

Inês Martins Silva

**Contribuição para a identificação do papel da MGP no
desenvolvimento tumoral no cancro colorretal**



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

2016

Inês Martins Silva

**Contribuição para a identificação do papel da MGP no
desenvolvimento tumoral no cancro colorretal**

Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana,
sob orientação científica da Doutora Leonor Cancela e do Doutor Daniel Tiago



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

2016

Contribuição para a identificação do papel da MGP no desenvolvimento tumoral no cancro colorretal

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

(Inês Martins Silva)

Declaração Copyright

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

*Dedicado aos meus pais, avós e ao meu namorado;
Sonhar é perder o chão para ganhar o céu
e, se o devo a alguém, é a vocês.*

Agradecimentos

Queria alongar-me um pouco nesta seção para agradecer e demonstrar a minha gratidão e reconhecimento a todos os que tornaram possível a elaboração deste trabalho. Para mim nada disto seria possível sem vós.

À Doutora **Leonor Cancela**, um muito obrigado por me ter dado a oportunidade de trabalhar no seu laboratório e ser a minha orientadora, pelo tempo que despendeu a transmitir-me valiosos conhecimentos e direções e pelo amor à ciência que me inculuiu desde o início desta, que já vai longa, jornada.

Ao Doutor **Daniel Tiago** que mesmo geograficamente nem sempre tão perto quanto eu gostaria, esteve sempre em cima do acontecimento, puxou por mim e fez com que eu perdesse o medo de por mãos ao trabalho e de errar. Os conhecimentos por si transmitidos foram preciosos e propiciaram o meu crescimento enquanto pessoa e quem sabe futura investigadora.

Helena Caiado, obrigado pelo tempo que roubaste ao teu próprio trabalho para me pões ao corrente das metodologias que tive de aplicar e por todos os esclarecimentos em alturas de crise existencial.

À minha querida amiga **Ana Cachucho** agradeço o timing! Apareceste no laboratório e no ano letivo certo e proporcionaste-me muita descontração em alturas em que esta era crítica. Agradeço também pelas muitas horas despendidas para me ajudar no que fosse preciso! Sei que juntas trabalhamos muito para concretizar os nossos objetivos e chegar ao ponto em que estamos

Aos restantes membros do laboratório **2.13**, obrigado pelo ambiente descontraído e de entreajuda, Vincent, Marco, João, Márcio, Natércia, Karine, Vânia, Nacho, Luís, Gavaia, Mariana, Marta, Gil, Patrícia.

Não posso deixar de agradecer aos meus avós e aos meus pais, que têm sido os financiadores desta longa aventura que escolhi viver, por sempre terem acreditado em mim e não se terem poupado a esforços para me verem seguir o caminho que idealizei.

Andreia, acompanhaste todo o meu percurso ao longo destes 5 anos, sempre me apoiaste e foste minha amiga nas melhores e piores alturas, não há palavras que descrevam isso.

Por último, mas não menos importante, obrigado **Arnaldo** pelas dicas úteis no domínio informático. Por seres uma pessoa espetacular, por trazeres ao de cima o melhor que há em mim, pelo amor incondicional e pela força que sempre me deste; para contigo o meu sentimento de gratidão vai além do imaginável. Pela tua calma que combina com a minha eletricidade, pelos teus pensamentos na terra que equilibram os meus que tão sonhadores e pelo teu positivismo que equilibra a minha ansiedade. És tudo!

Obrigado de Coração,

Inês

Resumo

A MGP é uma proteína de matriz extracelular inicialmente descoberta no esqueleto de bovinos, e posteriormente associada à cartilagem e sistema vascular de diversos vertebrados. Recentemente, a MGP foi implicada no cancro, associando-se a vários tumores. Contudo, o seu papel nesses tumores nunca foi decifrado, tendo-se apenas demonstrado o seu envolvimento em mecanismos de migração celular e angiogénese em glioblastomas e na proliferação e invasão celular no cancro da mama. Num trabalho desenvolvido no nosso laboratório, descobriu-se que a MGP estava sobre-expressa em tumores colorretais (CCR), atualmente um dos mais incidentes e mortais.

Com o objetivo de estudar o papel da MGP no CCR, utilizámos a linha celular HT-29, onde se verificou uma elevada expressão de MGP. Transfetámos estas células de forma estável com vetores contendo siRNAs anti-MGP. Selecionámos 2 clones celulares, R1E e R3C, que sobre-expressavam diferentes siRNAs, e analisámos a expressão genética, particularmente da MGP, assim como a capacidade proliferativa, migratória e invasiva destes clones.

Verificou-se uma redução significativa da MGP ao nível do mRNA (73,6% e 85%,) e proteína (63,6% e 34,3%) nos clones R1E e R3C *versus* células *wild-type* (WT), assim como na capacidade proliferativa (35,8% e 51,9%) e migratória (37,2% e 46,4%), respetivamente. Relativamente à capacidade invasiva, o clone R1E foi atualmente o único analisado, verificando-se um aumento de aproximadamente 6 vezes.

Os resultados sugerem que a MGP está envolvida em mecanismos proliferativos, migratórios e invasivos nestas células, evidenciando o seu potencial como alvo terapêutico no CCR. Baseados na literatura, postulámos uma possível interação da MGP com proteínas de matriz extracelular, local onde a MGP é secretada, interferindo com vias de sinalização associadas à Notch, BMPs ou Vitronectina. Analisada a expressão de genes associados a estas vias, concluímos que tanto a Notch como a PI3K/AKT associada à Vitronectina, poderiam estar envolvidas nos efeitos observados.

Palavras Chave: Cancro colorretal, Linha celular HT-29, MGP, RNA de interferência, Oncogénese, Vias de sinalização

Abstract

MGP is a matrix protein that was first identified in the skeleton of bovines, and later found to be associated with cartilage and vascular system of numerous vertebrates. Recently MGP was associated with a variety of tumors, however its role in those tumors was never demonstrated, even though it was shown to be involved with cell migration and angiogenesis in glioblastomas, and with proliferation and invasion in breast cancer. In our lab, we found that MGP was also up-regulated in colorectal cancer (CRC), one of the most incident and mortal worldwide.

In order to investigate MGP role in CRC, we used the HT-29 cell line, where we observed that MGP was highly expressed. We stably transfected these cells with constructs containing anti-MGP siRNAs. Two different cell clones, R1E and R3C, overexpressing two different siRNAs, were selected and further characterized in terms of MGP expression, proliferation, migration, invasion, and tumor associated gene expression.

A significant reduction in MGP mRNA (73.6% and 85%), and protein (63.6% and 34.3%) levels was observed when compared to wild-type (WT) cells. We also observed a significant down-regulation of cell proliferation (35.8% and 51.9%) and migration (37.2% and 46.4%) of these clones. Regarding cell invasion, so far we only analyzed clone R1E, and we observed an up-regulation of approximately 6-fold.

Our results suggest that MGP is involved in cell proliferation, migration and invasion mechanisms in these cells, indicating a potential use as a therapeutic target. Based on the literature, we postulated that MGP could interact with proteins in the extracellular matrix, at sites where MGP is secreted, and consequently interfere with pathways associated to Notch, BMPs or Vitronectin. After analyzing the expression of genes associated to these pathways, we concluded that both Notch and PI3K/AKT associated to Vitronectin could be involved in the observed effects.

Keywords: Colorectal cancer, HT-29 cell line, MGP, RNA interference, Oncogenesis, Signalling pathways

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract.....	III
Índice de Tabelas	VI
Índice de Figuras	VII
Abreviaturas.....	IX
Capítulo I - Introdução	1
1. Origem Tumoral	2
1.1 Mecanismos de ativação das células tumorais	2
1.1.1 Instabilidade do genoma e mutação.....	2
1.1.2 Inflamação.....	3
1.2 Iniciação e crescimento primário do tumor	3
1.2.1 Autossuficiência nos sinais de crescimento	3
1.2.2 Insensibilidade a sinais inibitórios do crescimento	4
1.2.3 Resistência a morte celular programada	5
1.2.4 Imortalização Replicativa	5
1.2.5 Desregulação energética celular	6
1.2.6 Eludindo o sistema Imunitário	7
1.3 Progressão Tumoral	8
1.3.1 Indução de angiogénese	8
1.3.2 Invasão local de tecidos e metastização	8
2. Cancro colorretal	9
2.1 Epidemiologia	9
2.2 Anatomia do Intestino	11
2.3 Pólipos não-neoplásicos/neoplásicos	12
2.4 Carcinogénese no CCR	13
2.5 Fatores de Risco	16
2.6 Rastreio	17
2.7 Estadiamento da Doença	18

3. Proteína Gla da Matriz (MGP).....	19
3.1 O que é a MGP?	19
3.2 Função da MGP.....	20
3.3 Envolvimento da MGP no cancro.....	22
4. Objetivos.....	25
Capítulo II – Material e Métodos.....	26
1. Linha celular e cultura.....	27
2. Desenvolvimento de clones com bloqueio da expressão da MGP	27
3. Extração e purificação de RNA total	29
4. Construção de oligonucleótidos.....	30
5. Análise da expressão da MGP por RT-qPCR em tempo real	30
6. Ensaio de luciferase para deteção da atividade dos elementos de resposta das BMPs.....	31
7. Imunocitoquímica	32
8. Análise de expressão da MGP no meio celular por <i>Western Blot</i>	33
9. Ensaio de proliferação celular	34
10. Ensaio de migração Celular	35
11. Ensaio de invasão Celular	35
12. Análise estatística	36
Capítulo III – Resultados e Discussão.....	37
1. Diferentes RNAs de interferência promovem diferentes bloqueios da MGP em HT-29.....	39
2. O bloqueio da MGP afeta negativamente a capacidade proliferativa das células HT-29	44
3. O bloqueio da MGP em pelo menos um dos clones promove capacidade invasiva das células HT-29.....	46
4. A via Notch está ativada em células HT-29 com bloqueio da MGP	49
Capítulo IV – Conclusão e Perspetivas Futuras	55
Bibliografia	58
Anexos	68

Índice de Tabelas

Tabela 1. Relação da MGP com o cancro	23
Tabela 2. Genes descritos na literatura como diferencialmente expressos	49
Tabela S1. Composição das soluções e dos tampões utilizados	69
Tabela S2. Tabela siRNAs	70
Tabela S3. Lista de oligonucleótidos utilizados	74

Índice de Figuras

Figura 1.1. Ciclo celular de mamíferos e principais <i>checkpoints</i>	5
Figura 1.2. Mecanismo de produção energética em células tumorais recorrendo a glicólise aeróbica, um fenómeno denominado por efeito de Warburg.	6
Figura 1.3. Percentagem de novos casos de CCR diagnosticados por faixa etária.....	10
Figura 1.4. Percentagem de óbitos em ambos os sexos por ano em Portugal, devidos ao cancro.	10
Figura 1.5. Percentagem de incidência de cancro em ambos os sexos, por ano, em Portugal.	11
Figura 1.6. Anatomia do Intestino grosso.	11
Figura 1.7. Corte do intestino grosso com as suas diversas camadas.....	12
Figura 1.8. Desenvolvimento do cancro colorretal e principais alterações genéticas.	14
Figura 1.9. Via de sinalização celular Wnt.....	15
Figura 1.10. Estrutura proteica da pré-proteína MGP humana.	19
Figura 1.11. Cronograma das principais descobertas relacionadas com a MGP.	21
Figura 2.1. Vetor de expressão pcDNA TM 6.2-GW/EmGFP-miR.	27
Figura 2.2. Processamento e mecanismo de ação de siRNAs, em vertebrados.....	28
Figura 3.1. Representação esquemática do gene, transcrito e sequência codante da MGP, bem como locais de ligação dos <i>primers</i> e siRNAs.....	40
Figura 3.2. Fluorescência dos clones em comparação com o WT.....	41
Figura 3.3. Expressão relativa da MGP (calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$) nas células HT-29 em comparação com os clones a sobre-expressar siRNAs contra a MGP.	41
Figura 3.4. Efeito dos siRNAs 1 e 3 nos níveis de produção de MGP nas células HT-29.	43
Figura 3.5. Deteção por imunocitoquímica de MGP em células HT-29 WT e clones.	44
Figura 3.6. Análise da capacidade proliferativa das células HT-29 e clones de expressão.	45
Figura 3.7. Migração de células HT-29 e clones com <i>knockdown</i> de MGP segundo o ensaio <i>wound-healing</i>	47
Figura 3.8. Efeito do bloqueio da expressão de MGP na capacidade invasiva de células HT-29.....	48
Figura 3.9. Análise da expressão relativa dos genes <i>JAG1</i> e <i>HES1</i> (calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$).	50

Figura 3.10. Análise da expressão relativa dos genes <i>EFNB2</i> , <i>BHLHB2</i> e <i>Stratifin</i>	52
Figura S1. Ensaio de morte celular em células HT-29 WT.....	71
Figura S2. Efeito dos siRNAs 1, 3 e 4 nos níveis de produção de MGP nas células HT-29.....	71
Figura S3. Detecção imunocitoquímica de MGP em células HT-29 WT e clones.....	72
Figura S4. Capacidade proliferativa das células HT-29 WT e clones de expressão.....	72
Figura S5. Migração de células HT-29 e clones com <i>Knockdown</i> de MGP segundo o ensaio <i>wound-healing</i>	73

Abreviaturas

APC	Gene supressor de tumores
BMP	Proteína Morfogénica do Osso
CCR	Cancro colorretal
CCRHNP	CCR hereditário não polipoide
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
KDa	Kilodalton
DAPI	Corante fluorescente que se liga a zonas de DNA ricas em AT
DMEM	Meio de cultura
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FBS	Soro Fetal Bovino
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GLA	Ácido γ -carboxiglutâmico
GSK	Glucose sintase quinase
MGP	Proteína Gla da Matriz
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
PAF	Polipose Adenomatosa Familiar
PBS	Tampão Fosfato Salino
PBST	Tampão Fosfato Salino e Triton
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAi	Técnica de interferência por RNA
RT-PCR	Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real
RUNX	Fator de transcrição relacionado com o domínio Runx
siRNA	Pequenos ácidos ribonucleicos de interferência
TGH	Hormona de Crescimento Tumoral
VDK	Dependência de Vitamina K
VTN	Vitronectina
WT	Estirpe Selvagem
XTT	2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfohenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

Capítulo I

Introdução

1. Origem Tumoral

De uma forma geral, os tumores são condições clínicas que se manifestam pela presença de crescimento neoplásico. O aparecimento de tumores resulta de alterações genéticas, i.e. mutações, que de alguma forma conseguem ultrapassar os mecanismos celulares de “correção” e são transmitidas para as “células filha” tumorais. Estas alterações genéticas resultam numa proliferação celular excessiva e desregulada, que ocorre de forma autónoma, i.e. sem controlo de sinais extracelulares. Geralmente os tumores dependem do hospedeiro para sua nutrição e suprimento sanguíneo, sendo esta interação essencial para o seu desenvolvimento (Weinberg, 2014).

Toda a população de células filha dentro de um tumor se origina a partir de uma única célula mãe. Assim, os tumores são constituídos por células clonais. Se o mesmo marcador genético estiver presente em todas as células de um tumor pode-se dizer que estas são monoclonais. Alternativamente, se a massa tumoral for constituída por células de diferentes fenótipos, cuja procedência seja divergente, estas células dir-se-ão policlonais (Weinberg, 2014; Lodish *et al.*, 2013).

Existem quatro tipos de tumores relativamente à origem celular: 1) hematopoiéticos, com origem em células do sangue, subdividindo-se estes em linfomas de linhagem linfóide, agregando-se para formar tumores sólidos, ou leucemias (provenientes de células hematopoiéticas que se movem livremente na circulação sanguínea); 2) carcinomas, de origem epitelial, originados a partir de células epiteliais com função estrutural (carcinoma escamoso) ou com função secretora (adenocarcinoma); 3) sarcomas, com origem em tecidos conjuntivos e células mesenquimais; e 4) neuroectodérmicos, com origem em células que constituem os sistemas nervoso central e periférico (Weinberg, 2014; Lodish *et al.*, 2013).

1.1 Mecanismos de ativação das células tumorais

1.1.1 Instabilidade do genoma e mutação

A progressão tumoral pode ser descrita como uma sucessão de expansões clonais desencadeadas pela aquisição de genótipos mutantes (Hanahan & Weinberg, 2011). No entanto, os fenótipos hereditários também podem ser adquiridos através de mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA e modificações das histonas. Desta forma, algumas expansões clonais podem também ser desencadeadas por alterações, não mutacionais, que afetam a regulação da expressão génica (Berdasco & Esteller, 2010; Esteller, 2007; Jones &

Baylin, 2007). Frequentemente, as células cancerígenas apresentam taxas de mutação elevadas, o que lhes permite escapar aos sistemas de manutenção do genoma que detetam e corrigem defeitos no DNA e/ou induzem a senescência ou apoptose das células mutadas.

De uma forma geral, as alterações genéticas que ocorrem nas células tumorais podem resultar da: 1) inativação de genes pró-apoptóticos, 2) inativação de genes envolvidos na reparação do DNA, 3) ativação de oncogenes e/ou 4) inativação de genes supressores de tumores (Jackson & Bartek, 2009; Kastan, 2008; Negrini *et al.*, 2010; Salk *et al.*, 2010; Sigal & Rotter, 2000).

1.1.2 Inflamação

A inflamação corresponde a um dos mecanismos essenciais para a ativação e perpetuação tumoral. Assim, as células inflamatórias secretam fatores de crescimento, fatores de sobrevivência que limitam a morte celular, fatores proangiogénicos e enzimas que modificam a matriz extracelular estimulando a proliferação de células cancerígenas, a capacidade de induzir a angiogénese e promovendo a transição epitelial-mesenquimal. Destas fazem parte fatores de crescimento tumorais e angiogénicos, como EGF e VEGF, fatores proangiogénicos como FGF2, quimiocinas e citoquinas que amplificam a inflamação ao produzir enzimas que degradam a matriz extracelular, incluindo MMP-9 e outras metaloproteínases, catepsinas e heparanases, ajudando as células cancerígenas no processo de invasão e metastização. As células cancerígenas hipóxicas secretam moléculas para recrutamento e indução de proliferação de células inflamatórias, maioritariamente macrófagos. Estes por sua vez libertam espécies reativas de oxigénio (ROS), o que acelera o aparecimento de mutações em células cancerígenas adjacentes (DeNardo *et al.*, 2010; Grivennikov *et al.*, 2010; Qian & Pollard, 2010).

1.2 Iniciação e crescimento primário do tumor

1.2.1 Autossuficiência nos sinais de crescimento

A proliferação das células dentro de um organismo depende do efeito promovido por hormonas e fatores de crescimento. Tecidos ditos normais controlam a produção e libertação dos mesmos, assegurando a manutenção da homeostasia em termos de número de células bem como a manutenção da arquitetura e função do tecido. Muitos fatores de crescimento transportam sinais que se ligam a recetores de superfície normalmente contendo domínios de tirosina-quinase que se localizam na região intracelular. Estes domínios emitem sinais que

regulam a progressão através do ciclo celular, o crescimento das células e muitas vezes influenciam também a sua sobrevivência e o seu metabolismo (Hanahan & Weinberg, 2011).

O conhecimento acerca destes mecanismos é ainda muito limitado pois experimentalmente é difícil de aceder a esta sinalização parácrina e não há biodisponibilidade de fatores de crescimento (Hanahan & Weinberg, 2011).

Alternativamente, as células cancerígenas: I) têm a capacidade de produzir ligandos dos fatores de crescimento aos quais respondem com recetores cognatos, resultando numa estimulação autócrina, ativando permanentemente vias de sinalização intracelulares que respondem a esses sinais por feedback negativo; II) enviam sinais às células normais do estroma que suporta o tumor e estas retribuem com vários fatores de crescimento; III) têm a capacidade de aumentar os níveis de proteínas recetoras na sua superfície (Cheng *et al.*, 2008; Bhowmick *et al.*, 2004). O constante estímulo destas vias de sinalização nas células tumorais leva ao desmesurado crescimento e divisão celular dentro do próprio tumor (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.2.2 Insensibilidade a sinais inibitórios do crescimento

Durante a divisão celular existem pontos de controlo ou *checkpoints*, onde ocorrem mecanismos de verificação de erros (i.e. mutações) impeditivos para a progressão do ciclo celular. Os *checkpoints* mais importantes são: G1, S, G2 e M (Figura 1.1) (Weinberg, 2014). As proteínas que controlam este processo de verificação são consideradas proteínas supressoras de tumores, pois ao evitar que uma célula com mutações progrida no ciclo celular impedem que estes erros se perpetuem e que degenerem em células tumorais. Em alguns tipos de cancro, estas proteínas supressoras encontram-se alteradas (i.e. mutadas), ocorrendo uma desregulação de tal forma que várias anomalias severas se vão acumulando (Hanahan & Weinberg, 2011).

Um outro aspeto relacionado com o controlo da divisão celular resulta da inibição de crescimento por contato célula–célula que ocorre em todas as células. De fato, as células tumorais, tanto *in vitro* como *in vivo*, perdem esta capacidade, continuando a dividir-se de forma independente, sugerindo que *in vivo* este mecanismo esteja relacionado com a manutenção da homeostasia do tecido normal (Hanahan & Weinberg, 2011).

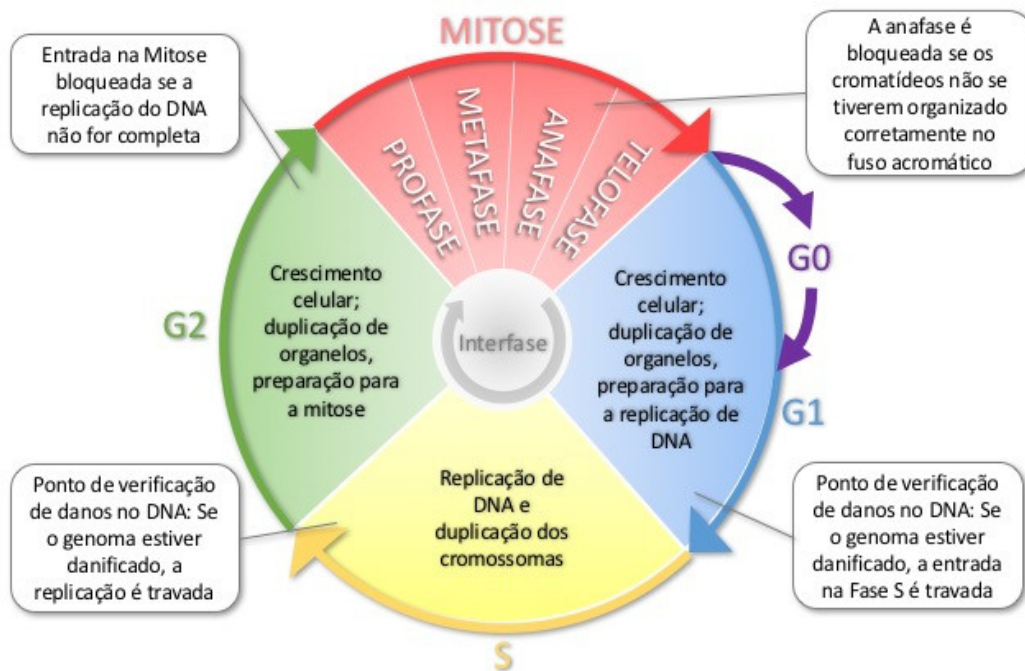


Figura 1.1. Ciclo celular de mamíferos e principais checkpoints. O ciclo celular é dividido em quatro fases – G1, S, G2 e M. Uma quinta fase, G0, corresponde às células que permanecem indefinidamente na interfase, onde a divisão celular está em suspenso. Quando estas células recebem estímulos suficientes entram na fase G1 e prosseguem no ciclo. A mitose é um processo de divisão celular no qual a partir de uma célula se originam duas com o mesmo número de cromossomas. Os checkpoints são responsáveis pelo controlo celular, uma célula tem de cumprir todos os requisitos de uma fase para passar à próxima, senão o ciclo é bloqueado. *Adaptado de “The Biology of Cancer”, Weinberg, 2014.*

1.2.3 Resistência a morte celular programada

De uma forma geral, todas as células têm a capacidade de ativar um mecanismo de autodestruição, denominado de apoptose, sempre que ocorrem erros irreparáveis (através dos checkpoints previamente referidos) ou quando é atingido o número crítico de replicações para uma célula (podendo em seguida ocorrer apoptose ou senescência). No entanto, as células tumorais conseguem escapar a este mecanismo, mesmo que ocorram anomalias severas. Isto pode acontecer devido à alteração dos mecanismos que detetam os danos, defeitos na sinalização a jusante ou nas proteínas envolvidas na apoptose (Hanahan & Weinberg, 2011).

Uma das proteínas mais sensíveis na deteção de mutações e capaz de induzir apoptose é a P53, que atua no checkpoint G1 antes que ocorra a replicação do DNA (Junttila & Evan, 2009).

1.2.4 Imortalização Replicativa

Tal como previamente descrito, todas as células de tecidos normais têm uma capacidade limitada de se dividir antes de entrarem em senescência ou apoptose. De fato, assim é porque os telómeros encurtam a cada divisão celular e, quando atingem um tamanho crítico, a célula

pára de se dividir e entra em senescência ou apoptose (Hanahan & Weinberg, 2011).

Uma das proteínas fundamentais neste processo é a telomerase, uma ribonucleoproteína com atividade de transcriptase reversa que adiciona sequências repetitivas aos telómeros existentes no topo dos cromossomas (Blasco, 2005; Shay & Wright, 2000) e cuja atividade se vai perdendo ao longo das várias divisões celulares, deixando de estar ativa na maioria das células depois do nascimento (Hanahan & Weinberg, 2011).

As células tumorais têm a capacidade de reativar as telomerasas, que aumentam o comprimento dos telómeros, podendo assim adquirir potencial replicativo ilimitado, sem entrarem em senescência e gerando tumores macroscópicos (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.2.5 Desregulação energética celular

Em condições de aerobiose, as células não tumorais processam a glicose a piruvato no citosol e a dióxido de carbono na mitocôndria, num processo denominado fosforilação oxidativa. Em condições de anaerobiose a glicólise é prosseguida pela fermentação láctica (Figura 1.2) (Hanahan & Weinberg, 2011).

