystrophy Protein Kinase</i>
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
FAK	Quinase de Adesão Focal
FAP	Polipose Adenomatosa Familiar
FOLFOX	Ácido folínico (Leucovorin)/ 5-fluorouracil/ Oxaliplatin (Eloxatin)
GDI	<i>GDP Dissociation Inhibitor</i>
GDP	Guanosina Difosfato
GEFs	<i>Guanine Nucleotide Exchange Factor</i>
GPA	<i>GTPase-Activating Proteins</i>
GRAF1	GTPase Reguladora Associada a FAK
GTP	Guanosina Trifosfato
Her2	Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico
HNPCC	Câncer Colorretal Hereditário Não Polipoide
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IF	<i>Immunofluorescence</i>
IFL	Imunofluorescência
IIQ	Imunoistoquímica

KRAS	<i>v-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
LGC	<i>Soro Fetal Bovino</i>
LIMK1	<i>LIM Domain Kinase 1</i>
LIMK2	<i>LIM Domain Kinase 2</i>
miR-7	<i>Micro RNA 7</i>
Mrck-α	<i>Myotonic Dystrophy Kinase-Related Cdc42-Binding Kinases Alpha</i>
Mrck-β	<i>Myotonic Dystrophy Kinase-Related Cdc42-Binding Kinases Beta</i>
N-WASP	<i>Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein</i>
Pak1	<i>p21 Protein (Cdc42/Rac)-Activated Kinase 1</i>
Pak2	<i>p21 Protein (Cdc42/Rac)-Activated Kinase 2</i>
Pak3	<i>p21 Protein (Cdc42/Rac)-Activated Kinase 3</i>
Pak4	<i>p21 Protein (Cdc42/Rac)-Activated Kinase 4</i>
Pak5	<i>p21 Protein (Cdc42/Rac)-Activated Kinase 5</i>
Pak6	<i>p21 Protein (Cdc42/Rac)-Activated Kinase 6</i>
PAR	<i>Protease-Activated Receptor</i>
PAR3	<i>Protease-Activated Receptor 3</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-4-Phosphate 3-Kinase</i>
PVDF	<i>Poli Fluoreto de Vinilideno</i>
Rac1	<i>Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1</i>
Rac2	<i>Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 2</i>
Rac3	<i>Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 3</i>
Rho	<i>Ras Homolog Family Member</i>
RhoA	<i>Ras Homolog Family Member A</i>
RhoB	<i>Ras Homolog Family Member B</i>
RhoBTB1	<i>Rho-related BTB Domain Containing 1</i>
RhoBTB2	<i>Rho-related BTB Domain Containing 2</i>
RhoC	<i>Ras Homolog Family Member C</i>
RhoD	<i>Ras Homolog Family Member D</i>
RhoG	<i>Ras Homolog Family Member G</i>

RhoH	<i>Ras Homolog Family Member H</i>
RhoJ	<i>Ras Homolog Family Member J</i>
RhoQ	<i>Ras Homolog Family Member Q</i>
RhoU	<i>Ras Homolog Family Member U</i>
Rif	<i>Ras Homolog Family Member F (in filopódia)</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RND1	<i>Rho family GTPase 1</i>
RND2	<i>Rho family GTPase 2</i>
RND3	<i>Rho family GTPase 3</i>
Rock1	<i>Rho-associated coiled Coil-Containing Protein Kinase 1</i>
Rock2	<i>Rho-Associated Coiled Coil-Containing Protein Kinase 2</i>
ROCKs	<i>Rho-Associated Coiled Coil-Containing Protein Kinases</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Tiam1	<i>T-cell Lymphoma Invasion and Metastasis 1</i>
Toca1	<i>Formin Binding Protein 1-like</i>
VEGF	Factor de Crescimento Endotelial Vascular
ZO-1	Zônula de Oclusão 1

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O câncer colorretal	1
1.2	O câncer colorretal e a doença metastática	6
1.3	Rho GTPases e o câncer	8
1.3.1	Rac1	13
1.4	Pak1	16
1.5	Mrck- β	17
1.6	Tiam1	19
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo Geral.....	22
2.2	Objetivos específicos.....	22
3	METODOLOGIA	23
3.1	Casuística	23
3.2	Imunoistoquímica	23
3.3	Linhagens e Cultura Celular	25
3.4	Imunofluorescência	25
3.5	Western-Blot.....	26
3.6	Análise Estatística	27
4	RESULTADOS.....	29
4.1	Caracterização dos Pacientes.....	29
4.2	Imunoistoquímica	30
4.3	Imunofluorescência	39
4.4	Western-Blot e culturas celulares	41
5	DISCUSSÃO	43

6	CONCLUSÃO	51
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER COLORRETAL

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

O câncer colorretal (CCR) é uma neoplasia de origem epitelial e abrange tumores de cólon [o apêndice (vermiforme), ceco, cólon ascendente, ângulo hepático do cólon, cólon transversal, ângulo esplênico do cólon, cólon descendente e cólon sigmoide], junção retossigmoide e reto em homens e mulheres (EDGE et al. 2010). É uma doença tratável e frequentemente curável quando há ausência de extensão para outros órgãos (EDGE et al. 2010). Os principais fatores de risco são: idade acima de 50 anos; história familiar de câncer de cólon e reto; história pessoal de câncer de ovário, endométrio ou mama; dieta com alto conteúdo de gordura, carne e baixo teor de cálcio; obesidade e sedentarismo. Também são fatores de risco, doenças inflamatórias do cólon como retocolite ulcerativa crônica e doença de Crohn e algumas condições hereditárias como Polipose

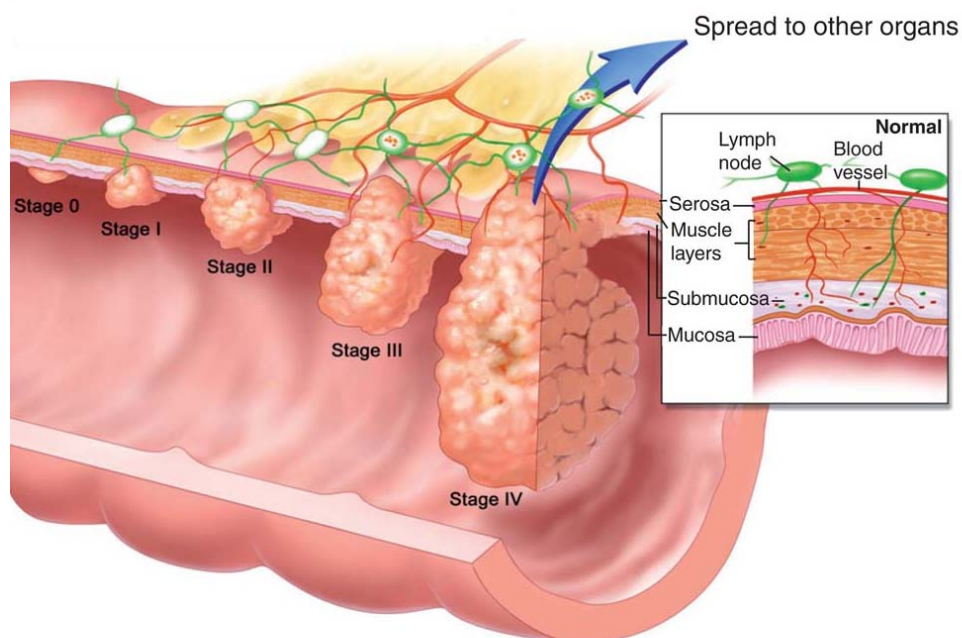
Adenomatosa Familiar (FAP) e Câncer Colorretal Hereditário Não Polipoide (HNPCC) (Ministério da Saúde 2013).

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

Aproximadamente 5% da população do mundo ocidental irá desenvolver CCR (BELOV et al. 2010). As estimativas no Brasil por ano são de 15 mil novos casos a cada 100 mil habitantes, sendo o terceiro tipo de câncer mais frequente para homens e mulheres (Ministério da Saúde 2011). Os fatores convencionais para prognóstico de sobrevida do paciente são: grau histológico (diferenciação) (ZINKIN 1983; BELOV et al. 2010; PUPPA et al. 2010) e o estágio do tumor, que é baseado no nível de invasão do tumor, acometimento de linfonodos regionais e metástase para outros órgãos (COMPTON 2003). Com a ocorrência de metástase a sobrevida dos pacientes nos próximos cinco anos, após a cirurgia, cai drasticamente de 90% a menos de 10% (O'CONNELL et al. 2004; BELOV et al. 2010).

A classificação TNM define o nível de agressividade dos tumores colorretais e é usada para uma melhor abordagem terapêutica. Sua classificação é definida em: T é referente ao tumor primário e seu nível de acometimento (T0-sem evidencia de tumor T1-submucosa, T2-muscular própria, T3-subserosa, T4-peritônio víscera/ outros órgãos) (Figura 1), N é referente ao acometimento linfonodal (N1- $\leq$ 3 linfonodos regionais, N2- $>$ 3

linfonodos regionais) e M a presença de metástase a distância (M0-ausência de metástase M1-presença de metástase (SOBIN e WITTEKIND 2010).



Fonte: NIBBE e CHANCE (2009).

Figura 1 - Diferentes estágios de acometimento de tumores colorretais primários

Exames de sangue oculto nas fezes, sigmoidoscopia e colonoscopia são recomendados em vários países em pessoas com mais de 50 anos, pólipos adenomatosos são considerados precursores do câncer colorretal e a retirada desses pólipos reduz consideravelmente a chance de desenvolver a doença (SABBAGH et al. 2011). A colonoscopia pode frequentemente não identificar pólipos (VAN RIJN et al. 2006; SABBAGH et al. 2011), mas os sistemas de detecção mais modernos não mostram diferenças relevantes em relação à colonoscopia (O'CONNELL et al. 2004).

O tratamento quimioterápico era inicialmente constituído apenas por um pelo 5-fluorouracil (5-FU) e, ao longo do tempo, foi modificado e outros agentes foram incluídos, promovendo uma resposta clínica mais eficiente para os pacientes (TONON et al. 2007).

Outros quimioterápicos adicionados a terapia do 5-FU foram o leucovorin (**5-FU/LV**), irotecano (FOLFIRI) e oxaliplatina (FOLFOX), essas terapias mostrou uma melhora na taxa de sobrevida em relação à terapia padrão (SALTZ et al. 2000; DE GRAMONT et al. 2000). Outra forma de tratamento desenvolvida foi a terapia com anticorpos monoclonais, que se ligam a antígenos tumorais específicos e desencadeiam respostas imunológicas devido à sua especificidade, evitando que células normais sejam afetadas e mostrando ainda uma toxicidade menor que a quimioterapia tradicional.

Três anticorpos monoclonais (Cetuximabe, Bevacizumabe e Panitumumabe) são usados no tratamento de câncer colorretal nos Estados Unidos e muitos outros estão sendo validados em testes clínicos. O potencial da terapia com anticorpos é associado a vários mecanismos, incluindo interferência em vias de sinalização vital através da imunocitotoxicidade seletiva, a porção Fc do anticorpo que está especificamente ligado ao tumor é reconhecida levando a resposta imune e morte celular (NOGUCHI et al. 2013).

O Cetuximabe (Erbix®), por exemplo, é um anticorpo quimérico, que atua no domínio extracelular do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), como antagonista competitivo, impedindo o crescimento e

proliferação celular. Esse tratamento é usado como segunda linha do câncer colorretal metastático em pacientes refratários ao esquema antineoplásico composto (ALEKSHUN e GARRETT 2005).

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

Panitumumabe é um anticorpo humanizado que atua de forma semelhante ao cetuximabe, inibindo EGFR, porém nos tumores colorretais que possuem alteração em KRAS (*v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) a eficiência de panitumumabe é afetada (AMADO et al. 2008). O mesmo ocorre com o Cetuximabe (KARAPETIS et al. 2008). As mutações em KRAS, as quais tipicamente ocorrem em lesões precursoras e no último estágio do adenoma, são encontradas em 40% de todos os tumores colorretais, com predominância de alterações nos códons 12 (82%) e 13 (17%) da sequência gênica.

Nenhuma característica histopatológica referente ao câncer colorretal, quando isolada, é confiável para prever metástases linfáticas e, portanto, a avaliação de vários fatores de risco que se correlacionam altamente com a doença não são utilizados como rotina padrão (GLASGOW et al. 2012). Enquanto características moleculares estabelecidas, como a expressão de HER2 e EGFR, já foram bem associadas à doença linfonodal (LU et al.

2012), mostrando a importância da busca de fatores moleculares para identificar a causa das metástases, tanto linfonodais como a distância.

1.2 O CÂNCER COLORRETAL E A DOENÇA METASTÁTICA

A metástase é uma cascata de eventos moleculares e celulares que envolvem a invasão celular, transporte e evasão da resposta imune no sistema circulatório, estabelecimento em um local secundário, extravasamento e, finalmente, colonização e crescimento (CHAMBERS et al. 2002; KAPLAN et al. 2006), tornando-se a principal causa de morte de pacientes com câncer. Melhorar os meios de prever o seu desenvolvimento é o principal objetivo da pesquisa clínica. Trabalhos recentes sugerem que é possível refinar os testes para que a recorrência a distância possa ser prevista (D'AMICO et al. 2001; RING e ROSS 2005; MINN et al. 2005a e b).

Menos de 1% destas células cancerosas que entram na circulação sanguínea, conseguem gerar focos de metástase (KAPLAN et al. 2006). O estabelecimento de metástases em locais distantes da origem do tumor não é aleatório e, portanto, potencialmente previsível. As células dos tumores de mama, por exemplo, seguem principalmente para o pulmão, medula óssea e cérebro. Estes locais são tropismos claramente anatômicos, relativos à distribuição e dimensões do sistema vascular ou linfático, que difundem as células tumorais (PAGET 1989; RING e ROSS 2005).

