



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

JOSÉ ANTONIO FAGUNDES ASSUMPÇÃO

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A AUTOFAGIA E PPAR $\gamma$  NA MANUTENÇÃO  
DAS PROPRIEDADES TUMORAIS NO MODELO DE CÂNCER COLORRETAL IN  
VITRO

Brasília

2014

JOSÉ ANTONIO FAGUNDES ASSUMPÇÃO

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A AUTOFAGIA E PPAR $\gamma$  NA MANUTENÇÃO  
DAS PROPRIEDADES TUMORAIS NO MODELO DE CÂNCER COLORRETAL IN  
VITRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. José Raimundo Corrêa

Co-orientador: Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães

Brasília

2014

JOSÉ ANTONIO FAGUNDES ASSUMPÇÃO

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A AUTOFAGIA E PPAR $\gamma$  NA MANUTENÇÃO  
DAS PROPRIEDADES TUMORAIS NO MODELO DE CÂNCER COLORRETAL IN  
VITRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Aprovado em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. José Raimundo Corrêa (Presidente)

\_\_\_\_\_

Profa. Dra. Graziella Anselmo Joanitti (Membro Efetivo)

\_\_\_\_\_

Profa. Dra. Cecília Beatriz Fiuza Favali (Membro Efetivo)

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Tatsuya Nagata (Membro Suplente)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos professores José Raimundo Côrrea e Kelly Grace Magalhães, pela oportunidade e orientação, pelos ensinamentos valiosos e pela paciência.

À minha família, pelo incentivo e apoio que recebi durante todos os momentos. Ao meu pai, por permitir que eu seguisse meus anseios e perseguisse meus sonhos e pela teimosia em me suportar mesmo longe de casa. À minha mãe, pelo carinho e amor incondicional e pela preocupação, em todos os momentos, com meu bem estar físico e psicológico. À minha irmã pelo amparo nas horas difíceis e pelo exemplo de esforço e perseverança. Ao Daniel, bem dizer da família, pelas cervejas e pelo bom humor. Muito obrigado, sem vocês eu não seria nada!

Aos amigos mais próximos, Arthur, Bárbara, Gabriel, Gisele, Hérik, João, Matheus e Thaís que, longe ou perto, foram verdadeiramente sinceros e presentes em toda a jornada, aliviando o peso e facilitando a caminhada.

Aos amigos de longa data, Eduardo, Hugo e Stefano, pelas experiências divididas e pelo acompanhamento desde a graduação até agora.

Aos colegas de bancada do LIM1, pelo auxílio com meu crescimento pessoal e profissional, pela disponibilidade, críticas, conselhos e pela convivência diária. Aos colegas do GPRO e do Laboratório de Microscopia Eletrônica pelo companheirismo e auxílio na pesquisa.

Ao professor Cezar Martins de Sá, que me iniciou na carreira acadêmica e mostrou os primeiros passos do caminho para a ciência, deixando saudades. E os membros de seu laboratório, em especial ao Ricardo, tutor por opção.

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, pela oportunidade.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O processo autofágico possui um papel dinâmico e dualístico na progressão do câncer, dependendo do seu estágio de desenvolvimento. Nos estágios iniciais, a autofagia tem um papel supressor de tumores pela remoção de organelas e proteínas defeituosas que tenham capacidade de alterar o metabolismo celular. Já em tumores bem estabelecidos, a autofagia se relaciona fortemente com a sobrevivência das células tumorais no microambiente adverso no qual se encontram, bem como com a manutenção de um estado metabólico acelerado. No câncer de mama o processo autofágico pode ser modulado através de receptores nucleares chamados PPAR, fator de transcrição que regula a expressão de diversos genes essenciais para diferenciação, proliferação e sobrevivência celular, além de influenciar o metabolismo lipídico e não lipídico. O papel conjunto e a relação entre autofagia e PPAR $\gamma$  no estabelecimento e progressão do câncer colorretal, todavia, ainda precisa ser determinado. Células de linhagem de câncer colorretal (Caco-2) foram tratadas com o indutores e inibidores de autofagia e do PPAR $\gamma$  durante 24 horas. Após tratamento, diversas propriedades tumorais, como morte celular, proliferação, ciclo celular, produção de espécies reativas de oxigênio e o perfil de células tronco tumorais foram aferidos através de citometria de fluxo. A expressão de PPAR $\gamma$  e LC3 (principal marcador autofágico) foram analisadas por Immunoblotting. Nossos resultados mostraram que na linhagem de câncer colorretal Caco-2, a ativação PPAR $\gamma$  leva a indução de autofagia e que a inibição autofágica resulta em aumento da expressão de PPAR $\gamma$ , como visto na expressão de PPAR $\gamma$  e LC3 e na regulação de corpúsculos lipídicos e vesículas acídicas. Além disso, as propriedades tumorais analisadas (morte, proliferação, ciclo celular, produção de espécies reativas de oxigênio e perfil de células-tronco) foram alteradas tanto pela indução ou inibição da via autofágica, quanto pela modulação de PPAR $\gamma$ . A inibição da autofagia teve como consequência um aumento da proliferação celular, da produção de espécies reativas de oxigênio e dos fenótipos CD44+, bem como do índice de morte celular. Portanto, nossos dados sugerem que autofagia e metabolismo lipídico são processos inter-relacionados, mas que afetam as propriedades tumorais do câncer colorretal de maneira diferencial e de forma independente. Neste modelo, a via autofágica parece desempenhar papel crucial na sobrevivência, estabelecimento e progressão tumoral do câncer colorretal.

Palavras-chave: câncer colorretal, autofagia, PPAR $\gamma$ , metabolismo lipídico

## ABSTRACT

The autophagic pathway shows a dynamic and dualistic role in cancer progression, depending on its developmental stage. In early stages, autophagy acts as a tumor suppressor, removing defective organelles and proteins with potential to alter the cellular metabolism. In the other hand, well-established tumors show the autophagy process to be related with cancer cell survival in the harsh microenvironment in which they are found, and this cellular process also contributes to maintain an accelerated metabolic state. In breast cancer, the autophagic process is modulated by nuclear receptors called PPAR, transcription factors that regulate the expression of many genes essential for differentiation, proliferation and cell survival, as well as influencing lipid and non-lipid metabolism. The cooperative action and the relationship between autophagy and PPAR $\gamma$  role in the establishment and progression of colorectal cancer, however, remains to be determined. To clarify this relationship, lineage cells from colorectal cancer (Caco-2) were treated with inducers and inhibitors of autophagy and PPAR $\gamma$  for 24 hours. After treatment, several tumor properties, such as cell death, proliferation, cell cycle, production of reactive oxygen species and the profile of cancer stem cells were measured by flow cytometry. The expression of PPAR $\gamma$  and LC3 (main autophagic marker) also was analyzed by Immunoblotting. Our results showed that the in Caco-2 colorectal cancer cell line, activation of PPAR $\gamma$  leads to induction of autophagy and that autophagic inhibition leads to a higher PPAR $\gamma$  expression, as seen by the expression of LC3 and PPAR $\gamma$ , lipid bodies regulation and also by formation of acidic vesicles. Moreover, the analyzed tumor properties were modified either by induction or inhibition of autophagy route, as well as by PPAR $\gamma$  modulation. The autophagic inhibition resulted in increased cell proliferation process, production of reactive oxygen species and CD44 + phenotypes, as well as cell death. Therefore, our data suggest that autophagy and lipid metabolism are interrelated processes that affect the tumoral properties of colorectal cancer differential and independently. In this model, the autophagic pathway seems to play a crucial role in colorectal cancer's survival, establishment and progression.

Keywords: colorectal cancer, autophagy, PPAR $\gamma$ , lipid metabolism

## Índice de Figuras

Figura 1. Remoção e degradação de material intracelular por autofagia .....	8
Figura 2. Mecanismos pelos quais defeitos na autofagia promovem o câncer .....	13
Figura 3. Potenciais mecanismos moleculares da ação de PPAR $\gamma$ como supressor de tumor no câncer colorretal .....	17
Figura 4. Desenho experimental esquemático .....	20
Figura 5. Análise da expressão de LC3B em células da linhagem de câncer colorretal Caco-2 .....	29
Figura 6. Níveis de expressão de LC3B em células da linhagem de câncer colorretal Caco-2 .....	30
Figura 7. Presença de vesículas acídicas (V.A.s) em células Caco-2 .....	31
Figura 8. Quantificação de vesículas acídicas (V.A.s) em células Caco-2 .....	32
Figura 9. Presença de PPAR $\gamma$ em células Caco-2 .....	33
Figura 10. Imunodeteção de PPAR $\gamma$ em células da linhagem de câncer colorretal Caco-2 .....	34
Figura 11. Níveis de expressão de PPAR $\gamma$ em células da linhagem de câncer colorretal Caco-2 .....	34
Figura 12. Análise de corpúsculos lipídicos em células Caco-2 por microscopia confocal .....	36
Figura 13. Biogênese de corpúsculos lipídicos em células Caco-2 .....	37
Figura 14. Morte celular de células Caco-2 .....	39
Figura 15. Quantificação da morte celular .....	40
Figura 16. Padrões de proliferação celular de células Caco-2 sob diferentes esquemas de indução e inibição do PPAR $\gamma$ e da autofagia .....	42
Figura 17. Quantificação de proliferação celular medida por citometria de fluxo .....	43

Figura 18. Variação na distribuição de células em diferentes etapas do ciclo celular	44
Figura 19. Quantificação da distribuição de células em diferentes pontos do ciclo celular .....	45
Figura 20. Análise das alterações da quantidade de produção de espécies reativas de oxigênio em células Caco-2 .....	46
Figura 21. Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio .....	47
Figura 22. Determinação dos fenótipos de CD44 e CD24 de células Caco-2 .....	48
Figura 23. Quantificação dos fenótipos de CD44 e CD24 de células Caco-2 após modulação da autofagia e do PPAR $\gamma$ .....	49
Figura 24. Interação das vias de ativação/inibição de PPAR $\gamma$ e a via autofágica .....	56