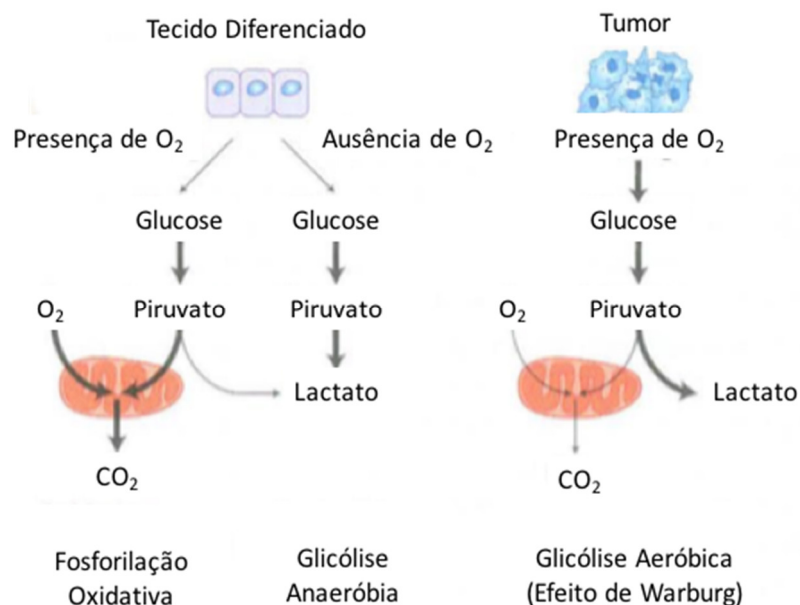


Figura 1.2. Mecanismo de produção energética em células tumorais recorrendo a glicólise aeróbica, um fenómeno denominado por efeito de Warburg. Na presença de oxigénio, células normais, metabolizam a glicose a piruvato via glicólise, sendo este depois incorporado no ciclo de Krebs onde é necessário como aceitador final de electrões durante a fosforilação oxidativa. Quando o oxigénio é limitante, as células não tumorais metabolizam o piruvato a lactato, sendo a glicólise assegurada pela conversão cíclica de NADH a NAD^+ . As células tumorais independentemente da presença ou ausência de oxigénio convertem glicose a lactato. *Imagem adaptada de molecular cell biology, 7ª edição.*

No entanto, as células tumorais têm um metabolismo de certa forma diferente, isto é, mesmo na presença de oxigénio o seu metabolismo é predominantemente anaeróbio, ocorrendo glicólise e fermentação láctica - efeito de Warburg (Warburg, 1956).

Este metabolismo é aparentemente contraproducente, porque as células tumorais têm de compensar pela mais baixa eficiência energética proporcionada pela glicólise, uma vez que menos piruvato é enviado para as mitocôndrias que consomem oxigénio, em relação à fosforilação oxidativa mitocondrial. No entanto, este mecanismo representa uma vantagem importante para as células tumorais pois a glicólise permite a produção de intermediários que podem ser utilizados em vias anabólicas para síntese de DNA, RNA, aminoácidos/proteínas e lípidos necessários para a proliferação celular ativa que se observa nestas células (Hanahan & Weinberg, 2011).

Este mecanismo permite ainda um aproveitamento energético em diferentes subpopulações de células tumorais. Assim, existem subpopulações dependentes da glicose que segregam lactato, enquanto outras importam e utilizam o lactato como a sua principal fonte de energia (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.2.6 Eludindo o sistema Imunitário

As células e os tecidos são constantemente monitorizados pelo sistema imunitário, responsável por reconhecer e eliminar a maioria das células tumorais e tumores em fase inicial de crescimento que não tenham sido induzidos por vírus (Hanahan & Weinberg, 2011).

De fato, a importância do sistema imunitário na proteção do organismo verifica-se pela existência de um aumento de certo tipo de tumores em indivíduos imunocomprometidos (Vajdic & van Leeuwen, 2009). Além disso, em experiências onde se expuseram ratinhos imunocomprometidos a carcinogéneos, verificou-se uma maior frequência de tumores relativamente à respetiva estirpe selvagem (WT) submetida ao mesmo tratamento (Vajdic & van Leeuwen, 2009). As principais imunodeficiências associadas ao desenvolvimento tumoral foram defeitos no desenvolvimento ou função dos linfócitos T citotóxicos, das células T auxiliares e das células NK (*natural killer*) (Hanahan & Weinberg, 2011; Vajdic & van Leeuwen, 2009).

1.3 Progressão Tumoral

1.3.1 Indução de angiogénese

Um dos mecanismos essenciais para o desenvolvimento tumoral é o da angiogénese. De fato, é através da neovascularização que um tumor em expansão obtém para seu benefício o oxigénio e os nutrientes necessários ao seu crescimento (Hanahan & Weinberg, 2011).

Nesse sentido, durante a progressão tumoral, novos vasos sanguíneos emergem a partir de vasos sanguíneos quiescentes normais sustentando a expansão neoplásica (Hanahan & Folkman, 1996). Existem assim vários reguladores angiogénicos, proteínas de sinalização, cuja função é ligarem-se a proteínas de superfície das células endoteliais, diminuir a produção de fatores inibitórios da angiogénese como TSP-1 (Trombospondina 1) e aumentar a produção de fatores pró-angiogénicos como VEGF-A (Fator de crescimento vascular endotelial A) (Baeriswyl & Christofori, 2009; Bergers & Benjamin, 2003).

1.3.2 Invasão local de tecidos e metastização

Para que ocorra a metastização de um tumor, é necessário que: 1) ocorra entrada de células cancerígenas nos vasos sanguíneos, processo denominado por intravasão, 2) haja transporte das células cancerígenas na corrente sanguínea, 3) ocorra extravasão, isto é, adesão à parede dos vasos sanguíneos e entrada das células tumorais para tecidos/órgãos distantes do tumor primário, 4) haja estabelecimento das células cancerígenas nos tecidos/órgãos, e por fim, 5) haja colonização de outros tecidos/órgãos para formação de macrometástases. Assim, neste processo deverá ocorrer em primeiro lugar uma transição epitelial-mesenquimal (TEM), sendo para isso essencial que ocorra diminuição da expressão de E-caderina, proteína que mantém as células epiteliais aderidas umas às outras (Berx & van Roy, 2009; Cavallaro & Christofori, 2004). Neste processo é também importante que ocorra a degradação de matriz extracelular através da secreção de enzimas proteolíticas tais como metaloproteases da matriz e do aumento de expressão do recetor do ativador de plasminogénio uroquinase (uPAR) e do ativador do plasminogénio uroquinase (uPA) (Hanahan & Weinberg, 2011; Lamouille *et al.*, 2014). Depois, para que as células tumorais invadam outros locais, nomeadamente vasos sanguíneos e outros tecidos, é necessário que ocorra um aumento da expressão de integrinas, que são recetores transmembranares essenciais para o contato com outros tecidos e para a invasão (Hanahan & Weinberg, 2011; Lamouille *et al.*, 2014).

Numa segunda fase, ocorre entrada de células cancerígenas nos vasos sanguíneos, deslocação das mesmas na corrente sanguínea, entrada para tecidos ou órgãos num local distante do tumor primário, estabelecimento das células cancerígenas e posterior colonização para formar macrometástases capazes de destruir o tecido circundante (Weinberg, 2014). Não estão completamente esclarecidos quais os fatores que conduzem a uma preferência de invasão de alguns tumores para determinados órgãos. No entanto, segundo Steven Paget é necessário haver um microambiente recetivo para receber as células tumorais e ocorrer metastização. Na sua teoria “Seed and Soil”, disse existirem “solos” (nichos) mais favoráveis para a disseminação de “sementes” (células tumorais) do que outros, refutando várias hipóteses que afirmavam que as células tumorais presentes no sistema venoso é que iriam determinar o local de metastização (Psaila & Lyden, 2009).

Embora as células tumorais atinjam a vasculatura de todos os órgãos, apenas se desenvolvem metástases em alguns deles (Psaila & Lyden, 2009). Em certos casos, como no carcinoma do cólon, há um local preferencial de metastização. A forte tendência de metastização para o fígado pode ser explicada pelo fato de as células tumorais abandonarem o intestino pela veia portal e se estabelecerem nos seus capilares, sendo constantemente alimentadas por esta veia. Enquanto que a maioria do sangue nos tecidos é drenado para o coração e depois para os pulmões, no caso do baço e do intestino a organização das veias que os drenam é um pouco diferente. O sangue venoso vai diretamente para o fígado através da circulação portal, antes de ser enviado para o coração (Weinberg, 2014).

2. Cancro colorretal

2.1 Epidemiologia

Segundo a base de dados da agência internacional de investigação do cancro (*International Agency for Research on Cancer - IARC*), GLOBOCAN 2012, estima-se que existam mais de 100 diferentes tipos de cancro em todo o mundo.

Segundo a GLOBOCAN, surgiram 14,1 milhões de novos casos e ocorreram 8,2 milhões de mortes relacionadas com cancro em 2012. Comparativamente a dados anteriores estes números têm vindo a aumentar, tendo sido, estimado em 2008 o aparecimento, em 2012, de 12,7 milhões de novos casos e 7,6 milhões de mortes, respetivamente.

Neste contexto, o cancro colorretal (CCR) é uma das neoplasias mais comuns em países desenvolvidos, sendo inclusive, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o tumor

maligno mais frequente na UE. Assim, estima-se que cerca de 3% das mulheres e 4% dos homens europeus irão desenvolver esta patologia até aos 75 anos.

A idade de diagnóstico mais frequente é na faixa etária dos 65-74 anos, sendo que a idade média de diagnóstico é aos 68 anos (Figura 1.3) (SEER Cancer Statistics Review, 2016). Cerca de 90% dos casos dos CCR são diagnosticados a partir dos 50 anos. Com o avançar da idade aumenta a prevalência de CCR, verificando-se o aumento das taxas de incidência e mortalidade à medida que se avança na faixa etária (Melo & Braga, 2003).

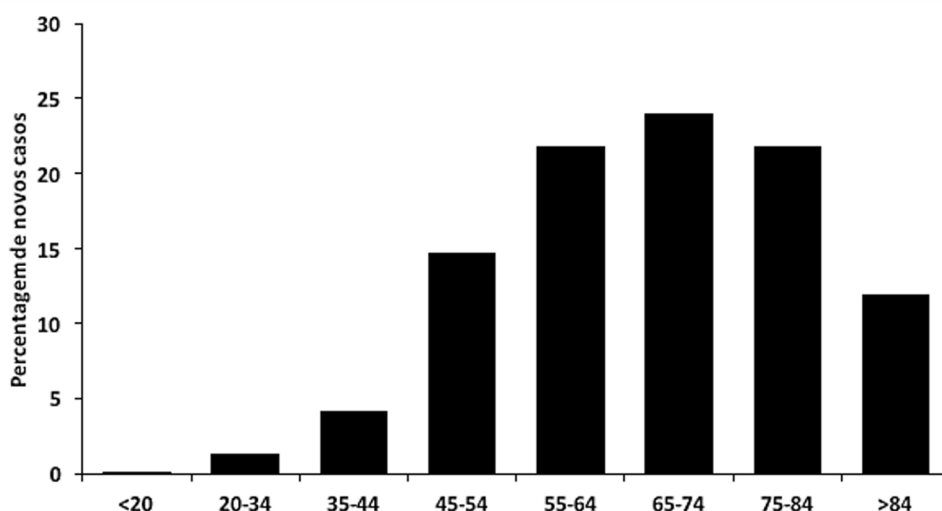


Figura 1.3. Percentagem de novos casos de CCR diagnosticados por faixa etária. Gráfico adaptado de SEER Cancer Statistics Review, 2016

Em Portugal, a mortalidade por CCR aumentou de forma significativa nas últimas décadas, constituindo por isso a segunda causa de morte por tumor maligno no nosso país; apenas ultrapassado pelo cancro do pulmão nos homens e com prevalência semelhante à do cancro da mama nas mulheres (Figura 1.4).

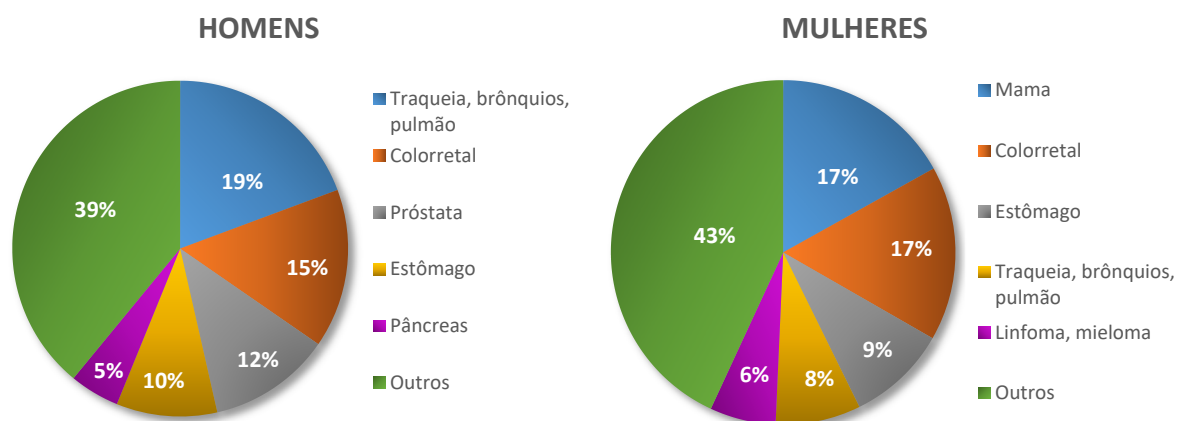


Figura 1.4. Percentagem de óbitos em ambos os sexos por ano em Portugal, devidos ao cancro. Gráficos adaptados de WHO cancer country profiles, 2014.

A incidência do CCR em Portugal é ligeiramente superior nos homens em relação às mulheres (Figura 1.5). Curiosamente, enquanto o cancro do cólon é mais frequente nas mulheres, o cancro do reto é mais frequente nos homens, não existindo uma justificação clara para esta diferença.

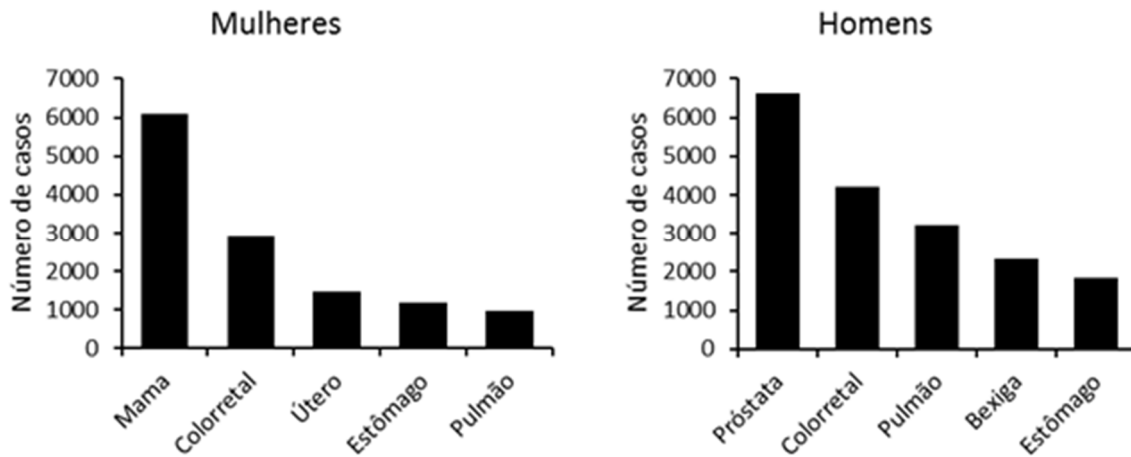


Figura 1.5. Percentagem de incidência de cancro em ambos os sexos, por ano, em Portugal. Gráficos adaptados de WHO cancer country profiles, 2014.

2.2 Anatomia do Intestino

O cólon e o reto correspondem à parte terminal do aparelho digestivo, encontrando-se distalmente ao íleo terminal (e válvula ileocecal). De uma forma geral, o cólon divide-se em quatro partes: cólon ascendente (desde o cego até ao ângulo hepático), cólon transverso (desde o ângulo hepático até ao ângulo esplénico), cólon descendente e sigmóide. O reto vai desde o sigmóide até ao ânus (Figura 1.6).

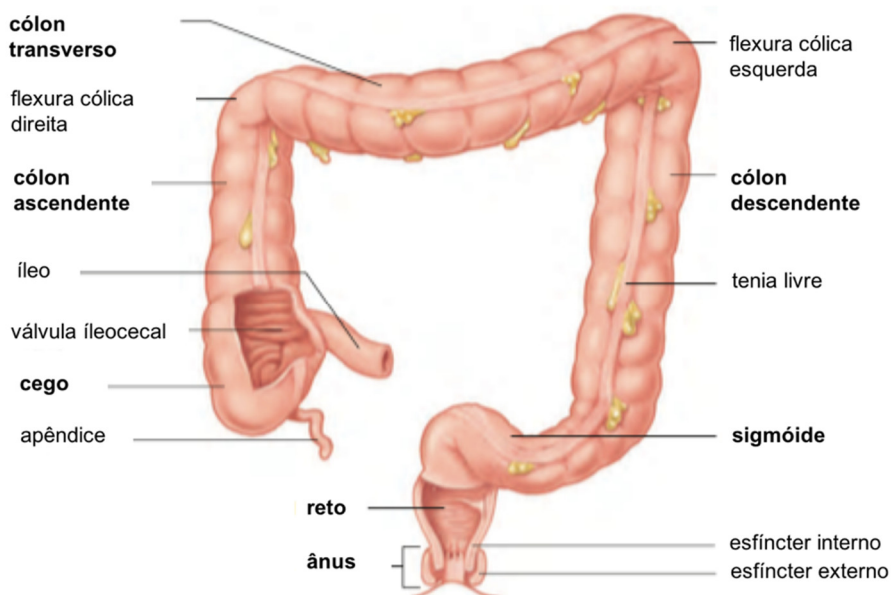


Figura 1.6. Anatomia do Intestino grosso. Imagem adaptada de Seeley's Essential of Anatomy & Physiology

Relativamente às dimensões, o cólon apresenta um tamanho de aproximadamente 120-150 cm, enquanto o reto mede aproximadamente 10-12 cm. O diâmetro médio do cólon e reto é de cerca de 6,5 cm, sendo variável dependendo da localização mais proximal (Forno, 2009; VanPutte *et al.*, 2016).

Histologicamente, a mucosa do intestino grosso não tem pregas nem vilosidades, exceto no reto; as criptas intestinais são abundantes e a lâmina própria é rica em células de origem linfóide e nódulos que se estendem até à camada da submucosa. A camada muscular é constituída por uma camada circular interna e uma camada longitudinal externa de músculo liso. A camada externa está organizada em 3 bandas conhecidas por *tenia coli*. A camada mais externa, a serosa, é constituída por tecido adiposo (Figura 1.7). No reto a mucosa intestinal é substituída por epitélio pavimentoso estratificado (Junqueira & Carneiro, 2004)

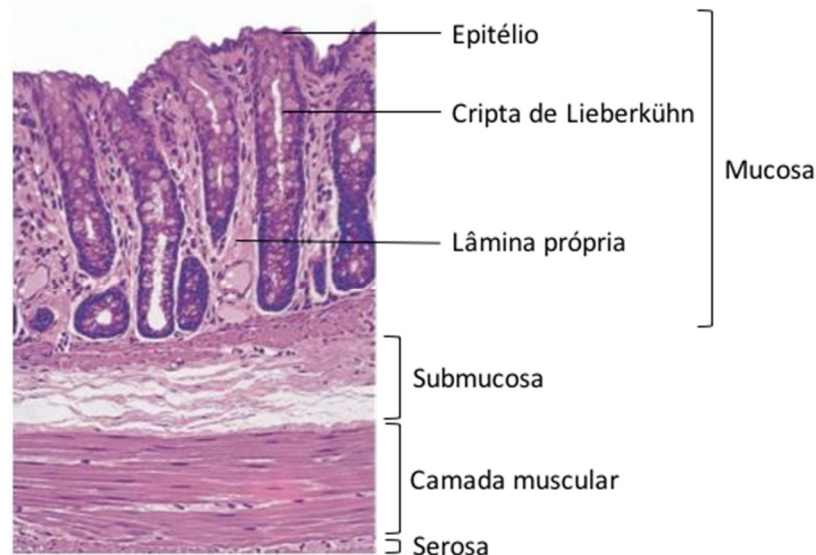


Figura 1.7. Corte do intestino grosso com as suas diversas camadas. Da camada mais interna para a mais externa temos a mucosa, a submucosa, a camada muscular e a serosa. *Imagem adaptada de Histologia Básica, Junqueira & Carneiro, 2004.*

2.3 Pólipos não-neoplásicos/neoplásicos

Os pólipos são estruturas que se projetam na superfície da mucosa intestinal e podem ser classificados como não-neoplásicos ou neoplásicos. Os pólipos não neoplásicos não têm potencial de malignidade, podem originar-se devido à maturação anormal da mucosa intestinal, inflamações, hiperplasias ou metaplasias (Forno, 2009; Neto *et al.*, 2011).

Os pólipos neoplásicos são característicos de adenomas, precursores dos adenocarcinomas, e surgem como resultado de displasias proliferativas do epitélio. Os pólipos adenomatosos correspondem a 70% de todos os pólipos encontrados no intestino e são lesões pré-malignas

que progridem lentamente podendo originar um carcinoma num intervalo de tempo que vai dos 10 aos 15 anos (Forno, 2009; Neto *et al.*, 2011).

A probabilidade de desenvolver uma lesão neoplásica é tanto maior quanto maior for a dimensão do pólipó. Pólipos com menos de 1 cm de dimensão raramente darão origem a uma neoplasia num curto espaço de tempo enquanto que, no caso de pólipos de dimensão superior a 1cm, a probabilidade destes se tornarem malignos e darem origem a um possível CCR é de 10-25% num curto espaço de tempo. Por esta razão, o controlo e os rastreios são considerados fundamentais na deteção de lesões pré-neoplásicas no intestino grosso, para prevenção do surgimento de complicações e para um elevado sucesso das terapias aplicadas (Forno, 2009; Neto *et al.*, 2011).

A prevalência de pólipos adenomatosos aumenta consideravelmente com a idade, sendo de 20 a 25% aos 50 anos e subindo para 50% na faixa etária dos 75-80 anos. A grande maioria dos CCR corresponde à forma esporádica (80-90%), embora estes possam ser também herdados, como no caso da polipose adenomatosa familiar (PAF; ocorre em 5-10% dos casos) ou como no caso do CCR hereditário não polipoide (CCRHNP; ocorre em 5-10% dos casos) (Forno, 2009).

2.4 Carcinogénese no CCR

O CCR é o tipo de cancro mais bem estudado a nível molecular e histopatológico, o que em parte se deve ao seu desenvolvimento geralmente lento, estimado em vários anos, bem como à facilidade de visualização e divisão nos diferentes estadios (Weinberg, 2014).

Na figura 1.8 estão representados os principais eventos moleculares associados ao aparecimento de cancro colorretal (iniciação, progressão e invasão). Cerca de 70-85% dos casos de CCR desenvolvem-se através da chamada via tradicional, que começa com o aparecimento de uma cripta aberrante displásica, uma lesão microscópica na mucosa que antecede o aparecimento da lesão macroscópica - o pólipó (Smith *et al.*, 1999). Uma mutação no gene *adenomatous polyposis coli* (APC), contribui para a transformação das criptas aberrantes em adenomas (Fearnhead *et al.*, 2001).

O APC é um gene supressor de tumor e a sua inativação leva ao aumento dos níveis celulares de β -catenina. O APC forma um complexo multiproteico com a axina, GSK-3 β (glucose sintase quinase) e β -catenina. Esta associação permite que GSK fosforile quatro resíduos amina terminais da β -catenina que é assim marcada para destruição no proteossoma.

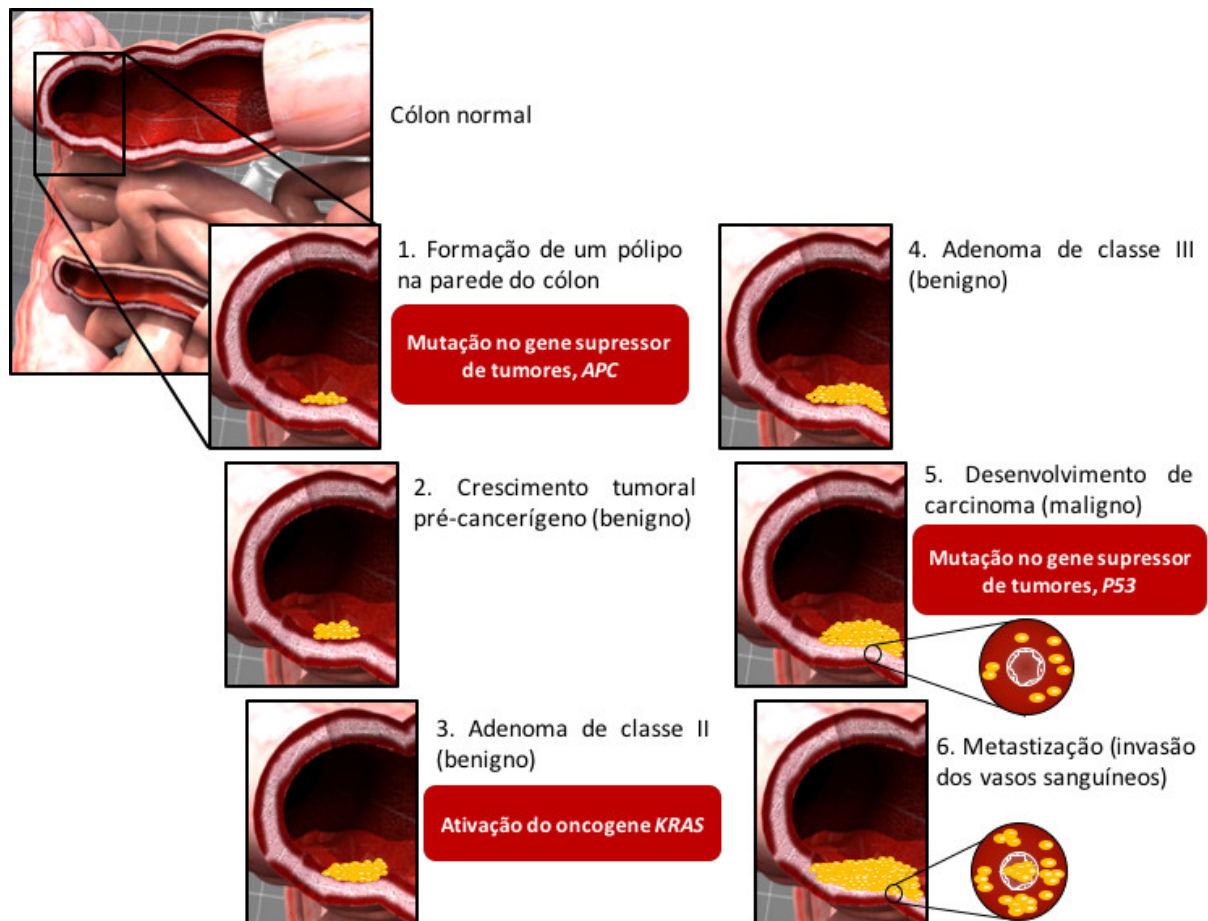


Figura 1.8. Desenvolvimento do cancro colorretal e principais alterações genéticas. Uma mutação no gene supressor de tumores *APC* faz com que as células se dividam dando origem a pólipos. Mutações subsequentes levam à ativação do oncogene *KRAS* e perda do gene supressor de tumores *P53*. Juntas, estas e outras alterações, originam carcinomas. As células cancerígenas são capazes de penetrar a membrana basal que envolve o tecido e entrar na corrente sanguínea e metastatizar para outros tecidos. *Imagem adaptada de Lodish Molecular Cell Biology.*

Assim, o *APC* é essencial para que ocorra degradação de β -catenina e, na sua ausência, há acumulação intracelular da proteína (Weinberg, 2014). Esta, por sua vez, é translocada para o núcleo e origina uma constante ativação da *Wnt*, uma via associada a crescimento, apoptose e diferenciação celular (Gregorieff *et al.*, 2005). No núcleo da célula, a β -catenina forma um complexo com o TCF (*T cell factor*), um fator de transcrição que regula a proliferação celular, aumentando a transcrição de genes de resposta a *Wnt* (Fearnhead *et al.*, 2001) (Figura 1.9). No caso do CCR, a sobre-expressão de β -catenina está fortemente correlacionada com a carcinogénese, promovendo um estado celular indiferenciado nas células basais ao invés de se diferenciarem e especializarem (Weinberg, 2014). Por outro lado, as células com deficiência de *APC* não são capazes de detetar anomalias cromossómicas durante a metafase, podendo originar instabilidade cromossómica (IC) (Draviam *et al.*, 2006).