Quase 50% dos pacientes com CCR irão desenvolver metástases no fígado, enquanto que apenas cerca de 10-15% dos pacientes desenvolverão

metástases pulmonares. Geralmente, as metástases de CCR ocorrem inicialmente no fígado e, posteriormente, aparecem de forma sistêmica devido à drenagem venosa. Diferente do que ocorre no fígado, as metástases pulmonares são mais propensas à disseminação bilateral, tornando a taxa de ressecção menor que a de metástases hepáticas (FOSTER 1984; PIHL et al. 1987; LI et al. 2010).

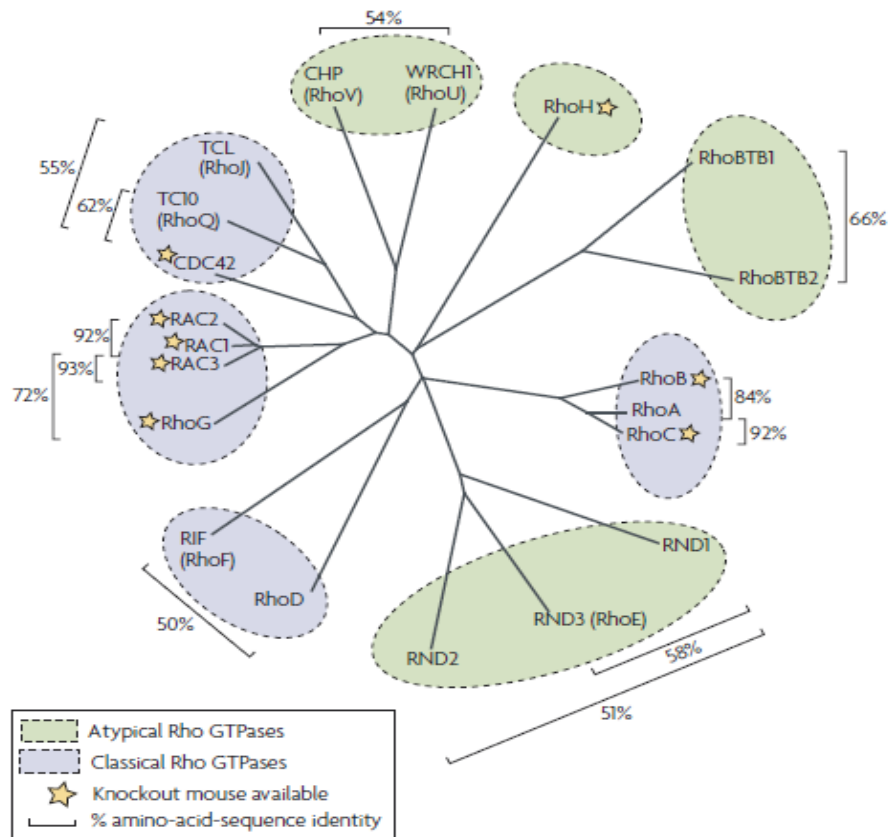
Em todo o mundo, 19% dos tumores colorretais apresentam doença em estágio IV, e a sobrevida global dos pacientes não tratados nesse estágio é de 11,3% em 5 anos, embora em uma população de pacientes selecionados, a ressecção de metástases pulmonares isoladas pode aumentar as taxas de sobrevivência superiores a 40% em 5 anos (VILLENEUVE e SUNDARESAN 2009).

A quimioterapia raramente produz um efeito que possibilite a sobrevivência em longo prazo nos pacientes com metástase de CCR o que leva à aceitação geral do tratamento cirúrgico de pacientes com doença metastática. Atualmente, a ressecção de metástases hepáticas tornou-se um tratamento eficaz com uma sobrevida relatada em 5 anos de 39% (SCHEELE e ALTENDORF-HOFMANN 1999; LIMMER et al. 2010). Da mesma forma, a ressecção de metástases do pulmão tem uma probabilidade de cinco anos de sobrevida variando de 21% para 43% (MCAFEE et al. 1992; GIRARD et al. 1996; LIMMER et al. 2010).

1.3 RHO GTPASES E O CÂNCER

Algumas características aberrantes dos tumores como migração, proliferação, invasão e interações célula a célula, que podem levar ao perfil metastático, podem estar relacionados à subfamília de proteínas Rho GTPases. Entre elas, são melhor caracterizadas: RhoA (*Ras homolog family member A*), Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) e Cdc42 (*Cell cycle division 42*). Estas proteínas têm a capacidade de regular uma grande variedade de processos celulares e possuem um papel crucial para os rearranjos do citoesqueleto necessários para motilidade celular. Estão envolvidas na progressão do ciclo celular e regulam a transcrição de genes. É cada vez mais claro que eles desempenham um papel importante na tumorigênese (SAHAI e MARSHALL 2002; MERTENS et al. 2003).

Essas proteínas são de baixo peso molecular (21-25kDa) e existem mais de 20 dentro da família das Rho GTPases, que são classificadas de acordo com sua similaridade em subfamílias: Rac (Rac1, Rac2, Rac3 e RhoG); Cdc42 (Cdc42, RhoQ e RhoJ); CHP e RhoU; RhoH; Rho BTB (RhoBTB1, RhoBTB2); Rho (RhoA, RhoB e RhoC); RND (RND1, RND2 e RND3); e Rif (RhoF e RhoD) (CHI et al. 2013), como mostrado na Figura 2.



Fonte: HEASMAN e RIDLEY (2008)

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

As Rho GTPases são mediadas através de uma grande quantidade de proteínas estão divididas em: fatores de troca GDP/GTP (GEFs), proteínas ativadoras de GTPases (GAPs) e inibidores de dissociação da guanina (GDIs). As GEFs se ligam as GTPases no estado GDP e aceleram a troca por GTP, o que faz com que as GTPases fiquem na sua forma ativa, enquanto as GAPs fazem o papel inverso, levando do estado ativo GTP para o inativo GDP. As GDIs permitem a translocação entre membrana e citosol,

e mantém as proteínas na forma inativa no citoplasma (Figura 3) (BOS et al. 2007; DAVID et al. 2012; XU et al. 2010; CHI et al. 2013).



Figura 3 - Ação de GDI, GEF e GAP na regulação das Rho GTPases.

O gene Rho foi identificado em 1985, mas foram observações relatadas em 1992, que forneceram a inspiração inicial para identificar a função celular de Rho GTPases. Foi observado que Rho, juntamente com Rac1, induz a contração da actina e dos filamentos de miosina (lamellipodia), e posteriormente foi demonstrado que o Cdc42 também promove alterações na contração interagindo com actina (filopódia) (ETIENNE-MANNEVILLE e HALL 2002). Durante a formação do epitélio, o contato célula-célula controlado por caderinas, leva ao desenvolvimento de junções aderentes, mas não se sabe ao certo como isso ocorre. No primeiro momento Cdc42 e Rac1 são ativados e recrutados, devido ao contato das caderinas entre células vizinhas, levando a formação de lamellipodia e/ou

filopódia que penetra nessas células vizinhas, isso parece gerar uma força motriz propiciando contato próximo entre as células. A inibição da Rho também impede aderência das células, sua contribuição aparentemente contribui para estabilizar as junções através do conjunto de filamentos de actina, (NOBES e HALL 1995; KOZMA et al. 1995; ETIENNE-MANNEVILLE e HALL 2002).

As Rho-GTPases têm a capacidade de estabilizar microtúbulos, através de seus efetores, levando a um rearranjo dos microtúbulos polarizados, e consequentemente estabelecendo e mantendo a polaridade celular (BARCELLOS et al. 2013). A polaridade celular é uma organização assimétrica que está envolvida na diferenciação, proliferação e morfogênese celular em uma grande variedade de processos celulares elementares. Muitos componentes da célula, como proteínas da membrana plasmática, organelas e componentes do citoesqueleto são organizados assimetricamente no interior da célula. Este padrão assimétrico da organização é reforçado por processos de diferenciação celular, resultando na dinâmica dos compartimentos celulares. Entre outras funções a polaridade é essencial para a divisão celular, a polarização do citoesqueleto e a adesão celular (ASSÉMAT et al. 2008).

Outro fator importante na estabilização e manutenção da polaridade celular é o transporte de vesículas, para manter a polaridade de alguns receptores expressos na membrana apical ou basolateral que precisam ser transportados, e as Rho GTPases têm um papel importante no transporte de vesículas. O Cdc42 regula endocitose dependente de clatrin, ajudando a

ancoragem lipídica. Durante o processo de endocitose Cdc42 interage com N-WASP levando a polimerização da actina e a endocitose dependente de clatrina envolve outro efector de Cdc42, chamado Toca1, formando um complexo trimérico que induz a formação dos tubos membranares e vesículas (CHI et al. 2013).

Rac1 regula as vias de endocitose e exocitose, mas diferente de Cdc42 não tem sido caracterizada em estágios iniciais da via de secreção e nem no transporte do complexo de Golgi. Rac1 atua na endocitose bloqueando o receptor de transferrina. PI3K regula GEFs específicas de Rac1 atuando na regulação do citoesqueleto e transporte vesicular em diversos tipos celulares. RhoA também atua inibindo o receptor de transferrina. Algumas proteínas reguladoras de RhoA como PI3K, quinase de adesão focal (FAK), e GTPase reguladora associada a FAK (GRAF1) quando inibidas, suprimem a endocitose pela inibição de RhoA. Esta redução da endocitose pode ser devida a diminuição do recrutamento das ROCKs (*Rho-associated coiled coil-containing protein kinases*), que são os principais efetores de RhoA. ROCK está envolvida em vias de sinalização que organizam o citoesqueleto de actina, inibindo a atividade da miosina de cadeia leve e aumentando a atividade da miosina 2, o que compõe e promove a contração celular (CHI et al. 2013).

A capacidade das Rho-GTPases em controlar a polaridade celular também reflete na migração celular. Em cultura de tecidos, muitas células podem adotar uma morfologia polarizada com uma parte dianteira e traseira, e são capazes de migrar, mas isto é apenas transitoriamente sustentado,

levando essencialmente a um passeio aleatório (quimiocinese). A estabilização do movimento direcional (quimiotaxia) exige a entrada de estímulos externos, o melhor estudo desta medida está relacionado a macrófagos movendo-se num gradiente de um fator quimiotático e quando Cdc42 é inibido, o macrófago é revertido para um passeio aleatório, enquanto a inibição de Rac1 bloqueia o movimento celular (ETIENNE-MANNEVILLE e HALL 2002). Cdc42 também foi observada como atuante na migração transendotelial mediando os níveis de beta integrina 1; uma vez que Cdc42 é inibido, a migração diminui e os níveis de beta integrina 1 também diminuem, mostrando que Cdc42 é necessário para que a célula possa atingir o vaso sanguíneo e possa desenvolver um tumor a distância (REYMOND et al. 2012).

1.3.1 Rac1

As diferentes isoformas de Rac, apesar da similaridade, não possuem funções redundantes e estão expressas em diferentes tecidos, Rac1 é a mais estudada entre as isoformas e está expressa em todas as células, enquanto Rac2 é expressa em células hematopoiéticas. Já o mRNA de Rac3 é mais abundante em tecido cerebral. RhoG é o que possui a menor sequência semelhante a Rac1, e é sabidamente expresso em uma grande variedade de tecidos humanos (HEASMAN e RIDLEY 2008).

Foi demonstrado que Rac1, quando silenciada, é letal na fase embrionária de camundongos enquanto Rac2, Rac3 e RhoG, não mostram defeitos de desenvolvimento tão claros, mas mostram específicas funções

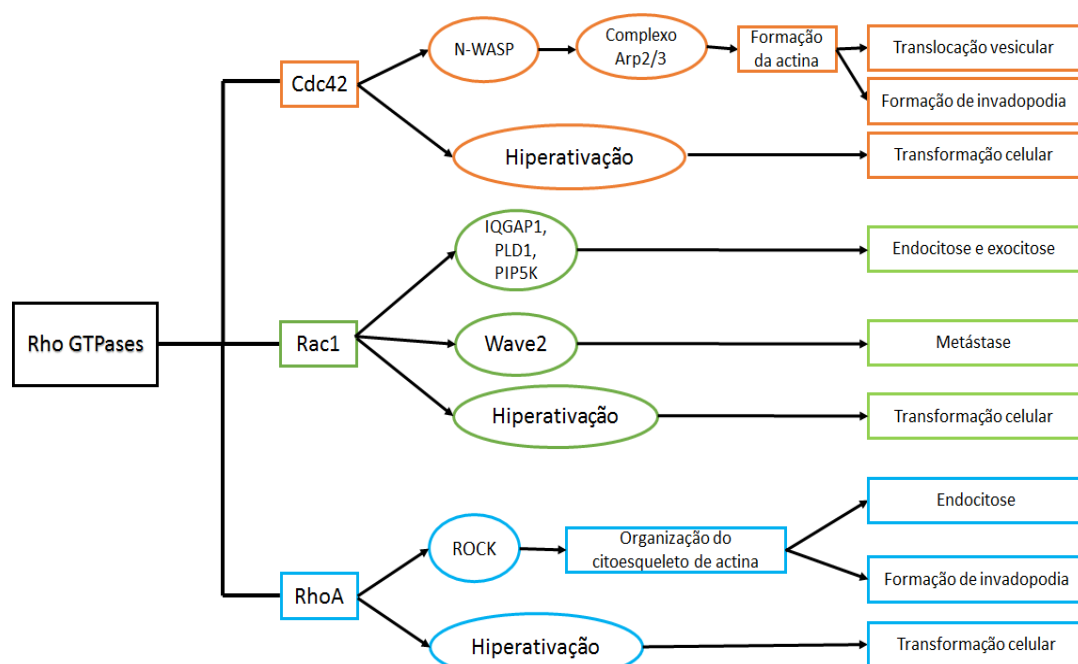
celulares. A ausência de Rac1 inibe extensão da lamellipodia e a migração em diferentes tipos celulares incluindo macrófagos, células T, células epiteliais e fibroblastos. Curiosamente a capacidade de migração de macrófagos com a depleção de Rac1 é igual ao macrófago em condições normais, entretanto eles possuem uma morfologia alongada e não têm a mesma capacidade de se espalhar (HEASMAN e RIDLEY 2008).