## Índice de Tabelas

Tabela 1. Compilação dos resultados .....	50
---	----

## Lista de Abreviaturas e Siglas

°C	Graus Celsius
3-MA	3-Metiladenina
AKT	Proteína quinase B
AMPK	Quinase dependente de AMP
APC	Complexo promotor da anáfase
ATP	Adenosina trifosfato
BODIPY	Boro-dipirrometeno
BRCA1	Gene do câncer de mama 1
BSA	Albumina sérica bovina
CAC	Câncer associado a colite
CD24	Agrupamento de diferenciação 24
CD44	Agrupamento de diferenciação 4
CDK	Quinase dependente de ciclina
CFSE	Éster carboxifluoresceína succinimidil
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CRC	Câncer colorretal
D.O.	Densidade óptica
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindole, diidroclorida
DC	Doença de Chron
DII	Doença inflamatória intestinal
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido

DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Câncer esofágico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FE	Fosfatidiletanolamida
FITC	Fluoresceína
GC	Câncer gástrico
GI	Câncer gastrointestinal
GW	GW-9662: 2-Cloro-5-nitro-N-fenilbenzamida
IgG	Imunoglobulina G
JNK-1	Quinase N-terminal JUN
K-RAS	Homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato v-Ki-ras2 Kirsten
LC3	Cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos
MAP	Proteína associada a microtúbulos
MGMT	Metiltransferase metilada-DNA-proteína-cisteína
MLH1	Homólogo 1 de mutL
mTOR	Alvo da Rapamicina em mamíferos
Ñ.E.	Não estimulado
NFkB	Fator nuclear kappa B
NSAID	Droga anti-inflamatória não esteróide
PBS	Tampão fosfato salino
PE	R-ficoeritrina
PEG	Propilenoglicol
PI	Iodeto de propídeo
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase

PI3K III	Fosfatidilinositol 3-quinase de classe III
PPAR	Receptor ativador da proliferação de peroxissomos
PTEN	Homólogo da fosfatase e tensina
Rapa	Rapamicina: 23,27-epoxi-3H-pirido[2,1-c][1,4]oxaazaciclohentriacontina
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Rosi	Rosiglitazona: 5-(metil-2-piridinilamino)etoxifenilmetil-2,4-tiazolidindiona
RUBICON	Proteína contendo domínio RUN
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TGF- $\beta$	Fator transformador do crescimento $\beta$
TFGBR2	Receptor 2 de TGF- $\beta$
TP53	Gene tumoral p53
TSC1	Gene da esclerose tuberosa 1
TSC2	Gene da esclerose tuberosa 2
SMAD4	Proteína homóloga mãe contra decapentaplégico 4
UC	Colite ulcerativa
UV	Ultravioleta
UVRAG	Gene associado à resistência à radiação ultravioleta
V.A.	Vesícula acídica
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
XIAP	Inibidor de apoptose ligado ao X

## SUMÁRIO

RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vi
ÍNDICE DE TABELAS .....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Câncer .....	1
1.1.1. Epidemiologia.....	2
1.1.2. Classificação .....	2
1.1.3. Patogênese .....	2
1.2. Câncer Colorretal.....	5
1.3. Autofagia .....	6
1.3.1. Regulação da autofagia .....	8
1.3.2. Autofagia e a patogênese de doenças.....	11
1.4. Autofagia, doenças inflamatórias intestinais e câncer colorretal.....	14
1.5. PPAR $\gamma$ , autofagia e câncer colorretal .....	16
1.6. Justificativa.....	18
1.7. Objetivos .....	18
1.7.1. Objetivo Geral.....	18
1.7.2. Objetivos Específicos.....	19
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
2.1. Fluxograma .....	20
2.2. Reagentes e equipamentos .....	20
2.3. Cultura de células .....	22
2.4. Tratamentos .....	22

2.5. Eletroforese em gel e imunodeteção .....	22
2.6. Imunofluorescência .....	23
2.7. Presença de vesículas acídicas .....	24
2.8. Biogênese de corpúsculos lipídicos .....	24
2.9. Morte celular .....	25
2.10. Proliferação celular .....	26
2.10.1. CFSE .....	26
2.10.2. Cristal Violeta.....	26
2.11. Ciclo celular.....	26
2.12. Espécies reativas de oxigênio.....	27
2.13. Células-tronco tumorais .....	28
2.14. Análise estatística .....	28
3. RESULTADOS .....	29
3.1. Regulação da autofagia por moduladores autofágicos e agonistas e antagonistas de PPAR $\gamma$ .....	29
3.2. Presença e regulação de PPAR $\gamma$ por moduladores autofágicos na linhagem Caco-2 .....	32
3.2.1 Análise da produção de corpúsculo lipídico por células Caco-2 .....	35
3.3. Efeitos da modulação da autofagia e da ativação de PPAR $\gamma$ na viabilidade celular do câncer colorretal.....	38
3.4. Mudanças na capacidade proliferativa de células de câncer colorretal induzidas por modulação autofágica e ativação de PPAR $\gamma$ .....	41
3.5. Análise do ciclo celular de células Caco-2 após modulação da autofagia e do PPAR $\gamma$ .....	44
3.6. Ação de moduladores autofágicos e da atividade de PPAR $\gamma$ na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	45
3.7. Análise da população de células-tronco tumorais após regulação da autofagia e da expressão de PPAR $\gamma$ .....	47

3.8. Compilação dos resultados .....	49
4. DISCUSSÃO .....	51
4.1. Autofagia e PPAR $\gamma$ no câncer colorretal .....	51
4.2. Envolvimento da autofagia e do metabolismo lipídico em aspectos tumorigênicos do câncer colorretal .....	57
5. CONCLUSÕES .....	61
6. PERSPECTIVAS .....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Câncer**

Neoplasias são definidas como a formação de uma massa tecidual resultante do crescimento tecidual anormal, geralmente precedida por metaplasia (diferenciação tecidual) e/ou displasia (anormalidade no desenvolvimento de um órgão), nas quais o crescimento das células neoplásicas ultrapassa o de células do tecido normal circundante (KIRCHNER, 2014). Neoplasias podem ser benignas, pré-malignas (carcinoma in situ) ou malignas (câncer) (2; 4). Geralmente, a transformação de uma neoplasia benigna em câncer é causada por danos ao material genético da célula (BERNSTEIN, 2013).

O câncer pode ser definido como um conjunto de doenças em que muitos dos controles e características normais da célula são perdidos ou perturbados. Proliferação celular descontrolada e capacidade de sobrevivência alterada são aspectos comuns de vários tipos de câncer. Geralmente apresentam também defeitos morfológicos aliados a aquisição de propriedades migratórias e invasivas de acordo com o estágio de progressão da doença (HALL, 2009; PIANA, 2013). A tumorigênese pode ser estabelecida por mutações somáticas, pela propagação de genes mutados de uma geração para outra, e/ou por fatores epigenéticos. Estas características conferem vantagens seletivas para as células tumorais frente as células normais, habilitando-as, ainda, para migração e colonização de regiões restritas a outros tipos celulares. Esta característica, conhecida como metástase, é o fator que determina a malignidade de um tumor (MICHOR, IWASA, 2004; FANG, ZHANG, JIN, 2014). A aquisição deste potencial irregular de expansão clonal ocorre também em associação à mutações adicionais (YACHIDA et al., 2010; SNIPPERT, 2014) e ao surgimento de anormalidades fenotípicas que concedem às células cancerígenas competências diferentes das do tecido original. A massa tumoral formada é, portanto, biologicamente heterogênea e contém subpopulações de células com diferentes propriedades angiogênicas, invasivas e metastáticas (FIDLER, 2002; BARRETT, 2013; ZHAO, 2014).



### **1.1.1. Epidemiologia**

No ano de 2012, em todo o mundo, foram relatados 14,1 milhões de novos casos com 8,2 milhões de óbitos. Nas regiões menos desenvolvidas, foram descritos 58% (8,178 milhões) dos novos casos e 65% (5,330 milhões) das mortes (FERLAY, 2013). A taxa de incidência de câncer é aproximadamente 25% mais alta em homens do que em mulheres e, em termos de mortalidade, as taxas também são maiores em países menos desenvolvidos, sendo 15% mais altas em homens e 8% em mulheres (FERLAY, 2013). Para 2014, no Brasil, o Instituto Nacional do Câncer estima o surgimento de 567 mil novos casos de câncer, com maiores taxas de incidência em localizações primárias na próstata, pulmão e cólon para homens e mama, cólon e útero para mulheres (INCA, 2013).

### **1.1.2. Classificação**

Existem mais de cem tipos distintos de câncer, com subtipos determinados a partir do órgão de origem específico (HANAHAN, WEINBERG, 2000; KOSARY, 2006). Em geral, cânceres são classificados de dois modos: pelo tipo de tecido no qual o câncer se origina (tipo histológico) e pelo seu sítio primário, a localização no corpo onde o câncer se desenvolveu. Do ponto de vista histológico, existem seis grandes categorias: carcinomas, sarcomas, mielomas, leucemias, linfomas e tipos mistos (KANDOTH, 2013; SEER, 2014). A maioria dos casos de câncer (80 a 90%) é caracterizada como carcinoma, se referindo a uma neoplasia maligna de origem epitelial. O tecido epitelial é vastamente encontrado no corpo, estando presente principalmente na pele e revestindo órgãos e passagens internas, como o trato gastrointestinal (VALASTYAN, WEINBERG, 2011; NAISH, REVEST, COURT, 2009). Os carcinomas são divididos em dois grandes subtipos: adenocarcinomas (originários de um órgão uma glândula, geralmente com capacidade secretora) e carcinomas de células escamosas (originários do epitélio escamoso) (TRAVIS, 1999; DABBS, SILVERMAN, 2001). O presente estudo se baseia no modelo de adenocarcinoma colorretal.