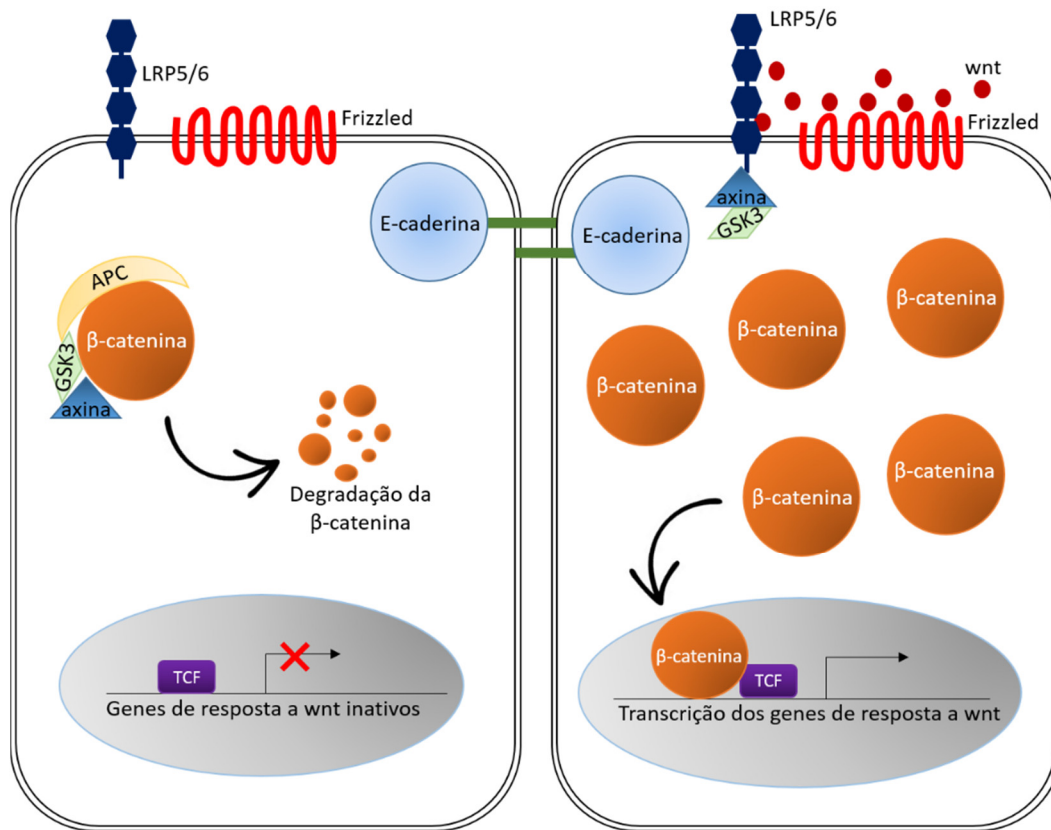


Figura 1.9. Via de sinalização celular Wnt. Na ausência de wnt, a proteína citoplasmática β -catenina é degradada devido à ação de proteínas do complexo de axina, responsáveis pela fosforilação sequencial da região amina terminal dessa proteína. A β -catenina ao ser reconhecida por subunidades de ubiquitina é marcada e é degradada no proteossoma, impedindo a ligação ao TCF (T cell factor). A via de sinalização é ativada quando wnt se liga aos recetores transmembranares *frizzled* ou LRP5/6 (*lipoprotein receptor related protein*) resultando na fosforilação, ativação e recrutamento dos complexos de axina aos seus recetores. Estes eventos levam à estabilização da β -catenina que se acumula no citoplasma e acaba por migrar para o núcleo onde se liga ao TCF ativando a transcrição de genes de resposta a wnt. *Imagem adaptada de Fearnhead et al., 2001.*

Um outro evento que ocorre em cerca de 35-42% dos adenocarcinomas colorretais é a mutação do gene *KRAS* (Jen *et al.*, 1994).

O *KRAS* é um proto-oncogene que codifica para uma proteína que se liga ao GTP. A sua mutação nestes casos compromete a sua atividade de GTPase, que no processo normal regula, por mecanismos de feedback negativo, a transdução de sinal do meio extracelular para o núcleo e assim promove o crescimento, divisão, maturação e diferenciação celular. Sem esta atividade, este mecanismo de *feedback* deixa de existir, ocorrendo um sinal contínuo e autónomo que promove a proliferação celular (Hanahan & Weinberg, 2011; Leslie *et al.*, 2002). As mutações nos genes *DCC*, *SMAD2* e *SMAD4* contribuem para o avanço na via tradicional, que se caracteriza pela acumulação de alterações moleculares ao longo do processo de carcinogénese (figura 1.8), uma vez que interferem na apoptose e na regulação do crescimento celular (Weinberg, 2014).

Por último, a mutação do gene supressor de tumores, *P53*, marca a transição para doença invasiva, verificando-se esta alteração em cerca de 50-75% dos doentes com CCR (Vogelstein & Kinzler, 1993).

2.5 Fatores de Risco

O risco de desenvolver CCR depende, para além dos fatores genéticos, de vários outros fatores ambientais, em particular os relacionados com a dieta e o estilo de vida dos indivíduos, já reportados e amplamente estudados. Assim, sabe-se que o risco de desenvolver CCR aumenta com a idade, sendo que cerca de 91% dos casos são diagnosticados em indivíduos com mais de 50 anos, e que a média de idades em que é realizado o diagnóstico é de 62 anos (Cotter *et al.*, 2008). Por outro lado, dietas ricas em açúcar, gordura, carnes vermelhas e pobres em fibras, associadas a uma elevada ingestão de bebidas alcoólicas, estão associadas a um maior risco de desenvolver CCR. A obesidade e o sedentarismo são dois fatores etiológicos do CCR a ter em conta, uma vez que 1/3 dos doentes não pratica qualquer desporto e tem um elevado índice de massa corporal (Forno, 2009; Guedes *et al.*, 2010). As substâncias carcinogénicas presentes no tabaco são transportadas pela corrente sanguínea e também estas aumentam o risco (em aproximadamente 13%) de desenvolver CCR. A quantidade de maços por dia/ano e a duração do hábito aumentam significativamente o risco de desenvolver CCR (Zhao *et al.*, 2010).

Por outro lado, existem outras patologias que também potenciam o risco de desenvolver CCR como a diabetes, principalmente tipo II. O constante estado de hiperinsulinémia faz com que haja síntese de recetores de IGF-1 e inibição da apoptose ao nível da mucosa do cólon (He *et al.*, 2010). Um outro fator muito importante é a hereditariedade, estimando-se que esta seja responsável por 15 a 25% dos CCR. O fator hereditariedade eleva o risco para o dobro ou triplo, principalmente se a doença afetar familiares de primeiro grau (Fauci *et al.*, 2008, Leslie & Steele, 2002). Neste contexto, relativamente ao CCR descreveram-se duas síndromes autossómicas dominantes muito importantes: a Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) e o Cancro Colorretal Hereditário não associado a Polipose (CCRHNP) (Fauci *et al.*, 2008).

No caso da PAF, mutações na linha germinal do gene *APC* resultam em proteínas truncadas com função anómala (Fearnhead *et al.*, 2001). A PAF é diagnosticada através da deteção de centenas ou milhares de pólipos no cólon ou no reto do paciente e o risco de desenvolver cancro é tanto maior quanto maior o número de pólipos encontrados (Fearnhead *et al.*, 2001).

No caso do CCRHNP ou síndrome de Lynch ocorre uma mutação num dos genes de reparação de incompatibilidades ao nível do DNA como o *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ou *PMS2*, o que leva a uma instabilidade cromossómica e subsequentemente ao desenvolvimento do CCR (Vasen *et al.*, 2007). Nestes casos, o diagnóstico clínico baseia-se no preenchimento de todos os critérios de Amesterdão: o paciente tem de ter três ou mais familiares com tumor confirmado, sendo um deles familiar de primeiro grau dos outros dois, com pelo menos duas gerações sucessivas afetadas e pelo menos um tumor detetado antes dos 50 anos de idade (Cohen & Leininger, 2014).

2.6 Rastreio

Apesar do CCR ser uma doença com elevada morbidade, o longo processo de carcinogénese e a existência de lesões precursoras benignas oferecem uma janela de oportunidade para a implementação precoce de uma terapêutica, contribuindo para o aumento das taxas de sucesso do tratamento (Kasztelan-Szczerbińska *et al.*, 2008).

Quando o diagnóstico é feito nas fases mais avançadas da doença, já com sintomas associados (sangue nas fezes, cólicas, dor abdominal, alterações do trânsito intestinal, fraqueza, cansaço e em alguns casos anemia), o prognóstico dos doentes piora significativamente (Cancer Research UK, 2016). Compreende-se assim a importância do rastreio do CCR que, sendo efetuado ainda numa fase pré-clínica, permite a deteção precoce de pólipos ou lesões benignas, impedindo a sua progressão.

Na população em geral, considerada como grupo de baixo risco, deverão ser realizados exames de pesquisa de sangue oculto nas fezes, testes fecais de DNA, palpação retal, clister opaco com duplo contraste ou ainda investigação endoscópica, quando existem suspeitas de doença gastrointestinal (Kuipers *et al.*, 2015).

Sigmoidoscopias ou colonoscopias permitem a realização de biópsias para a caracterização histopatológica de lesões suspeitas e são normalmente efetuadas a partir dos 50 anos. Nos indivíduos pertencentes ao grupo de maior risco (com história familiar ou pessoal de CCR ou de pólipos adenomatosos), a investigação endoscópica, permite a localização do tumor e identificação de outras neoplasias (Leslie & Steele, 2002).

Indivíduos com um familiar de primeiro grau a quem foi diagnosticado CCR antes dos 50 anos é aconselhado o rastreio com endoscopia baixa a iniciar 10 anos antes da idade do familiar na altura do diagnóstico (Hobbs, 2000).

2.7 Estadiamento da Doença

O sistema de estadiamento tumor-nódulo-metástases (TNM) é amplamente utilizado para prever o prognóstico de pacientes com CCR e para orientar a terapia adjuvante após cirurgia (Li *et al.*, 2014). É atualmente o sistema mais utilizado para caracterização de tumores e foi desenvolvido pela união internacional contra o cancro (UICC) em 1958 (Giardiello *et al.*, 2014). São avaliados três critérios, o tamanho do tumor primário (T), a existência de células tumorais nos nódulos linfáticos (N) e se o cancro se espalhou e metastizou para outros órgãos (M) (Cancer Research UK, 2016).

O tratamento do CCR é baseado no estadiamento atribuído a cada paciente, sendo que este é tanto mais agressivo quanto o aumento do estadio. Para doentes de estadio 0 e I, a cirurgia (polipectomia ou colonoscopia de excisão local) é, na maioria dos casos, suficiente. Caso o pólipso não tenha sido retirado por completo, pode-se recorrer a uma outra cirurgia para remover as várias partes ou, no caso de o cancro não estar confinado a um pólipso, recorrer a colectomia parcial (American Cancer Society).

Nos estadios II e III, a cirurgia para remover a seção do cólon afetada e os nódulos linfáticos proximais poderá ser o único tratamento necessário, mas se o cancro tiver um potencial de recorrência elevado recomendar-se-á quimioterapia adjuvante (5-FU, leucovorin ou capecitabine no estadio II e FOLFOX ou CapeOx no estadio III) e/ou radioterapia (American Cancer Society).

Por fim no estadio IV, a cirurgia é realizada para remoção da seção afetada do colon, nódulos linfáticos e áreas afetadas por metástases ajudando a prolongar a vida do paciente ou mesmo com potencial de cura. A quimioterapia é realizada antes e/ou depois das cirurgias. Se o tumor é demasiado grande para ser removido, a quimioterapia é dada com o objetivo de diminuir o tumor. Se o cancro se espalhou tanto que se desconsidera a cirurgia, então a quimioterapia é o principal tratamento. A radioterapia poderá ser uma opção para alívio dos sintomas (American Cancer Society).

No caso do cancro do reto o tratamento é mais agressivo em estadios iniciais da doença sendo aplicada após cirurgia, quimioterapia combinada e radioterapia (American Cancer Society).

3. Proteína Gla da Matriz (MGP)

3.1 O que é a MGP?

Originalmente, a MGP foi isolada a partir do osso de bovinos (em 1983) (Price *et al.*, 1983) acabando no entanto por ser posteriormente detetado o seu mRNA na cartilagem, dentina e vários tecidos moles (como o coração, rins, baço e pulmões) de diversas espécies de vertebrados (Conceição *et al.*, 2002; Hale *et al.*, 1988). A MGP é uma proteína de matriz extracelular sintetizada por condrócitos e fibroblastos (Cancela & Price, 1992; Hale *et al.*, 1988), células vasculares do músculo liso (Shanahan *et al.*, 1993), cemento dos dentes (Hashimoto *et al.*, 2001) e células da rede trabecular do olho (Gonzalez *et al.*, 2000; Tomarev *et al.*, 2003). A MGP tem um peso molecular de aproximadamente 14KDa e 84 aminoácidos (no caso da proteína humana), 5 dos quais correspondem a ácido γ -carboxiglutâmico (GLA) originados pós-tradução a partir de aminoácidos glutamato específicos (Cancela *et al.*, 1997; Conceição *et al.*, 2002; Price, 1988).

A estrutura primária da MGP (Figura 1.10) inclui um péptido sinal, um domínio de fosforilação, um local de reconhecimento da γ -glutamil carboxilase e um domínio Gla (onde estão inseridos 4 dos 5 resíduos GLA) na proteína madura, sendo que cada uma destas regiões é codificada por um exão diferente no gene correspondente (Cancela *et al.*, 1990; Conceição *et al.*, 2002; Fazenda *et al.*, 2012). Na figura 1.11 estão representadas, por ordem cronológica, algumas das principais descobertas relativas à MGP.

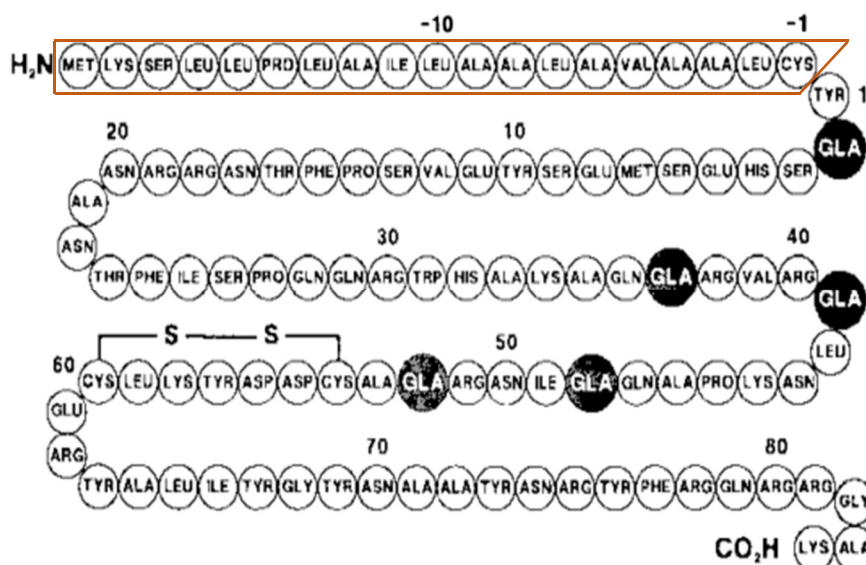


Figura 1.10. Estrutura proteica da pré-proteína MGP humana. O péptido sinal está delimitado pelas linhas cor de laranja, a preto estão representados os resíduos Gla. *Imagem adaptada de Price, 1988.*

É através dos cinco resíduos Gla que a MGP, a exemplo de outras proteínas da família das proteínas dependentes da vitamina K (DVK), se pode ligar a íões cálcio e cristais de hidroxiapatite (Price, 1988). A MGP é uma proteína pertencente à família DVK, sendo esta vitamina um cofator essencial nas modificações pós-tradução de proteínas envolvidas na coagulação, como por exemplo a protrombina (Kulman *et al.*, 1997). Para além de fatores de coagulação, a família DVK engloba outras proteínas associadas à matriz dos tecidos calcificados como a proteína gla do osso (BGP) ou osteocalcina, sendo esta proteína essencial para a correta formação e mineralização do osso, tal como recentemente revisto (Cancela *et al.*, 2014).

3.2 Função da MGP

O tecido ósseo é formado por processos de ossificação, quer intramembranosa quer endocondral. O primeiro ocorre no interior de membranas de tecido conjuntivo, em centros de ossificação primária, que crescem radialmente e acabam por substituir a membrana conjuntiva existente, enquanto que o segundo se inicia num molde de cartilagem hialina que é gradualmente destruída dando origem a tecido ósseo (Junqueira & Carneiro, 2008; Kini & Nandeesh, 2012).

Do ponto de vista funcional pode-se considerar dois tipos de calcificação da matriz extracelular: fisiológica e patológica. No primeiro caso, ocorre uma conversão de matriz extracelular num material rígido capaz de sustentar forças mecânicas; o segundo tipo, corresponde àquele que conduz à calcificação de artérias, cartilagem e tecidos moles (Luo *et al.*, 1997). Em relação à MGP, tendo em conta a sua localização e as suas características, postulou-se desde logo que esta teria uma importante função no controlo da calcificação fisiológica ou patológica.

Esta hipótese começou por ser demonstrada quando numa experiência realizada com ratinhos *knock-out* para a MGP se demonstrou que estes morriam prematuramente devido à calcificação arterial e rompimento dos vasos sanguíneos (Luo *et al.*, 1997). Além disso, verificou-se que estes mesmos ratinhos apresentavam vários fenótipos relacionados com o esqueleto, incluindo uma menor estatura, osteopénia e maior número de fraturas em relação ao WT, associados a uma calcificação prematura dos moldes cartilagíneos (Luo *et al.*, 1997). Curiosamente, também em ratos tratados com varfarina, um antagonista da vitamina K, foi possível observar vários fenótipos relacionados com a regulação da mineralização

(calcificação das fibras de elastina da *tunica* média e das artérias coronárias e aorta) (Hale *et al.*, 1988; Schurgers *et al.*, 2008). O equivalente deste modelo de ratinhos em humanos corresponde à síndrome de Keutel (Keutel *et al.*, 1972) (OMIM #245150), uma doença rara, com prevalência de 1 caso num milhão, onde ocorre um déficit de função da MGP resultante de mutações genéticas com perda de função do gene da MGP. Estes doentes apresentam estenoses periféricas multifocais da artéria pulmonar, calcificação difusa das cartilagens das orelhas, nariz, laringe, traqueia, tiroide, epiglote, costelas, cotovelos e joelhos, hipoplasia do maxilar, depressão nasal e encurtamento das falanges médias (Keutel *et al.*, 1972; Sharma & Albig, 2013; Yao *et al.*, 2011). De uma forma geral, as mutações no gene da MGP levam ao aparecimento de calcificações ectópicas e estão associadas a várias patologias como a arteriosclerose de Monckberg e síndrome de Keutel (Fazenda *et al.*, 2012; Khosroshahi *et al.*, 2014; Weaver *et al.*, 2014).

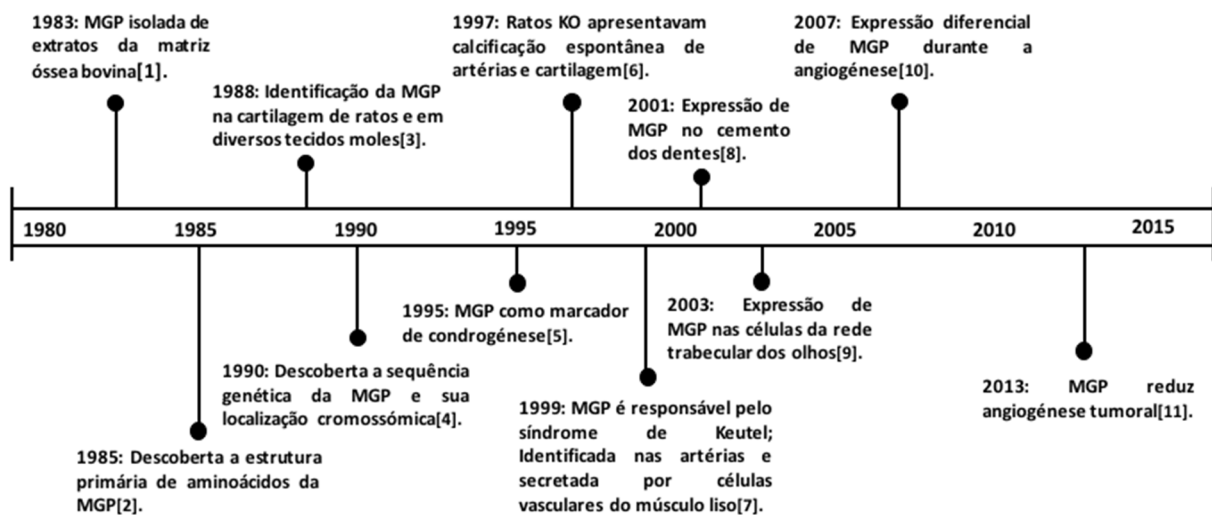


Figura 1.11. Cronograma das principais descobertas relacionadas com a MGP. [1] Price *et al.*, 1983; [2] Price & Williamson, 1985; [3] Hale *et al.*, 1988; Fraser & Price, 1988; [4] Cancela *et al.*, 1990 [5] Luo *et al.*, 1995; [6] Luo *et al.*, 1997; [7] Munroe *et al.*, 1999; Wallin *et al.*, 1999 [8] Hashimoto *et al.*, 2001 [9] Tomarev *et al.*, 2003 [10] Yao *et al.*, 2007 [11] Sharma & Albig, 2013.

Para além da ligação ao cálcio, pensa-se que a MGP poderá desempenhar funções de regulação celular através da interação específica com outras proteínas, tais como a BMP-2 (Schurgers *et al.*, 2008) ou a Vitronectina (Nishimoto & Nishimoto, 2005). Desconhece-se ainda como é que a expressão de MGP é regulada em mamíferos. No entanto, alguns estudos indicam que a sua expressão é controlada por alguns reguladores da transcrição como o ácido retinóico, vitamina D3, FGF2 e Runx2 (Cancela *et al.*, 1992, 1997, 2014; Kirfel *et al.*, 1997, Farzaneh-Far *et al.*, 2001). Além disso, foi recentemente reportada a regulação pós-transcricional da MGP através do miR-155 (Tiago *et al.*, 2016).

3.3 Envolvimento da MGP no cancro

Recentemente, a MGP foi relacionada com a progressão tumoral, mecanismos de apoptose (Zhao *et al.*, 1995), e também com a angiogénese, este último através da regulação específica das vias de sinalização Notch e BMP (Cancela *et al.*, 2014; Sharma & Albig, 2013). Nas duas últimas décadas foram observados níveis de expressão anormais (sobre-expressão) de MGP em vários tumores, tais como glioblastoma (Van den Boom *et al.*, 2003), cancro da mama (Yoshimura *et al.*, 2009), do ovário (Hough *et al.*, 2001), urogenital (Levedakou *et al.*, 1992) e gástrico, aparentemente relacionando esta proteína com mecanismos de diferenciação celular (Cancela *et al.*, 1997; Cancela *et al.*, 2014).

O envolvimento da MGP nestes processos ainda é desconhecido e a correlação entre a expressão de MGP e o cancro diferem de acordo com o tipo de tumor (Van den Boom *et al.*, 2003). Por exemplo, foi reportado num estudo de cancro da mama que a expressão da MGP se encontrava aumentada em tumores com pior prognóstico, ou seja, com uma sobrevivência em média menor que 10 anos. Embora este resultado tenha sugerido que a MGP poderia servir como um bom biomarcador da doença, não foi possível verificar a existência de uma correlação entre os níveis de proteína e esse mesmo prognóstico (Yoshimura *et al.*, 2009).

Mais recentemente, um estudo desenvolvido no nosso laboratório mostrou que a MGP poderia ser alvo de regulação pós-transcricional, através do miR-155, em células tumorais do cancro da mama (MCF-7). Esse mecanismo poderá não só explicar os resultados previamente observados por Yoshimura *et al.* (2009), mas sugere também uma maior complexidade em relação ao envolvimento da MGP no cancro. Em todo o caso, o bloqueio da expressão da MGP através do miR-155 em células tumorais da mama foi relacionado com uma maior capacidade proliferativa e invasiva (Tiago *et al.*, 2016).

Já em glioblastomas, a sobre-expressão da MGP parece promover o crescimento tumoral e a migração das células, enquanto que o efeito da MGP no adenocarcinoma do pâncreas é muito semelhante ao promovido nos tumores da mama, ou seja, o rápido crescimento e aumento da vascularização foram associados a uma menor expressão da MGP (Revisto em Sharma & Albig, 2013).