Rac1 induz a polimerização da actina e a montagem do complexo de adesão de integrinas na periferia das células, levando à protrusão da membrana, o que é essencial para a migração das células. Os mecanismos bioquímicos pelos quais Rac1 catalisa a polimerização de actina são de grande interesse. Um exemplo é o complexo Arp2/3, que catalisa a polimerização de actina e a formação de novos filamentos (CONDEELIS 2001). Além desse mecanismo com o complexo Arp2/3, Rac1 pode regular a formação de lamellipodia afetando a viabilidade da actina livre e bloqueando proteínas ou rompendo a actina através da confilina ou gelsolina¹, e de uma terceira forma, Rac1 pode aumentar a viabilidade dos monômeros de actina para incorporação dos filamentos através da regulação da confilina (HEASMAN e RIDLEY 2008). Além da função de formação de lamellipodia, Rac1 também foi identificado atuando na ativação de células fagocitárias, gerando superóxidos, o que coordena um mecanismo de defesa antibacteriano (MOREL et al. 1991).

Rac1 não é somente controlada por GEFs e GAPs. Sua expressão também pode ser mediada por RhoH, que é um membro da família da Rho, predominantemente em células hematopoiéticas, com função de inibir a

ação de algumas GTPases. Quando superexpressa, RhoH inibe a expressão de Rac1, e quando ausente, RhoH leva a hiperativação da expressão de Rac1 e não de Rac2, e ao aumento da migração e quimiotaxia (HEASMAN e RIDLEY 2008).

Com isso, conclui-se que RhoA, Rac1 e Cdc42 regulam três vias de transmissão de sinal de ligação de receptores de membrana plasmática para a montagem de diferentes estruturas de actina filamentosa, comprovado em diversos tipos de células, tanto em mamíferos quanto em fungos (ETIENNE-MANNEVILLE e HALL 2002) (Figura 4).



Fonte: Adaptada de CHI et al. (2013).

Figura 4 - As principais Rho GTPases e suas funções mais bem descritas na literatura.

1.4 PAK1

Pak1 (*p21 protein Cdc42/Rac-activated kinase 1*) pertence a uma família de serina/treonina quinases. Seis isoformas de Pak quinase foram descritas em mamíferos (Pak1-6) e são divididas em dois grupos. O grupo 1 consiste na Pak1 (α Pak), Pak2 (γ Pak) Pak3 (β Pak) e o grupo 2 em Pak4, Pak5 e Pak6. Pak1 desempenha um papel fundamental na sinalização e regulação celular, morfogênese, sobrevivência, proliferação e motilidade (DUMMLER et al. 2009). Quando ativada, Pak1 interrompe a dimerização, o que ocorre pela liberação de um bloqueio auto inibitório no domínio de ligação de GTPase permitindo a autofosforilação (GATTI et al. 1999). Essa ativação leva a fosforilação da miosina de cadeia leve de células de músculo liso e esquelético, induzindo as alterações do citoesqueleto celular junto com seus ativadores Rac1 e Cdc42, como a dissolução de fibras de estresse e complexos de adesão focal e a formação de lamellipodia e filopódia (KE et al. 2009). Devido à grande quantidade de processos celulares que Pak1 está associado, suas relações com um processo carcinogênico e com a metástase têm sido estudadas. A hiperativação de Pak1 no câncer colorretal ocorre frequentemente através de alterações em KRAS, e também foi observado que a superexpressão de Pak1 em células do câncer de mama leva a uma aneuploidia, o que pode facilitar a perda de genes supressores tumorais e acumulação de oncogenes (VADLAMUDI et al. 2000; DUMMLER et al. 2009). As alterações gênicas em Pak1 não são tão frequentes para serem o único mecanismo molecular que eleva a sua expressão no câncer.

A ação de micro RNAs, como o miR-7, também tem um importante papel na regulação dessa proteína (REDDY et al. 2008; YE e FIELD 2012).

1.5 MRCK-B

A importância do Cdc42 na migração e metástase tem sido muito discutida na literatura, e alguns autores têm demonstrado a interação de algumas proteínas com Cdc42, como por exemplo, Cdc42 induz o silenciamento de ID4 que é considerado um supressor tumoral (GÓMEZ DEL PULGAR et al. 2008), e que Cdc42 pode ser induzido por VEGF, atuando na formação de novos vasos (LAMALICE et al. 2004). Todos esses estímulos e funções se devem a diferentes moléculas que atuam nas Rho GTPases como as GEFs ou moléculas efetoras como a Mrck- β (WILKINSON et al. 2005).

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

para invasão das células com uma morfologia mesenquimal é dependente sinalização Cdc42-Mrck (WILKINSON et al. 2005).

Apenas a inibição de Mrck por RNA de interferência não tem efeito significativo na invasão celular. O mesmo acontece com o silenciamento de ROCK, mas quando silenciados ao mesmo tempo são muito mais efetivos na inibição da invasão. A morfologia da célula tende a ter um formato espiral e não alongada, mostrando que durante invasão mesenquimal, ROCK e Mrck regulam vias uma forma independente e cooperativa, não compensatória. Juntas as proteínas devem regular a capacidade da célula de mudar a morfologia, respondendo a diferentes estímulos causados na invasão celular (HEIKKILA et al. 2011). Uma importante contribuição da Mrck é aparentemente na invasão coletiva, promovendo a contração da actomiosina que ajuda na manutenção da co-adesão das células (HEIKKILA et al. 2011).

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

Mrck- β durante o processo de migração celular possui uma co-expressão com Zônula de oclusão 1 (ZO-1), que é um tipo de junção intercelular que estabelece a adesão célula-célula e mantém a estrutura ancorando e gerando grupos de moléculas transmembranais e proteínas do citoesqueleto. Esta interação requer que Cdc42 module Mrck- β na

membrana das células que estão no processo de migração. A interrupção do complexo ZO-1/Mrck- β inibe a migração celular, o que mostra a importância de Mrck- β durante esse processo (HUO et al. 2011).

1.6 TIAM1

As GEFs podem ser as principais responsáveis pelas diferentes funções e estímulos que controlam as Rho GTPases. Entre elas está Tiam1 (*T-lymphoma invasion and metastasis*) que é específica de Rac1, e originalmente foi identificada em uma tela de proteínas cuja superexpressão mostrou que pode causar um fenótipo invasivo em células de linfoma T (HABETS et al. 1994; ADAMS et al. 2010). Estudos posteriores identificaram papéis para Tiam1 na regulação da polaridade apical-basal em células epiteliais, crescimento e diferenciação de neurônios e motilidade celular (MINARD et al. 2004; MERTENS et al. 2006; ADAMS et al. 2010). Cada uma destas atividades envolve uma distinta interação entre Tiam1 e o complexo polaridade PAR, como por exemplo, na migração polarizada de queratinócitos, Tiam1 associa-se a PAR3 e proteína quinase C, e estabelece a polaridade da frente para trás, promovendo a estabilização da rede de microtúbulos (PEGTEL et al. 2007; ADAMS et al. 2010).

Embora esses resultados demonstrem estar em conflito com estudos anteriores indicando que Tiam1 promove a adesão da célula em contato com queratinócitos (MERTENS et al. 2005), tem sido proposto que, quando há contatos célula-célula, a função de Tiam1 é apoiar a polaridade apical-basal,

mas quando esses contatos estão ausentes, como na migração de queratinócitos, Tiam1 promove a motilidade celular, estabilizando a polaridade da célula e pode auxiliar a progressão do câncer. A superexpressão de Tiam1 contribui para o potencial metastático das células de câncer de cólon, (MINARD et al. 2005, 2006) e sua expressão proteica também se correlaciona com a capacidade de migração em linhas de células tumorais de mama (MERTENS et al. 2006). Uma estreita correlação foi observada entre a expressão aumentada Tiam1 e grau tumoral (ADAM et al. 2001). O aumento da expressão de Tiam1 está associado com a invasão e transição epitélio mesênquima em linhagens de cólon, mama e pâncreas (MINARD et al. 2004, 2005; CRUZ-MONSERRATE e O'CONNOR 2008), enquanto sua ausência retarda a formação de colônias de células pancreáticas e diminui o crescimento e invasão do câncer colorretal (BAINES et al. 2006; LIU et al. 2006).

A via da família Rho GTPases tem capacidade de regular diversos processos celulares, principalmente a motilidade e migração celular. Estas proteínas são cada vez mais relacionadas a tumorigênese e formação de metástases, porém apenas a avaliação das Rho GTPases separadamente não é o suficiente para entender todo o complexo tumoral, e tanto proteínas que regulam quanto as que são reguladas pelas Rho GTPases devem ser incluídas na avaliação. Estudos das Rho GTPases e suas proteínas relacionadas em câncer colorretal, não conseguem estabelecer com precisão padrões de expressão, que possam servir como fator preditivo ou prognóstico do câncer. Desta forma, a identificação e validação dessas

proteínas diferencialmente expressas em tumores com diferentes características e evoluções, pode ter um papel muito importante para o diagnóstico e prevenção do câncer colorretal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar proteínas diferencialmente expressas da família das Rho GTPases e proteínas diretamente relacionadas em tumores colorretais primários com e sem metástases e validar sua expressão e localização em culturas celulares com potencial metastático ou não.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a expressão proteica de Rac1, Rho, Tiam1, Pak1 e MRCK- β entre tumores primários metastáticos e não metastáticos;
- Comparar a expressão proteica de Rac1, Rho, Tiam1, Pak1 e MRCK- β entre tumores primários metastáticos e suas respectivas metástases;
- Validar os achados encontrados através de imunocitoquímica em linhagens celulares de câncer colorretal não metastáticas e metastáticas e através de western-blot.

3 METODOLOGIA

3.1 CASUÍSTICA

40 casos de CCR metastáticos, suas respectivas metástases (34 casos com metástase hepática, 3 casos com metástase pulmonar e 3 casos com metástase pulmonar e hepática) e também 40 casos de CCR que não desenvolveram metástases com seguimento de, no mínimo, cinco anos, foram selecionados retrospectivamente dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center do período de 1992 a 2011. Os blocos de parafina foram resgatados para a realização de imunoistoquímica. Os critérios de inclusão foram disponibilidade suficiente e qualidade do material arquivado. Critérios de exclusão foram ausência de material ou baixa qualidade da amostra.

3.2 IMUNOISTOQUÍMICA

Foram realizados cortes de quatro micrômetros de espessura colocados em lâminas com carga elétrica (StarFrost) e mantidas em estufa a 60°C *overnight*. As lâminas foram identificadas e desparafinizadas em xilol (2 trocas de 10 minutos cada); então, são passadas em álcool etílico em concentração decrescente (100%, 85% e 75%) e lavadas em água corrente por 5 minutos. Os procedimentos seguiram o protocolo Envision Flex/HRP, a

recuperação antigênica por calor foi realizada utilizando a panela de pressão usando a solução Flex pH alto, a peroxidase endógena foi bloqueada com reagente do mesmo fabricante por 5 minutos. Em seguida os cortes foram incubados com bloqueador de proteínas (DAKO®) por 5 minutos, à temperatura ambiente e em câmara úmida. Os cortes foram incubados com os seguintes anticorpos primários: anti-Rho, anti-Rac1, anti-Pak1, anti-Tiam1 e anti-Mrck- β (Quadro 1) por 90 minutos à temperatura ambiente e posteriormente incubados com o anticorpo secundário e com o polímero HRP (Flex Plus, DAKO®) durante 30 minutos cada também à temperatura ambiente. Após lavagem em PBS, os cortes foram incubados com o cromógeno Diaminobenzidina (DAB – DAKO®) por 5 minutos e então lavados em água corrente e contra corados com hematoxilina de Harris por 2 segundos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, xilol, e montadas em equipamento automatizado (Tissue-Tek film). Para a análise das lâminas de imunoistoquímica, estas foram digitalizadas em equipamento digitalizador de lâminas (3DHISTECH's®) e a intensidade de marcação imunoistoquímica, bem como a contagem de células marcadas e o escore de positividade de cada caso (dependendo do marcador) foram analisados de forma automatizada por programa analisador de imagens (Pannoramic viewer, 3DHISTECH's®). Os controles utilizados foram tecidos normais de colon.