### **1.1.3. Patogênese**

O estabelecimento do tumor é um processo complexo e que consiste em várias etapas sucessivas até a transformação total da célula (NOWELL, 1976; FOULDS, 1958; PURANDARE, 2013). Em modelos experimentais, foram discriminados ao menos três estágios distintos para o câncer: iniciação, promoção e progressão

(HECKER, 1982). O avanço através desses estágios ocorre como resultado de um pequeno número de eventos pontuais (STEEN, 2000). A maioria dos tipos de câncer se estabelece a partir de quatro a oito eventos mutacionais necessários para a transformação de células normais em células tumorais (BALMAIN, 1993; STEPHENS, 2011). Cada passo representa uma barreira fisiológica que deve ser quebrada para que a célula progrida por estas fases até atingir o ponto final de malignidade. Tais barreiras tem como objetivo assegurar que a transformação seja um evento raramente alcançado (WEINBERG, 1989; GIALELI, THEOCHARIS, KARAMANOS, 2011). O próprio genoma das células normais, contudo, contém genes com o potencial de, sob certas circunstâncias, induzir transformações celulares e desenvolver, conseqüentemente, o câncer, definindo o conceito de proto-oncogenes (ADAMSON, 1987; WEINBERG, 2006; MENG, 2012).

Proto-oncogenes são genes que codificam proteínas que fazem parte da regulação do crescimento e diferenciação celular, estando geralmente envolvidos na transdução e execução de sinais mitogênicos (TODD, WONG, 1999; WEINSTEIN, JOE, 2006). Como consequência de mutações e/ou superexpressão, um proto-oncogene se torna um agente indutor de tumores, um oncogene (LAKSHMI, 2010). Oncogenes são originados pela aquisição de mutações que resultam em um ganho de função da proteína produzida. Nesse caso, a mutação em um só alelo é suficiente para induzir a transformação celular (DAI, WANG, 2010). Certos tipos de tumor se estabelecem através de alterações genéticas específicas que causam a ativação oncogênica e a manutenção continuada daquele sinal em particular (STELLA, 2013). Células cancerígenas, contudo, são caracterizadas não só por mutações de oncogenes específicos, mas também por uma gama de aberrações cromossômicas (MITELMAN, 1997; THOMPSON, COMPTON, 2011). O desenvolvimento do câncer, então, é marcado pela “quebra” da defesa dos mecanismos adaptativos existentes para a prevenção da transformação celular (DEMETRIUS, 2010). A progressão tumoral em direção à seu estágio final (metastático) pode ser, portanto, definida como um processo de múltiplos estágios. O ponto mais crítico para a vida humana é representado pela fase da doença na qual as células cancerígenas se dispersam do tumor de origem para colonizar órgãos distantes (NGUYEN, 2009; CASÁS-SELVES, DEGREGORI, 2011).

Diversos estudos investigaram o impacto de mutações genéticas no desenvolvimento do câncer, principalmente nos estágios iniciais da gênese tumoral (VOGELSTEIN, 2013; MCFARLAND, 2013; VALTORATA, 2013). De maneira contrastante, poucas mutações genéticas foram especificamente ligadas à progressão tumoral, sugerindo o envolvimento de outros mecanismos, como o sistema de controle epigenético (FEINBERG, 2004; SLATER, 2013; MALUMBRES, 2013). Em células normais, os genes também podem ser modificados por fatores epigenéticos, que alteram os padrões de expressão gênica. Isso pode ocorrer por metilação do DNA, metilação, acetilação, ou fosforilação de histonas e outras proteínas que interagem com o DNA para formar a cromatina (NOVAK, 2004; LOKODY, 2013; SETON-ROGERS, 2013). A metilação do DNA é geralmente a marca epigenética com maior diferença entre células normais e células tumorais. O perfil de metilação CpG normal geralmente é invertido em células que se tornam tumorigênicas (ESTELLER, 2007; HERVOUET, 2013; PORTELA, 2013). Alterações epigenéticas são comumente encontradas em diversos genes reguladores do ciclo celular e do sistema de reparo a danos no DNA, à exemplo do silenciamento transcricional através de hipermetilação de genes como *p16* (inibidor de CDK), *p53* (supressor de tumor), complexo promotor da anáfase (APC) (regulador do ciclo celular), MGMT, MLH1 e BRCA1 (genes de reparo do DNA) (JONES, BAYLIN, 2002; GOMES, 2014; LI, 2014). Desta forma, a sinergia das mutações gênicas e alterações epigenéticas tem papel importante para a aquisição de vantagens adaptativas pelas células tumorais, possibilitando a tumorigênese.

Um exemplo clássico que segue a linha de desenvolvimento tumoral em múltiplas etapas é o estabelecimento do câncer colorretal. O câncer colorretal se desenvolve como resultado do acúmulo progressivo de alterações genéticas e epigenéticas que levam à transformação do epitélio colônico normal em adenocarcinoma colorretal (BARDHAN; LIU, 2013; FEINBERG, 2004). Geralmente, o câncer de cólon tem desenvolvimento lento e demonstra mudanças nos padrões moleculares e histológicos (GRADY; MARKOWITZ, 2002; NGUYEN, BOS, MASSAGUÉ, 2009).

## 1.2. Câncer Colorretal

No mundo, o câncer colorretal (CRC) é o terceiro tipo de câncer mais comum em homens e o segundo em mulheres, sem considerar o câncer de pele não melanoma (SCHOEN, 2012). Para 2014, estima-se que no Brasil surjam 15.070 novos casos de câncer colorretal (INCA, 2013). Particularmente, esôfago, estômago e cólon são órgãos com alto risco de desenvolvimento de câncer (FUCCI, 2012). De fato, os cânceres esofágico (EC), gástrico (GC) e colorretal representam doenças muito comuns, sendo responsáveis por aproximadamente 30% das mortes relacionadas a câncer no mundo (THOMAS, SOBIN, 1995; SAMADDER, 2013)

O revestimento interno do trato digestivo é composto por células de alta proliferação localizadas na base do epitélio e por células diferenciadas submetidas a substituição contínua (VAN LOMMEL, 2002). A rápida renovação das células é necessária para a manutenção da homeostase da mucosa e a resposta a um ambiente adverso, representado por toxinas e agentes cancerígenos presentes em alimentos digeridos, fazendo do trato digestivo um local propício para o desenvolvimento do câncer (FUCCI, 2012).

Consistente com a hipótese de desenvolvimento em múltiplas etapas, o câncer de cólon é geralmente iniciado por alterações nas vias de sinalização Wingless/Wnt e sua progressão é resultado do acúmulo de eventos sequenciais que ou ativam oncogenes ou inativam genes supressores de tumor (WANG, 1998; PARK, 2012). Algumas das alterações já descritas que promovem a carcinogênese do câncer colorretal afetam K-RAS, p53 e elementos da via de sinalização de TGF- $\beta$ , como TGFBR2 e SMAD4. De fato, p53 e K-RAS já são alvos terapêuticos e passam por estudos de fase clínica (GRADY, MARKOWITZ, 2002; SUI, 2011; ZEESTRATEN, 2013).

Embora as alterações genéticas e epigenéticas responsáveis pelo estabelecimento de diferentes cânceres gastrointestinais (GI) sejam descritas em certos estudos (SELARU, 2009; ALI, 2013), há pouco, um papel fundamental da inflamação na patogênese do câncer colorretal começou a ser descrito (GRIVENNIKOV, 2013; SEBASTIAN, 2014).

Na vasta maioria dos casos, o CRC tem apenas 5 a 10% dos casos relacionados à mutações hereditárias (SCHOEN, 2012). O risco de desenvolvimento

de CRC aumenta significativamente em pessoas com doenças inflamatórias intestinais (DIIs), como colite ulcerativa e doença de Chron (DC) (MANNINEM, 2013; JESS, 2013). O processo de inflamação crônica induz o desenvolvimento de cânceres associados à colites (CAC) geralmente iniciados por mutações na proteína P53 ou pela superexpressão de COX seguida de inativação de APC (HARTNETT, EGAN, 2012; FOERSCH, 2013; WOHL, 2013). De maneira concordante, estudos epidemiológicos demonstraram que o uso regular e a longo prazo de drogas anti-inflamatórias não esteroidais (NSAIDs, inibidores de COX2) reduz a mortalidade em grupos de indivíduos com tumores do trato digestivo (HAFNER, REICHLE, VOGT, 2005; BITTO, 2012; JIANG, 2013).

Condições inflamatórias promovem o desenvolvimento do câncer por aumento do estresse oxidativo e do número de mutações (REUTER, 2010). Concomitantemente, oncogenes promovem inflamação, permitindo a progressão do tumor por alteração do microambiente tumoral (MANTOVANI, 2008; BALKWILL, MANTOVANI, 2012). Em muitos casos, as causas da inflamação crônica são conhecidas: infecção persistente por patógeno (por exemplo, hepatite B e C; infecção por *H. pylori*) ou exposição a toxinas (álcool, fumo) (HE, KLIONSKY, 2009; MÜNZ, 2013).