Estes diferentes resultados sugerem que a MGP poderá ter efeitos díspares dependendo do tipo tumoral. Uma hipótese para explicar estas observações envolve a diminuição da expressão da MGP em estadios iniciais do tumor para permitir a angiogénese e aumento da expressão da MGP em estadios mais avançados para promover a estabilidade vascular e a

perfusão do tumor (Sharma & Albig, 2013). Na tabela 1 podem-se observar de forma cronológica alguns dos estudos e respetivos resumos onde foi demonstrado o envolvimento da MGP no cancro.

Relativamente ao envolvimento da MGP nos tumores colorretais, um primeiro estudo realizado em 2001 demonstrava uma diminuição da sua expressão no tecido tumoral em comparação com a mucosa normal (Fan *et al.*, 2001). No entanto, dados recentes obtidos no nosso laboratório permitiram detetar um aumento da MGP em tecido tumoral do colón em comparação com mucosa normal (Caiado, 2014), contrariando assim os resultados previamente observados por Fan *et al.* (2001).

De uma forma geral, desconhece-se ainda qual o verdadeiro envolvimento da MGP no desenvolvimento tumoral. O mecanismo pelo qual a MGP promove os seus efeitos nos diversos tumores também está por esclarecer, embora alguns autores sugiram que a MGP poderá interagir com proteínas de matriz extracelular, nomeadamente a Vitronectina e a BMP-2 (Nishimoto & Nishimoto, 2005; Schurgers *et al.*, 2008, Mertsch *et al.*, 2009), promovendo assim efeitos a este nível, i.e. através de vias de sinalização celular ativadas pelos respetivos recetores na membrana celular. Por fim, também não se sabe ainda se a MGP poderá ser um bom alvo terapêutico contra os diversos tipos tumorais. Nesse sentido será necessário realizar mais estudos para elucidar todos estes aspetos.

Tabela 1. Relação da MGP com o cancro

Título do artigo	Breve descrição da temática do artigo	Referência
Overexpression of matrix Gla protein mRNA in malignant human breast cells: Isolation by differential cDNA hybridization	Sobre-expressão de MGP na linha celular 600 PEI de cancro da mama e implicação na redução de metástases em modelos experimentais	Chen <i>et al.</i> , 1990
Expression of the matrix gla protein in urogenital malignancies	Perda de expressão de MGP em carcinoma renal metastático e carcinoma da próstata quando comparada com tumores primários, associada a progressão tumoral e metástase	Levedakou <i>et al.</i> , 1992
Down-regulation of matrix Gla protein messenger RNA in human colorretal adenocarcinomas	Subexpressão da MGP em adenocarcinomas colorectais humanos	Fan <i>et al.</i> , 2001

Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer	Sobre-expressão da MGP em cancro do ovário	Hough <i>et al.</i> , 2001
Characterization of Gene Expression Profiles Associated with Glioma Progression Using Oligonucleotide-Based Microarray Analysis and Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction	A expressão relativa de MGP está significativamente aumentada em gliomas de estadios mais avançados em relação aos de estadios mais baixos	Van den Boom <i>et al.</i> , 2003
Lung cancers detected by screening with spiral computed tomography have a malignant phenotype when analyzed by cDNA microarray	Uma perda MGP de expressão também foi descrito na progressão do cancro do pulmão, do estágio da doença sintomática	Bianchi <i>et al.</i> , 2004
In Situ Identification of Genes Regulated Specifically in Fibroblasts of Human Basal Cell Carcinoma	Gene da MGP upregulated nos CAFs do carcinoma celular basal humano	Micke <i>et al.</i> , 2007
Gene expression profiling to identify markers associated with deregulated hTERT in HPV transformed keratinocytes and cervical cancer	Aumento da expressão da proteína MGP mais frequente em lesões pré-malignas do colo do útero de alto grau	de Wilde <i>et al.</i> , 2008
Prognostic value of matrix Gla protein in breast cancer	MGP entre genes mais expressos e potencial indicador de bom prognóstico no cancro da mama	Yoshimura <i>et al.</i> , 2009
Matrix gla protein (MGP): an overexpressed and migration-promoting mesenchymal component in glioblastoma	Sobre-expressão de MGP em glioblastomas e associação com um pior prognóstico devido ao aumento da invasão celular	Mertsch <i>et al.</i> , 2009
Inhibitor of DNA binding-4 promotes angiogenesis and growth of glioblastoma multiforme by elevating matrix GLA levels	Inibição da MGP resultou em tumores de menor dimensão e menos vascularizados	Kuzontkoski <i>et al.</i> , 2010
Discovery and verification of matrix gla protein, a TNM staging and prognosis-related biomarker for gastric cancer	A MGP foi identificada e confirmada como um novo biomarcador para estadiamento e prognóstico de cancro gástrico	Guo <i>et al.</i> , 2010
Matrix Gla Protein reinforces angiogenic resolution	A MGP impede a angiogénese normal e tumoral, restringe a densidade microvascular nos músculos cardíaco e esquelético.	Sharma & Albig, 2013

4. Objetivos

Dados recentemente obtidos no nosso laboratório, resultantes da análise de biopsias de cancro colorretal (obtidas através de colaboração com o serviço de Gastrenterologia do Hospital de Faro – CHA), permitiram identificar um aumento da expressão da MGP na mucosa tumoral em comparação com a mucosa normal adjacente (Caiado, 2014), consistente com resultados obtidos noutros tipos tumorais e contrariando resultados prévios que mostravam uma diminuição da expressão da MGP neste tipo de tumores (Fan *et al.*, 2001).

Na tentativa de esclarecer a relação entre o aumento da expressão da MGP em tumores colorretais e as características de proliferação e invasão dos mesmos (Hanahan & Weinberg, 2011), o principal objetivo deste trabalho foi investigar o envolvimento da MGP no comportamento tumoral das células, utilizando para tal a linha celular HT-29. Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Estudar o efeito da redução da expressão da MGP nos processos de proliferação, migração e invasão celular;
- Analisar a expressão de genes diferencialmente expressos no contexto das experiências de invasão e proliferação;
- Contextualizar resultados obtidos com a progressão tumoral.

Capítulo II

Material e Métodos

1. Linha celular e cultura

A linha celular de adenocarcinoma do cólon, HT-29 e os respetivos clones desenvolvidos foram cultivados em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco, Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 1% de L-glutamina e 1% de Pen Strep (mistura de penicilina e estreptomicina; Life Technologies) e mantida a 37°C com 5% de CO₂. As células foram tripsinizadas e divididas de 1:4 em dias alternados.

2. Desenvolvimento de clones com bloqueio da expressão da MGP

Para bloquear a expressão da MGP nas células HT-29 utilizou-se a técnica de RNA de interferência (RNAi) por intermédio de um vetor (pcDNA6.2) especificamente desenvolvido para sobre-expressar siRNAs e degradar mRNAs alvo (BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit, Invitrogen) (Figura 2.1).

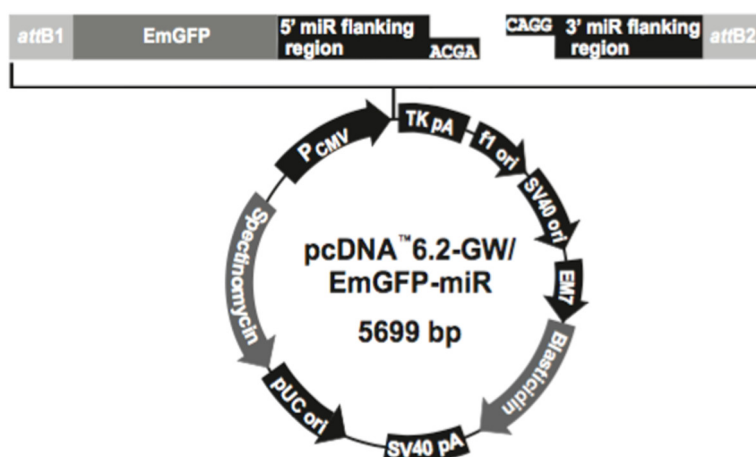


Figura 2.1. Vetor de expressão pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR. A função deste vetor é sobre-expressar os siRNAs introduzidos e degradar por complementaridade os mRNA alvo, resultando numa subexpressão do alvo, neste caso a MGP.

Na figura 2.2 é possível observar uma descrição do mecanismo de RNAi. De forma sumária, os genes siRNAs, quando transcritos pela RNA polimerase II, dão origem a pri-siRNAs. Estes são então clivados por um complexo proteico, do qual faz parte a enzima Drosha. Esta clivagem dá origem a um pre-siRNA que é posteriormente exportado para o citoplasma pela exportina-5, onde é novamente clivado pela enzima Dicer, originando um siRNA maduro. O complexo RISC liga-se ao siRNA maduro e condu-lo até à região homóloga no mRNA alvo, onde este se vai ligar com total complementaridade de bases. A ligação do siRNA maduro ao mRNA alvo resulta na degradação da molécula.

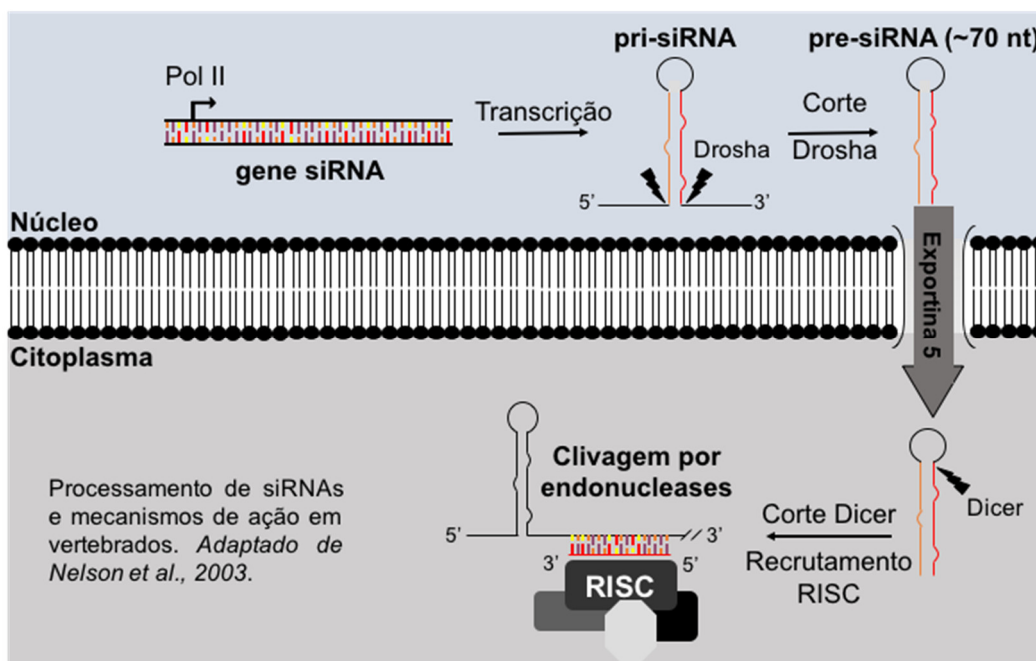


Figura 2.2. Processamento e mecanismo de ação de siRNAs, em vertebrados. A técnica de RNA de interferência (RNAi) baseia-se num processo biológico no qual pequenos RNAs inibem a expressão de genes específicos ao causar a degradação do mRNA alvo, impedindo a produção de proteína. Uma vez que esta técnica não reprime completamente a tradução, é referida como um *knockdown*. Imagem adaptada de Nelson et al., 2003.

Os siRNAs utilizados para bloquear a expressão da MGP foram previamente desenhados (Anexo, Tabela S2) e introduzidos no vetor pcDNATM 6.2-GW/± EmGFP-miR de acordo com as instruções do fabricante (trabalho realizado previamente no laboratório por Daniel Tiago e Helena Caiado). Posto isto, o DNA plasmídico foi transfetado para as células HT-29 utilizando Lipofectamina LTX (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, plaquearam-se $1,5 \times 10^5$ células no dia anterior à transfeção. No dia da transfeção 0,75µg de DNA foram diluídas em 100µl de Opti-MEM (Gibco) e adicionaram-se 0,75µl de reagente PLUSTM diretamente ao DNA diluído. Incubou-se 15 minutos à temperatura ambiente. Por cada poço adicionou-se 5µl de lipofectamina LTX à solução anterior e incubou-se 30 minutos. Findo este tempo foram adicionados 100µl de DNA+LTX a cada poço de células seguido de uma incubação a 37°C e 5% de CO₂ durante 48 horas.

As células transformadas foram selecionadas recorrendo ao uso do antibiótico blasticidina. Para isso, foi em primeiro lugar necessário determinar a concentração ótima de blasticidina para matar aproximadamente 90% das células HT-29. Testou-se então uma gama de concentrações entre 2-10µg/ml de blasticidina em diferentes poços de uma placa de 6 poços durante 14 dias, tal como indicado pelo fabricante do BLOCK-ITTM Pol II miR RNAi Expression Vector Kit (Invitrogen). Os resultados do teste de morte celular para as diferentes

concentrações testadas encontram-se em anexo (Figura S1). A concentração mínima de blasticidina a usar na linha celular HT-29, para seleção de clones, é de 10µg/ml, onde se pode verificar um efeito letal do antibiótico de aproximadamente 90%.

Quando foi notório o aparecimento de clones, verificou-se a sua fluorescência (gene GFP utilizado como repórter dos siRNAs introduzidos no vetor pcDNATM6.2-GW/±EmGFP-miR) ao microscópio de fluorescência (Olympus IX2-UCB) e recolheram-se os clones que exibiam fluorescência com aplicação direta de tripsina (20µl), sendo transferidos inicialmente para placas de 24 poços e posterior passagem para placas de 6 poços e finalmente para uma placa de 10cm. Os clones obtidos foram sempre mantidos em blasticidina até ao momento em que foram realizadas as experiências.

3. Extração e purificação de RNA total

Foi utilizado o método de isolamento total de RNA de acordo com o manual “Isol-RNA Lysis Reagent” (5Prime). Sucintamente, adicionou-se 1ml de reagente trizol às células e com a ajuda de um raspador raspam-se as células lisadas da placa, transferiu-se o conteúdo para um tubo de centrifugação, seguindo-se uma incubação à temperatura ambiente durante 5 minutos. Seguidamente adicionou-se clorofórmio (200µl por cada ml de tampão de lise), agitou-se vigorosamente durante 15 segundos e deixou-se à temperatura ambiente por 2-3 minutos. Fez-se uma centrifugação a 12,000 x g durante 15 minutos a 4°C e transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo contendo isopropanol (500µl por cada ml de tampão de lise), agitando-se depois suavemente. Incubou-se à temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida centrifugou-se a 12,000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA lavado com 1ml de etanol a 75% a 4°C. De seguida secou-se o precipitado à temperatura ambiente e dissolveu-se em 50µl de água (Sigma).

A quantidade de RNA presente em cada amostra foi avaliada por espectrofotometria (Nanodrop ND-1000; Thermo Scientific) através da leitura das absorvâncias a 260 e 280nm e das razões a 260/230nm e 260/280nm. A qualidade do RNA foi analisada num gel de 0,8% de agarose em tampão TAE (Anexo, Tabela S1). Depois, o RNA total foi tratado com RQ1 DNase (1U por cada µg de RNA; Promega) de acordo com as indicações do fabricante (30 minutos de incubação a 37°C, inativação com solução RQ1 stop (Promega) a 65°C durante 10 minutos).

4. Construção de oligonucleótidos

Os pares de oligonucleótidos (*primers*) específicos de cada transcrito a analisar (Tabela S3 em Anexo) foram desenhados com o auxílio da ferramenta Primer Blast do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e otimizados através do programa VectorNTI em relação à sua termodinâmica, dimerização e formação de *hairpins*. Tal como virá descrito na tabela 2, inserida no capítulo dos resultados, as sequências de alguns oligonucleótidos foram retiradas de publicações científicas e devidamente referenciados.

5. Análise da expressão da MGP por RT-qPCR em tempo real

Para a análise da expressão da MGP e de genes diferencialmente expressos nas células HT-29 WT e clones, as amostras de RNA total foram usadas para sintetizar cDNA utilizando a transcriptase reversa (200U/ μ l; Invitrogen) do vírus da leucemia murina de Moloney (M-MLV, do inglês, *Moloney-murine leukemia virus*), de acordo com as indicações do fabricante.

Primeiramente fez-se uma digestão com DNase. Sucintamente, 1 μ g de RNA total foi diluída em água (volume final de 7,64 μ l), adicionou-se 0,96 μ l de RQ1 *buffer*, 1 μ l de RQ1 DNase e incubou-se 30 minutos a 37°C. Adicionou-se 1 μ l de *stop solution* e incubou-se mais 10 minutos a 65°C.

Findo este processo, o RNA foi purificado recorrendo ao uso do High Pure RNA isolation Kit (Roche) de acordo com as indicações do fabricante.

Posto isto, o RNA foi suplementado com 0,4 μ l oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500 μ g/ml; Sigma-Aldrich), 1 μ l de dNTP's (10mM, Invitrogen) e água (10,6 μ l de RNA + H₂O) (Sigma-Aldrich) para perfazer um volume total de 12 μ l. Esta mistura foi incubada durante 5 minutos a 65°C, arrefecida a 4°C durante 5 minutos, e depois suplementada com 4 μ l de *first strand buffer* (5x; Invitrogen), 2 μ l DTT (0,1M; Invitrogen), 1 μ l RNaseOUT (40U/ μ ; Invitrogen) e 1 μ l de transcriptase reversa M-MLV. A transcrição reversa continuou por 50 minutos a 37°C. Finalmente as amostras foram incubadas a 70°C durante 15 minutos para inativação das enzimas da reação e desnaturação do DNA. Neste ponto o cDNA pode ser guardado a -20°C.

As amostras de cDNA foram utilizadas como modelo para análise da expressão do mRNA por PCR em tempo real utilizando *primers* específicos que se encontram listados (Anexo, Tabela S3). Para determinar a expressão do mRNA, 2 μ l de cDNA diluído 1:10 (em H₂O, Sigma) foram misturados com 10 μ l de SsoFast™ EvaGreen Mix (Biorad), 0,6 μ l de cada *primer* (10 μ M), diluídos de 1:10 e água (até aos 20 μ l).

O PCR foi realizado no termociclador CFX96™ Real-Time Detection System (BioRad) nas seguintes condições: i) desnaturação do DNA a 95°C durante 30 segundos; ii) 45 ciclos com desnaturação a 95°C durante 5 segundos, hibridação/elongação a 60°C, durante 5 segundos; iii) curva de dissociação dos *primers* (65°C-95°C, incremento de 0,5°C a cada 5 segundos) para determinação do ponto correspondente à temperatura de dissociação dos *primers* da sequência alvo.

Para determinação da expressão génica relativa utilizou-se o método $\Delta\Delta C_t$ (Livak & Schmittgen, 2001). Os ciclos de *threshold* obtidos para cada um dos genes analisados foram normalizados utilizando o gene *housekeeping*, GADPH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).

Os resultados obtidos a partir do RT-qPCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1.5% em tampão TAE (Tris-ácido acético-EDTA). Por cada 80ml de gel foi adicionado 1 μ l de GreenSafe (Nzytech) para visualização sob luz ultravioleta (UV) do DNA amplificado em cada reação. Os fragmentos foram visualizados num transiluminador UV. As bandas visualizadas no gel de eletroforese foram excisadas e o DNA foi purificado através do GeneJET gel extraction kit (Thermo Scientific) seguindo as instruções do fabricante. O DNA obtido foi posteriormente enviado para sequenciação, baseada no método de Sanger, nas instalações do Centro de Ciências do Mar (CCMAR). As sequências correspondentes à MGP foram confirmadas pela ferramenta online do NCBI (National Center for Biotechnology Information), BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch).

6. Ensaios de luciferase para deteção da atividade dos elementos de resposta das BMPs

Para a avaliação da atividade da via de sinalização das BMPs nas células HT-29 e respetivos clones utilizou-se um vetor contendo a sequência dos elementos de resposta das BMPs (vetor BRE-luc; gentilmente cedido pelo Dr. Peter ten Dijke da Universidade de Leiden, Holanda) (Korchynskyi & ten Dijke, 2002) associado ao gene repórter da luciferase. Bactérias DH5 α previamente transformadas com este vetor e crescidas em cultura com meio de cultura LB seletivo com ampicilina (o vetor utilizado possui o gene de resistência à ampicilina, genótipo ampR) e congeladas a -80°C em glicerol a 50%, foram recuperadas em 5 ml de meio LB líquido com ampicilina (50mg/ml) durante a noite a 37°C com agitação.

No dia seguinte procedeu-se à extração do DNA plasmídico, com o auxílio do kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) e seguindo as indicações do fabricante.

A qualidade do DNA obtido a partir de cada cultura e a presença dos fragmentos clonados foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% após digestão com as endonucleases BglII + PstI e BglII + Sall respetivamente (Takara). O vetor de normalização das transfeções, pRL-SV40, foi descrito para o vetor BRE-Luc.

No dia anterior à transfeção, plaquearam-se as células numa quantidade de $1,2 \times 10^5$ células por poço, em placas de 24 poços, num volume total de 500 μ l de meio de cultura DMEM suplementado. No dia da transfeção as células apresentavam uma confluência de aproximadamente 50-60%. Para cada poço a transfetar diluíram-se 800 ng de DNA de vetor BRE-Luc e 80ng de PRL-SV40 em 100 μ l de Opti-MEM (Gibco). Foram adicionados 0,8 μ l de reagente MIX PLUS™ (Invitrogen) ao DNA diluído e incubou-se durante 30 minutos. Após este tempo, adicionaram-se 100 μ l de cada mistura diretamente a cada poço de células e incubou-se a 37°C numa incubadora com 5% de CO₂ durante as 24h.

Para a avaliação da atividade das luciferases do vetor BRE-Luc (firefly luciferase, F-Luc) e do vetor de normalização da transfeção pRL-SV40 (Renilla luciferase, R-Luc) utilizou-se o kit Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega) seguindo as indicações do fabricante. No dia do ensaio o meio das células foi descartado e estas foram lavadas com PBS. Posteriormente adicionou-se 100 μ l de *passive lysis buffer* 1X a cada poço e agitou-se durante 15 minutos. Passado esse tempo ressuspenderam-se as células e 10 μ l de cada um dos lisados foram transferidos para uma placa de 96 poços opaca de fundo plano (Greiner). Foram depois adicionados 50 μ l de LAR II para medição da atividade *firefly* da luciferase e 50 μ l de reagente Stop&Glo para medição da atividade luciferase da *Renilla*. Estas medições foram realizadas no leitor de microplacas Synergy4 (Biotek).

7. Imunocitoquímica

Para a imuno-localização celular da MGP, as células HT-29 WT e respetivos clones foram cultivadas em placas de 24 poços numa densidade de 2×10^4 células por poço. Antes do cultivo, as placas tiveram de ser preparadas para receber as células, introduzindo-se no fundo de cada poço uma lamela previamente esterilizada e tratada com uma solução de poli-L-lisina 0,01% (Sigma). As células foram incubadas durante aproximadamente 16 horas a 37°C e 5% de CO₂. Findo esse período, o meio foi removido e as células lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 1% durante 15 minutos à temperatura ambiente. As células foram depois lavadas com PBST (PBS + 0,1% Triton X-100) durante 30 minutos à temperatura ambiente,

incubadas a 37°C em solução de bloqueio (Anexo, Tabela S1). Procedeu-se então a uma incubação com anticorpo primário de coelho anti-MGP (1:100) em solução de bloqueio durante 2h a 37°C e lavaram-se as células (3 x 10 minutos) com solução de bloqueio. Incubaram-se as células com anticorpo secundário de cabra anti-IgG de coelho marcado com Alexa Fluor® 594 (1:1000) em solução de bloqueio durante 1h a 37°C. A partir deste ponto as células foram sempre mantidas em câmara escura. Lavaram-se as células novamente (2 x 10 minutos) em solução de bloqueio e PBST (1 x 10 minutos). Montaram-se as lâminas com 2,4g de *mowiol* em 24ml de solução e DAPI (1,5µg/ml), selando com verniz transparente. Observaram-se as células no microscópio de fluorescência (Carl Zeiss Axioimager Z2). Dois controlos foram feitos para cada amostra, um só com anticorpo secundário e outro só com DAPI.

8. Análise de expressão da MGP no meio celular por *Western Blot*

Para a imuno-deteção da MGP secretada para o meio de cultura, as células HT-29 WT e respetivos clones foram cultivadas até atingirem a confluência e depois lavadas 2X com PBS (tampão fosfato salino) e incubadas em meio DMEM sem suplementos durante 24h a 37°C e 5% de CO₂. Retirou-se o meio e centrifugou-se a 200G durante 5 minutos. O volume do meio foi dividido por 2 tubos de centrifugação de 15ml, aos quais se adicionaram 4 volumes de acetona. Os tubos foram conservados a -30°C durante pelo menos 24h. Posto isto, fez-se uma centrifugação a 4°C a 10.000G durante 10min para precipitação das proteínas presentes no meio. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 38,5µl de tampão de lise (Tampão RIPA, Anexo, Tabela S1), retirou-se 1µl para quantificação de proteína e ao restante adicionou-se 12,5µl de tampão de amostra 4X (Anexo, Tabela S1).

A quantidade de proteína nas amostras foi determinada utilizando o Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad), de acordo com as indicações do fabricante. Resumidamente, o reagente foi diluído de 1:5 em água e filtrado em filtros porosos de 0,45µm. Para a elaboração da reta de calibração de Bradford, adicionaram-se 10µl de várias diluições de uma solução *stock* de 2 mg/ml de BSA (Bovine Serum Albumin) a cada poço de uma placa de 96 poços. Para a quantificação da proteína nas amostras diluiu-se 1µl de amostra previamente retirado em 9µl de H₂O. Para o controlo negativo fez-se uma diluição idêntica, mas só com tampão de lise. Cada um dos poços foi suplementado com 200µl de reagente de Bradford diluído 1:5. Incubou-

se durante 10 minutos à temperatura ambiente e leram-se as absorvâncias a 595nm no leitor de microplacas Synergy4 (Biotek).