Quadro 1 - Anticorpos, clones, clonalidades, fabricantes e diluições usados na imunistoquímica:

Anticorpos	Clone	Clonalidade	Fabricante	Diluição
Mrck-β	2F4	Monoclonal	Abfrontier®	1/200
Tiam1	Não informado	Policlonal	Abcam®	1/100
Rho	EP487Y	Monoclonal	Epitomics®	1/200
Rac1	Não informado	Monoclonal	Lifespan®	1/200
Pak1	EP656Y	Monoclonal	Epitomics®	1/1000

3.3 LINHAGENS E CULTURA CELULAR

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

3.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para observar a localização celular de todos os cinco marcadores escolhidos, foi feito um ensaio de imunofluorescência. A linhagem celular humana HCT116 foi fixada em solução recém preparada contendo 4% de paraformaldeído por 1 hora a 4°C em lâminas com carga elétrica (StarFrost). As lâminas foram permeabilizadas com uma solução 0,25% Triton X-100

(0,1% Tween-20 em PBS) por 30 minutos a bloqueadas em BSA 1% (Albumina Sérica Bovina) e PBS por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram incubadas nos respectivos anticorpos primários (os mesmos utilizados na imunoistoquímica) diluídos em solução PBS contendo BSA 1% (Mrck- β 1:200, Tiam1 1:100, Rho 1:200, Rac1 1:200 e Pak1 1:1000), por 12 horas a 4°C. Após lavar três vezes com PBS, as células foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (Invitrogen, Carisbad, CA, USA) contendo 10 μ g/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole) para corar o núcleo numa diluição de 1/200 em BSA 1% por 1 hora a temperatura ambiente. Por fim, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS e foram completamente digitalizadas em equipamento digitalizador de lâminas (confocal) e a marcação, bem como a contagem de células marcadas, foi analisada de forma automatizada por programa analisador de imagens (HistoQuant®). Para os controles negativos, todas as condições descritas acima foram mantidas, exceto a incubação com os anticorpos primários.

3.5 WESTERN-BLOT

O anticorpo contra Mrck- β foi quantificado e comparado entre as diferentes culturas através de western-blot. As células foram lisadas em tampão de lise contendo 10% SDS (*sodium dodecyl sulfate*) e uma mistura de inibidores de protease (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA). Após 10 minutos no gelo, as amostras foram centrifugadas a 12.000 RPM

por 10 minutos a fim de remover os restos celulares. Em seguida, os lisados celulares (20 e 40 µg) foram adicionados para corrida em um gel SDS-PAGE composto por 10% poliacrilamida. Após a eletroforese, as respectivas proteínas foram eletrotransferidas para membranas de PVDF (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), sendo que a eficiência da transferência foi monitorada por meio do corante de Ponceau (0,5%). Posteriormente, as membranas foram incubadas no tampão de bloqueio contendo 10% BSA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, e 0.1% Tween 20 por 2 horas à temperatura ambiente e, então, incubadas *overnight* à 4°C com o anticorpos primários anti-Mrck-β com a diluição de 1:200. Após incubação com os anticorpos conjugados com a peroxidase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), a detecção foi realizada por meio de reagentes quimioluminescentes de alta performance (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A expressão de cada marcador nos grupos primário metastático (PM) e primário não metastático (PNM) foi comparada por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para comparar a expressão das amostras primárias metastáticas com suas respectivas amostras metastáticas foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon. A correlação entre os marcadores foi verificada por meio do coeficiente de correlação de Spearman. Para comparar os tempos de sobrevida dos grupos PM e PNM

foi utilizado o teste de log-rank. O gráfico do estimador Kaplan-Meier também foi construído. Uma análise de sobrevida mais aprofundada não foi realizada devido ao número reduzido de amostras.

O nível de significância adotado foi o de 5% e o software livre R versão 2.15.1 foi utilizado nas análises

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES

A média de idade entre os pacientes foi de 57 anos, sendo 58 anos entre os casos não metastáticos e 56 anos entre os casos metastáticos, variando de 29 a 79 anos.

Entre os casos não metastáticos, 75% são do sexo feminino, 17,5% apresentaram recidiva do tumor primário. 47,5% apresentaram invasão da camada subserosa ou tecidos peri-cólicos ou peri-retais não peritonizados e 57,5% não apresentaram acometimento linfonodal. Todos os casos com ausência de metástase não foram tratados previamente com quimioterapia.

Entre os casos metastáticos, 57,5% são do sexo masculino, 33,3% apresentaram recidiva da metástase, 69,2% dos pacientes apresentaram invasão da camada subserosa ou tecidos peri-cólicos ou peri-retais não peritonizados e 46% pela ausência de linfonodos acometidos. Em 69% dos casos apresentaram a doença de forma sincrônica, 38% dos tumores primários foram tratados com quimioterapia e radioterapia, e 74% das metástases foram tratadas com quimioterapia.

Os pacientes do grupo metastático apresentaram pior sobrevida (Figura 5), porém a avaliação da sobrevida para cada marcador não foi realizada devido ao número de amostras.

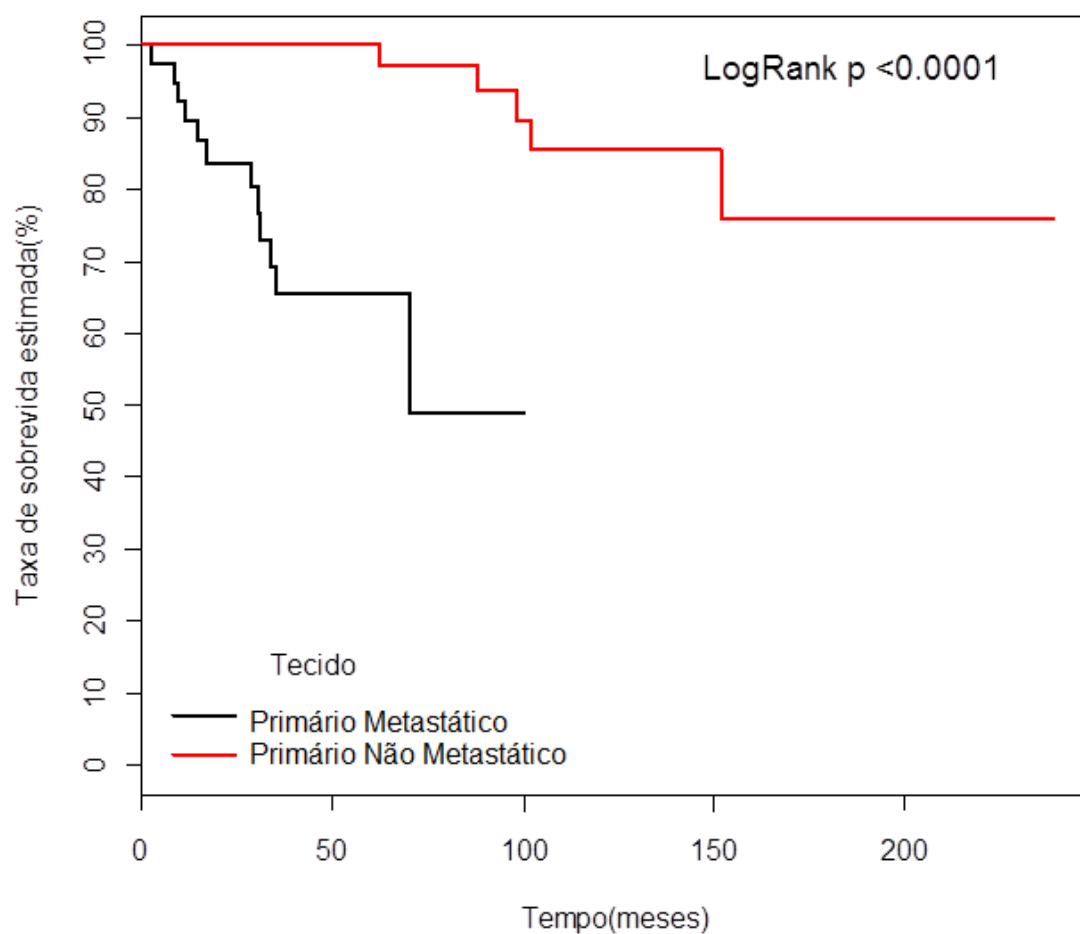


Figura 5 - Análise de sobrevida entre primários metastáticos e não metastáticos.

4.2 IMUNOISTOQUÍMICA

Foram avaliados 40 casos de câncer colorretal não metastático e 39 casos metastáticos; 1 caso foi excluído devido a ausência de material tumoral no bloco de parafina.

Marcações citoplasmáticas foram observadas em todos os marcadores. (Figuras 7-11) Além disso, marcação nuclear em Tiam1 foi observada em

alguns casos analisados (Figura 6). dentre eles, 7 casos apresentaram marcação nuclear no tumores primários e suas respectivas metástases, quando comparados os tumores primários metastáticos e primários não metastáticos a marcação de Tiam1 no núcleo mostrou estar mais presente nos tumores metastáticos ($p=0,001$)(Tabela 1). Como panorama geral, os marcadores apresentaram homogeneidade de marcação.

Tabela 1 - Marcação nuclear de Tiam1 nos diferentes grupos avaliados.

Marcação nuclear de Tiam1	Casos marcados/Total de casos (%)
Primário metastático	13/39 (33,3%)
Metástase hepática	9/37 (24,3%)
Metástase pulmonar	0/6 (0%)
Primário não metastático	2/40 (5%)

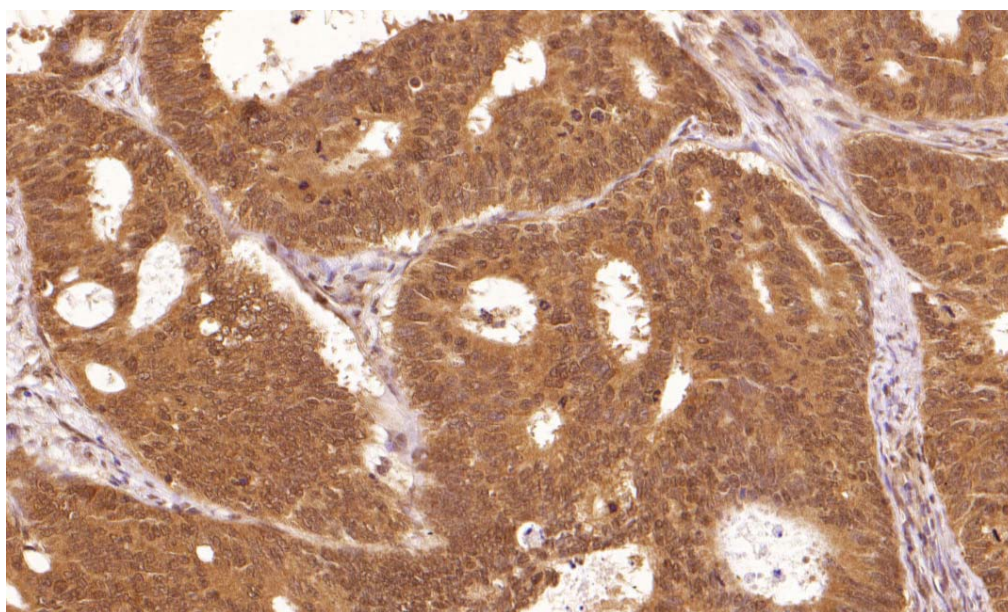


Figura 6 - Marcação atípica de Tiam1 no núcleo avaliada pela imunoistoquímica (20x).

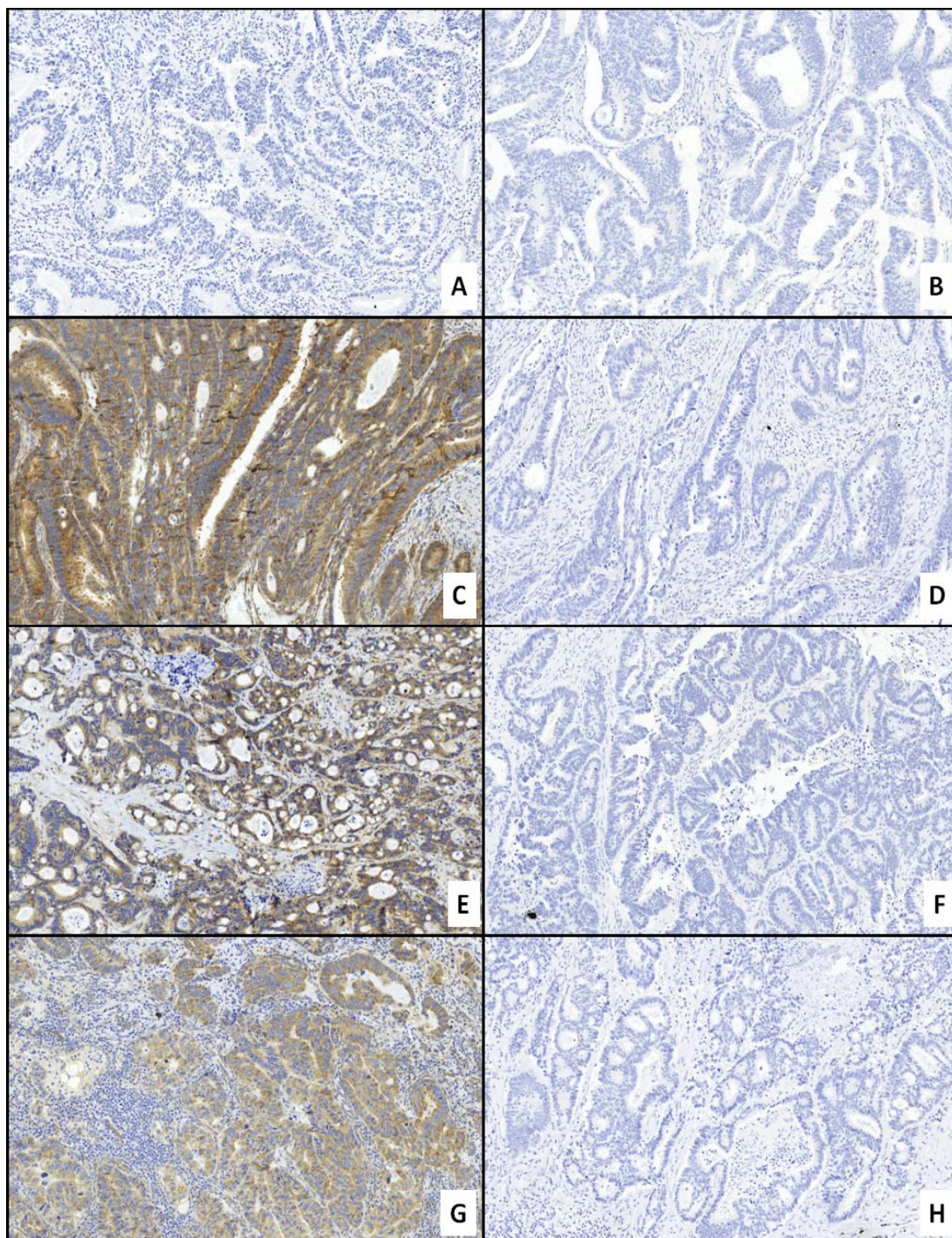


Figura 7 - Marcação imunoistoquímica de Mrck- β nos diferentes grupos avaliados (10x). Imunoistoquímica negativa (A e B) nos tumores não metastáticos, positiva (C) e negativa (D) nos tumores primários metastáticos, positiva (E) e negativa (F) nas metástases hepáticas e positiva (G) e negativa (H) nas metástases pulmonares.