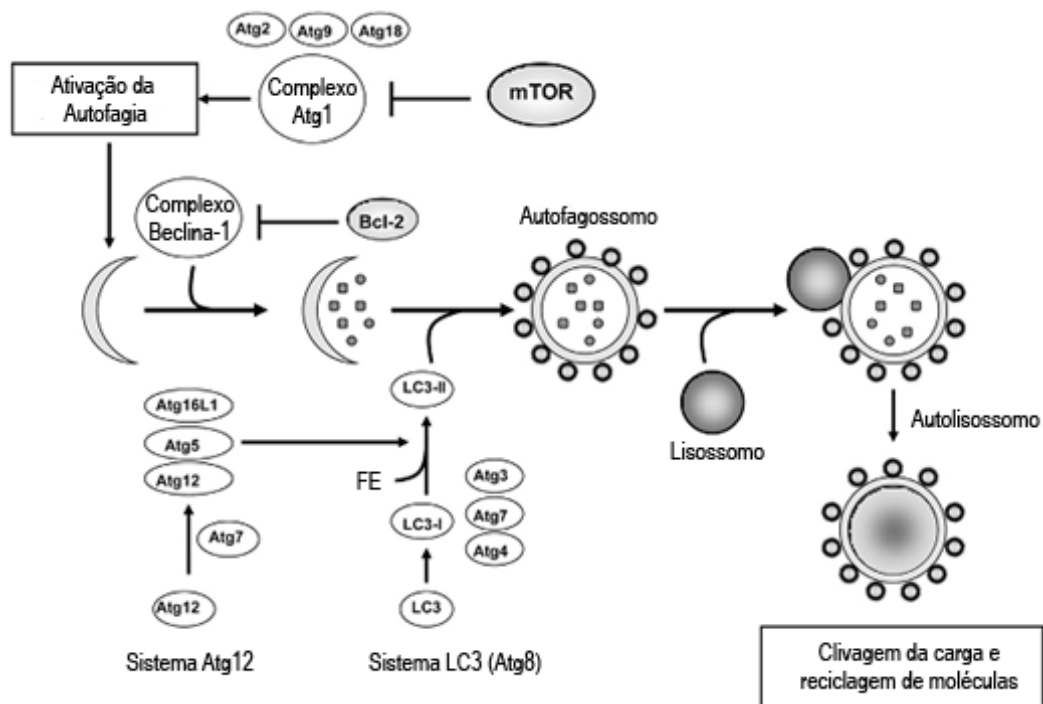
### **1.3. Autofagia**

A autofagia é um processo biológico natural que tem como objetivo a remoção de organelas danificadas e micro-organismos, sendo também o mecanismo de resposta para escassez de nutrientes (BETIN, 2013; MCALPINE, 2013).

Autofagia é um processo intracelular catabólico que resulta na degradação de componentes citosólicos a fim de manter a homeostase celular. Proteínas e organelas podem ser removidas pela autofagia para controle do *turnover* e/ou reciclagem (RANDALL-DEMLLO, CHIEPPA, ERI, 2013). Em mamíferos, o processo autofágico transporta em vesículas o conteúdo a ser degradado até o lisossomo, onde essas vesículas se fundem (HE, KLIONSKY, 2009). A via autofágica participa de diversos processos celulares, como diferenciação celular, remodelamento tecidual, crescimento, defesa contra patógenos e resposta a condições ambientais adversas (KIM, KLIONSKY, 2000; FIMIA, PIACENTINI, 2010; LIU, 2013; SATO, SATO, 2013).

Nos eucariotos, o termo autofagia se refere a três grandes vias intracelulares: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (SUI, 2011). O presente trabalho lida apenas com a macroautofagia, o processo pelo qual organelas e porções citoplasmáticas são envoltos por uma membrana, resultando na formação de uma estrutura chamada autofagossomo. Subsequentemente, o autofagossomo se funde com o lisossomo, formando o autofagolisossomo, no qual enzimas hidrolíticas degradam o seu conteúdo (YANG, KLIONSKY, 2010). As macromoléculas resultantes deste processo de clivagem são transportadas de volta para o citosol para reutilização (reciclagem) (MIZUSHIMA, 2007). A microautofagia envolve o englobamento do citoplasma na superfície lisossomal, enquanto a autofagia mediada por chaperonas ocorre pelo transporte de proteínas solúveis diretamente através da membrana do lisossomo (RANDALL-DEMLLO, CHIEPPA, ERI, 2013).

Na Figura 1 estão representados as principais etapas da autofagia, conhecidas como indução, reconhecimento de carga, formação de vesícula, fusão e formação do autofagolisossomo, degradação da carga e liberação dos produtos no citosol (GARCÍA-MAURIÑO, ALCAIDE, DOMÍNGUEZ, 2012).



**Figura 1. Remoção e degradação de material intracelular por autofagia.** O material intracelular é envolto por membrana, formando o autofagossomo. O autofagossomo (contendo LC3, representado por círculos) se funde com o lisossomo, formando o autofagolisossomo. Os produtos da degradação são liberados no citoplasma. Interações positivas são representadas por setas e negativas, por linhas. Adaptado de GARCÍA-MAURIÑO, ALCAIDE, DOMÍNGUEZ, 2012.

### 1.3.1. Regulação da autofagia

Ao menos 33 genes relacionados a autofagia (ATG) foram descritos em leveduras, e ortólogos de muitos deles vem sendo descritos em outros eucariotos (KLIONSKY, 2003; YANG, KLIONSKY, 2009). O complexo Ulk1 (*unc51-like* kinase) controla as primeiras etapas na formação do autofagossomo, agindo a jusante do alvo da Rapamicina (mTOR) (KAMADA, 2000; HOSOKAWA, 2009; JUNG, 2009). Ulk1, mAtg13 e FIP200 (ortóloga de Atg17) formam um complexo independentemente do estado de fosforilação de mAtg13. A atividade do complexo está relacionada à mTOR, que se liga a ele em condições ricas em nutrientes e rapidamente se dissocia em caso de escassez de nutrientes (YANG, 2007). Além disso, uma nova proteína, Atg101, foi identificada e interage com Ulk1, sendo essencial para a autofagia (MERCER, KALIAPPAN, DENNIS, 2009). A inibição de mTOR resulta na translocação do complexo Ulk1 do citosol para certos domínios do retículo endoplasmático (RE) (MIZUSHIMA, 2010). Isso leva ao recrutamento do complexo de fosfatidilinositol-3

quinase para o RE (ITAKURA, MIZUSHIMA, 2010) ou para outras organelas ligadas à formação do autofagossomo.

O complexo PI3K III/Beclina-1 (Bcl-2 interacting coiled-coil protein 1) controla a produção de sinais que facilitam a montagem do autofagossomo (TASSA, 2003). Em mamíferos, a Beclina-1 forma um complexo com hVps34 (vacuolar sorting protein 34), uma PI3K III (MEHRPOUR, 2010); este complexo interage com outras proteínas, como p150 (vacuolar sorting protein 15), Atg14L (ortólogo de Atg14 de levedura), UVRAG (UV irradiation resistance-associated gene) e Rubicon (RUN domain and cysteine-rich domain containing, Beclin 1-interacting) (FUNDERBURK, WANG, YUE, 2010). O núcleo principal é formado por Beclina-1, hVps34 e p150.

Dois sistemas semelhantes ao sistema ubiquitina são necessários para a dinâmica correta da membrana durante o processo (OHSUMI, 2001), o sistema Atg12 e o sistema Atg8. A cascata de Atg12 se inicia quando essa proteína é ativada por Atg7, resultando em ligação covalente. Atg12 é então transferida à Atg10 e finalmente forma um conjugado com Atg5. A maioria de Atg5 e Atg12 existe na forma de conjugados, independente da indução ou não da autofagia (KUMA, 2002; OTOMO, 2013). Além dessa interação, Atg5 interage não-covalentemente, com Atg16 (MIZUSHIMA, 1998; MIZUSHIMA, 2003). Atg16L1, de mamíferos, é um alelo de risco associado a doença de Chron (MASSEY, PARKES, 2007). Uma função do conjugado Atg12-Atg5 é promover a formação do conjugado Atg8-fosfatidiletanolamina (FE), o segundo conjugado essencial para formação do autofagossomo (SUZUKI, 2001; HANADA, 2007). Em mamíferos, Atg8 é chamada de LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3). A cascata se inicia com a clivagem de um resíduo de glicina de LC3, chamada agora de LC3-I ou LC3A, por Atg4. Atg7 catalisa a ativação de LC3-I, que é transferida para Atg3 e, subsequentemente, conjugada a fosfatidiletanolamida (FE) (KABEYA, 2000; MANN, HAMMARBACK, 1994). O conjugado PE é chamado de LC3-II ou LC3B e se associa à membrana do autofagossomo.

Diversos sinais podem induzir a autofagia, tais como a escassez de nutrientes. Além disso, a autofagia se conecta a vários processos fisiológicos (LEGAKIS, YEN, KLIONSKY, 2007; MIZUSHIMA, 2009). O nível basal de autofagia tem papel central na homeostase e também na resposta ao estresse ambiental (hipóxia, estresse oxidativo, infecção, radiação, droga antitumoral) (RYTER, CLOONAN; CHOI, 2013).



O nível autofágico pode ser aumentado como resposta protetora, resultando em adaptação e sobrevivência. Ainda assim, o excesso de autofagia pode levar à morte celular.

Nos últimos anos, cascatas de sinalização complexas de controle da autofagia foram descritas (YANG, KLIONSKY, 2010). Um dos principais reguladores da autofagia é o mTOR. Esta quinase representa um ponto de convergência de várias vias e é considerada a mais importante reguladora negativa da autofagia (CHEN, KLIONSKY, 2011). Não obstante, mTOR não é a única molécula em ação. A associação entre o mau funcionamento da autofagia e diversas doenças (SRIDHAR, 2012) tem destacado a importância de outras moléculas no processo.

Conforme previamente indicado, o complexo PI3K III/Beclina-1 é essencial para a indução da autofagia. A atividade desse complexo é regulada por proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2 (MARQUEZ; XU, 2012). Tais proteínas inibem a função autofágica de Beclina-1, atuando como inibidores autofágicos. A ligação de Bcl-2 à Beclina-1 desfaz a associação de Beclina-1 com hVps34 e diminui sua atividade de PI3K III, inibindo a autofagia (PATTINGRE, 2005). A fosforilação de Bcl-2 por JNK1 (c-Jun N-terminal kinase 1), que é induzida por escassez de nutrientes, desfaz as interações entre Beclina-1 e Bcl-2, liberando Beclina-1 para promover autofagia (WEI, 2008).

A proteína mTOR existe na forma de dois complexos diferentes, mTORC1 e mTORC2 (YANG, GUAN, 2007), sendo que o primeiro possui papel importante no controle da autofagia. Várias vias de sinalização que regulam a autofagia convergem em mTOR (JUNG, 2010). mTOR integra sinais a montante que inibem a autofagia através da via PI3K-Akt (fosfatidilinositol-3 quinase de classe I-proteína quinase B) (LI, 2013). Tal via é ativada pela ligação de fatores de crescimento a receptores tirosina-quinase, levando à ativação de mTOR pela inibição de TSC1/TSC2 (tuberous sclerosis complex 1/2) (INOKI, 2002). Sinais que ativam AMPK (AMP-dependent kinase) e ativação de P53 causam indução da autofagia por inibição de mTOR (FENG, 2005). Dessa maneira, tanto reguladores autofágicos positivos quanto negativos convergem em mTOR. Aqueles que o ativam (PI3K-Akt), suprimem autofagia, enquanto os que o inibem (AMPK e p53), a promovem. O complexo Ulk1, que controla

as etapas iniciais da formação do autofagossomo, está a jusante de mTOR, sendo regulados, assim, pela disponibilidade de nutrientes (SHANG, 2011).