Para a separação das proteínas através da técnica SDS-PAGE, as amostras previamente preparadas foram aquecidas a 100°C durante 5 minutos (para desnaturação das proteínas). Carregaram-se concentrações idênticas de proteínas de cada amostra em cada um dos poços de gel de SDS-PAGE pré-feito (NuPAGE®MÊS 4-12% Tris-Acetate 3-8%; Invitrogen) e correu-se num tampão de corrida (Anexo, Tabela S1) a 120V, 1h. Após a separação das proteínas no gel, procedeu-se à sua transferência para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF; Immobilon®, Milipore). Para isso, incubou-se a membrana de PVDF em metanol (1 minuto) e água (2 minutos), e montou-se uma cassette num sistema SureLock (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Utilizou-se a seguinte ordem: i) duas esponjas, ii) um papel de filtro *Whatman*, iii) gel, iv) membrana, v) um papel de filtro *Whatman* e vi) duas esponjas.

Procedeu-se à transferência das proteínas durante 1 hora a 30V. Depois da transferência incubou-se a membrana com uma solução de bloqueio (Anexo, Tabela S1) durante 2 horas à temperatura ambiente, e posteriormente com o anticorpo primário anti-MGP (coelho IgG; ProteinTech) diluído de 1:1500 em solução de bloqueio durante 24-48 horas a 4°C. Procedeu-se a uma série de lavagens; (i) 2 x 5 minutos com PBST, (ii) 2 x 5 minutos com solução de sais (ver apêndice). Incubou-se novamente a membrana em solução de bloqueio por 15 minutos. Finalmente a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase de rábano; Sigma) diluído de 1:30000 em solução de bloqueio durante 1 hora à temperatura ambiente. Depois de uma série de novas lavagens, (i) 2 x 5 minutos com PBST, (ii) 1 x 10 minutos com solução de sais, (iii) 3 x 5 minutos com PBST e (iv) 1 x 1 minuto com PBS, o sinal foi revelado com um substrato quimioluminescente (Western Lightning® Plus-ECL, PerkinElmer, Inc.), de acordo com as indicações do fabricante. As imagens foram obtidas utilizando o ImageQuant LAS500 (GE Healthcare Life Sciences).

9. Ensaio de proliferação celular

O XTT (2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) (AppliChem) foi usado com o objetivo de determinar o número de células viáveis em cultura.

O XTT é um sal que é clivado por ação da succinato desidrogenase, uma enzima proveniente da cadeia respiratória mitocondrial, dando origem ao formazan, um composto com um pico de absorvância a 450nm de comprimento de onda. Apenas as células vivas, que possuem

atividade mitocondrial intacta têm esta enzima ativa. Agentes que façam ruptura das membranas e destruam a cadeia respiratória irão inativar a enzima e, portanto, não se formam por redução do sal de tetrazólio. Como diferentes linhas celulares são metabolicamente distintas, o ensaio teve de ser otimizado para as células HT-29. Estas foram cultivadas em placas de 96 poços (0, 1000, 2000, 4000, 6000, 10000, 15000 e 20000 células/poço) e incubadas aproximadamente 16 horas a 37°C e 5% CO₂. O XTT foi adicionado às células de acordo com as indicações do fornecedor (AppliChem). As absorvâncias a 450nm para o formazan e a 650nm para correção do *background* foram lidas às 0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas no leitor de microplacas Synergy4 (Biotek). O tempo ótimo determinado para a incubação do reagente foi de 2 horas. Da mesma forma, o número mínimo de células para se conseguir realizar a leitura foi de 2000 células por poço.

Assim sendo, avaliaram-se as capacidades proliferativas das células HT-29 WT e respetivos clones da seguinte forma: plaquearam-se 2000 células por poço em placas de 96 poços, e avaliou-se a viabilidade através do ensaio XTT ao fim de 16 horas (tempo 0), e ao fim de 1, 2, 4, 6 e 8 dias após o tempo 0.

10. Ensaio de migração celular

As células HT-29 WT e respetivos clones foram cultivadas (500µl de suspensão de uma placa confluenta) em placas de 6 poços e esperou-se até atingirem 100% de confluência. Utilizando uma ponta de micropipeta fez-se um risco através da cultura, simulando uma ferida visualizável numa objetiva de 10x. Os poços foram lavados 2x com PBS e adicionou-se novo meio às células. Realizaram-se pelo menos 3 fotos (Canon PowerShot G12) em cada poço às 0, 24, 48 e 72h. Calculou-se a percentagem de área ocupada pelas células em relação ao tempo 0 tendo em conta a largura da ferida medida aos diversos tempos.

11. Ensaio de invasão celular

Para estudar a capacidade invasiva das células HT-29 WT em comparação com um dos clones com *knockdown* de MGP, utilizou-se o kit BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber (BD Biosciences) específico para placas de 24 poços. Este kit contém *inserts* que se aplicam diretamente em cada um dos poços de uma placa de 24 poços especificamente desenhada para este efeito. Cada um dos *inserts* contém uma membrana na sua base sobre a qual foi preparada uma matriz extracelular, matrigel (60% laminina, 30% colagénio IV, 8% entactina)

onde as células são cultivadas. Através deste kit avalia-se a capacidade das células abandonarem a matriz celular e invadirem a membrana adjacente.

Assim sendo, cultivaram-se $2,5 \times 10^4$ células em cada um dos *inserts* revestidos de matrigel. Previamente, os *inserts* foram descongelados até atingirem a temperatura ambiente (aproximadamente 20 minutos), re-hidratados durante 2h com meio (DMEM, Gibco) sem soro (500µl diretamente no insert + 500µl no fundo do poço) a 37°C e 5% CO₂. Após a re-hidratação, o meio sem soro foi removido do *insert* e do poço, colocaram-se 750µl de DMEM suplementado no fundo do poço, aplicaram-se 500µl de uma suspensão de células a 5×10^4 células/ml, e incubou-se durante 22 horas a 37°C e 5% CO₂. No dia seguinte, o meio foi aspirado, e com um cotonete seco, removeu-se suavemente o matrigel, repetindo-se esse processo, desta vez com um cotonete embebido em meio sem soro. Posteriormente, as células retidas na membrana adjacente (já sem matrigel) foram fixadas durante 2 minutos em metanol, coradas numa solução de 1% (m/m) de Azul de Toluidina em 1% (m/m) de Borax, durante 2 minutos, e lavadas com água destilada para remover o excesso de corante.

As membranas foram removidas dos *inserts* com o auxílio de um bisturi e montadas em óleo de imersão, conforme descrito no protocolo do fabricante. As células retidas na membrana foram observadas e contadas no microscópio invertido Zeiss AxioVert 25, através de uma objetiva de 10X. Para o cálculo da invasão foram analisadas 5 áreas diferentes da membrana, considerou-se a média das células contadas e normalizou-se o valor conforme a capacidade migratória das células, como descrito no protocolo do fabricante.

12. Análise estatística

O estudo da significância foi realizado através do teste one-way ANOVA no software GraphPad prism 6.0 (Inc., La Jolla, CA, USA), utilizando-se 3 ou mais replicados. As probabilidades abaixo de 5% ($P \leq 0,05$) foram consideradas estatisticamente significativas.

Capítulo III

Resultados e Discussão

A MGP tem sido reportada como uma proteína sobre-expressa em diferentes tipos tumorais como no cancro da mama (Yoshimura *et al.*, 2009), cancro do ovário (Hough *et al.*, 2001), glioblastomas (Van den Boom *et al.*, 2003), cancro renal, testicular, prostático (Levedakou *et al.*, 1992) e gástrico (Guo *et al.*, 2010), mas no caso do cancro colorretal, resultados de análises *northern blot* realizadas em 2001 por Luo *et al.*, (Luo *et al.*, 2001) apontaram para uma subexpressão de MGP, algo que também se verificou em adenocarcinomas pancreáticos (Sharma & Albig, 2013) e cancro do pulmão (Bianchi *et al.*, 2004). Nessa análise com 80 pacientes de origem asiática com adenocarcinoma esporádico, comparou-se a expressão da MGP na mucosa normal do cólon com a mucosa tumoral, ambas obtidas de ressecções cirúrgicas. Os resultados mostraram uma elevada expressão de MGP em tecido colorretal humano e uma subexpressão em células da mucosa tumoral (Luo *et al.*, 2001).

Num decorrer de um trabalho preliminar no nosso laboratório sobre uma população do Algarve, fez-se um estudo idêntico com 20 doentes onde também se comparou mucosa normal com mucosa tumoral do cólon. Neste estudo, as biópsias analisadas foram obtidas através de uma colaboração com o serviço de Gastreenterologia do Hospital de Faro. Neste caso, os níveis de expressão da MGP foram determinados por PCR quantitativo (Caiado, 2014). Este estudo concluiu que pelo menos na população portuguesa em análise, a MGP, embora com muita variabilidade, se encontra quase sempre aumentada nos tumores colorretais. Alguns fatores que poderão ter contribuído para esta diferença em relação à população asiática do estudo anterior são: o *background* genético de cada paciente analisado, o regime alimentar, a localização do tumor e o seu estadiamento. Podem estas diferenças dever-se também à biópsia da mucosa dita normal, que é retirada do tecido adjacente ao tumor e utilizada como controlo na análise da expressão da MGP em tumores colorretais. Esta mucosa dita normal poderá certamente apresentar alterações, fenotipicamente impercetíveis, devido à proximidade das células tumorais, quando comparada com mucosa de doentes saudáveis.

No sentido de esclarecer os resultados obtidos por Helena Caiado (Caiado, 2014), analisou-se na altura uma linha celular de adenocarcinoma do cólon, HT-29, considerada um bom modelo *in vitro* para investigar a tumorigénese do CCR (Lenaerts *et al.*, 2007), e neste caso o papel da MGP no CCR. Verificou-se que a expressão da MGP nesta linha celular era comparável à expressão na mucosa tumoral obtida no estudo anterior do nosso laboratório. Tendo em conta o aumento significativo da expressão da MGP obtido na mucosa tumoral

comparativamente à observada em mucosa normal de dadores sem tumor, o presente estudo surge como um complemento àquele desenvolvido anteriormente onde se pretende analisar qual o efeito de uma diminuição da expressão da MGP no funcionamento das células tumorais. Neste contexto, procuramos avaliar quais os efeitos de um bloqueio da expressão da MGP na linha celular HT-29, nomeadamente ao nível da proliferação, migração e invasão celular.

1. Diferentes RNAs de interferência promovem diferentes bloqueios da MGP em HT-29

Na fase inicial deste trabalho desenvolveram-se clones estáveis de células HT-29 com *knockdown* específico da MGP através de RNAs de interferência (siRNAs) expressos no vetor pcDNATM 6.2-GW/± EmGFP-miR (Block-iTTM Pol II miR RNAi Expression Vector Kits, Invitrogen) (Figura 2.1). Este vetor contém um promotor CMV (derivado do citomegalovírus), que ao ser reconhecido pela RNA polimerase II, induz a expressão constitutiva de transcritos contendo a sequência codante da GFP (proteína verde fluorescente), utilizado como gene indicador, e de siRNAs inseridos no vetor tal como indicado pelo fabricante (Invitrogen). Estes siRNAs encontram-se flanqueados pela sequência de um pré-microRNA molde (pre-miR-155 de rato), de forma a serem reconhecidos pela maquinaria de processamento de microRNAs própria da célula e posteriormente conduzirem o *RNA-silencing complex* (RISC) ao RNA mensageiro alvo (Figura 2.2). Este vetor contém ainda um gene de resistência à blasticidina, para seleção em células de mamífero, de modo a gerar linhas celulares estáveis.

Os siRNAs introduzidos no vetor de expressão foram desenhados através da ferramenta online da Invitrogen (<http://www.invitrogen.com/rnai>). Nesta ferramenta, os siRNAs são ordenados de acordo com uma escala de eficiência determinada por análise *in silico*, e por isso é recomendado usar os 2 ou 3 primeiros siRNAs para uma maior garantia de eficiência.

Para este trabalho foram selecionados os 3 siRNAs com melhor *score* e simultaneamente específicos da sequência da MGP: o siRNA1 com sequência alvo TAGCGGTAGTAACTTTGTGTT, localizado no primeiro exão; o siRNA3 com sequência alvo TATGGATAACAATGCTGCCTAT, localizado no quinto exão; e por fim o siRNA4 com sequência alvo AGAACGCTCTAAGCCTGTCCA, localizado também no quinto exão (Figura 3.1).

O siRNA2, i.e. o siRNA com o segundo melhor *score*, acabou por não ser utilizado por se verificar que não era específico da variante da MGP presente nestas células (tal como descrito por Caiado, 2014). As células HT-29 foram então transfetadas com os 3 diferentes *constructs*

e selecionadas com blasticidina.

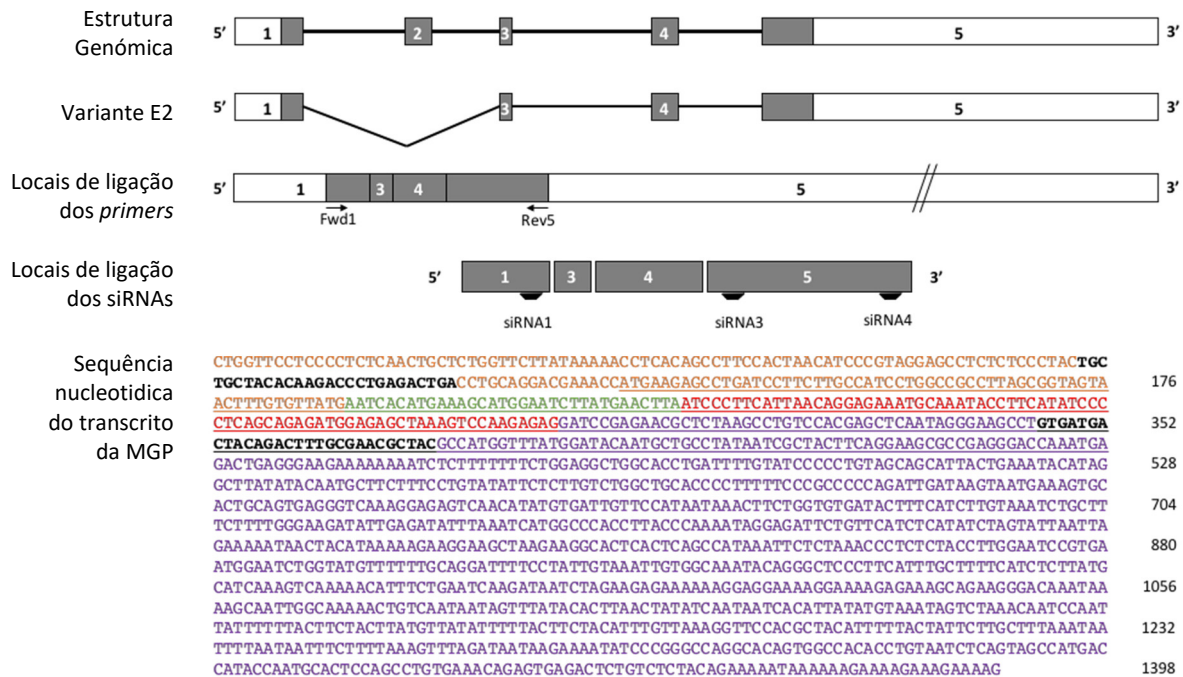


Figura 3.1. Representação esquemática do gene, transcrito e sequência codante da MGP, bem como locais de ligação dos primers e siRNAs. O tamanho dos exões (1cm=100bp) e dos intrões (1cm=300bp), desenhados à escala para o esquema representativo da estrutura genômica e da variante E2 da MGP, correspondem a ½ da escala usada para o esquema representativo dos locais de ligação dos primers e a ¼ da escala usada para a representação dos locais de ligação aos siRNAs. As caixas preenchidas correspondem à região codante da MGP (em baixo, sublinhado) e as caixas a branco correspondem às regiões não traduzidas (sem sublinhado). A cor de laranja está representada a sequência de nucleótidos do exão 1, a verde do exão 3, a vermelho do exão 4 e a roxo do exão 5. A negrito encontram-se os primers forward e reverse, respetivamente.

Depois de transferir as células HT-29 com as várias construções referidas, incubou-se com blasticidina até à obtenção de clones. Estes foram recolhidos para placas de 24 poços e mantidos na presença de antibiótico, sendo transferidos sucessivamente para placas cada vez maiores até placas de 10 cm. No total, obtiveram-se 5 clones: 3 clones do siRNA1 (R1A, R1D, R1E), 1 clone do siRNA3 (R3C) e 1 clone do siRNA4 (R4B). Na figura 3.2 é possível observar a fluorescência da GFP nos clones em comparação com as células HT-29 controlo, não transfetadas (WT).

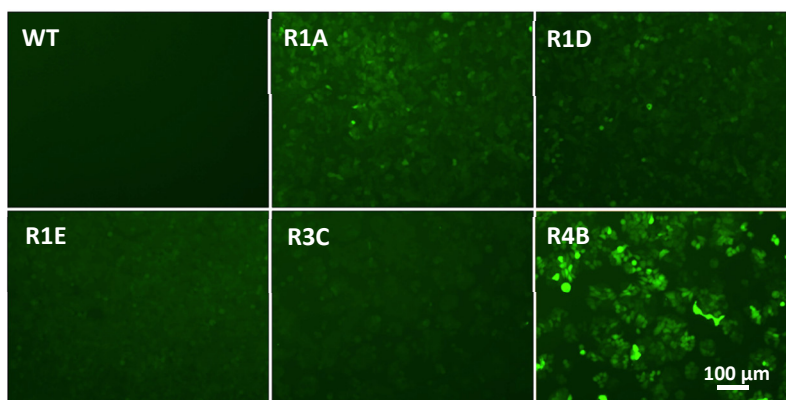


Figura 3.2. Fluorescência dos clones em comparação com o WT. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência (Olympus IX2- UCB) que demonstram a eficiência da transfeção e seleção de clones com o vetor pcDNA™ 6.2-GW/±EmGFP-miR. A barra de escala corresponde a 100μm; WT: estirpe selvagem, células não transfetadas; R1A: clone A do siRNA 1; R1D: clone D do siRNA 1; R1E: clone E do siRNA 1; R3C: clone C do siRNA 3; R4B: clone B do siRNA 4.

Para comprovar a existência do bloqueio da MGP nos clones, procedeu-se à análise de expressão da MGP por RT-qPCR. Foi realizada uma extração de RNA às 24h (Figura 3.3) e outra às 96h após tripsinização (dados não apresentados). Em ambos os casos verificou-se que a expressão de MGP ao nível de mRNA se encontrava diminuída nas células transfetadas com o vetor pcDNA6.2 quando comparadas com as células WT. Além disso, verificou-se que este bloqueio era estável, ou seja, não era perdido ao longo do tempo. O bloqueio de mRNA da MGP nos clones (R1A, R1D, R1E, R3C e R4B) em relação ao WT (n=3) foi de 98%, 93%, 74%, 85% e 30% respetivamente (Figura 3.3). Todos os valores são estatisticamente significativos.

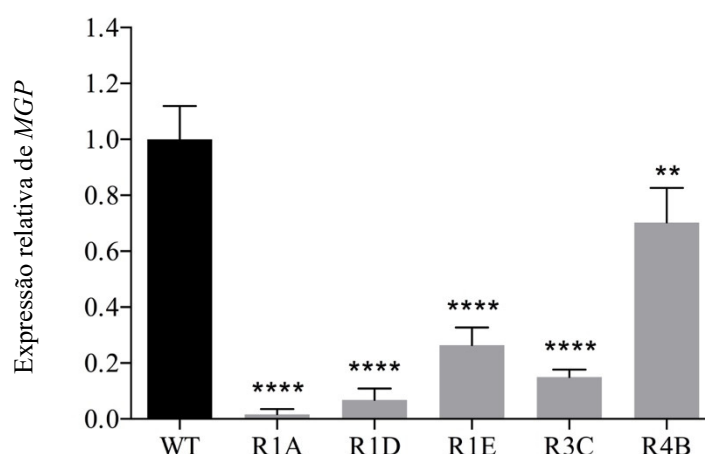


Figura 3.3. Expressão relativa da MGP (calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$) nas células HT-29 em comparação com os clones a sobre-expressar siRNAs contra a MGP. Os resultados do PCR quantitativo em tempo real foram analisados, através do teste estatístico one-way ANOVA para dados emparelhados, para determinar a significância da diferença entre a expressão da MGP nas células WT e clones. Os dados estão apresentados como média e desvio padrão de pelo menos 3 replicados independentes. A significância estatística dos resultados foi calculada utilizando o software GraphPad prism 6.0 (Inc., La Jolla, CA, USA). As probabilidades abaixo de 5% ($P \leq 0,05$) foram consideradas estatisticamente significativas. ** $P \leq 0,01$ **** $P \leq 0,0001$

O manual do Kit Block-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector (Invitrogen) sugere a procura e utilização de mais do que uma sequência pré-siRNA que venha a integrar o vetor de expressão para a identificação de uma que esteja ativa nos clones com *knockdown* do gene em estudo. A escolha do siRNA pode afetar significativamente o grau de silenciamento da MGP uma vez que a sequência alvo pode ter homologia com outros genes, aumentando o efeito *off-target*. A energia de ligação à molécula de mRNA alvo é também diferente consoante o local de ligação, uma vez que moléculas mais acessíveis têm geralmente energias de ligação mais altas.

Para confirmar o bloqueio da MGP ao nível da proteína, foi realizado um ensaio de *western blot* a partir de extratos proteicos preparados a partir do meio condicionado das células.

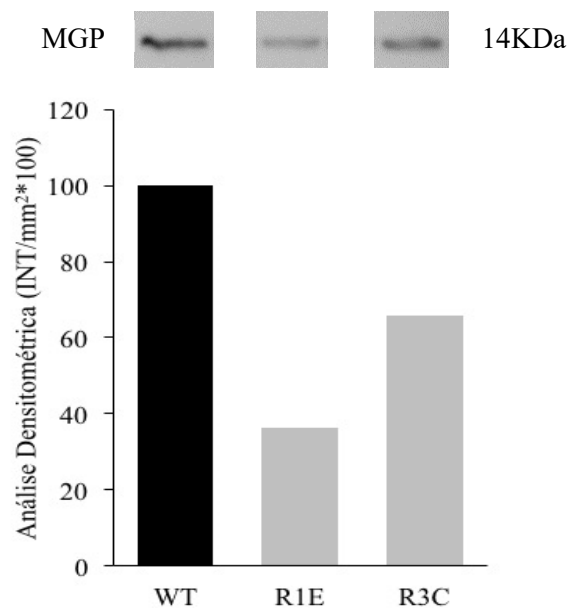
Inicialmente, começaram por se analisar extratos celulares preparados em tampão de lise (Tampão RIPA; Anexo, Tabela S1). No entanto, dos 5 clones analisados nenhum apresentava diferenças significativas em relação ao WT e verificava-se muita variabilidade entre experiências. Foram testadas células em várias confluências (50-100%), mas sempre sem resultados significativos.

Depois considerou-se que, sendo a MGP uma proteína secretada para o meio extracelular, as diferenças poderiam estar na quantidade de proteína acumulada no meio de cultura. Cresceram-se então as células até à confluência e mudou-se o meio de cultura para meio sem soro. Este meio foi recolhido ao fim de 72 horas e utilizado para precipitar todas as proteínas.

O extrato proteico preparado a partir destas amostras foi re-suspenso em volumes idênticos de tampão RIPA, tendo-se verificado que todas as amostras apresentavam uma quantidade de proteína idêntica. Correu-se então um gel de SDS-PAGE com um volume idêntico de cada amostra, fez-se a transferência para uma membrana de PVDF e detetou-se com um anticorpo anti-MGP. Uma vez que não existia nenhuma proteína para normalizar estes resultados, os resultados foram comparados diretamente entre si. Até agora, realizou-se este ensaio apenas uma vez. No futuro, será necessário repetir este ensaio de forma a realizar-se um estudo estatístico e a validação dos resultados. Além disso, será importante encontrar uma proteína (secretada para o meio extracelular) cuja expressão seja constante, de forma a normalizar estes resultados. Alternativamente, poder-se-ão preparar extratos celulares e analisar a expressão de proteínas *housekeeping*, ex. GAPDH ou β -Actina. Com o ensaio realizado até ao momento, foi possível verificar uma redução da expressão da MGP em todos os clones, exceto no clone B do siRNA4 (Figura S2 em anexo). De forma detalhada,

verificou-se no clone R1A um bloqueio de 29%, no clone R1D um bloqueio de 34%, no clone R1E um bloqueio de 64%, e no clone R3C um bloqueio de 34%. Na figura 3.4 é possível observar estes resultados em relação aos clones R1E e R3C, representativos dos siRNAs 1 e 3.

Para simplificação da discussão deste trabalho, os resultados apresentados neste manuscrito focam-se apenas nestes 2 clones, estando os restantes disponíveis em anexo. O clone B do siRNA4 foi excluído das análises por não se verificar um bloqueio efetivo.



3.4. Efeito dos siRNAs 1 e 3 nos níveis de produção de MGP nas células HT-29; os clones foram ambos transfetados com o vetor pcDNA6.2. A produção de MGP foi determinada por análise densitométrica do sinal de *western blot*.

Finalmente, para confirmar o bloqueio da expressão da MGP ao nível do transcrito analisado por qPCR e ao nível da proteína, por *western-blot* a partir dos extratos do meio celular, realizou-se um ensaio de imunocitoquímica para localizar a proteína MGP a nível sub-celular e investigar uma possível diminuição de sinal (dependente da sensibilidade da técnica).

O anticorpo secundário utilizado encontra-se acoplado ao fluorocromo Alexa 594 sendo o sinal revelado através de microscopia de fluorescência (Axioimager Z2, Zeiss). Foi utilizada uma sonda DAPI, com capacidade para intercalar DNA genómico, para localizar os núcleos das células analisadas.

De acordo com os resultados apresentados na figura 3.5 (restantes clones apresentados em anexo, Figura S3), o sinal obtido para as células WT aparenta ser mais forte na matriz

extracelular, onde a MGP normalmente se deposita (Price *et al.*, 1983; Hale *et al.*, 1988), do que nos clones R1E e R3C onde se verifica um aparente decréscimo de expressão desta proteína pela diminuição do sinal ao redor das células.

Como a resolução de sinal apresentada não é suficiente para validar este decréscimo, analisou-se cada lâmina individualmente num microscópio confocal. Estes resultados, ainda preliminares, apontam também no sentido de diminuição da expressão de MGP ao redor das células nos clones.