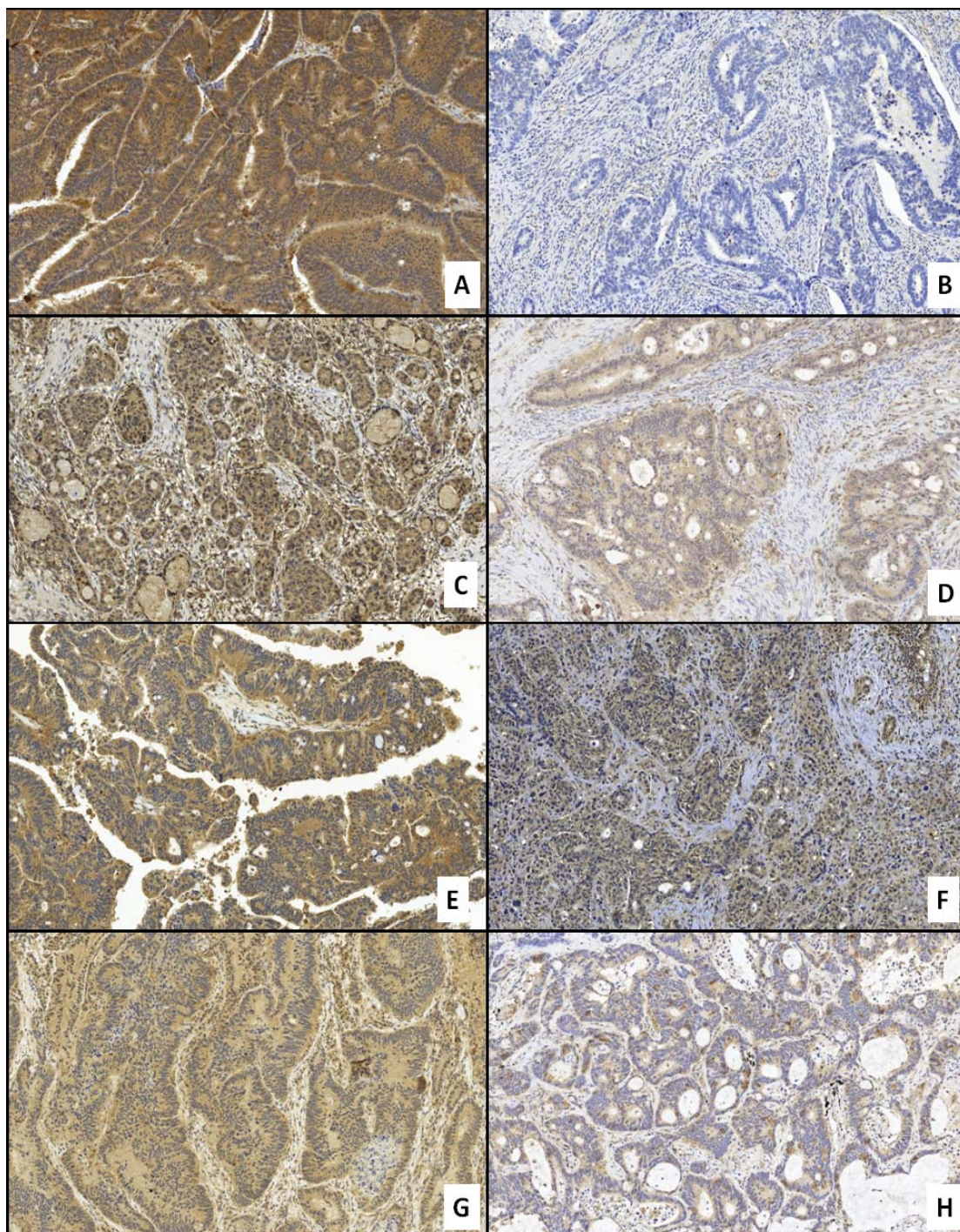


Figura 8 - Marcação imunoistoquímica de Rac1 nos diferentes grupos avaliados (10x). Imunoistoquímica positiva (A) e negativa (B) nos tumores não metastáticos, positiva (C e D) nos tumores primários metastáticos, positiva (E e F) nas metástases hepáticas e positiva (G e H) nas metástases pulmonares.

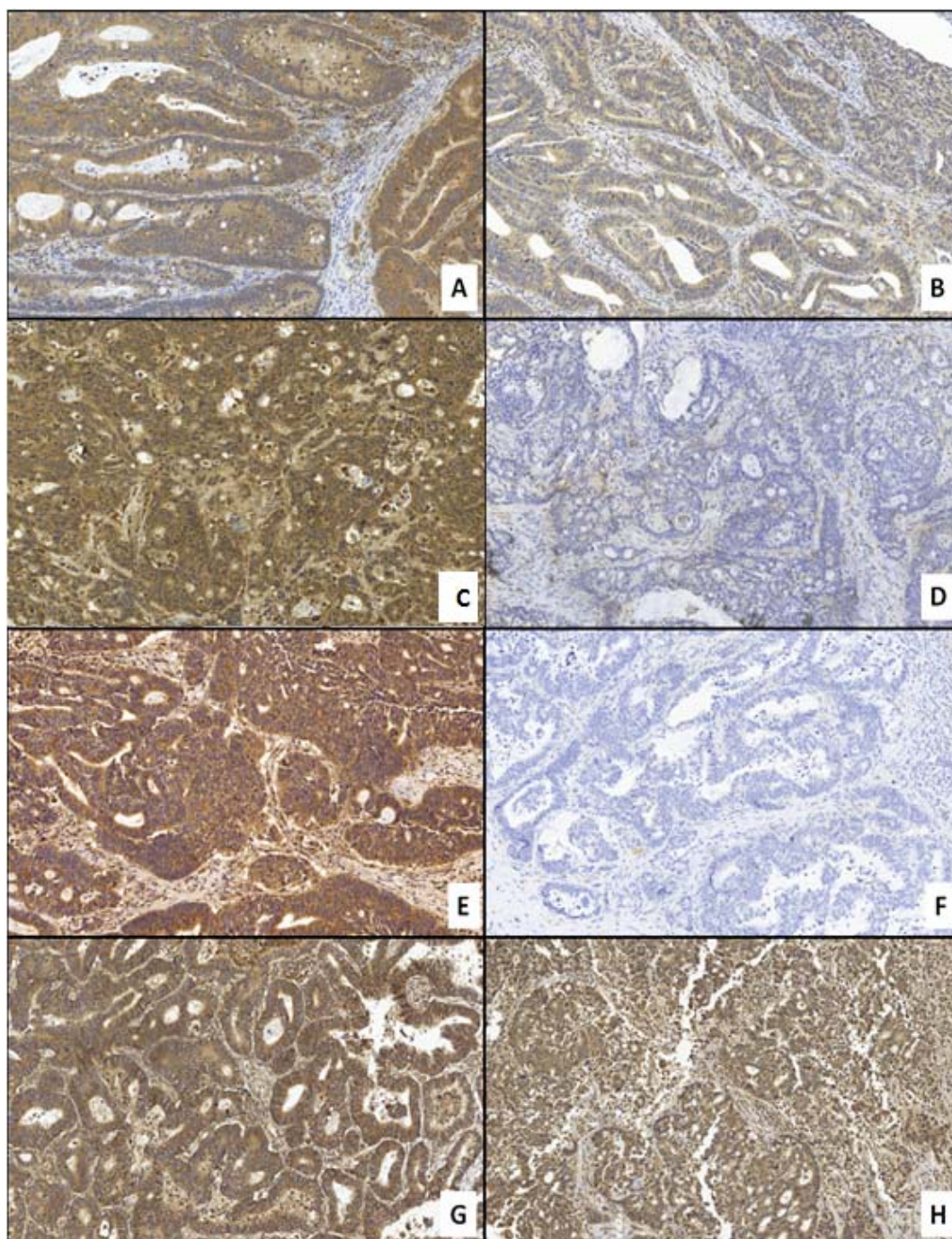


Figura 9 - Marcação imunoistoquímica de Rho nos diferentes grupos avaliados (10x). Imunoistoquímica positiva (A e B) nos tumores não metastáticos, positiva (C e D) nos tumores primários metastáticos, positiva (E) e negativa (F) nas metástases hepáticas e, positiva (G e H) nas metástases pulmonares.

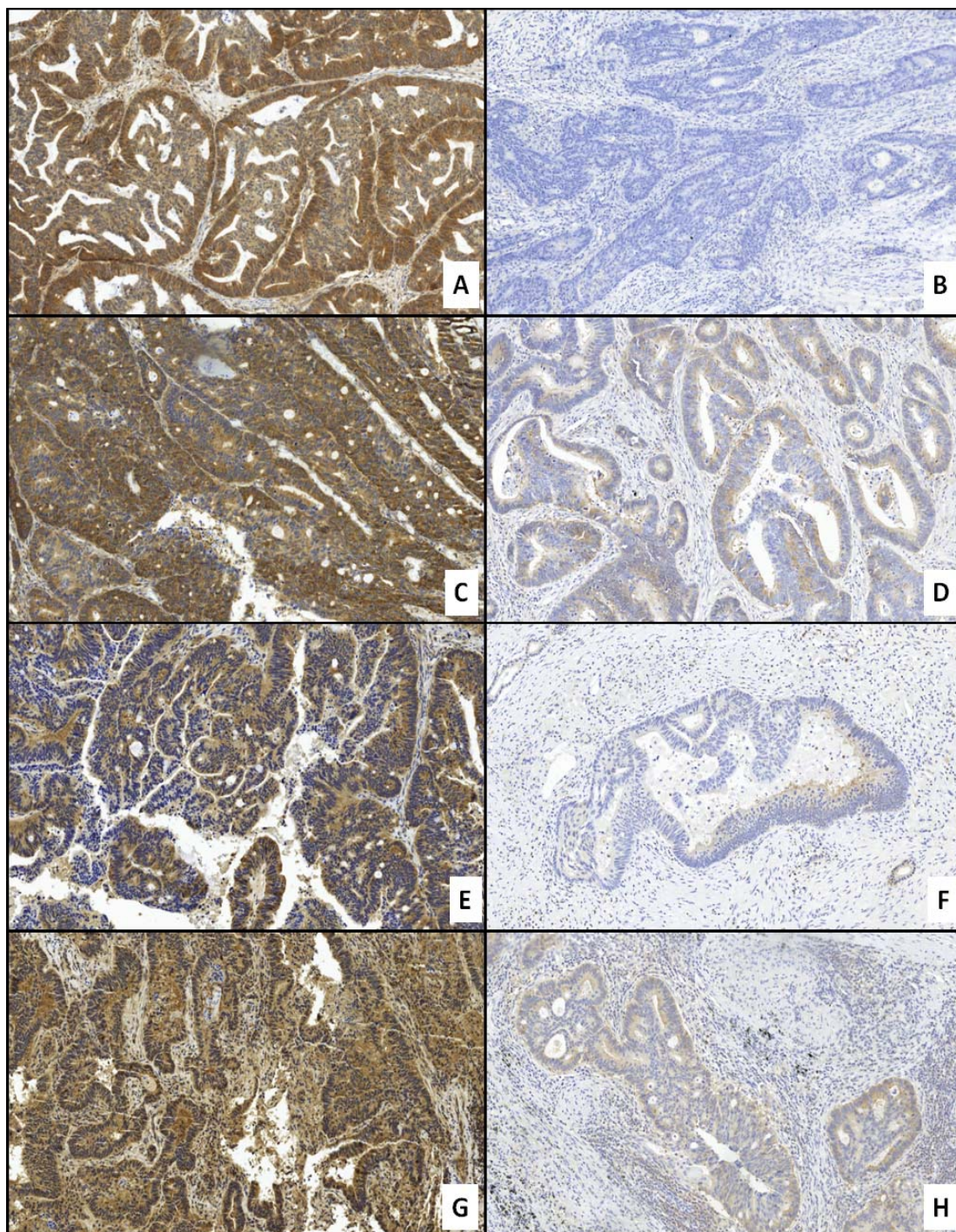


Figura 10 - Marcação imunoistoquímica de Pak1 nos diferentes grupos avaliados (10x). Imunoistoquímica positiva (A) e negativa (B) nos tumores não metastáticos, positiva (C e D) nos tumores primários metastáticos, positiva (E) e negativa (F) nas metástases hepáticas e, positiva (G e H) nas metástases pulmonares.