### **1.3.2. Autofagia e a patogênese de doenças**

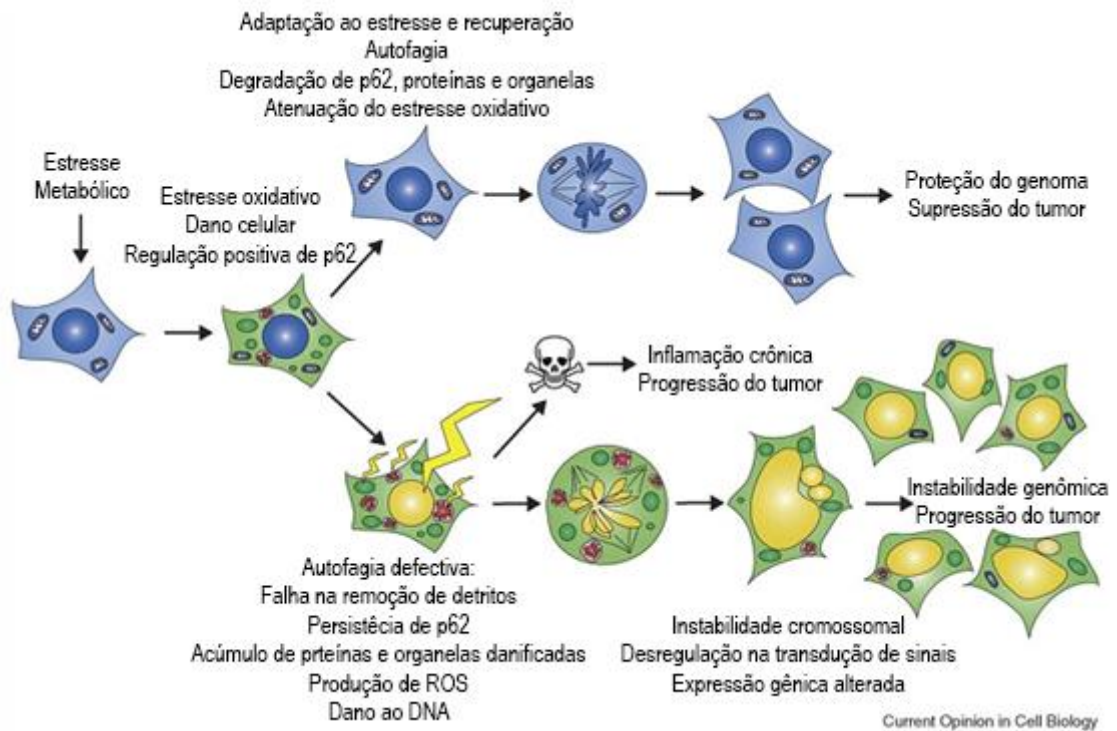
A autofagia se encontra comprometida em uma variedade de doenças, como Alzheimer, Parkinson, Huntington e outras desordens neurodegenerativas (SARKAR, RAVIKUMAR, RUBINSZTEIN, 2009; CHEUNG, IP, 2011; PAN, YUE, 2014). Autofagia também está relacionada à desordens musculares (NISHINO, 2006) e diferentes tipos de câncer (CUERVO, 2004; MORSELLI, 2009).

Muito se discute sobre o papel da autofagia em doenças e sobre sua função dualística como mecanismo de sobrevivência e de morte celular (ESKELINEN, 2011). Inicialmente, a ativação da autofagia pode prover à célula a energia necessária para o mínimo funcionamento durante indisponibilidade nutricional, além de diminuir os riscos de danos pela eliminação de proteínas ou organelas anômalas (RUBIO, 2012). Contudo, em estágios mais avançados do câncer, a autofagia pode garantir a execução da morte celular (RESENDE, ULRICH, 2013). A observação do acúmulo de autofagossomos em células no processo de morte levou à definição de uma forma de morte celular programada não-apoptótica, chamada de morte celular do tipo II, que funcionaria como mecanismo supressor de tumores, semelhante à apoptose (LEVINE, YUAN, 2005). Autofagia e apoptose podem ser iniciadas por sinais em comum (HACKENBERG, 2013). Ocasionalmente, isto resulta na combinação das duas vias, enquanto em diferentes condições, a célula varia entre as duas respostas de maneira mutuamente exclusiva (MAIURI, 2007; TAVASSOLY, 2013).

A redução dos níveis de várias proteínas requeridas para a autofagia tem sido associada a um maior desenvolvimento tumoral (LIU, 2013). No entanto, o papel da autofagia no câncer é muito complexo, já que existem evidências de que a autofagia pode ser oncogênica em certos contextos e supressora de tumor em outros (KONDO, 2005; HIPPERT, O'TOOLE, THORBURN, 2006; MATHEW, KARANTZAWADSWORTH, WHITE, 2007; WHITE, DIPOLA, 2009; RAO, 2014). O número crescente de evidências conectando câncer e autofagia torna sua manipulação interessante para o tratamento deste. Em teoria, ambas a ativação e inativação da autofagia podem beneficiar células cancerígenas dependendo do estágios em que

estas células se encontrem. Em estágios iniciais de desenvolvimento do câncer, a ativação da autofagia bloqueia o crescimento tumoral. Em contraste, a ativação da autofagia em estágios mais avançados pode promover a sobrevivência de células cancerígenas sob restrição de nutrientes, como em tumores pouco vascularizados. Além disso, a ativação autofágica promove a eliminação de moléculas e organelas intracelulares danificadas após tratamentos antitumorais, o que aumenta a resistência do tumor à quimioterapia (LIU, 2011; DASS, 2013).

Defeitos no processo autofágico recriam um estado inflamatório sem a necessidade de uma fonte de dano extrínseca. Assim, em células e tecidos defectivos para a autofagia, a falha na remoção de detritos celulares e a disfunção celular resultante são estímulos inflamatórios que criam um ambiente propenso ao desenvolvimento do câncer (HE, KLIONSKY, 2009; MÜNZ, 2013). O conceito de que o mecanismo autofágico limita o dano tecidual e a inflamação, se tornando um mecanismo supressor de tumores, é recente (WHITE, 2010; LORIN, 2013). A autofagia suprime doenças resultantes de agregações proteicas, inflamação e câncer (PERLMUTTER, 2009; GRANNEL, 2008; KNAEVELSRUD, SIMONSEN, 2010; CHOI, RYTER, LEVINE, 2013), apoiando o possível papel para o controle de qualidade celular pela via autofágica na supressão tumoral, envolvendo proteínas como a P62, responsável pelo reconhecimento de proteínas poliubiquitinadas e agregados proteicos (MATHEW, 2009; MURROW, DEBNATH, 2013; MORIMOTO, CHRISTEN, 2013) (Figura 2).



**Figura 2. Mecanismos pelos quais defeitos na autofagia promovem o câncer.** Estresse metabólico resulta em dano oxidativo e acúmulo de p62. A autofagia é responsável pela degradação do material celular danificado. Adaptado de WHITE, 2010.

Os efeitos promotores de tumor da autofagia podem estar relacionados a:

- Reciclagem de nutrientes para abastecer as células cancerígenas
- Aumento das chances de células tumorais de sobreviver a hipóxia
- Aumento da resistência à drogas antitumorais

Os efeitos antitumorais da autofagia podem estar relacionados a:

- Prevenção do acúmulo de proteínas e organelas defeituosas
- Controle do estresse oxidativo por remoção de mitocôndrias danificadas
- Prevenção do estresse do retículo endoplasmático (RE), requerido por certos tumores
- Limitação e prevenção da inflamação crônica, fator de risco para vários tipos de câncer

Em relação a este último ponto, as doenças inflamatórias intestinais são bons exemplos de como o mau funcionamento da autofagia pode induzir inflamação e, assim, criar um ambiente pró-tumorigênico. A inflamação crônica é, conhecidamente, um fator de risco para o desenvolvimento do câncer colorretal (EKBOM, 1990; O'CONNOR, 2010; KAPPELMAN, 2014).

#### **1.4. Autofagia, doenças inflamatórias intestinais e câncer colorretal**

Doenças inflamatórias intestinais (DII) compreendem duas formas de inflamação intestinal: colite ulcerativa (UC) e doença de Chron (PODOLSKY, 1991; HANAUER, 2006). DIIs diferem de outras doenças inflamatórias por sua incapacidade de regular negativamente a resposta inflamatória. Em indivíduos saudáveis, o intestino se torna inflamado em resposta a um patógeno e então retorna ao seu estado de tolerância uma vez que o patógeno tenha sido removido. Em indivíduos com DIIs, contudo, a inflamação não é negativamente regulada e o sistema imune da mucosa permanece cronicamente ativado (LAGNHORST, 2007).

A inflamação crônica é um fator de risco chave para CRC em pacientes com DIIs (O'CONNOR, 2010). A progressão de adenoma a carcinoma que ocorre durante o desenvolvimento esporádico de tumores colorretais parece ser uma sequência de inflamação-displasia-carcinoma em CRC associados a DIIs (ZISMAN, RUBIN, 2008). Levando em conta este relacionamento, pode se considerar que os mesmos defeitos autofágicos envolvidos na patogênese de DIIs também são fatores de risco para o desenvolvimento de CRC.