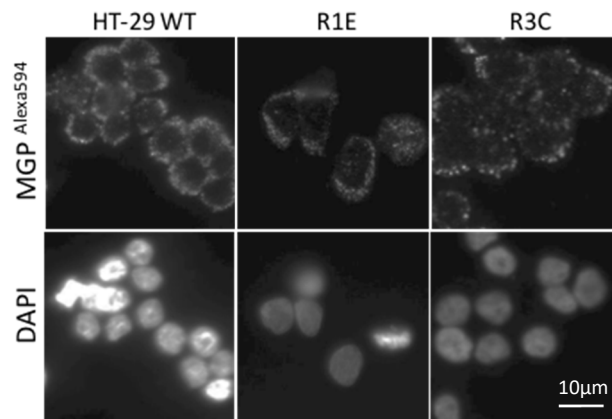


Figura 3.5. Detecção por imunocitoquímica de MGP em células HT-29 WT e clones. As células foram incubadas com anticorpo primário de coelho anti-MGP (1:100) seguido de anticorpo secundário Alexa Fluor® 594 de cabra anti-coelho (1:1000). As imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência Carl Zeiss Axioimager Z2. A barra de escala corresponde a 10µm.

No seu conjunto, os resultados até agora apresentados ao nível do transcrito (qPCR) e da proteína (*western-blot* e imunocitoquímica) indicam que houve bloqueio da expressão da MGP nos clones das células HT-29 transfetadas com siRNA1 e 3 em comparação com WT. Os resultados confirmam ainda a existência de diferenças entre as eficiências dos siRNAs utilizados, tal como referido pelo fabricante (Invitrogen) e sugerido pelos diferentes *scores* dos siRNAs.

2. O bloqueio da MGP afeta negativamente a capacidade proliferativa das células HT-29

Uma das principais características das células tumorais é a sua capacidade de proliferar descontroladamente, sendo isso mais ou menos evidente conforme o tipo tumoral (tumores indolentes, como o caso de tumores colorretais, cujo período de carcinogénese está estimado em vários anos, têm um potencial proliferativo mais baixo enquanto que tumores mais agressivos têm um potencial proliferativo maior, como é o caso de alguns tumores da mama, da tiroide e tumores germinativos) (Weinberg, 2014). Esta capacidade de proliferação

descontrolada depende de vários mecanismos diferentes, como por exemplo: hormonas e fatores de crescimento que transportam sinais que se ligam a recetores de superfície, estimulando vias de sinalização nas células tumorais responsáveis pela proliferação, mutação no oncogene *KRAS*, que impede a transdução de sinal do meio extracelular para o núcleo, ocorrendo um sinal contínuo e autónomo que promove a proliferação celular (Hanahan & Weinberg, 2011). São também conhecidos vários marcadores proliferativos dos diversos tumores, como por exemplo o Ki67, sendo estes utilizados para os caracterizar e definir estratégias anti-tumorais. Anteriormente, verificou-se que a MGP tem a capacidade de alterar a capacidade proliferativa de células tumorais, nomeadamente no cancro da mama (Tiago *et al.*, 2016). Neste estudo, verificou-se que a sobre-expressão de MGP leva à diminuição da capacidade proliferativa da linha celular MCF-7 e que o contrário também é verdade, um bloqueio da expressão de MGP leva ao aumento da capacidade proliferativa. Em conjunto esses resultados levaram à conclusão de que a MGP estaria implicada na proliferação e sugerem que outros mecanismos estão também implicados nessa capacidade.

No presente trabalho, os efeitos do bloqueio da expressão de MGP na capacidade proliferativa das células HT-29 foram avaliados pela adição do sal XTT às células ao fim de 1, 2, 4, 6 e 8 dias de proliferação (Figura 3.6A e Figura S4 em anexo).

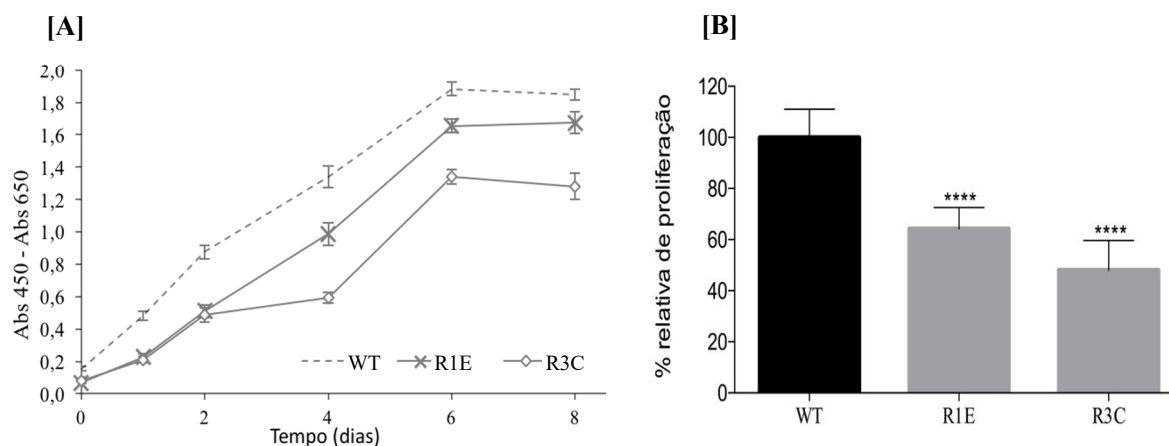


Figura 3.6. Análise da capacidade proliferativa das células HT-29 e clones de expressão. Os clones apresentam uma menor proliferação celular quando comparados com o WT. [A] As células foram monitorizadas durante 8 dias e a sua atividade metabólica foi avaliada aos 0, 1, 2, 4, 6 e 8 dias de cultivo através da adição de XTT e após 2h a leitura das absorvâncias a 450nm e 650nm no leitor de microplacas synergy4-Biotek. [B] Às 96 horas foi avaliada a percentagem relativa de proliferação dos clones em relação ao WT, sendo os dados apresentados como média e desvio padrão de replicados independentes (n=6). A significância estatística dos resultados foi obtida utilizando o software GraphPad prism 6.0 (Inc., La Jolla, CA, USA). As probabilidades abaixo de 5% ($P \leq 0,05$) foram consideradas estatisticamente significativas. **** $P \leq 0,0001$

Inicialmente foram plaqueadas 2000 células/poço em placas de 96 poços, pelo que todas as células partiram da mesma condição inicial. Ao longo do ensaio observaram-se sempre

alterações estatisticamente significativas no padrão proliferativo dos clones em relação ao WT (Figura S4). Analisou-se então isoladamente os clones E e C ao fim de 4 dias (96 horas), tendo-se observado uma diminuição de proliferação de cerca de 36% e 52%, respetivamente. Estes resultados sugerem o envolvimento da MGP na capacidade proliferativa da linha celular HT-29, no entanto não estão de acordo com os resultados observados para a linha celular MCF-7 (Tiago *et al.*, 2016) dando força à ideia de que outros mecanismos estarão implicados na capacidade proliferativa conferida às células tumorais.

3. O bloqueio da MGP em pelo menos um dos clones promove capacidade invasiva das células HT-29

Ao demonstrarmos que o bloqueio de MGP diminui a capacidade proliferativa dos clones, decidimos estudar que outros mecanismos seriam mediados, em parte, pela subexpressão desta proteína, como é caso da migração celular que pode ser afetada pela capacidade proliferativa das células.

No sentido de se perceber qual o efeito do bloqueio da expressão da MGP na capacidade migratória das células HT-29, e de posteriormente se utilizar esse mesmo resultado para normalizar a capacidade invasiva destas células, realizou-se um ensaio *wound-healing* ao longo de 72 horas.

Ao tempo zero (0h) foi feita uma ferida (*wound*) em cada placa de células de 6 poços, e registou-se, em fotografia, o avanço das células ao longo do tempo num local devidamente marcado. É possível verificar que as células com bloqueio de MGP apresentam uma diminuição na capacidade migratória, de 37% para o clone R1E e 46% para o clone R3C em relação ao WT (Figura 3.7). A capacidade migratória dos restantes clones poderá ser observada na Figura S5 em anexo, verificando-se uma diminuição de 48% e 20%, para os clones R1A e R1D, respetivamente. Estes resultados são de certa forma consistentes com aqueles observados no estudo dos glioblastomas, onde existia uma menor capacidade migratória nas linhas celulares de glioma com *knockdown* de MGP. Mais se acrescenta que é concebível que a interação específica com membros da família das proteínas morfogénicas do osso (BMPs) e/ou a ligação da MGP à Vitronectina possam mediar a migração destas células (Mertsch *et al.*, 2009).

De qualquer forma, a capacidade migratória das células tumorais é muito pouco informativa em relação à sua capacidade invasiva. Além disso, num estudo recentemente

realizado no nosso laboratório, verificou-se que o bloqueio da MGP é capaz de promover a capacidade invasiva de células do cancro da mama, sem, no entanto, alterar a sua capacidade migratória (Tiago *et al.*, 2016).

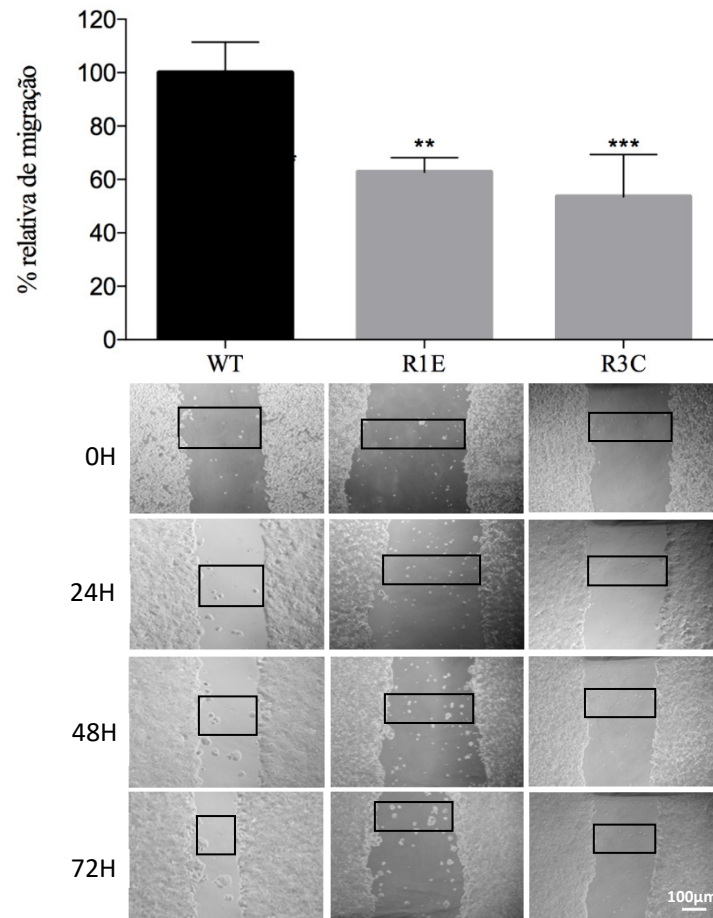


Figura 3.7. Migração de células HT-29 e clones com knockdown de MGP segundo o ensaio *wound-healing*. Células com bloqueio da expressão de MGP exibem uma menor capacidade migratória (n=5) quando comparadas com células WT não transfetadas. As probabilidades abaixo de 5% ($P \leq 0,05$) foram consideradas estatisticamente significativas. ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. As imagens apresentadas são representativas do ensaio com células HT-29 e clones, em intervalos de 24 horas. Para melhor ilustração, as margens das feridas estão marcadas nas imagens. A barra de escala corresponde a 100µm.

Neste trabalho, o efeito do bloqueio de MGP na capacidade invasiva das células HT-29 foi avaliado apenas para um clone de células, o R1E, através de câmaras de invasão matrigel. As células com capacidade invasiva são capazes de degradar a matriz e passar através do matrigel, onde posteriormente ficam retidas na membrana adjacente. Utilizamos uma coloração com azul de toluidina para corar estas células retidas e proceder à sua contagem. Neste ensaio, verificou-se que o número de células retidas na membrana adjacente ao matrigel, onde foram cultivadas células com *knockdown* de MGP (clone R1E), era maior do que na membrana adjacente ao matrigel, onde foram cultivadas células HT-29 WT (Figura 3.8).

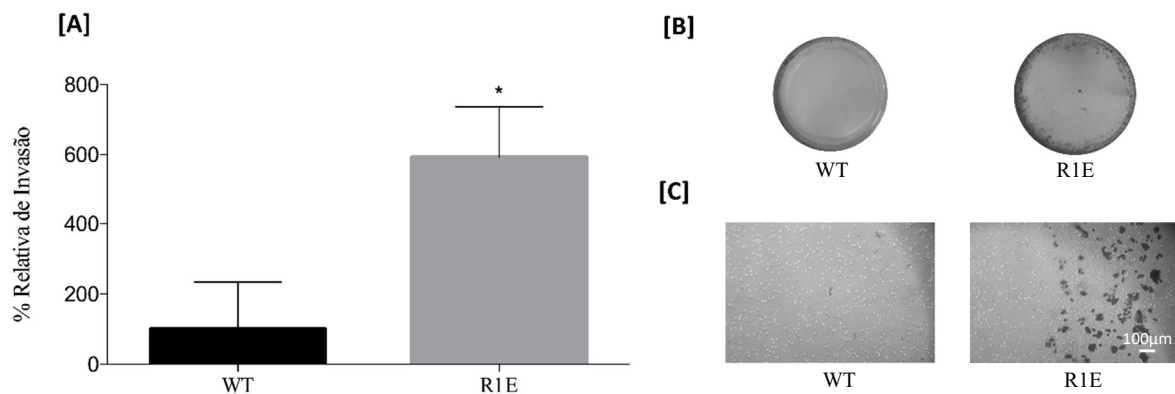
Após normalização dos dados com a respetiva capacidade migratória das células, conforme descrito no manual de utilização das câmaras de invasão (Equação 1), calculou-se a percentagem relativa de invasão.

Equação 1:

$$\% \text{ Invasão} = \frac{\text{Média de células que invadem a membrana do insert com matrigel}}{\text{Média de células que migram através da membrana do insert controlo}} \times 100$$

Nota: Como não existiam inserts controlo ao nosso dispor, utilizámos o valor da migração das células determinado pelo ensaio “wound-healing” em vez da “Média de células que migram através da membrana do “insert” controlo”.

Apesar de se verificar uma grande variabilidade entre ensaios (ensaio com 3 replicados), os resultados sugerem de forma clara que o clone R1E é muito mais invasivo do que as células WT, observando-se uma percentagem relativa de invasão no clone R1E de $593\% \pm 83\%$ em comparação com as células WT com uma percentagem relativa de invasão de $100\% \pm 77\%$.



3.8. Efeito do bloqueio da expressão de MGP na capacidade invasiva de células HT-29. As células foram transfetadas com o vetor pcDNA6.2 contendo o siRNA1 e comparadas contra o WT (controlo). **[A]** A invasão celular foi avaliada após plaqueamento de $2,5 \times 10^5$ células no matrigel e detetada por coloração com azul de toluidina das células nos *inserts*. As probabilidades abaixo de 5% ($P \leq 0,05$) foram consideradas estatisticamente significativas ($n=3$); $*P \leq 0,05$, teste estatístico *t-student*. **[B]** Fotografia representativa de dois *inserts* após o ensaio de invasão. **[C]** Fotografia de células HT-29, com *knockdown* de MGP, invasivas e o respetivo controlo, células WT. A barra de escala corresponde a $100\mu\text{m}$.

Globalmente, estes resultados sugerem que a MGP tem um efeito anti-tumorigénico no clone R1E. Este efeito poderá estar relacionado com a capacidade que a MGP tem de interagir com proteínas de matriz extracelular, como a Vitronectina, bloqueando-as (Nishimoto & Nishimoto, 2005). Já anteriormente, em células de cancro da mama, se tinha demonstrado que a Vitronectina promovia a invasão celular através da ligação específica ao recetor de integrinas $\alpha\beta 3$ (Pola *et al.*, 2013).

De acordo com o que já foi descrito, foi proposto um mecanismo no qual a MGP inibe os sinais invasivos da Vitronectina regulando desta forma a invasão celular (Tiago *et al.*, 2016). Esse mecanismo vai de encontro aos resultados observados neste trabalho, uma vez que há maior capacidade de invasão por parte de células com bloqueio de expressão da MGP, i.e, como há menos disponibilidade de MGP para inibir a Vitronectina esta vai promover a invasão celular.

4. A via Notch está ativada em células HT-29 com bloqueio da MGP

A transformação de uma célula normal para uma célula cancerígena resulta da acumulação de mudanças genéticas que por sua vez promovem, entre outros mecanismos, a alteração da expressão genética (Weinberg, 2014). Assim, a identificação e caracterização de genes com expressão alterada entre células tumorais comparados com células normais (controlo), ou entre células tumorais com diferentes características (ex. diferente capacidade invasiva), permite estudar mecanismos e vias de sinalização alteradas com o objetivo de desenvolver biomarcadores para diagnóstico ou tratamento do cancro (Luo *et al.*, 2001).

Estudos anteriores sugerem que a MGP interage na matriz extracelular com proteínas tais como a BMP-2 (Schurgers *et al.*, 2008) ou a Vitronectina (Nishimoto & Nishimoto, 2005), e assim regula vias de sinalização celular ativadas pelos respetivos recetores na membrana celular. Também o seu envolvimento na angiogénese e angiogénese tumoral, bem como calcificação vascular, foi relacionado com o bloqueio sinérgico das vias Notch e BMP (Sharma & Albig, 2013).

Com o intuito de se perceber se algumas destas vias estavam envolvidas nos efeitos promovidos pelo bloqueio da MGP nas células HT-29, fez-se uma pesquisa bibliográfica com o objetivo de identificar genes ativados por estas vias. Assim na tabela 2 temos o conjunto de 11 genes previamente associados as estas vias, a respetiva via de sinalização afetada, e uma breve descrição dos artigos em causa.

Tabela 2. Genes descritos na literatura como diferencialmente expressos

Gene	Via Afetada	Descrição	Artigo
<i>DLL4</i>	Notch	Em células microvasculares humanas endoteliais a ativação da via Notch tem efeitos sobre o crescimento endotelial durante a angiogénese.	Sharma & Albig, 2013
<i>JAG1</i>			
<i>HES1</i>			

<i>EFNB2</i>		Na linha celular de cancro da mama, MCF7, os complexos IGF-1:IGFBP:VN que se formam aumentam a proliferação, adesão e migração das células bem como a sua sobrevivência facilitando o processo metastático.	Kashyap <i>et al.</i> , 2011
<i>BHLHB2</i>			
<i>F3</i>	PI3K/AKT:IGF:mTOR		
<i>SFN</i>			
<i>PAI1</i>			
<i>IRS1</i>			
<i>CTNNBIP1</i>	Wnt/BMP2	A via de sinalização BMP ativa ou inibe a via de sinalização Wnt dependendo da expressão dos genes <i>SMAD4</i> e <i>P53</i> em células tumorais colorretais.	Voorneveld <i>et al.</i> , 2015
<i>DVL1</i>			

Sempre que possível, utilizaram-se no nosso trabalho os mesmos *primers* que foram anteriormente utilizados nos respetivos estudos. De entre os genes analisados por RT-qPCR (n=4), apenas genes associados à via Notch e à via da Vitronectina apareceram com expressão alterada, embora nem sempre de forma significativa e constante para os 2 clones analisados. Em relação ao *JAG1* e *HES1*, os 2 genes associados à via Notch, verificou-se um aumento de 87% (não significativo) e 199% (significativo) para o *JAG1*, e de 96% (significativo) e 243% (significativo) para o *HES1*, nos clones R1E e R3C, respetivamente (Figura 3.9).

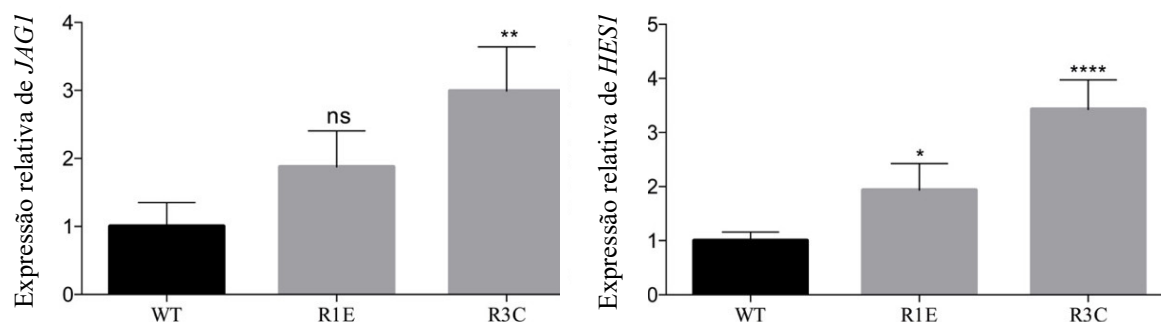


Figura 3.9. Análise da expressão relativa dos genes *JAG1* e *HES1* (calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$). Os dados foram obtidos por amplificação por PCR tempo real utilizando *primers* específicos e normalizando contra o gene *housekeeping GAPDH*. Os resultados representam os valores de média mais desvio padrão de 4 replicados independentes. Os resultados do PCR quantitativo em tempo real, analisados através do teste estatístico ANOVA para dados emparelhados, assim como a significância estatística dos resultados foi obtida utilizando o software GraphPad prism 6.0 (Inc., La Jolla, CA, USA). As probabilidades abaixo de 5% ($P \leq 0,05$) foram consideradas estatisticamente significativas. (ns) não significativo, $*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$, $****P \leq 0,0001$

Estes resultados sugerem que a via Notch está associada aos efeitos promovidos pelo bloqueio da MGP nas células HT-29, e estão em concordância com aqueles obtidos por Sharma & Albig (2013), que sugeriam que a MGP atuava como inibidora da expressão de *HES1* e da

angiogénese ao suprimir a expressão do gene *JAG1*, responsável pela promoção da angiogénese e ramificação endotelial bem como ativação da via de sinalização Notch. Esta via é altamente conservada e controla um conjunto de processos como crescimento, diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (Benedito *et al.*, 2009). A MGP opera como um agente balanceador entre *JAG1* e *DLL4* para que ocorra normal estabelecimento e manutenção da vasculatura (Benedito *et al.*, 2009). A ativação da via de sinalização Notch, por um ou por outro gene, despoleta atividades angiogénicas distintas.

Os nossos resultados parecem ainda ser concordantes com aqueles previamente obtidos para tumores da próstata metastáticos, onde se verificou que o *JAG1* se encontrava sobre-expresso em comparação com tecido normal ou tecido cancerígeno localizado, sugerindo que a via de sinalização Notch é importante para a progressão do cancro através do aumento da invasão celular (Wang *et al.*, 2010).

Assim, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, poder-se-á pensar numa terapêutica para o CCR, em que a inativação de genes específicos implicados na via Notch como *JAG1*, poderão levar a uma possível diminuição da invasão celular. Por forma a provar que a via de sinalização Notch está de fato envolvida na invasão celular, poder-se-á no futuro realizar um estudo do efeito do bloqueio da expressão de *JAG1*, ou mesmo toda a sinalização Notch, na invasão celular de células WT vs clones com subexpressão de MGP.

No entanto, outras vias de sinalização ou outros genes poderão estar implicados nestes processos e mais estudos serão necessários para compreender estes mecanismos ao pormenor e desenvolver um biomarcador robusto. Futuramente o ideal seria recorrer à técnica de *RNAseq* ou *microarrays* para medição dos níveis relativos dos transcritos com maior nível de expressão.

Em relação à Vitronectina, sabe-se que esta pode associar-se ao IGF-I (*insulin growth factor-I*) e assim controlar funções biológicas como a proliferação e a migração celular (Kashyap *et al.*, 2011). Em relação aos resultados obtidos, verificou-se uma alteração em apenas três dos seis genes associados à Vitronectina e identificados na tabela 2, e apenas os resultados do clone R3C são estatisticamente significativos. De forma interessante, é precisamente neste clone que se verifica um maior efeito do bloqueio da MGP na proliferação e na migração (apesar de não existirem ainda dados relativamente à capacidade invasiva do clone R3C). Assim, neste clone verificou-se um aumento de 192%, 438% e 263% em relação ao WT para os genes *EFNB2*, *BHLHB2* e *SFN*, respetivamente (Figura 3.10). Estes resultados corroboram a

tese de que a MGP interage com a Vitronectina, bloqueando-a, e ao inibir a expressão de estes e outros genes não analisados regula funções biológicas como a proliferação e a migração. Os recetores Eph são uma família de recetores de quinases de tirosina que têm como ligandos epherinas, tal como o EFNB2 (Kashyap *et al.*, 2011).

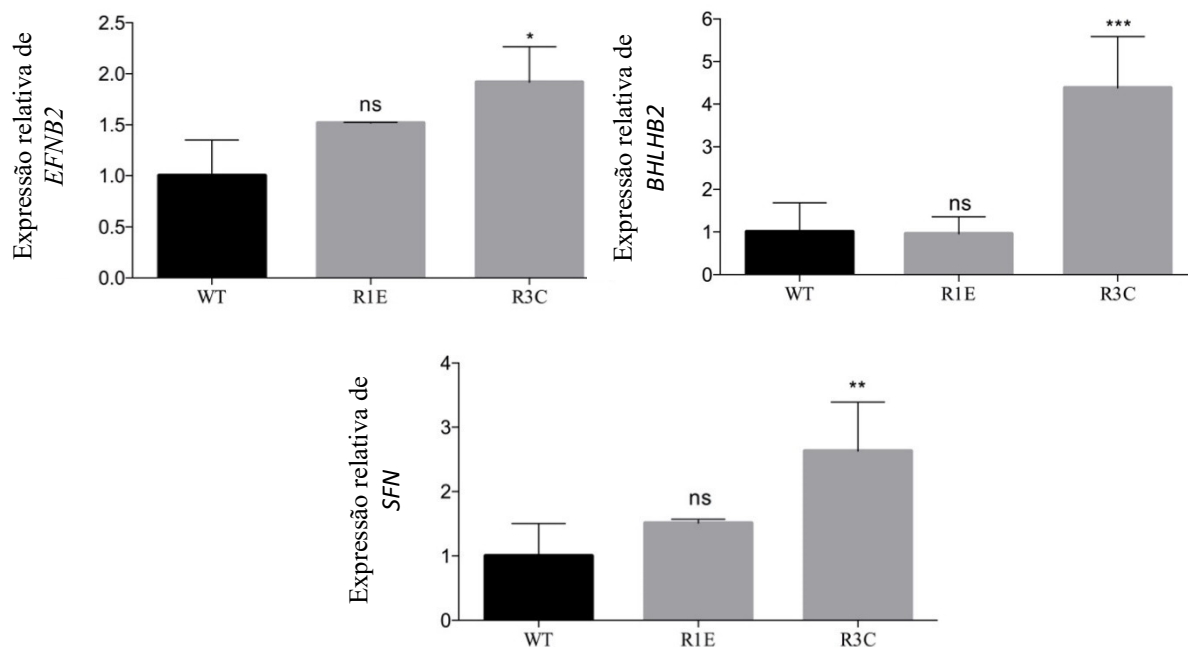


Figura 3.10. Análise da expressão relativa dos genes *EFNB2*, *BHLHB2* e *SFN*. Os dados representam os valores de média mais desvio padrão de 4 replicados independentes. Os resultados do PCR quantitativo em tempo real, analisados através do teste estatístico ANOVA para dados emparelhados e a significância estatística dos resultados foi obtida utilizando o software GraphPad prism 6.0 (Inc., La Jolla, CA, USA). As probabilidades abaixo de 5% ($P \leq 0,05$) foram consideradas estatisticamente significativas. (ns) não significativo, * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

As eferinas estão frequentemente sobre-expressas numa variedade de tumores e linhas celulares tumorais, incluindo cancro do cólon e medeiam as interações célula a célula, quer entre células do microambiente tumoral quer entre o estroma e vasculatura tumoral (Brantley-Sieders *et al.*, 2004).