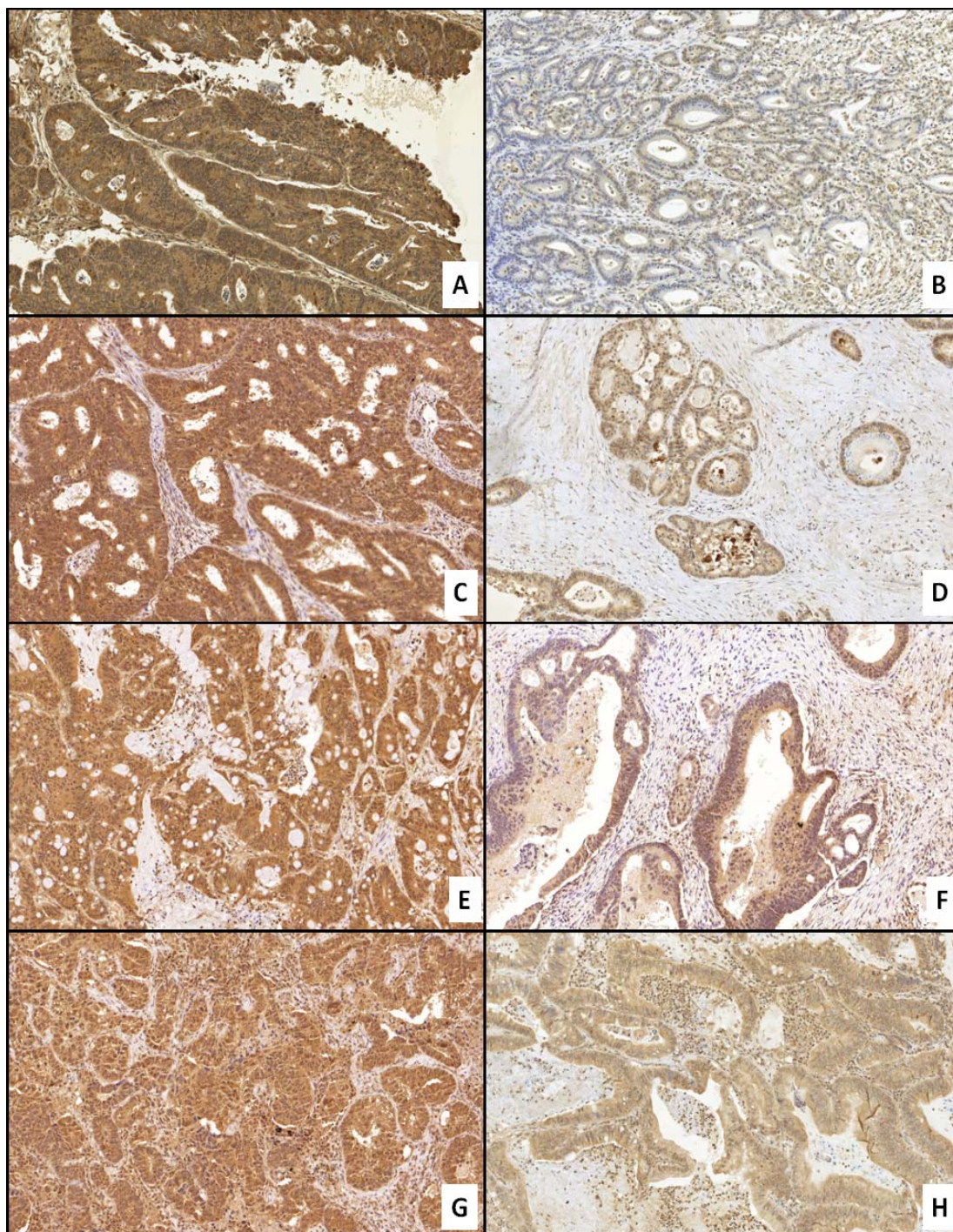


Figura 11 - Marcação imunoistoquímica de Tiam1 nos diferentes grupos avaliados (10x). Imunoistoquímica positiva (A e B) nos tumores não metastáticos, positiva (C e D) nos tumores primários metastáticos, positiva (E e F) nas metástases hepáticas e positiva (G e H) nas metástases pulmonares.

Ao comparar o grupo de tumores não metastáticos com o grupo de tumores metastáticos, os marcadores Tiam1 e Mrck- β , avaliados pela imunohistoquímica, mostraram diferença significativa entre eles ($p=0.029$ e $p=0.003$, respectivamente). O marcador Tiam1 apresentou-se mais expresso no grupo de tumores primários não metastáticos, enquanto o marcador Mrck- β estava mais expresso no grupo de tumores primários metastáticos. O marcador RHO mostrou tendência ($p=0,051$) entre estes dois grupos, estando mais expresso no grupo de tumores primários não metastáticos. Os marcadores PAK1 e RAC1 não mostraram significância estatística nos 40 casos avaliados (Tabela 2).

Tabela 2 - Expressão dos marcadores entre os tumores primários metastáticos e não metastáticos.

Marcador	Tecido	n	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	p
Pak1	PM	38	124.81	41.83	51.85	126.71	203.75	0.12
	PNM	40	105.16	66.35	0.08	101.09	228.77	
Tiam1	PM	39	174.28	17.57	127.21	177.10	210.39	0.029
	PNM	40	191.47	45.03	0.00	195.16	260.50	
Rho	PM	39	193.30	41.04	13.19	202.91	247.98	0.051
	PNM	40	211.45	40.13	112.34	220.08	275.07	
Rac1	PM	39	162.52	25.46	93.37	166.56	209.20	0.19
	PNM	40	173.06	43.21	18.25	182.45	246.53	
Mrck- β	PM	38	24.68	47.18	0.00	0.71	212.82	0.003
	PNM	40	0.07	0.13	0.00	0.02	0.45	

Legenda: PM: Primário metastático. PNM Primário não metastático

Não houve diferença significativa entre a expressão IIQ de todos os marcadores quando se comparou o grupo de tumores primários metastáticos com suas respectivas metástases (Tabela 3).

Tabela 3 - Expressão dos marcadores entre os tumores primários metastáticos e metástases.

Marcador	Tecido	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	p
Pak1	Metástase	38	117.36	55.57	9.15	127.01	233.11	0.41
	Primário	38	124.81	41.83	51.85	126.71	203.75	
Tiam1	Metástase	39	167.28	21.87	58.85	169.30	194.79	0.11
	Primário	39	174.28	17.57	127.21	177.10	210.39	
Rho	Metástase	39	190.39	36.10	1.72	196.24	224.08	0.74
	Primário	39	193.30	41.04	13.19	202.91	247.98	
Rac1	Metástase	39	161.08	24.23	99.62	162.35	194.96	0.76
	Primário	39	162.52	25.46	93.37	166.56	209.20	
Mrck- β	Metástase	37	16.00	29.00	0.00	0.23	116.39	0.09
	Primário	37	25.35	47.65	0.00	0.89	212.82	

As correlações entre a expressão IIQ de todos os marcadores avaliados nos diferentes grupos (primários metastáticos, primários não metastáticos e as metástases) podem ser visualizadas na Tabela 4. Pak1 e Rac1 tiveram correlação nos três diferentes grupos enquanto Tiam1 e Mrck- β , Rho e Mrck- β e Rac1 e Mrck- β não mostraram correlação nos três grupos.

Tabela 4 - Correlação entre os marcadores nos diferentes grupos avaliados.

Correlação		Primário		Primário não		Metástases	
		metastático		metastático			
		r	p	r	p	r	p
Pak1	Tiam1	0.321	0.049	0.325	0.041	0.014	0.933
Pak1	Rho	0.263	0.110	0.323	0.042	0.374	0.019
Pak1	Rac1	0.333	0.041	0.530	0.000	0.316	0.050
Pak1	Mrck- β	0.382	0.020	-0.156	0.336	0.171	0.297
Tiam1	Rho	0.487	0.002	0.072	0.661	0.043	0.796
Tiam1	Rac1	0.674	<0.001	0.126	0.439	0.521	0.001
Tiam1	Mrck- β	0.254	0.124	0.027	0.871	0.069	0.677
Rho	Rac1	0.492	0.002	0.367	0.020	0.015	0.926
Rho	Mrck- β	0.283	0.085	0.135	0.405	0.233	0.154
Rac1	Mrck- β	0.286	0.082	-0.022	0.890	0.003	0.984

4.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Utilizando a linhagem celular HCT116, a imunofluorescência foi realizada e a especificidade dos cinco marcadores, assim como sua localização de marcação citoplasmática, pode ser visualizada devido a marcação dos anticorpos secundários em vermelho (Alexa594 goat anti-mouse IgG) e azul (Alexa488 goat anti-mouse IgG) na Figura 12.

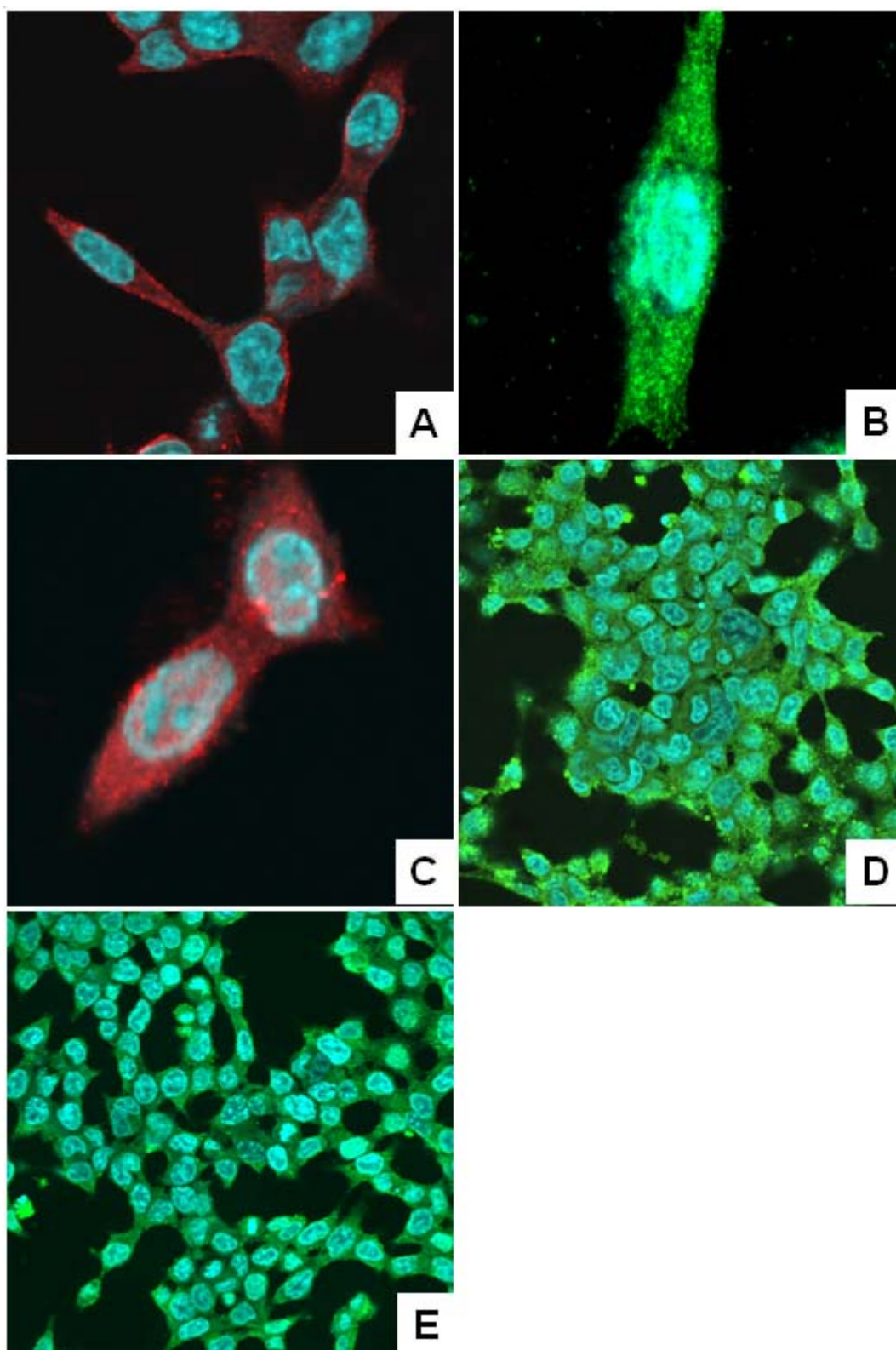


Figura 12 - Os cinco marcadores avaliados pela imunofluorescência. Marcação citoplasmática de Mrck- β (A), Pak1 (B), Rac1 (C), Tiam1 (D) e Rho (E)

4.4 WESTERN-BLOT E CULTURAS CELULARES

A partir dos resultados encontrados na imunoistoquímica, foi realizado um Western-blot com o anticorpo anti-Mrck- β , usando as linhagens HCT116 e SW480, e mostrou marcar especificamente a proteína que possui 194kDa.