A relação, por exemplo, entre ativação de mTOR e CRC é suportada por diversos estudos (GULHAT, 2009; CAI, 2014; DUFOUR, 2011). A polipose colônica, formação de pólipos, ou seja, protuberâncias teciduais resultantes de crescimento anormal do tecido, observada em camundongos knock-out para *Apc716* foi relacionada à instabilidade cromossomal mediada pela ativação de mTOR (AOKI, 2003). No mesmo modelo, a inibição de mTORC1 por everolimus, inibidor de mTOR, reduziu o número e o crescimento destes pólipos (FUJISHITA, 2008).

A via Akt-mTOR desempenha um papel crítico no crescimento e na progressão do CRC. Um estudo envolvendo pacientes com câncer colorretal mostrou que

variações genéticas relacionadas a via Akt-mTOR contribuem para o risco de câncer colorretal (SLATTERY, 2010; PANDURANGAN, 2013). Várias proteínas da via estavam significativamente superexpressas em CRCs quando comparados ao tecido colônico normal dos mesmo pacientes (JOHNSON, 2010). A regulação positiva da sinalização por mTOR também foi evidenciada em outros estudos envolvendo CRC (GULHATI, 2009; ZHANG, 2009; EKSTRAND, 2010). Na mesma linha, a ativação anormal de mTOR foi encontrada em pacientes com DII (DENG, 2010), tornando, assim, o uso de inibidores de mTOR/indutores autofágicos uma terapia promissora.

O assunto se torna ainda mais complexo pelo fato de que os efeitos oncogênico e supressor de tumor podem coexistir dentro do mesmo tumor. Além disso, a autofagia possui diversos papéis benéficos no tecido normal, impossibilitando uma terapia sistêmica. Vários estudos focam na autofagia como alvo para prevenção e tratamento do câncer (LIU, 2010; TURCOTTE, GIACCIA, 2010; YANG, 2011; MESCHINI, 2011; HELGASON, HOLYOAKE, RYAN, 2013). No que diz respeito ao CRC, a maioria dos dados apontam para a autofagia como processo de atraso da apoptose e, por conseguinte, a inibição da autofagia é mais susceptível a realizar o efeito terapêutico desejado do que o uso de compostos indutores de autofagia. Ainda assim, evidências experimentais mostram efeitos antitumorais tanto para inibidores quanto para indutores autofágicos (WANG, 2012; SELVAKUMARAN, 2013; ZHAI, 2013). Inibidores da autofagia podem aumentar a eficácia de tratamentos antineoplásicos utilizados atualmente, ao passo que promotores da autofagia podem induzir morte celular mediada por autofagia em tumores não apoptóticos.

A maioria dos estudos envolvendo inibição da autofagia na terapia do câncer utilizam cloroquina e hidroxicloroquina (SASAKI, 2010; KIMURA, 2013). Tais compostos são vastamente utilizados como tratamentos para malária e reumatismo e atuam inibindo a acidificação lisossomal, bloqueando, assim, os estágios finais da autofagia (MORIMURA, 2014). A Cloroquina inibe a proliferação da linhagem de câncer colorretal de camundongo CT26 *in vivo* e *in vitro* (ZHENG, 2009) e potencializa o efeito antitumoral de 5-fluorouracil (5-FU) em células de câncer de cólon humano (SASAKI, 2010).

O bloqueio autofágico é uma abordagem promissora para evitar a função citoprotetora desse processo durante a terapia antitumoral. Já foi relatada a

modulação da autofagia por tratamentos cuja ação é bastante distinta, como radiação ionizante e quimioterápicos tradicionais contra o câncer (HØYER-HANSEN, JÄÄTTELÄ, 2008). A ativação da autofagia em resposta a radiação ou quimioterapia é benéfica para células tumorais, devido a contribuição para a eliminação de organelas danificadas, prevenindo, desse modo, a ativação da apoptose. Para esse fim, a inibição autofágica pode ser usada como uma estratégia de sensibilização do tumor para promover a atividade antitumoral de compostos quimioterápicos.

O método mais comum de indução da autofagia é através da via Akt-mTOR. Ativação exacerbada de mTOR leva à produção de sinais proliferativos e resistência à morte celular (LIN, 2014; LOPEZ-RIVERA, 2014). Além disso, mTOR regula a invasão celular, metástase e angiogênese. Em CRCs, mTOR se encontra regulada positivamente e existem evidências que sugerem um potencial terapêutico para inibidores de mTOR (DUFOR, 2011). Rapamicina e seus análogos demonstraram atividade antitumoral em alguns modelos de CRC *in vitro*. Por exemplo, a combinação de Rapamicina e 5-aza-deoxicitidina suprimiu o crescimento de células HCT116 e reduziu a incidência e volume do tumor em camundongos (ZHANG, 2009). Efeitos favoráveis da Rapamicina tem sido relatados em testes clínicos com pacientes com tumores sólidos, incluindo CRCs (TABERNERO, 2008; FUJISAKA, 2010; OKAMOTO, 2010; LANE, O'REILLY, WOOD, 2013). Embora Rapamicina e seus análogos tenham se mostrado eficientes em modelos pré-clínicos, quando utilizados como agentes terapêuticos únicos, seus efeitos tem sido modestos (DON, ZHENG, 2011).

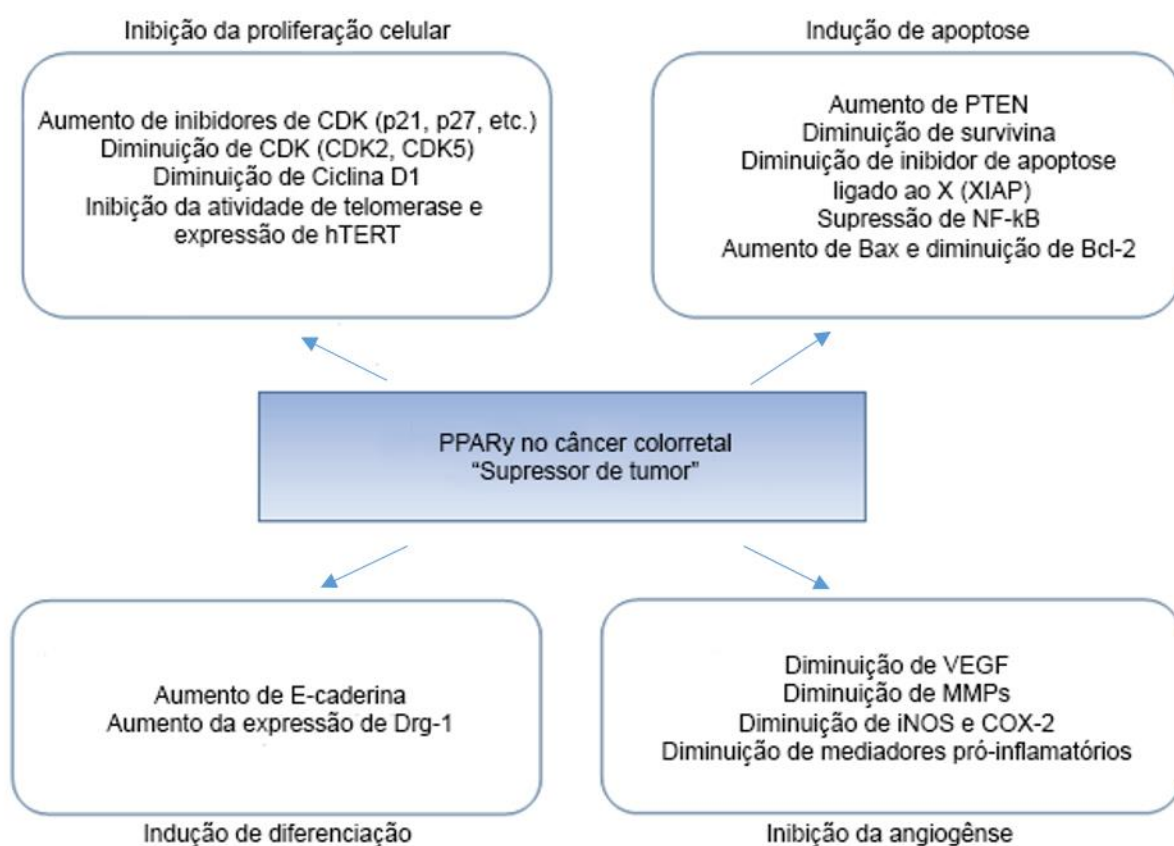
As vias inflamatórias e autofágicas também podem ser reguladas por outros elementos, como fatores de transcrição da família PPAR. Dentre estes fatores, o PPAR $\gamma$  tem sido proposto como um fator de proteção em colites, agindo principalmente através da atenuação da atividade de NF $\kappa$ B (DUBUQUOY, 2003; KELLY, 2004; ZUBAIR, FRIERI, 2013). Bactérias comensais parecem contribuir para a homeostase da mucosa intestinal por elevar a expressão de PPAR $\gamma$  (CARIO, 2005)

### **1.5. PPAR $\gamma$ , autofagia e câncer colorretal**

PPAR $\gamma$  faz parte de uma família de aproximadamente 50 fatores de transcrição envolvidos em vários processos biológicos diferentes (GUAN, 2004). PPAR $\gamma$  não regula apenas o metabolismo lipídico, mas também proliferação, diferenciação e

apoptose em diferentes tipos de câncer (FUCCI, 2012; ZENG, 2012; PANG, 2014). Em linhagens de câncer de mama, a ativação de PPAR $\gamma$  induz autofagia e inibe o crescimento tumoral através de morte celular por apoptose (ROVITO, 2013). Os efeitos da ativação de PPAR $\gamma$  na inflamação não foram completamente elucidados, pois diferentes tipos celulares mostram diferentes respostas inflamatórias em resposta à sua ativação (ZHOU, 2009; MAHMOOD, 2011; GRAY, 2012).

As células de câncer colorretal, particularmente, apresentam alta expressão de PPAR $\gamma$  (SU, 2007) e sua ativação parece estar ligada a efeitos antitumorais. Estudos utilizando agonistas de PPAR $\gamma$  mostram redução na severidade de modelos *in vitro* de DIIs (TANAKA, 2001; SHRESTHA, XIA, 2012) e inibição da proliferação celular aliada à indução de apoptose (DAI, WANG, 2010) (Figura 3). Contudo, existem dados contrários mostrando uma tendência à maior severidade do câncer em camundongos com susceptibilidade à doenças colorretais quando PPAR $\gamma$  é ativado (SAEZ, 1998).