O gene *EFNB2*, em particular, encontra-se expresso em pericitos e células vasculares do músculo liso, participando de forma ativa na neoangiogénese (Foo *et al.*, 2006). Como tal, a alteração da expressão do gene *EFNB2* foi ligado a invasão celular e metástases (Brantley-Sieders *et al.*, 2004).

Por sua vez, o gene *BHLHB2* está fortemente associado com HIF-1 α , tendo diferentes papéis na proliferação, apoptose e diferenciação celular em condrócitos (Chakrabarti *et al.*, 2004). É também um regulador do ritmo circadiano que, quando perturbado, pode induzir

várias patologias, incluindo cancro, estando envolvido na transição epitélio-mesênquima (Sato *et al.*, 2016).

Por fim, *Stratifin* (*SFN*) é um gene que regula a função de metaloproteínas e a degradação da matriz extracelular durante o desenvolvimento e progressão de tumores epiteliais (Plant *et al.*, 2014). Foi descrita também a relação deste gene com a proliferação celular em adenocarcinoma do pulmão. A supressão da *SFN* reduz significativamente a proliferação celular na linha celular A549 e a metastização em ratinhos com *knockdown* de *SFN* (Shiba-Ishii *et al.*, 2015). Concluindo, embora não existam dados em relação à capacidade invasiva do clone R3C, o envolvimento da via PI3K/Akt:IGF:mTOR associada à Vitronectina poderá ser um mecanismo importante para os efeitos promovidos pela MGP (ou o seu bloqueio) nas células HT-29.

Por último, para além dos membros das vias Notch e PI3K/AKT, também é concebível a interação da MGP com membros da família das BMPs (proteínas morfogénicas do osso), tal como previamente referido (Mertsch *et al.*, 2009).

No sentido de esclarecer esta potencial interação MGP-BMPs, decidimos realizar um ensaio preliminar para averiguar a existência da via de sinalização das BMPs nas células HT-29 e a sua possível alteração nos clones. Para isso, utilizámos um vetor contendo elementos de resposta às BMPs (BRE) associado à atividade da luciferase *firefly* (vetor BRE-FLuc; gentilmente cedido pelo Dr. Peter ten Dijke da Leiden University Medical Center, Leiden, Holanda) (Korchynskiy & ten Dijke, 2002). Transfetaram-se as células HT-29 e os clones, duas vezes, com o vetor BRE-FLuc em simultâneo com um vetor de normalização contendo a luciferase de Renilla (RLuc) associado ao promotor TK. Apesar da atividade RLuc ser relativamente elevada (aproximadamente 2000), demonstrando uma eficiência elevada da transfeção, não se verificou qualquer atividade de FLuc nas células, demonstrando que a via das BMPs (pelo menos a canónica) não se encontrava ativa.

Assim, decidimos avançar com uma análise por RT-PCR *array* da expressão relativa dos genes *CTNNBIP1* e *DVL1* (Tabela 2), descritos na literatura como sobre-expressos em tumores colorretais (Voorneveld *et al.*, 2015). No entanto, também não se verificou nenhuma alteração da expressão destes genes nos clones R1E e R3C (gráficos não apresentados). Contudo, não podemos descartar uma possível interação da BMP-2 com a MGP, tendo em conta os vários estudos já realizados que demonstram que esta interação é real e que tem efeitos reais ao nível celular. Num destes estudos, demonstrou-se que a interação entre a MGP e a BMP-2

impedia que a BMP-2 se ligasse ao seu recetor e ativasse as Smad1 (Zebboudj *et al.*, 2002), e que a repressão da via de sinalização BMP pela MGP poderia manter as células num estado indiferenciado e com um maior potencial migratório (Canoll & Goldman, 2008).

De fato, esta regulação da BMP2 pela MGP até é um mecanismo bastante plausível, uma vez que foi demonstrado que a ativação da via Wnt/ β -catenina, tão importante em tumores colorretais, induz a expressão de genes alvo da via BMP em tumores esporádicos no cólon (Kim *et al.*, 2002).

De uma forma geral, concluiu-se que várias vias de sinalização poderão interferir com diversos mecanismos como a proliferação, a migração e a invasão nas células HT-29, destacando-se na nossa análise a via Notch e a via PI3K/Akt:IGF:mTOR associada à Vitronectina.

Capítulo IV

Conclusão e Perspetivas Futuras

Em conclusão, este trabalho proporcionou novos conhecimentos ao nível dos efeitos do bloqueio da MGP em tumores colorretais. Em particular, verificou-se que o bloqueio da MGP em células HT-29 de tumores do cólon inibe 1) a atividade proliferativa, 2) migratória e 3) induz a capacidade invasiva das células. Ficam ainda por esclarecer qual ou quais os mecanismos pelos quais a MGP promove os seus efeitos. No entanto, foi possível identificar genes diferencialmente expressos associados às vias Notch e PI3K/AKT (associada à ativação da via mTOR pela Vitronectina), sugerindo o envolvimento das mesmas nos efeitos observados. Um possível mecanismo seria a interação da MGP, ou, neste caso, ausência de interação, e respetiva inibição das proteínas efetoras destas vias na matriz extracelular, para onde a MGP é normalmente secretada.

De uma forma geral, apesar do progresso que se tem observado na tentativa de redução das taxas de incidência e mortalidade e no aumento da sobrevivência, o CCR ainda é responsável por mais mortes do que as provocadas pelas doenças cardiovasculares em pessoas com menos de 85 anos. Mais progressos poderão ser desenvolvidos através da aplicação de conhecimentos existentes sobre controlo do cancro em todos os segmentos da população e apoiando novas descobertas/investigações na prevenção do cancro, deteção precoce e tratamento. Nesse sentido, todos os novos conhecimentos adquiridos ao longo deste estudo abrem caminho, no nosso ponto de vista, à validação da MGP, e vias por esta controladas, como bons alvos terapêuticos no CCR.

No entanto, futuramente será necessário esclarecer alguns pontos em relação ao envolvimento da MGP no CCR, e nas células HT-29 em particular. Nos clones das células HT-29, apesar de se ter verificado o bloqueio da expressão da MGP a diferentes níveis e apesar de se ter validado este bloqueio através de várias técnicas, será necessário repetir a análise da expressão da proteína no meio extracelular por *Western Blot*, de forma a confirmar a reprodutibilidade deste resultado. Será também importante expandir a nossa análise da invasão celular aos restantes clones, nomeadamente em relação ao clone R3C, de forma a confirmar este efeito. Refira-se que o clone R3C é o clone que apresenta maior alteração da expressão de genes associados às vias Notch e PI3K/Akt, e seria, portanto, importante perceber se existe uma correspondência com a capacidade invasiva destas células. Ainda em relação à expressão genética, seria importante realizar uma análise mais alargada de genes diferencialmente expressos na linha celular HT-29 recorrendo, por exemplo, às técnicas de *microarray* ou *RNAseq*. Em última análise, a confirmação das vias até ao momento

identificadas, i.e. Notch e PI3K/Akt, seriam passíveis de serem confirmadas através do bloqueio das mesmas com moléculas previamente desenvolvidas, e confirmação da reversibilidade dos efeitos proliferativos, migratórios e invasivos. Num outro registo, seria importante estender a nossa análise a outras linhas celulares do CCR previamente estabelecidas, tais como Caco-2. Por último, seria crucial fazer a ligação entre genes diferencialmente expressos nas linhas celulares de CCR com genes diferencialmente expressos em biopsias de tumores do CCR.

Após a confirmação deste mecanismo tumoral, poder-se-ia pensar nas diferentes estratégias terapêuticas anti-tumorais. Estas poderiam passar não pelo bloqueio específico da MGP dirigidos às células tumorais do CCR, mas sim pelo bloqueio das respetivas vias por esta reguladas (até agora Notch e PI3k/Akt). Eventualmente poder-se-ia tentar um bloqueio direto destas vias através de moléculas previamente desenvolvidos, ou então tentar uma indução da MGP nestes tumores através de técnicas como a terapia génica. A vantagem desta última estaria na possibilidade da MGP controlar várias vias em simultâneo. A desvantagem é que, pelos efeitos até agora observados nas células HT-29 (ex. pró-proliferativos), o efeito da MGP também poderá ser deletério.

Bibliografia

- American Cancer Society. (2016). *Colon/Rectum Cancer*. [online] Cancer.org. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer/index> [Acedido a 11 agosto 2016].
- Baeriswyl, V., Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, **19**, pp.329–337.
- Benedito, R., Roca, C., Sörensen, I., Adams, S., Gossler, A., Fruttiger, M., Adams, RH. (2009). The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell*, **137**, pp.1124–1135.
- Berdasco, M., Esteller, M. (2010). Aberrant epigenetic landscape in cancer: How cellular identity goes awry. *Developmental Cell*, **19**, pp.698–711.
- Bergers, G., Benjamin, LE. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*, **3**, pp.401–410.
- Berx, G., van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **1**, pp.a003129.
- Bhowmick, NA., Neilson, EG., Moses, HL. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, **432**, pp.332–337.
- Bianchi, F., Hu, J., Pelosi, G., Cirincione, R., Ferguson, M., Ratcliffe, C., Di Fiore, PP., Gatter, K., Pezzella, F., Pastorino, U. (2004). Lung cancers detected by screening with spiral computed tomography have a malignant phenotype when analyzed by cDNA microarray. *Clinical Cancer Research*, **10**(18 Pt 1), pp.6023–6028.
- Blasco, MA. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics*. **6**, pp.611–622.
- Brantley-Sieders, D., Schmidt, S., Parker, M., Chen, J. (2004). Eph receptor tyrosine kinases in tumor and tumor microenvironment. *Current Pharmaceutical Design*, **10**(27), pp.3431–3442.
- Caiado, H. (2014). *Functional analysis of a transcriptional variant of Matrix Gla Protein (MGP)*. Dissertação de mestrado, Universidade do Algarve.
- Cancela, L., Hsieh, C., Francket, U., Price, PA. (1990). Molecular Structure, Chromosome Assignment and Promoter Organization of the Human Matrix Gla Protein Gene. *The Journal of Biological Chemistry*, **265**(25), pp. 15040–15048.
- Cancela, M., Hu, B., Price, P. (1997). Effect of cell density and growth factors on matrix GLA protein expression by normal rat kidney cells. *Journal of Cellular Physiology*, **171**(2), pp.125–134.

Cancela, M., Laizé, V., Conceição, N. (2014). Matrix Gla protein and osteocalcin: From gene duplication to neofunctionalization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **561**, pp.56-63.

Cancela, ML., Price, PA. (1992). Retinoic acid induces matrix Gla protein gene expression in human cells. *Endocrinology*, **130**(1), pp.102-108.

Cancer Research UK, C. (2016). *Bowel cancer (colorectal cancer)*. [online] Cancerresearchuk.org. Disponível em: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/bowel-cancer/> [Acedido a 18 junho 2016].

Canoll, P., Goldman, JE. (2008). The interface between glial progenitors and gliomas. *Acta Neuropathologica*, **116**(5), pp.465-77.

Cavallaro, U., Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews Cancer*, **4**, pp.118–132.

Chakrabarti, J., Turley, H., Campo, L., Han, C., Harris, AL., Gatter, KC., Fox, SB. (2004). The transcription factor DEC1 (stra13, SHARP2) is associated with the hypoxic response and high tumor grade in human breast cancers. *British Journal of Cancer*, **91**(5), pp.954-958.

Chen, L., O'Bryan, J. P., Smith, H. S., Liu, E. (1990). Overexpression of matrix Gla protein mRNA in malignant human breast cells: Isolation by differential cDNA hybridization. *Oncogene*, **5**(9), pp.1391-1395.

Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., Moses, H.L. (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Molecular Cancer Research*, **6**, pp.1521–1533.

Cohen, S., Leininger, A. (2014). The genetic basis of Lynch syndrome and its implications for clinical practice and risk management. *The Application of Clinical Genetics*, **7**, pp.147-158.

Conceição, N., Henriques, N., Ohresser, M., Hublitz, P., Schüle, R., Cancela, M. (2002). Molecular cloning of the Matrix Gla Protein gene from *Xenopus laevis*. *European Journal of Biochemistry*, **269**(7), pp.1947-1956.

Conceição, N., Laizé, V., Simões, B., Pombinho, A., Cancela, M. (2008). Retinoic acid is a negative regulator of matrix Gla protein gene expression in teleost fish *Sparus aurata*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, **1779**(1), pp.28-39.

Cotter, J., Lima, S., Barroso, S., Marinho, C., Moutinho, P., Rodrigues, A., Alberto, L., Moreira, MJ., Lobo, L. (2008). Rastreio endoscópico do Cancro Colorrectal: experiência de dois anos. *Jornal Português de Gastreenterologia*, **15**(4), pp.156-60.

de Wilde, J., Wilting, SM., Meijer, CJ., van de Wiel, MA., Ylstra, B., Snijders, PJ., Steenbergen, RD. (2008). Gene expression profiling to identify markers associated with deregulated hTERT in HPV transformed keratinocytes and cervical cancer. *International Journal of Cancer*, **122**(4), pp.877-888.

DeNardo, DG., Andreu, P., Coussens, LM. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. *Cancer and Metastasis Reviews*, **29**, pp.309–316.

Draviam, VM., Shapiro, I., Aldridge, B., Sorger, PK. (2006). Misorientation and reduced stretching of aligned sister kinetochores promote chromosome missegregation in EB1 or APC depleted cells. *EMBO Journal*, **25**, pp.2814-2827.

Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genetics*, **8**, pp.286–298.

Fan, C., Sheu, D., Fan, H., Hsu, K., Allen Chang, C., Chan, E. (2001). Down-regulation of matrix Gla protein messenger RNA in human colorectal adenocarcinomas. *Cancer Letters*, **165**(1), pp.63-69.

Farzaneh-Far, A., Davies, JD., Braam, LA., Spronk, HM., Proudfoot, D., Chan, SW., O’Shaughnessy KM., Weissberg, PL., Vermeer, C., Shanahan, CM. 2001. A polymorphism of the human matrix gamma-carboxyglutamic acid protein promoter alters binding of an activating protein-1 complex and is associated with altered transcription and serum levels. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(35), pp.32466-32473.

Fauci, AS., Braunwald, E., Kasper, DL., Hauser, SL., *et al.* (2008). Harrison’s Principles of internal medicine. New York, *McGraw Hill*, 19th edition.

Fazenda, C., Silva, I., Cancela, M., Conceição, N. (2012). Molecular characterization of two paralog genes encoding Gla-rich protein (Grp) in zebrafish. *Journal of Applied Ichthyology*, **28**(3), pp.377-381.

Fearnhead, N. (2001). The ABC of APC. *Human Molecular Genetics*, **10**(7), pp.721-733.

Foo, SS., Turner, CJ., Adams, S., Compagni, A., Aubyn, D., Kogata, N., Lindblom, P., Shani, M., Zicha, D., Adams, RH. (2006). Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly. *Cell*, **124**, pp.161-173.

Forno, SEA. (2009). *O Cancro colo-rectal e o rastreio: Conhecimentos e atitudes dos portuenses*. Dissertação de mestrado, Universidade do Porto.

Fraser, JD., Price, PA. (1988). Lung, Heart and Kidney express high levels of mRNA for the vitamin K-dependent Matrix Gla Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, **263**(25), pp.11033-11036.

Giardiello, F., Allen, J., Axilbund, J., Boland, C., Burke, C., Burt, R., Church, J., Dominitz, J., Johnson, D., Kaltenbach, T., Levin, T., Lieberman, D., Robertson, D., Syngal, S., Rex, D. (2014).

Guidelines on Genetic Evaluation and Management of Lynch Syndrome: A Consensus Statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, **147**(2), pp.502-526.

Gonzalez, P., Epstein, DL., Borrás, T. (2000). Characterization of gene expression in human trabecular meshwork using single-pass sequencing of 1060 clones. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **41**, pp.3678–3693.

Gregorieff, A., Clevers, H. (2005). Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes & Development*, **19**(8), pp.877-890.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, **140**, pp.883–899.

Guedes, M., Barbosa, S., Nogueira, L. (2010). A colonoscopia virtual no rastreio do cancro rectal. 1st ICH Gaia-Porto, pp.1-9.

Guo, L., Guo, XB., Jiang, JL., Zhang, JN., Ji, J., Liu, BY., Zhu, ZG., Yu, YY. (2010). Discovery and verification of matrix Gla protein, a TNM staging and prognosis-related biomarker for gastric cancer. *Chinese journal of pathology*, **39**(7), pp.436-441.

Hale, JE., Fraser, JD., Price, PA. (1988). The Identification of Matrix Gla Protein in Cartilage. *The Journal of Biological Chemistry*, **263**(12), pp.5820-5824.

Hanahan, D., Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, **86**, pp.353–364.

Hanahan, D., Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, **144**(5), pp.646-674.

Hashimoto, F., Kobayashi, Y., Kobayashi, ET., Sakai, E., Kobayashi, K., Shibata, M., Kato, Y., Sakai, H. (2001). Expression and localization of MGP in rat tooth cementum. *Archives of Oral Biology*, **46**(7), pp.585-592.

He, J., Stram, D., Kolonel, L., Henderson, B., Le Marchand, L., Haiman, C. (2010). The association of diabetes with colorectal cancer risk: The multiethnic cohort. *British Journal of Cancer*, **103**(1), pp.120-126.

Hobbs, FDR. (2000). ABC of colorectal cancer. The role of primary care. *BMJ*, **321**, pp.1068-1070.

Hough, CD., Cho, KR., Zonderman, AB., Schwartz, DR., Morin, PJ. (2001). Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer. *Cancer research*, **61**, pp.3869-3880.

International Agency for Research on Cancer. (2013). Latest world cancer statistics Global cancer burden rises to 14.1 million new cases in 2012: Marked increase in breast cancers must be addressed. *Press release*, **223**.

Jackson, SP., Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, **461**, pp.1071–1078.

Jen, J., Powel, SM., Papadopoulos, N., Smith, KJ., Hamilton, SR., Vogelstein, B., Kinzler, KW. (1994). Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer research*, **54**, pp.5523-5526.

Jones, P.A., Baylin, SB. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, **128**, pp.683–692.

Junqueira, LC., Carneiro, J. (2008). Histologia básica. Rio de Janeiro, *Guanabara*, 10ª edição.

Junttila, MR., Evan, GI. (2009). p53 – a Jack of all trades but master of none. *Nature Reviews Cancer*, **9**, pp.821–829.

Kashyap, AS., Hollier, BG., Manton, KJ., Satyamoorthy, K., Leavesley, DI., Upton, Z. (2011). Insulin-like growth factor-I: vitronectin complex-induced changes in gene expression effect breast cell survival and migration. *General endocrinology*, **152**, pp.1388-1401.

Kastan, MB. (2008). DNA damage responses: mechanisms and roles in human disease: 2007 G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Molecular Cancer Research*, **6**, pp.517–524.

Katoh, M., Kato, M. (2006). Notch ligand, JAG1, is evolutionarily conserved target of canonical WNT signaling pathway in progenitor cells. *International Journal of Molecular Medicine*, **17**(4), pp. 681-685.

Kasztelan-Szczerbińska, B., Cichoz-Lach, H., Stomka, M. (2008). Colorectal cancer as a health care problem: evaluation of the current diagnostic options. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, **118**(4), pp.224-226.

Keutel, J., Jorgensen, G., Gabriel, P. (1972). A new autosomal recessive syndrome: peripheral pulmonary stenoses, brachytelephalangism, neural hearing loss and abnormal cartilage calcifications-ossification. *Birth Defects Original Article Series*, **5**, pp.60–68.

Khosroshahi, H., Sahin, S., Akyuz, Y., Ede, H. (2014). Long term follow-up of four patients with Keutel syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, **164**(11), pp.2849-2856.

Kim, J., Crooks, H., Dracheva, T., Nishanian, TG., Singh, B., Jen, J., Waldman, T. (2001). Oncogenic β -catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells. *Cancer Research*, **62**(10), pp.2744-2748

Kini, U., Nandeesh, BN. (2012). Physiology of bone formation, remodelling and metabolism. *Radionuclear Hybrid Bone Imaging*. pp.29-57.

Kirfel, J., Kelter, M., Cancela, ML., Price, PA., Schule, R. 1997. Identification of a novel negative retinoic acid responsive element in the promoter of the human matrix Gla protein gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**, pp.2227-2232.

Korchynskiy, O., ten Dijke, P. (2002). Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, pp.4883–4891.

Kuipers, EJ., Grady, WM., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, JJ., Boelens, PG., Van De Velde, CJH., Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature Publishing Group*, **1**, pp. 1–25.

Kulman, JD., Harris, JE., Haldeman, BA., Davie, EW. (1997). Primary structure and tissue distribution of two novel proline-rich γ -carboxyglutamic acid proteins. *Proceedings of the national academy of sciences*, **94**, pp. 9058-9062.

Kuzontkoski PM, Mulligan-Kehoe, MJ., Harris, BT., Israel, MA. (2010). Inhibitor of DNA binding-4 promotes angiogenesis and growth of glioblastoma multiforme by elevating matrix GLA levels. *Oncogene*, **29**, pp.3793–802.

Lamouille, S., Xu, J., Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **15**(3), pp.178-196.

Lenaerts, K., Bouwman, FG., Lamers, WH., Renes, J., Mariman, EC. (2007). Comparative proteomic analysis of cell lines and scrapings of the human intestinal epithelium. *BMC Genomics*, **8**, pp.91-105.

Leslie, A., Steele, RJC. (2002). Management of colorectal cancer. *Postgraduate Medical Journal*, **78**, pp.473-478.

Levedakou., EN; Strohmeyer., TG; Effert., PJ; Liu., ET. (1992). Expression of the matrix Gla protein in urogenital malignancies. *International Journal of Cancer*, **52**, pp.534–537.

Li, J., Guo BC., Sun, LR., Wang, JW., Fu, XH., Zhang, SZ., Poston, G., Ding, KF. (2014). TNM staging of colorectal cancer should be reconsidered by T stage weighting. *World Journal of Gastroenterology*, **20**(17), pp.5104.

Livak, K., Schmittgen, T. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, **25**(4), pp.402-408.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, CA., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A. (2013). Molecular cell biology. New York, *Harvey Lodish*, 7th edition.

Luo, G., D'Souza, R., Hogue, D., Karsenty, G. (1995). The matrix Gla protein gene is a marker of the chondrogenesis cell lineage during mouse development. *Journal of Bone and Mineral Research*, **10**(2), pp.325-334.

Luo, G., Ducy, P., McKee, M., Pinero, G., Loyer, E., Behringer, R., Karsenty, G. (1997). Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*, **386**(6620), pp.78-81.

Melo, M., Braga, R. (2003). Rastreo do Cancro do Cólon e do Recto. *Revista Portuguesa de Clínica Geral*, **19**, pp.471-482.

Mertsch, S., Schurgers, L., Weber, K., Paulus, W. and Senner, V. (2009). Matrix gla protein (MGP): an overexpressed and migration-promoting mesenchymal component in glioblastoma. *BMC Cancer*, **9**(1), pp.302-313.

Micke, P., Kappert, K., Ohshima, M., Sundquist, C., Scheidl, S., Lindahl, P., Heldin, C., Botling, J., Ponten, F. and Östman, A. (2007). In Situ Identification of Genes Regulated Specifically in Fibroblasts of Human Basal Cell Carcinoma. *Journal of Investigative Dermatology*, **127**(6), pp.1516-1523.

Munroe, PB., Olgunturk, RO., Fryns, JP., Van Maldergem, L., Ziereisen, F., Yuksei, B., Gardiner, RM., Chung, E. (1999). Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nature Genetics*, **21**(1), pp.142-144.

Negrini, S., Gorgoulis, VG., Halazonetis, TD. (2010). Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **11**, pp.220–228.

Nelson, P., Kiriakidou, M., Sharma, A., Maniataki, E., Mourelatos, Z. (2003). The microRNA world: small is mighty. *Trends in Biochemical Sciences*, **28**, pp.534-540.

Neto, JRTN., Arcieri, JS., Teixeira, FR. (2011). Epidemiological aspects of colorectal polyps and flat adenomas. *Revista Brasileira de Coloproctologia*, **30**(4), pp.419-429.

Nishimoto, S., Nishimoto, M. (2005). Matrix Gla protein C-terminal region binds to vitronectin. Co-localization suggests binding occurs during tissue development. *Matrix Biology*, **24**(5), pp.353-361.

Plant, HC., Kashyap, AS., Manton, KJ., Hollier, BG., Hurst, CP., Stein, SR., Francis, GD., Beadle, GF., Upton, Z., Leavestley, DI. (2014). Differential subcellular and extracellular localisations of proteins required for insulin-like growth factor and extracellular matrix-induced signalling events in breast cancer progression. *BMC Cancer*, **14**, pp.627-641.

Pola, C., Formenti, SC., Schneider, RJ. (2013). Vitronectin- $\alpha v\beta 3$ integrin engagement directs hypoxia-resistant mTOR activity and sustained protein synthesis linked to invasion by breast cancer cells. *Tumor and Stem Cell Biology*, **73**(14), pp.4571-4578.

Price, P., Fraser, J., Metz-Virca, G. (1987). Molecular cloning of matrix Gla protein: implications for substrate recognition by the vitamin K-dependent gamma-carboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **84**(23), pp.8335-8339.

Price, PA. (1988). Role of Vitamin-K-Dependent proteins in bone metabolism. *Annual Review of Nutrition*, **8**, pp.565-583.

Price, PA., Williamson, MK. (1985). Primary structure of bovine matrix gla protein, a new vitamin k-dependent bone protein. *The Journal of Biological Chemistry*, **260**(26), pp.14971-14975.