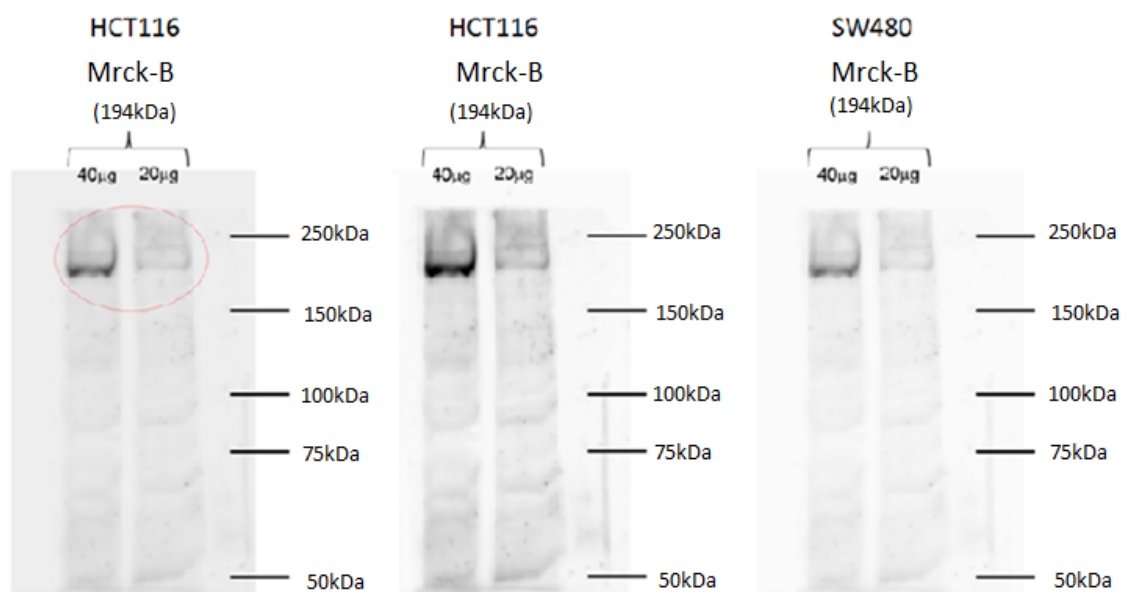


Figura 13 - Especificidade do anticorpo contra Mrck- β , avaliado por western-blot com 40μg e 20μg de proteínas.

A linhagem HCT116, que possui o maior potencial metastático em relação a SW480, mostrou maior expressão de Mrck- β quando avaliada por western-blot. (Figura 13) A α - β tubulina foi usada como normalizador por estar expressa de forma endógena.

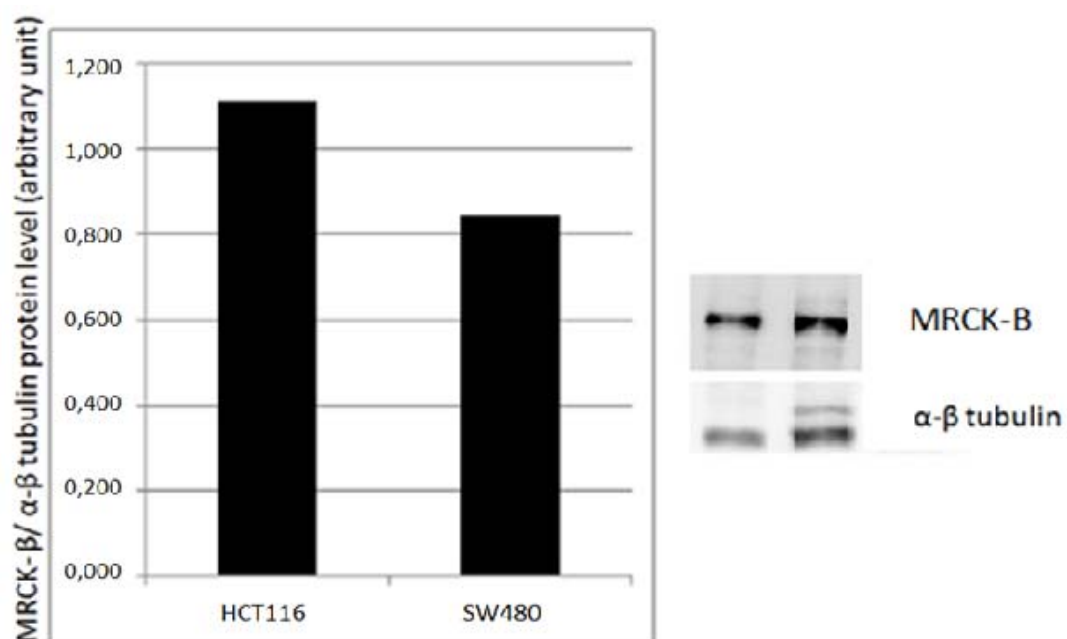


Figura 14 - Diferença da expressão de Mrck-β nas linhagens avaliadas.

5 DISCUSSÃO

O câncer colorretal (CCR) é uma neoplasia de origem epitelial, tratável e frequentemente curável quando na ausência de extensão para outros órgãos. A estimativa é de 30.000 novos casos por ano no Brasil de acordo com o INCA (Ministério da Saúde 2011).

No presente estudo foram avaliadas as diferentes expressões de proteínas da família das Rho-GTPases e outras proteínas relacionadas, em carcinomas colorretais metastáticos, suas metástases pareadas e carcinomas colorretais não metastáticos, com pelo menos cinco anos de acompanhamento.

Como esperado, entre os casos avaliados, os pacientes metastáticos apresentaram tempo de sobrevida menor em relação aos pacientes não metastáticos (Figura 6). 40% de todos os casos avaliados eram do sexo masculino. Este dado corrobora com a literatura que mostra que 47% dos casos são do sexo masculino (GOLAN et al. 2013).

Entre a casuística, 25% dos pacientes foram diagnosticados com câncer colorretal com a idade inferior a 50 anos. Esta porcentagem de pacientes mostrou-se elevada quando comparada a dados da literatura (12%) (GOLAN et al. 2013).

Os tumores primários com e sem metástases foram classificados em sua maioria pela ausência de linfonodos acometidos (46% e 57%, respectivamente). Apesar da ausência de linfonodos acometidos, cerca de

30% dos pacientes morrem por causa da doença metastática (HYSLOP e WALDMAN et al. 2013). Devido as questões levantadas sobre a classificação TNM (GAO et al. 2013), a avaliação de marcadores relacionados a progressão tumoral e metástase, como as Rho GTPases, podem ser de grande importância para a identificação de pacientes que irão desenvolver metástases.

Uma das proteínas que pode ajudar na identificação da progressão tumoral é Tiam1. Esta proteína é um fator de troca de guanina (GEF) específica de Rac1 e possui um papel na regulação da polaridade apical-basal em células epiteliais, crescimento, diferenciação e motilidade celular (ADAMS et al. 2010). Tiam1 apresentou-se diferencialmente expresso nos tumores primários ($p=0.029$) e sua expressão foi maior nos tumores não metastáticos. Porém outros autores encontraram resultados divergentes em CCR. Foi observado, em diferentes linhagens tumorais de câncer colorretal com e sem metástase, que a expressão de Tiam1 está elevada nas linhagens com perfil metastático (LIU et al. 2005). Por outro lado, já foi relatado em câncer de mama, que a baixa expressão de Tiam1, avaliada pela imunoistoquímica, está relacionada a um alto índice de proliferação, ao nível de invasão tumoral (classificação T) e com a positividade de p53 (STEBEL et al. 2009).

Curiosamente, não foi observada diferença de Rac1 entre os tumores primários, porém existe uma forte correlação entre Rac1 e Tiam1 nos tumores metastáticos ($p<0,001$) e suas metástases ($p=0,001$). Esta correlação não foi observada entre os tumores não metastáticos ($p=0,439$).

Uma vez que Rac1 não está diferencialmente expresso entre os tumores primários e Tiam1 tem a função específica de catalisar a troca de GDT para GTP em Rac1, é possível afirmar que a correlação positiva Tiam1-Rac1 não seja a principal causa de metástase em câncer colorretal. Esses dados contradizem a literatura, que sugere que Tiam1 regula Rac1 levando ao processo metastático. Em melanócitos foi avaliado que apenas Rac1 constitutivo não gera o perfil metastático e foi detectada alta expressão de Tiam1 (DALTON et al. 2013). Esta relação foi vista também em câncer renal (ENGERS et al. 2001) e em câncer de mama (BOURGUIGNON et al. 2000).

A marcação atípica de Tiam1, presente no núcleo celular, foi encontrada nos tumores primários, com e sem metástases, e nas metástases hepáticas. Dentre os 13 casos de tumores primários metastáticos, 7 casos apresentaram marcação nuclear em suas metástases hepáticas, mostrando que o mesmo padrão expresso nos tumores primários reflete em suas respectivas metástases. Não há relatos na literatura sobre a marcação nuclear de Tiam1; essa marcação atípica pode estar relacionada ao comportamento aberrante do tumor e futuros estudos devem investigar a presença nuclear de Tiam1.

Por outro lado, Rac1 mostrou uma marcação exclusivamente citoplasmática, e já foi descrita sua marcação nuclear em células de câncer cervical (MENDOZA-CATALÁN et al. 2012) e gástrico (SU et al. 2011); essa marcação nuclear de Rac1 pode estar ligada ao aumento de expressão de Tiam1 e relacionada a invasão em câncer gástrico (SU et al. 2011). Apesar

da correlação positiva com Rac1, Tiam1 não induz a presença de Rac1 no núcleo celular no câncer colorretal.

Como efetora de Rac1 e seu papel fundamental na sobrevivência, proliferação e motilidade celular, a proteína Pak1 foi avaliada e apresentou uma correlação, entre os tumores primários com e sem metástases, com Tiam1 e nos três grupos avaliados com Rac1 (Tabela 4). Apesar das correlações positivas, Pak1 não está diferencialmente expressa entre os tumores primários. As correlações indicam que as interações proteicas entre Tiam1, Rac1 e Pak1 corroboram com a literatura, porém não se mostraram responsáveis pela formação do perfil metastático, indicando que essa via não é a principal via para a progressão tumoral e metástase em câncer colorretal. Por outro lado, já foi relatado que a alta expressão de Pak1 está relacionada à progressão tumoral em câncer colorretal (CARTER et al. 2004). Esta alta expressão pode estar relacionada à expressão de Cdc42 ou a outras proteínas que regulam a expressão de Pak1 (DUMMLER et al. 2009).

Já a GTPase Rho, mostrou uma correlação positiva com Rac1 nos tumores primários metastáticos ($p=0,002$) e primários não metastáticos ($p=0,02$). Apesar de não ter interação direta com Tiam1, Rac1 e Pak1, já foi descrito que a depleção de RhoA diminui a atividade de Rac1 (HEASMAN et al. 2010). Esta correlação é esperada uma vez que ambos, Rho e Rac1, têm um papel na formação de lamellipodia (ETIENNE-MANNEVILLE e HALL 2002). Rho apresentou um valor próximo de significância entre os tumores primários ($p=0,051$) e sua expressão foi maior em tumores não metastáticos.

Estudos mostram que várias proteínas da família Rho estão relacionadas ao perfil invasivo e metastático, como por exemplo, RhoA e RhoE em câncer de colorretal (AL-HAIDARI et al. 2013; ZHOU et al. 2013), RhoB em câncer de próstata (VEGA et al. 2012) e RhoC e RhoJ em melanoma (RUTH et al. 2006; HO et al. 2013). O anticorpo usado para avaliar Rho identifica um grupo de proteínas (RhoA, RhoB e RhoC) que interagem com os mesmos efetores (VEGA et al. 2008). Apesar dos inúmeros relatos envolvendo Rho na progressão do câncer, sua elevada expressão nos tumores primários não metastáticos mostrou que a expressão proteica de Rho não deve ser a principal causa de metástase em câncer colorretal.

Mrck- β é uma proteína que possui sítios de ligação de Cdc42 e Rac1 e apresentou-se diferencialmente expressa entre os tumores primários sem e com metástase ($p=0.003$). Quando comparado aos tumores primários e suas metástases, não apresentou significância ($p=0.09$). Os tumores não metastáticos mostraram uma expressão negativa de Mrck- β , enquanto a expressão positiva nos tumores metastáticos foi observada em 50% dos casos. Mrck- β , avaliada pela imunoistoquímica, quando ausente não mostrou relevância, mas quando presente é indicativo de pior prognóstico em tumores colorretais.

Não foi observado correlação entre Rac1 e Mrck- β , apesar de Mrck- β possuir um sítio de ligação de Rac1 (CHOI et al. 2008). A ausência de correlação entre os marcadores mostra que a diferença de expressão de Mrck- β nos tumores primários sem e com metástase não é controlada por Rac1. Na literatura não há relatos dessa correlação. Mrck- β diferencialmente

expressa deve ser mediada por Cdc42, que também possui um sítio de ligação para Cdc42 (HUO et al. 2011).

Mrck- α está mais bem descrita como efetor de Cdc42 e seus efeitos na migração e invasão celular. Esta proteína regula LIMK1 e LIMK2, quando mediada por Cdc42, e leva a reorganização do esqueleto de actina. Outros efetores das Rho GTPases como Pak1 e ROCK, efetores de Rac1 e RhoA respectivamente, também regulam LIMK (SUMI et al. 2001).

Em relação à Mrck- β , já foi descrita sua co-expressão com Zônula de oclusão 1 (ZO-1), que é um tipo de junção intercelular que estabelece a adesão célula-célula e mantém a estrutura gerando *clusters* de moléculas transmembranais e proteínas do citoesqueleto. Ensaio de migração em linhagens celulares mostram a co-expressão de Mrck- β e ZO-1 dependente de Cdc42 durante o processo de migração, mas quando as células estão confluentes e param de migrar, a co-expressão não é mais visualizada (HUO et al. 2011).

Essas interações de Mrck reguladas por Cdc42 mostram a importância dessa via na migração celular e no processo metastático. Foi relatado que Mrck- α e Mrck- β estão relacionadas à invasão celular em câncer de mama. A inibição de Mrck, juntamente com ROCK, diminui a progressão tumoral. Mrck- α e Mrck- β são 77% idênticas no domínio quinase, mas Mrck- β possui maior similaridade com ROCK (HEIKKILA et al. 2011).