**Figura 3: Potenciais mecanismos moleculares da ação do PPAR $\gamma$  como supressor de tumor no câncer colorretal.** Adaptado de PARK, KWAK, 2012.



## **1.6. Justificativa**

O câncer é um problema de saúde pública não só no Brasil, mas também em escala mundial. O câncer colorretal, especificamente, tem grande incidência e é responsável por grande número de mortes, tanto entre homens quanto entre mulheres, anualmente, em todo o mundo. Desta forma, uma melhor compreensão dos mecanismos de estabelecimento e progressão do tumor de cólon retal é essencial para o desenvolvimento de novos tratamentos e métodos de diagnóstico precoce para esta doença. O processo autofágico e o controle do metabolismo lipídico, como mantenedores da homeostase celular, possuem grande impacto nas vias que podem levar à transformação celular. O melhor entendimento de suas atuações como processos pró ou antitumorais é fundamental para o entendimento do estabelecimento desta doença.

Até o momento, não foi relatada a regulação da via autofágica pelo fator de transcrição nuclear PPAR $\gamma$  ou da expressão de PPAR $\gamma$  pela autofagia em células de câncer colorretal. Além disso, os efeitos da modulação das duas vias em conjunto são desconhecidos neste tipo de câncer.

A utilização, portanto, de células de linhagem de câncer colorretal, como Caco-2, se torna uma ferramenta útil para o desmembramento das vias e análise das consequências de suas regulações sobre a inflamação e as propriedades tumorais.

Assim sendo, o presente trabalho investigou o envolvimento da autofagia e do metabolismo lipídico em relação as propriedades tumorais observadas no câncer colorretal, utilizando, para tal fim, células Caco-2.

## **1.7. Objetivos**

### **1.7.1. Objetivo Geral**

Investigar a relação entre o metabolismo lipídico, a via autofágica e o fator de transcrição PPAR $\gamma$  e seus efeitos nas propriedades tumorais do câncer colorretal em modelo de adenocarcinoma colorretal *in vitro*.

### **1.7.2. Objetivos Específicos**

- Verificar a existência de regulação da via autofágica pela ativação de PPAR $\gamma$  em células Caco-2.
- Avaliar a regulação da expressão de PPAR $\gamma$  por modulação do processo autofágico em células Caco-2;
- Analisar os efeitos da ativação e inibição de PPAR $\gamma$ , bem como da indução e inibição da autofagia nas células tumorais de adenocarcinoma colorretal pela análise dos eventos de morte, proliferação, ciclo celular, produção de espécies reativas de oxigênio e pelo perfil de células-tronco tumorais.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Fluxograma

O fluxograma experimental se resume à estimulação de células Caco-2 e subsequente análise de diversos parâmetros (Figura 4).

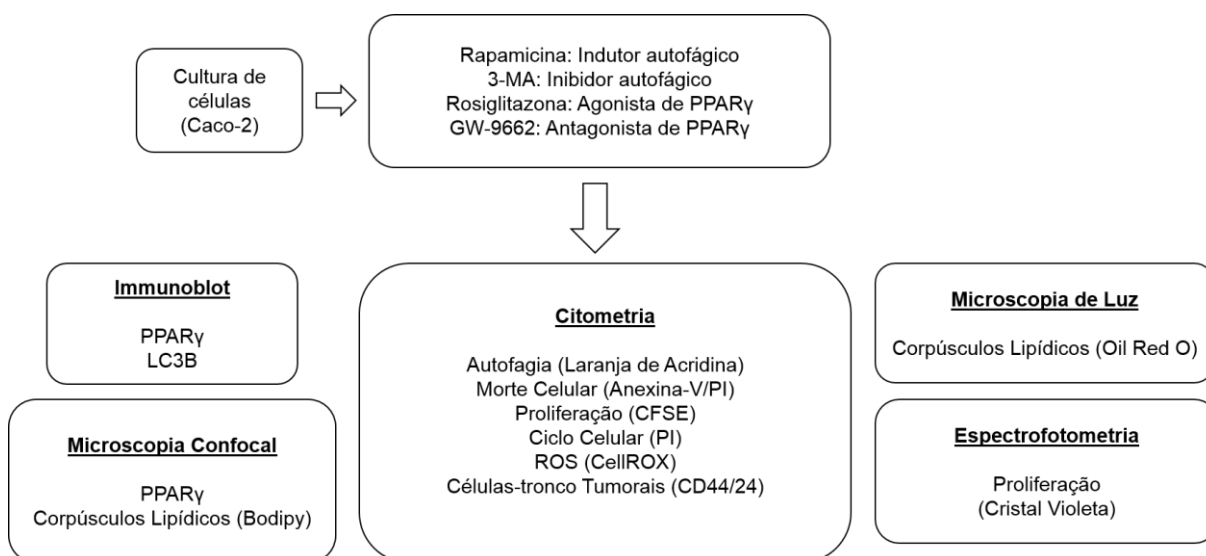


Figura 4. Desenho experimental esquemático. Resumo da metodologia utilizada.

### 2.2. Reagentes e equipamentos

Para o cultivo celular, utilizou-se meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) High Glucose e Soro Fetal Bovino (SFB) da empresa Gibco – Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). Além disso, Tripsina 0,25% em EDTA (T4049) e antibiótico Penicilina-Estreptomicina (P4333) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Para estimulações, foram utilizados Rapamicina (R8781), 3-Metiladenina (M9281), Rosiglitazona (R2408) e GW-9662 (M6191), todos obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Os anticorpos primários utilizados foram: anti-MAP LC3 $\beta$  H-50 (SC-28266) e anti-PPAR $\gamma$  H-100 (SC-7196) da Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, EUA); anti-CD44-FITC (MHCD4401) e anti-CD24-PE (MHCD2404) da Molecular Probes – Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA); anti- $\beta$ -Actina-Peroxidase (A3854) da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os anticorpos secundários utilizados foram IgG de cabra anti-coelho – Alexa Fluor 546 (A-11010) e IgG de cabra anti-coelho Alexa Fluor 680 (A-21076), ambos da Invitrogen – Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA);

IgG de cabra anti-coelho conjugada à peroxidase (111-035-006) da Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. Como controles isotípicos, foram utilizados os anticorpos IgG1-PE (SC-2866) e IgG2b-FITC (SC-2857), ambos da Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, EUA). Os marcadores fluorescentes utilizados foram Laranja de Acridina (6130), da empresa ImmunoChemistry Technologies, LLC (Bloomington, MN, EUA), Óleo Vermelho O (O1391), BODIPY 493/503 e DAPI (32670), obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Na eletroforese de proteínas em gel, utilizou-se inibidor de protease (BP-477) da Boston Bioproducts (Ashland, MA, EUA) e géis pré-prontos Amersham ECL Gel 10%, 10 poços da GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, Inglaterra). A revelação foi realizada usando solução SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (34077) da Thermo Scientific - Thermo Fisher Scientific, Inc. (Pittsburgh, PA, EUA) e a aquisição de imagens foi realizada pelo equipamento Image Quant LAS 4000 da GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, Inglaterra), com a análise realizada no programa ImageJ (NIH, EUA).

Para os ensaios de imunofluorescência, utilizou-se Triton X-100 (X100) e Albumina de Soro Bovino (BSA) (A2153) da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), leite desnatado Molico e meio de montagem anti-decaimento de fluorescência, ProLong Gold (P36934), da Invitrogen – Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).

Diferentes *kits* foram utilizados: Anexina-V conjugada a FITC (BMS500FI), da eBioscience (San Diego, CA, EUA), para análise de morte celular; CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (C34554), da Invitrogen – Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA), para análise de proliferação; Iodeto de Propídeo (P3566) da Molecular Probes – Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA), para análise do ciclo celular e CellROX Deep Red Flow Cytometry Assay Kit (C10491), da Molecular Probes – Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA), para análise do estresse oxidativo.

Cristal Violeta (42555) foi adquirido da empresa VETEC, Propilenoglicol (0398039) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e Entellan da empresa Merck Millipore.

A separação de proteínas por eletroforese em gel foi realizada no aparelho Amersham ECL Gel Box, da GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire,

Inglaterra) e a transferência foi feita no aparelho Trans-Blot Semi-Dry, da BIORAD. A leitura de absorbâncias foi realizada no leitor de microplacas Spectramax M5, com análise dos dados realizada pelo programa SoftMax Pro 5.2, ambos da Molecular Devices, LLC (Sunnyvale, CA, EUA). Dois citômetros de fluxo foram utilizados, o BD FACSCalibur e o BD FACSVerser, da BD Biosciences, Inc., com a análise dos dados realizada no programa FlowJo v.7.6.5, da Tree Star, Inc. (Ashland, OR, EUA). As imagens de imunofluorescência foram obtidas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser SP5, da Leica (Wetzlar, HE, Alemanha).

### **2.3. Cultura de células**

Células de linhagem de adenocarcinoma colorretal Caco-2 (ATCC HTB-37), adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB, 100.000 U/L de penicilina e 100mg/L de estreptomicina e mantidas em atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Passagens eram feitas ao atingir 90% de confluência.

### **2.4. Tratamentos**

As células foram tratadas com indutor autofágico Rapamicina (100ng/mL), inibidor de PI3K III 3-Metiladenina (5mM), agonista de PPAR $\gamma$  Rosiglitazona (10 $\mu$ M), antagonista de PPAR $\gamma$  GW-9662 (10 $\mu$ M) e combinações destes estímulos por 24 ou 48 horas. Como controles experimentais, foram utilizadas células mantidas em meio de cultivo e tratadas com volumes correspondentes de DMSO.