- Price, PA., Urist, MR., Otawara, Y. (1983). Matrix Gla protein, a new γ -carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochemical Biophysical Research Communications*, **117**, pp.765–771.
- Psaila, B., Lyden, D. (2009). The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nature Reviews Cancer*, **9**(4), pp.285-293.
- Qian, BZ., Pollard, JW. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, **141**, pp.39–51.
- Ricarte Filho, JCM., Kimura, ET. (2006). MicroRNAs: novel class of gene regulators involved in endocrine function and cancer. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, **50**(6), pp.1102-1107.
- Salk, JJ., Fox, EJ., Loeb, LA. (2010). Mutational heterogeneity in human cancers: origin and consequences. *Annual Review of Pathology*, **5**, pp.51–75.
- Sato, F., Bhawal, UK., Yoshimura, T., Muragaki, Y. (2016). DEC1 and DEC2 crosstalk between circadian rhythm and tumor progression. *Journal of Cancer*, **7**(2), pp.153-159.
- Schurgers, L., Cranenburg, E., Vermeer, C. (2008). Matrix Gla-protein: The calcification inhibitor in need of vitamin K. *Thrombosis and Haemostasis*, **100**, pp.593-603.
- Shanahan, CM., Weissberg, PL., Metcalfe, JC. (1993). Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells. *Circulation research*, **73**, pp.193-204.
- Sharma, B., Albig, AR. (2013). Matrix Gla Protein reinforces angiogenic resolution. *Microvascular Research*, **85**, pp.24-33.
- Shay, JW., Wright, WE. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **1**, pp.72–76.
- Shiba-Ishii, A., Kim, Y., Shiozawa, T., Iyama, K., Satomi, K., Kano, J., Sakashita, S., Morishita, Y., Noguchi, M. (2015). Stratifin accelerates progression of lung adenocarcinoma at an early stage. *Molecular Cancer*, **14**, pp.142-148.
- Sigal, A., Rotter, V. (2000). Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Research*, **60**, pp.6788–6793.
- Smith, K., Bui, TD., Kaklamanis, L., Williams, G., Harris, AL. (1999). Up-regulation of macrophage wnt gene expression in adenoma-carcinoma progression of human colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, **81**(3), pp.496-502.
- Tiago, DM., Conceição, N., Caiado, H., Laizé, V., Cancela, ML. (2016). Matrix Gla protein repression by miR-155 promotes oncogenic signals in breast cancer MCF-7 cells. *FEBS Letters*, **590**, pp.1234-1241.

Tomarev, Sl., Wistow, G., Raymond, V., Dubois, S., Malyukova, I. (2003). Gene expression profile of the human trabecular meshwork: NEIBank sequence tag analysis. *Investigative Ophthalmology & visual science*, **44**(6), pp.2588-2596.

Vajdic, CM., van Leeuwen, MT. (2009). Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *International Journal of Cancer*, **125**, pp.1747–1754.

van den Boom, J., Wolter, M., Kuick, R., Misek, D., Youkilis, A., Wechsler, D., Sommer, C., Reifenberger, G. and Hanash, S. (2003). Characterization of Gene Expression Profiles Associated with Glioma Progression Using Oligonucleotide-Based Microarray Analysis and Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *The American Journal of Pathology*, **163**(3), pp.1033-1043.

VanPutte, C., Regan, J., Russo, A. (2016). Seeley's essentials of Anatomy & Physiology. New York, *McGraw-Hill Education*, 9th edition.

Vasen, H., Moslein, G., Alonso, A., Bernstein, I., Bertario, L., Blanco, I., Burn, J., Capella, G., Engel, C., Frayling, I., Friedl, W., Hes, F., Hodgson, S., Mecklin, J., Moller, P., Nagengast, F., Parc, Y., Renkonen-Sinisalo, L., Sampson, J., Stormorken, A., Wijnen, J. (2007). Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *Journal of Medical Genetics*, **44**(6), pp.353-362.

Su, LK., Vogelstein, B., Kinzler, KW. (1993). Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science*, **262**, pp.1734–1737.

Voorneveld, PW., Kodach, LL., Jacobs, RJ., van Noesel, CJM., Peppelenbosch, MP., Korkmaz, KS., Molendijk, I., Dekker, E., Morreau, H., van Pelt, GW., Tollenaar, RAEM., Mesker, W., Hawinkels, LJAC., Paauwe, M., Verspaget, HW., Geraets, DT., Hommes, DW., Offerhaus, GJA., van den Brink, GR., ten Dijke, P., Hardwick, JCH. (2015). The BMP pathway either enhances or inhibits the wnt pathway depending on the smad4 and p53 status in CRC. *British Journal of Cancer*, **112**, pp.122-130.

Wallin, R., Cain, D., Sane, DC. (1999). Matrix Gla protein synthesis and gamma-carboxylation in the aortic vessel wall and proliferating vascular smooth muscle cells-a cell system which resembles the system in bone cells. *Thrombosis and Haemostasis*, **82**(6), pp.1764-1767.

Wang, Z., Banerjee, S., Kong, D., Ahmad, A., Nogueira, V., Hay, N., Sarkar, FH. (2010). Down-regulation of Notch-1 and Jagged-1 inhibits prostate cancer cell growth, migration and invasion, and induces apoptosis via inactivation of Akt, mTOR, and NF- κ B signaling pathways. *Journal of Cellular Biochemistry*, **109**(4), pp.726-736

Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, **123**, pp.309–314.

Weaver, K., El Hallek, M., Hopkin, R., Sund, K., Henrickson, M., del Gaudio, D., Yuksel, A., Acar, G., Bober, M., Kim, J., Boyadjiev, S. (2014). Keutel syndrome: Report of two novel MGP mutations and discussion of clinical overlap with arylsulfatase E deficiency and relapsing polychondritis. *American Journal of Medical Genetics*, **164**(4), pp.1062-1068.

- Weinberg, RA. (2014). The biology of cancer. New York, *Garland Science*, 2nd edition.
- Yao, Y., Jumabay, M., Wang, A., Boström, KI. (2011). Matrix Gla protein deficiency causes arteriovenous malformations in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, **121**(8), pp.2993-3004.
- Yao, Y., Nowak, S., Yochelis, A., Garfinkel, A., Bostrom, K. (2007). Matrix GLA Protein, an Inhibitory Morphogen in Pulmonary Vascular Development. *Journal of Biological Chemistry*, **282**(41), pp.30131-30142.
- Yoshimura, K., Takeuchi, K., Nagasaki, K., Ogishima, S., Tanaka, H., Iwase, T., Akiyama, F., Kuroda, Y., Miki, Y. (2009). Prognostic value of matrix Gla protein in breast cancer. *Molecular Medicine Reports*, **2**, pp.549–553.
- Zebboudj, A., Imura, M., Bostrom, K. (2002). Matrix Gla protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, pp.4388–94.
- Zhao, J., Araki, N., Nishimoto, SK. (1995). Quantitation of matrix Gla protein mRNA by competitive polymerase chain reaction using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an internal control. *Gene*, **155**, pp.159-165.
- Zhao, J., Halfyard, B., Roebouthan, B., West, R., Buehler, S., Sun, Z., Squires, J., Mclaughlin, JR., Parfrey, PS., Wang, PP. (2010). Tobacco smoking and colorectal cancer: A population-based case-control study in Newfoundland and Labrador. *Canadian Journal of Public Health*, **101**(4), pp.281-289.

ANEXOS

Tabela S1. Composição das soluções e dos tampões utilizados:

TAMPÃO RIPA (1x)	PBS
Tris-HCl 50 mM pH 7,4 (0,30g)	NaCl 137mM (16,01g)
NP40-Igepal 1 % (500µl)	KCl 2.7mM (0,4g)
C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄ 0,5% (0,025g)	HNa ₂ O ₄ P.2H ₂ O 8.1mM (2,88g)
SDS 0,1% (0,05g)	KH ₂ PO ₄ 1.47mM (0,4g)
NaCl 150 mM (0,4383g)	H ₂ O _{dd} para perfazer 2L
EDTA 2mM (0,0372g)	Ajustar o pH a 7,4
NaVO ₄ 0,2mM (0,0018g)	Autoclavar
H ₂ O _{dd} para perfazer 50 ml	
Adicionar 1 tablet de Cocktail inibidor da Roche (ref: 11836153001) por cada 10 ml de tampão	
SOLUÇÃO T	TAMPÃO AMOSTRA (4x)
NaCl 137mM (4g)	Tris-HCL 320mM a pH 6.8 (6,4ml)
KCl 2.7mM (0,1g)	2-mercaptoetanol 0.4M (559µl)
HNa ₂ O ₄ P.2H ₂ O 8.1mM (0,72g)	8% SDS (m/v) (1,6g)
KH ₂ PO ₄ 1.47mM (0,08g)	0.024% (m/v) azul bromofenol (4,8mg)
EDTA 1.1mM (0,2g)	15% glicerol (v/v) (3ml)
Tripsina 0,2% (40ml de 2,5% GIBCO 10X)	H ₂ O _{dd} para perfazer 20ml
H ₂ O _{dd} para perfazer 0,5L	
SOLUÇÃO DE SAIS (2x)	TAMPÃO DE CORRIDA
HNa ₂ O ₄ P.2H ₂ O 8,1mM (1,44g)	MES 50mM (8,528g)
NaCl 1M (116,880g)	Tris 50mM (4,856g)
Tween-20 1% (10ml)	SDS 0.1% (0,8g)
H ₂ O _{dd} para perfazer 1L	EDTA 1mM (0,23g)
Diluir 1:2 para obter solução	H ₂ O _{dd} para perfazer 1L

TAMPÃO DE TRANSFERÊNCIA (20x)	PBST
Glicina 500mM (10,2g) Bis-tris 500mM (13,08g) EDTA 20.5mM (0,7494g) H ₂ O _{dd} para perfazer 1L	PBS 10X (100ml) H ₂ O _{dd} (900ml) Tween 20 (1ml)
<u>Tampão de transferência 1X</u>	
Tampão de transferência 20X (50ml) METOH (100ml) H ₂ O _{dd} (850ml) 4-Cloro-1-butanol (5µl)	Ajustar o pH a 7,4
SOLUÇÃO DE BLOQUEIO WESTERNS	TAMPÃO TAE (1x)
Leite em pó Biorad (1,5g) PBST até perfazer (50ml)	Tris base (242g) Ácido acético glacial (57,1ml) EDTA 0.5M pH 8.0 (100ml) H ₂ O _{dd} para perfazer 1L
AGAROSE	SOLUÇÃO DE BLOQUEIO IMUNOCITOQUÍMICA
Agarose (1,6g) TAE (80ml) Green Safe (1,3µl)	PBS 1X (400ml) Glicina (3g) BSA (800mg) Azida de Sódio (80mg)

Tabela S2. Tabela siRNAs

siRNA	Sequência alvo	Local de ligação	Posição
siRNA1	5' – TAGCGGTAGTAACTTTGTGTT – 3'	Exão 1	5166-5186
siRNA3	5' – TATGGATAACAATGCTGCCTAT – 3'	Exão 5	8646-8666
siRNA4	5' – AGAACGCTCTAAGCCTGTCCA – 3'	Exão 5	8725-8745

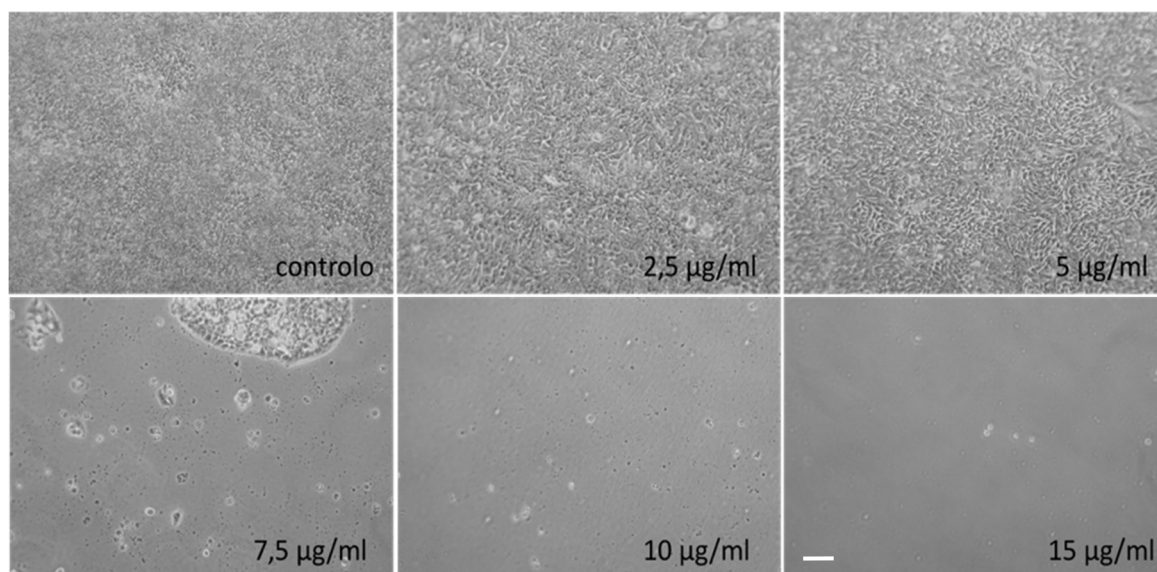


Figura S1. Ensaio de morte celular em células HT-29 WT. Foram testadas concentrações crescentes de blasticidina. O controle diz respeito a uma placa com 100% de confluência celular. A barra de escala corresponde a 10µm.

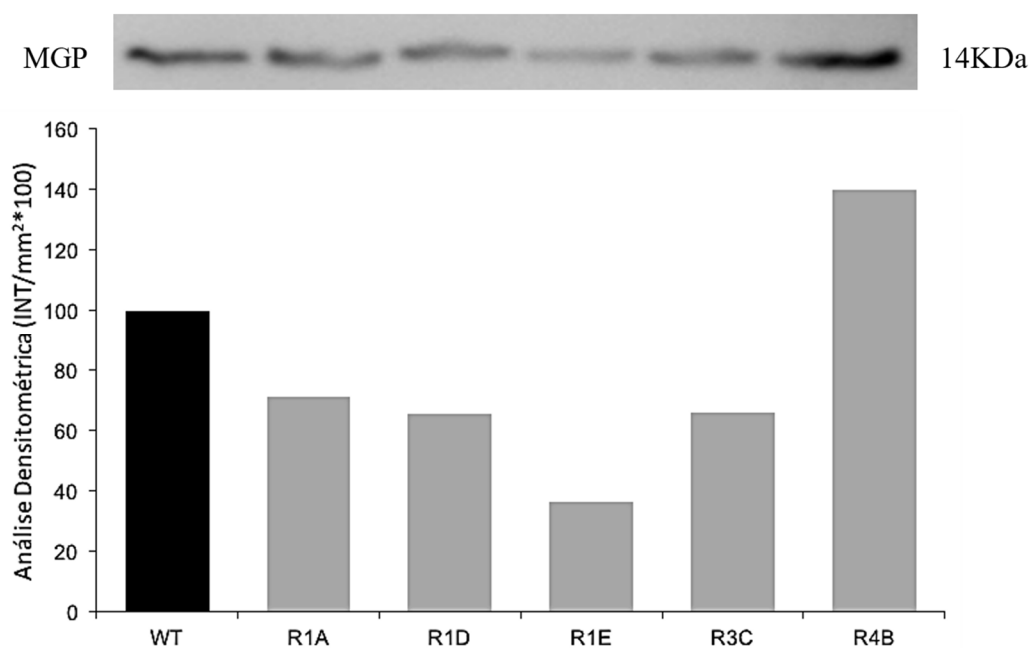


Figura S2. Efeito dos siRNAs 1, 3 e 4 nos níveis de produção de MGP nas células HT-29; os clones foram transfetados com o vetor pcDNA6.2 contendo cada um dos três siRNAs. A produção de MGP foi determinada por análise densitométrica do sinal de *western blot*.

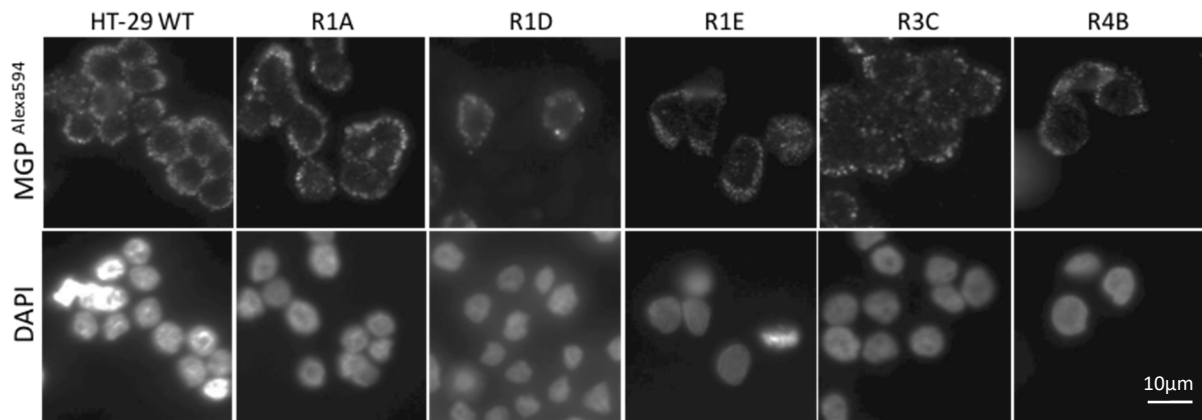


Figura S3. Detecção imunocitoquímica de MGP em células HT-29 WT e clones. As células foram incubadas com anticorpo primário de coelho anti-MGP (1:100) seguido de anticorpo secundário Alexa Fluor® 594 de cabra anti-coelho (1:1000). As imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência Carl Zeiss Axioimager Z2. A barra de erro corresponde a 10µm.

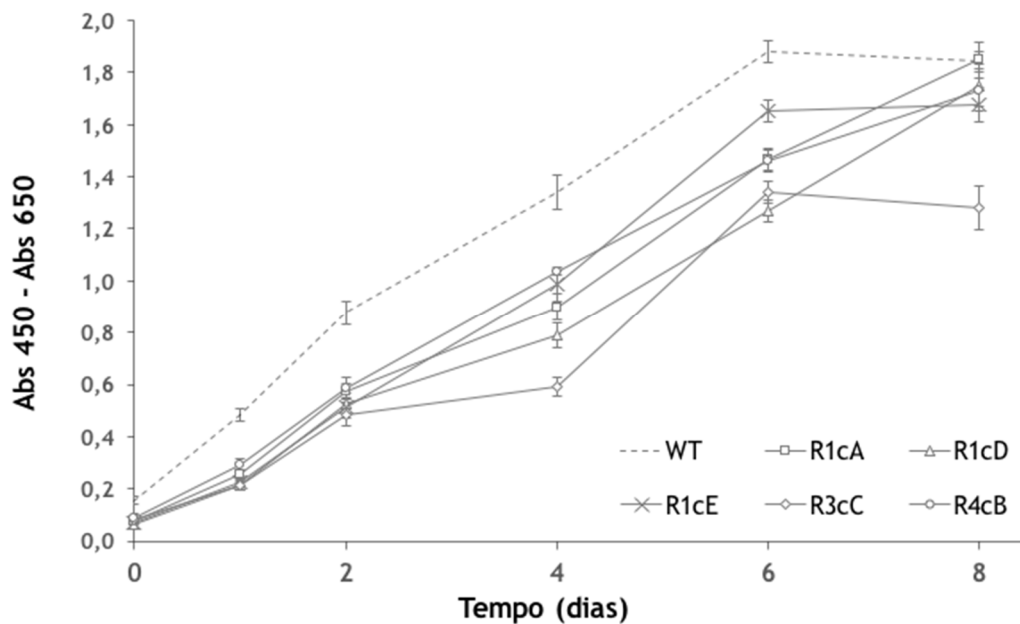


Figura S4. Capacidade proliferativa das células HT-29 WT e clones de expressão. Os clones apresentam uma menor proliferação celular quando comparados com o WT. As células foram monitorizadas durante 8 dias e a sua atividade metabólica foi avaliada através da adição de XTT e leitura passadas 2 horas das absorvâncias a 450nm e 650nm no leitor de microplacas synergy4-Biotek. As análises foram efetuadas aos 0, 1, 2, 4, 6 e 8 dias.

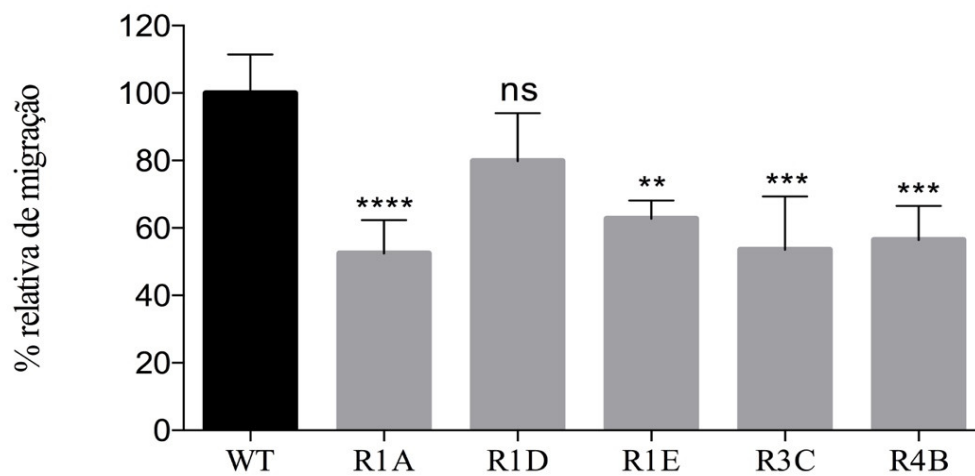


Figura S5. Migração de células HT-29 e clones com *knockdown* de MGP segundo o ensaio *wound-healing*. Células com bloqueio da expressão de MGP exibem uma menor capacidade migratória (n=5) quando comparadas com células WT não transfetadas. As probabilidades abaixo de 5% ($P \leq 0,05$) foram consideradas estatisticamente significativas. ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.

Tabela S3. Lista de oligonucleótidos utilizados:

Gene	Primers	T _M	Tamanho do Amplicon	Localização do Amplicon	Dímeros	Hairpin	Crossdímeros
<i>GADPH</i>	Forward: 5'-TCAACGGATTTGGTCGTATTGGGCG-3' Reverse: 5'-CTCGCTCCTGGAAGATGGTGATGGG-3'	66,0 60,0	219bp	CDS	0 0	1 (-0,9) 0	1 (-1,8)
<i>MGP</i>	Forward: 5'-TGCTGCTACACAAGACCCTGAGACTGA-3' Reverse: 5'-GTAGCGTTCGCAAAGTCTGTAGTCATCAC-3'	62,2 61,4	289bp	5'UTR	0 2 (-1,8; -1,8)	0 0	5 (-0,1; -0,1; -0,9; -1,1; -2,0;
<i>DLL4</i>	Forward: 5'-CCTGCATTGTGAACACAGCACCTT-3' Reverse: 5'-ACATGAGCCCATTCTCCAGGTCAT-3'	59,9 59,6	323bp	CDS	5 (-0,1; -0,1; -0,2; -0,2 -2,0) 1 (-0,4)	1 (-0,2) 0	1 (-0,4)
<i>JAG1</i>	Forward: 5'-ATTGCCAGCTACTACTGCGACTGT-3' Reverse: 5'-TTCTGGCAGGGATTAGGCTCACAA-3'	56,2 60,7	317bp	CDS	1 (-1,3) 0	0 0	0
<i>HES1</i>	Forward: 5'-TGGAGAAGGCGGACATTCTGGAAA-3' Reverse: 5'-ATGGCATTGATCTGGGTCATGCAG-3'	62,5 61,7	235bp	3'UTR	2 (-0,1; -0,1) 4 (-0,4; -1,6; -1,6; -2,0)	1 (-2,0) 0	3 (-0,4; -1,2; -3,2)
<i>EFNB2</i>	Forward: 5'-AAAGAGTTCCTGCAACCAATTG-3' Revers: 5'-GACGATCATACAAGCAAGGCATTTAC-3'	56,2 57,2	146bp	3'UTR	2 (-2,0; -4,3) 0	0 0	2 (-0,1; -0,1)
<i>BHLHB2</i>	Forward: 5'-CAACGGCATATGGAGTGCCT-3' Reverse: 5'-CACGATCAGCAATCAGGCAT-3'	53,9 53,3	150bp	3'UTR	1 (-2,8) 0	0 0	2 (-0,1; -4,6)

Gene	Primers	T _M	Tamanho do Amplicon	Localização do Amplicon	Dímeros	Hairpin	Crossdímeros
<i>F3</i>	Forward: 5'-TTACCTGGAGACAAACCTCGGA-3' Reverse: 5'-AAAACATCCCGGAGGCTTAGG-3'	55,2 56,1	135bp	CDS	0 1 (-4,7)	0 0	3 (-0,2; -1,2; -3,3)
<i>SFN</i>	Forward: 5'-ACTCTTCTTGAGCTGTTGAGC-3' Reverse: 5'-TCAATTCCTACGATCAGAGGCA-3'	53,1 53,9	151bp	3'UTR	0 2 (-2,0; -5,2)	0 0	1 (-0,1)
<i>PAI1</i>	Forward: 5'-CCCCATCACCCAGTAACAAGAA-3' Reverse: 5'-CTCTTAATGCTTTCCAGCGAT-3'	55,3 54,4	120bp	CDS	0 0	0 1 (-0,3)	3 (-1,1; -3,1; -4,7)
<i>IRS1</i>	Forward: 5'-TCATTGACTGAACTGCACGTTC-3' Reverse: 5'-AAACCCATTCTCTCATGACACG-3'	52,7 53,1	162bp	5'UTR	0 1 (-1,8)	0 0	2 (-0,2; -2,1)
<i>CTNNBIP1</i>	Forward: 5'-GGCTGCTTAACTGGAAAGGGAC-3' Reverse: 5'-CACACGCATCGAAAGCCAATC-3'	57,2 57,8	251bp	3'UTR	0 1 (-1,8)	0 0	3 (-0,1; -1,7; -2,8)
<i>DVL1</i>	Forward: 5'-CGCTACGAGCTGGAAGAGGCG-3' Reverse: 5'-CCCCGAAGACGTAGTAGCACTGC-3'	60,9 58,9	295bp	CDS	3 (-1,3; -1,8; -1,8) 3 (-0,1; -0,1; -1,3)	1 (-0,9) 0	2 (-0,2; -1,7)