Independente de todos os processos e estímulos que as células sofrem durante a migração como a invasão celular, transporte e evasão da resposta imune no sistema circulatório, parada em um local secundário,

extravasamento e, finalmente, colonização e crescimento (KAPLAN et al. 2006), os marcadores avaliados apresentaram, em suas metástases, o mesmo padrão de marcação observado nos respectivos tumores primários. Esta expressão entre primários e suas metástase reforça ainda mais a importância da avaliação dos tumores primários em câncer colorretal para identificar os tipos tumorais que virão a desenvolver metástases. É importante ressaltar, que 38% dos tumores primários foram tratados com quimioterapia e radioterapia, e o perfil de expressão das proteínas avaliadas não mostrou ser influenciada por esses tratamentos.

Os cinco marcadores também foram avaliados pela imunofluorescência e mostraram uma boa especificidade marcando os citoplasmas das células HCT116 (Figura 11). Esta marcação está de acordo e valida os achados imunoistoquímicos.

Devido aos resultados encontrados de Mrck- β que mostrou significativa diferença de expressão entre os primários e não foi observada diferença de expressão entre o primário e sua metástase, sua expressão foi avaliada em duas diferentes linhagens celulares. Uma com características metastáticas (HCT116) (ISHIZU et al. 2007) e uma com características não metastáticas (SW480) (FLATMARK et al. 2004). O western-blot confirmou a especificidade do anticorpo anti-Mrck- β nas duas linhagens avaliadas. Ambas reconheceram uma banda de 194kDa e não apresentaram bandas inespecíficas.

Mrck- β apresentou maior expressão na linhagem com perfil metastático, o que corresponde com os achados imunoistoquímicos. A

expressão elevada de Mrck- β nos casos metastáticos e na linhagem metastática indica que essa proteína pode ter um papel importante na formação de metástases.

Esta diferença de expressão de Mrck- β nunca foi descrita e deve ter grande importância durante o processo metastático no câncer colorretal, devido a suas funções de motilidade e migração celular. É necessário que mais estudos sejam realizados para validação de Mrck- β como fator prognóstico do câncer colorretal e em outros tumores, incluindo a avaliação de Cdc42 e outras proteínas que podem mediar ou serem mediadas por Mrck- β .

6 CONCLUSÃO

Entre as proteínas estudadas Rac1, Rho e Pak1 não estão diferencialmente expressas entre os tumores primários metastáticos e não metastáticos. Tiam1 está mais expresso nos tumores primários não metastáticos e Mrck- β está mais expresso nos tumores primários metastáticos.

Entre os tumores primários e suas respectivas metástases os cinco marcadores estudados possuem o mesmo padrão de marcação. A marcação atípica de Tiam1 no núcleo das células também mostrou o mesmo padrão de marcação quando comparado os tumores primários e suas metástases.

Através dos ensaios celulares e do western-blot, Mrck- β mostrou-se mais expresso na linhagem com perfil metastático, validando as marcações encontradas pela análise imunoistoquímica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adam L, Vadlamudi RK, McCrea P, Kumar R. Tiam1 overexpression potentiates heregulin-induced lymphoid enhancer factor-1/beta-catenin nuclear signaling in breast cancer cells by modulating the intercellular stability. **J Biol Chem** 2001; 276:28443-50.

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

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

Al-Haidari AA, Syk I, Jirström K, Thorlacius H. CCR4 mediates CCL17 (TARC) induced migration of human colon cancer cells via RhoA/Rho-kinase signaling. **Int J Colorectal Dis** 2013 May 7. [Epub ahead of print].

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

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

Assémat E, Bazellières E, Pallesi-Pocachard E, Le Bivic A, Massey-Harroche D. Polarity complex proteins. **Biochim Biophys Acta** 2008; 1778:614-30.

Barcellos Ks, Bigarella CI, Wagner MV. ARHGAP21 protein, a new partner of α -tubulin involved in cell-cell adhesion formation and essential for epithelial-mesenchymal transition. **J Biol Chem** 2013; 288:2179-89.

Baines AT, Lim KH, Shields JM, et al. Use of retrovirus expression of interfering RNA to determine the contribution of activated K-Ras and ras effector expression to human tumor cell growth. **Methods Enzymol** 2006; 407:556-74.

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

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

Bourguignon LY, Zhu H, Shao L, Chen YW. Ankyrin-Tiam1 interaction promotes Rac1 signaling and metastatic breast tumor cell invasion and migration. **J Cell Biol** 2000; 150:177-91.

Carter JH, Douglass LE, Deddens JA, et al. Pak-1 expression increases with progression of colorectal carcinomas to metastasis. **Clin Cancer Res** 2004; 10:3448-56.

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

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

Choi SH, Czifra G, Kedei N, et al. Characterization of the interaction of phorbol esters with the C1 domain of MRCK (myotonic dystrophy kinase-related Cdc42 binding kinase) alpha/beta. **J Biol Chem** 2008; 283:10543-9.

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

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

Cruz-Monserrate Z, O'Connor KL. Integrin alpha 6 beta 4 promotes migration, invasion through Tiam1 upregulation, and subsequent Rac activation. **Neoplasia** 2008; 10:408-17.

D'Amico TA, Aloia TA, Moore MB, et al. Predicting the sites of metastases from lung cancer using molecular biologic markers. **Ann Thorac Surg** 2001; 72:1144-8.

Dalton LE, Kamarashev J, Barinaga-Rementeria Ramirez I, White G, Malliri A, Hurlstone A. Constitutive rac activation is not sufficient to initiate melanocyte neoplasia but accelerates malignant progression. **J Invest Dermatol** 2013; 133:1572-81.

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

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

Dummler B, Ohshiro K, Kumar R, Field J. Pak protein kinases and their role in cancer. **Cancer Metastasis Rev** 2009; 28:51-63.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. **AJCC cancer staging manual**. 7th ed. New York: Springer-Verlag; 2010. Colon and rectum; p.143-64.

Engers R, Springer E, Michiels F, Collard JG, Gabbert HE. Rac affects invasion of human renal cell carcinomas by up-regulating tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2 expression. **J Biol Chem** 2001; 276:41889-97.

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

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

Foster JH. Treatment of metastatic disease of the liver: a skeptic's view. **Semin Liver Dis** 1984; 4:170-9.

Gao P, Song YX, Wang ZN, et al. Is the prediction of prognosis not improved by the seventh edition of the TNM classification for colorectal cancer? Analysis of the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) database. **BMC Cancer** 2013; 13:123.

Gatti A, Huang Z, Tuazon PT, Traugh JA. Multisite autophosphorylation of p21-activated protein kinase g-Pak as a function of Activation. **J Biol Chem** 1999; 274:8022-8.

Girard P, Ducreux M, Baldeyrou P, et al. Surgery for lung metastases from colorectal cancer: analysis of prognostic factors. **J Clin Oncol** 1996; 14:2047-53.

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

Golan T, Urban D, Berger R, Lawrence YR. Changing prognosis of metastatic colorectal adenocarcinoma: differential improvement by age and tumor location. **Cancer** 2013 May 29. [Epub ahead of print]

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

Habets GG, Scholtes EH, Zuydgeest D, et al. Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rholike proteins. **Cell** 1994; 77:537-49.

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

Heasman SJ, Carlin LM, Cox S, Ng T, Ridley AJ. Coordinated RhoA signaling at the leading edge and uropod is required for T cell transendothelial migration. **J Cell Biol** 2010; 190:553-63.

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

Ho H, Soto Hopkin A, Kapadia R, Vasudeva P, Schilling J, Ganesan AK. RhoJ modulates melanoma invasion by altering actin cytoskeletal dynamics. **Pigment Cell Melanoma Res** 2013; 26:218-25.

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

Hyslop T, Waldman SA. Molecular staging of node negative patients with colorectal cancer. **J Cancer** 2013; 4:193-9.

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

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

Li WH, Peng JJ, Xiang JQ, Chen W, Cai SJ, Zhang W. Oncological outcome of unresectable lung metastases without extra pulmonary metastases in colorectal cancer. **World J Gastroenterol** 2010; 16:3318-24.

Limmer S, Oevermann E, Killaitis C, Kujath P, Hoffmann M, Bruch HP. Sequential surgical resection of hepatic and pulmonary metastases from colorectal cancer. **Langenbecks Arch Surg** 2010; 395:1129-38.

Liu L, Wu DH, Ding YQ. Tiam1 gene expression and its significance in colorectal carcinoma. **World J Gastroenterol** 2005; 11:705-7.

Liu L, Zhang Q, Zhang Y, Wang S, Ding Y. Lentivirus-mediated silencing of Tiam1 gene influences multiple functions of a human colorectal cancer cell line. **Neoplasia** 2006; 8:917-24.

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

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

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

McAfee MK, Allen MS, Trastek VF, Ilstrup DM, Deschamps C, Pairolero PC. Colorectal lung metastases: results of surgical excision. **Ann Thorac Surg** 1992; 53:780-5; discussion 785-6.

Mendoza-Catalán MA, Cristóbal-Mondragón GR, Adame-Gómez J, et al. Nuclear expression of Rac1 in cervical premalignant lesions and cervical cancer cells. **BMC Cancer** 2012; 12:116.

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

Mertens AE, Rygiel TP, Olivo C, van der Kammen R, Collard JG. The Rac activator Tiam1 controls tight junction biogenesis in keratinocytes through binding to and activation of the Par polarity complex. **J Cell Biol** 2005; 170:1029-37.

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

Minard ME, Kim LS, Price JE, Gallick GE. The role of the guanine nucleotide exchange factor Tiam1 in cellular migration, invasion, adhesion and tumor progression. **Breast Cancer Res Treat** 2004; 84:21-32.

Minard ME, Herynk MH, Collard JG, Gallick GE. The guanine nucleotide exchange factor Tiam1 increases colon carcinoma growth at metastatic sites in an orthotopic nude mouse model. **Oncogene** 2005; 24:2568-73.

Minard ME, Ellis LM, Gallick GE. Tiam1 regulates cell adhesion, migration and apoptosis in colon tumor cells. **Clin Exp Metastasis** 2006; 23:301-13.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2012 Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Prevenção**. Disponível em: <URL:<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal/prevencao>> [2013 jan 12]

Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. **Nature** 2005a; 436:518-24.

Minn AJ, Kang Y, Serganova I, et al. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. **J Clin Invest** 2005b; 115:44-55.

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

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

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

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

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

Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. **Cancer Metastasis Rev** 1989; 8:98-101.

Pegtel DM, Ellenbroek SI, Mertens AE, van der Kammen RA, de Rooij J, Collard JG. The Par-Tiam1 complex controls persistent migration by stabilizing microtubule-dependent front-rear polarity. **Curr Biol** 2007; 17:1623-34.

Pihl E, Hughes ES, McDermott FT, Johnson WR, Katrivessis H. Lung recurrence after curative surgery for colorectal cancer. **Dis Colon Rectum** 1987; 30:417-9.

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

Reddy SD, Ohshiro K, Rayala SK, Kumar R. MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions. **Cancer Res** 2008; 68:8195-200.

Reymond N, Im Jh, Garg R, et al. Cdc42 promotes transendothelial migration of cancer cells through $\beta 1$ integrin. **J Cell Biol** 2012; 199:653-68.

Ring BZ, Ross DT. Predicting the sites of metastases. **Genome Biol** 2005; 6:241.

Ruth MC, Xu Y, Maxwell IH, Ahn NG, Norris DA, Shellman YG. RhoC promotes human melanoma invasion in a PI3K/Akt-dependent pathway. **J Invest Dermatol** 2006; 126:862-8.

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

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

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

Scheele J, Altendorf-hofmann A. Resection of colorectal liver metastases. **Langenbecks Arch Surg** 1999; 384:313-27.

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

Stebel A, Brachetti C, Kunkel M, Schmidt M, Fritz G. Progression of breast tumors is accompanied by a decrease in expression of the Rho guanine exchange factor Tiam1. **Oncol Rep** 2009; 21:217-22.

Sobin LH, Wittekind CH. **TNM classification of malignant tumours**. 7th ed. New York: Wiley-Blackwell; 2010. Colon and rectum.

Su L, Xu W, Yan GZ, et al. Biological significance of relationship between nuclear localization of Rac1 and progression of gastric carcinoma. **Zhonghua Zhong Liu Za Zhi** 2011; 33:676-80.

Sumi T, Matsumoto K, Shibuya A, Nakamura T. Activation of LIM kinases by myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha. **J Biol Chem** 2001; 276:23092-6.

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

Vadlamudi RK, Adam L, Wang RA, et al. Regulatable expression of p21-activated kinase-1 promotes anchorage-independent growth and abnormal organization of mitotic spindles in human epithelial breast cancer cells. **J Biol Chemistry** 2000; 275:36238-44.

van Rijn JC, Reitsma JB, Stoker J, Bossuyt PM, van Deventer SJ, Dekker E. Polyp miss rate determined by tandem colonoscopy: a systematic review. **Am J Gastroenterol** 2006; 101:343-50.

Vega FM, Ridley AJ. Rho GTPases in cancer cell biology. **FEBS Lett** 2008; 582:2093-101.

Vega FM, Colomba A, Reymond N. RhoB regulates cell migration through altered focal adhesion dynamics. **Open Biol** 2012; 2:120076.

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

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

Ye Dz, Field J. PAK signaling in cancer. **Cell Logist** 2012; 2:105-116.

Zinkin LD. A critical review of the classifications and staging of colorectal cancer. **Dis Colon Rectum** 1983; 26:37-43.

Zhou J, Yang J, Li K, et al. RhoE is associated with relapse and prognosis of patients with colorectal cancer. **Ann Surg Oncol** 2013; 20:175-82.