### **2.5. Eletroforese em gel e imunodeteção**

Para o ensaio de imunodeteção, 2x10<sup>6</sup> células foram semeadas em placas de 6 poços contendo 2mL de meio de cultura por poço. Após tratamentos, o meio foi retirado e as células lavadas três vezes com PBS. Adicionou-se ao poço solução de lise celular (Tris 50mM, NaCl 150mM, EDTA 5mM e 1% de Triton X-100 – pH 7,4) contendo inibidor de protease. A lise foi auxiliada mecanicamente pelo uso de espalhador de células. O lisado celular foi mantido no gelo e severamente agitado 5 vezes com intervalos de 5 minutos entre cada agitação e, por fim, centrifugado a

15.000 r.p.m. O sobrenadante coletado foi armazenado a -80°C. Antes da aplicação no gel, as amostras foram quantificadas pelo método de Bradford e a quantidade necessária de Tampão de Amostra (Tris 125mM, 20% de glicerol, 10% de 2-mercaptoetanol, 4% de SDS e 0,004% de azul de bromofenol) foi adicionada. As amostras, então, foram fervidas por 5 minutos a 95°C e aplicadas no gel.

Géis de acrilamida pré-prontos foram utilizados de acordo com o indicado para o produto. As amostras correram em tampão Tris-Glicina (Tris 25mM; Glicina 192mM; 1% SDS – pH 8,3) a 160V, por uma hora e 20 minutos, a 4°C. Após a corrida, o gel seguiu para transferência à membrana de nitrocelulose.

O gel foi transferido em sistema *semi-dry* por 45 minutos a 15V, a 4°C, utilizando membranas de nitrocelulose e Tampão de Transferência (Tris 25mM, Glicina 192mM, 20% Metanol – pH 8,3). As membranas foram então bloqueadas por 1 hora com 5% leite desnatado e 0,05% Tween-20 em PBS em agitação. Os anticorpos primários foram diluídos na solução de bloqueio e incubados com a membrana “*overnight*” a 4°C em agitação, nas seguintes diluições: 1:1.000 anti-LC3B; 1:500 anti-PPAR $\gamma$ .

Após incubação, as membranas foram então lavadas três vezes, por 5 minutos cada, com 0,05% Tween-20 em PBS e incubadas com os anticorpos secundários conjugados à HRP, diluídos em solução de bloqueio em 1:2.000. O anticorpo anti- $\beta$ -Actina foi utilizado em diluição de 1:20.000. As incubações ocorreram por uma hora e meia em temperatura ambiente sob agitação. As membranas foram novamente lavadas e incubadas com proporções iguais de solução para revelação.

Após a captura de imagens, a análise das quantidades de proteínas foi realizada pela normalização das intensidades das bandas de proteínas alvo para a intensidade de  $\beta$ -Actina. A quantificação demonstrada nos gráficos significa a proporção de expressão proteica, tendo-se a expressão da célula não estimulada como 100%.

## 2.6. Imunofluorescência

Para microscopia confocal de fluorescência,  $3 \times 10^5$  células foram semeadas em placas de 24 poços contendo 1mL de meio de cultura por poço e lamínulas em seu

interior. Após tratamento, as células foram lavadas três vezes com PBS e fixadas com Formalina 3,7% *overnight*, a temperatura ambiente. Após retirada da Formalina, as células foram novamente lavadas três vezes com PBS e, em seguida, permeabilizadas com 0,2% Triton X-100 em PBS por 20 minutos, em temperatura ambiente. Após lavagem, adicionou-se solução de bloqueio (2,5% de BSA em PBS) por 20 minutos, em temperatura ambiente.

PPAR $\gamma$  foi marcado com anticorpo anti-PPAR $\gamma$  na diluição de 1:300 e 5 $\mu$ g/ml de anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 546 ou Alexa Fluor 680; lipídios neutros foram marcados com BODIPY na diluição de 1:300. Os anticorpos foram incubados *overnight* a 4°C, em câmara úmida, ou por 1 hora a 37°C. O núcleo foi marcado com DAPI, na concentração final de 300nM. As lâminas foram montadas utilizando meio de montagem anti-decaimento de fluorescência.

## **2.7. Presença de vesículas acídicas**

A detecção de vesículas acídicas intracelulares se deu com a marcação com Laranja de Acridina. Laranja de Acridina é uma base fraca que se acumula nos lisossomos das células devido ao baixo pH lisossomal, produzindo fluorescência vermelha quando excitada por luz azul.

3 $\times$ 10<sup>5</sup> células foram semeadas em placas de 24 poços contendo 1mL de meio de cultura por poço. Após tratamentos, as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com solução de Laranja de Acridina 1 $\mu$ g/mL por 15 minutos, a 37°C e protegidas da luz. As células então foram lavadas, ressuspensas em 500 $\mu$ L de PBS e analisadas por citometria de fluxo.

Foram adquiridos 10.000 eventos e analisadas as fluorescências nos canais FL1-H e FL3-H em escalas logarítmicas. A análise dos dados foi realizada com a sobreposição dos histogramas e comparação entre as médias geométricas de intensidade de fluorescência.

## **2.8. Biogênese de corpúsculos lipídicos**

A biogênese dos corpúsculos lipídicos foi detectada pela marcação de lipídeos neutros por Óleo Vermelho O.

No ensaio,  $2 \times 10^5$  células foram semeadas em placas de 24 poços contendo 1mL de meio de cultura por poço e lamínulas no interior. Após tratamentos, as células foram fixadas com Formalina 3,7% por 10 minutos e lavadas com água Milli-Q três vezes, por 30 segundos cada vez. Em seguida, as lâminas foram incubadas com 100% de Propilenoglicol (PEG) por 2 minutos e posteriormente com solução de 0,5% de Óleo Vermelho O por 15 minutos. As células foram então lavadas com solução de 60% de PEG por 1 minuto e mais três vezes com água Milli-Q, por 30 segundos cada vez. Para marcação nuclear, utilizou-se Hematoxilina por 5 segundos seguida de lavagens com água Milli-Q. A lamínula foi montada utilizando Entellan.

## **2.9. Morte celular**

A viabilidade celular foi constatada através de marcação com Anexina-V FITC e PI. Células apoptóticas perdem a assimetria dos componentes da membrana e tem a fosfatidilserina marcada por Anexina-V, enquanto aquelas que perdem a integridade da membrana, como células necróticas, ficam permeáveis ao PI. Assim, os diferentes eventos de morte celular podem ser distinguidos conforme os padrões de marcação.

$3 \times 10^5$  células foram semeadas em placas de 24 poços contendo 1mL de meio de cultura por poço. Após tratamentos, o sobrenadante foi coletado e centrifugado para o resgate de células mortas desaderidas. As células totais foram lavadas três vezes com PBS e ressuspendidas em Tampão de Ligação de Anexina 1X (HEPES 10mM; NaCl 140mM;  $\text{CaCl}_2$  2,5mM – pH 7,4) e incubadas com 2,5 $\mu$ L de Anexina-V FITC por 15 minutos, em temperatura ambiente e protegidas da luz. Decorrido o tempo, adicionou-se 400 $\mu$ L de Tampão de Ligação de Anexina 1X e PI em concentração final de 2  $\mu$ g/ml por 5 minutos, a 4°C protegido da luz, analisando as células imediatamente por citometria de fluxo.

Foram adquiridos 10.000 eventos e analisadas as fluorescências nos canais FL1-H e FL3-H em escalas logarítmicas. A análise dos dados foi realizada usando a porcentagem de células presente em cada quadrante. Para controle experimental, a apoptose foi induzida com 20% de DMSO por 15 minutos em meio de cultura. Células necróticas foram obtidas fervendo as células por 15 minutos a 70°C.



## **2.10. Proliferação celular**

### **2.10.1. CFSE**

O ensaio com CFSE tem como base a incorporação do marcador pelas células. Tal marcador, após clivagem, torna-se fluorescente. Com o passar das divisões celulares, o conteúdo citoplasmático vai sendo diluído entre as células-filhas e a intensidade da fluorescência, assim, caindo pela metade a cada divisão.

$3 \times 10^5$  células foram semeadas em placas de 24 poços contendo 1mL de meio de cultura por poço. Após tratamentos, as células foram lavadas três vezes com PBS e adicionou-se CFSE na concentração de  $10 \mu\text{M}$  durante 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , no escuro. As células foram então lavadas e DMEM foi adicionado por 30 minutos. Para a análise em citômetro de fluxo, as células foram ressuspendidas em PBS. Foram adquiridos 10.000 eventos e analisada a fluorescência no canal FL1-H em escala logarítmica. A análise dos dados foi realizada com a sobreposição dos histogramas e conforme parâmetros de proliferação celular do próprio programa. Para controle experimental, células foram tratadas com Colchicina ( $10 \mu\text{M}$ ) por 24 horas.

### **2.10.2. Cristal Violeta**

Como alternativa de análise, foi realizado o ensaio de proliferação celular utilizando Cristal Violeta. Neste ensaio,  $5 \times 10^4$  células foram semeadas em placas de 96 poços contendo  $200 \mu\text{L}$  de meio de cultura por poço. Após tratamentos, por 24 ou 48 horas, as células foram fixadas com etanol por 10 minutos e marcadas com Cristal Violeta 0,05% em etanol 20% por 10 minutos, com subsequente lavagem para retirada do excesso de corante. Após solubilização com metanol, a leitura no espectrofotômetro foi realizada no comprimento de onda de 595nm.

## **2.11. Ciclo celular**

A marcação do ciclo celular com Iodeto de Propídeo se resume à capacidade do PI interagir com o DNA e, assim, tornar possível sua quantificação. Dessa maneira, as populações podem ser divididas de acordo com a quantidade de DNA presente. Células possuindo  $2n$  de DNA se encontram na fase G0 ou G1, células com  $4n$  de

DNA se encontram na fase G2 ou M e células com quantidades intermediárias de DNA se encontram na fase S.

$3 \times 10^5$  células foram semeadas em placas de 24 poços contendo 1mL de meio de cultura por poço. Após tratamentos, as células foram removidas e centrifugadas a 300G por 10 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 100 $\mu$ l de PBS e, em seguida, adicionou-se 900 $\mu$ l de etanol 70% gelado por tubo, ficando assim por duas horas a 4°C. As amostras então passaram por centrifugação a 3000G durante 10 minutos. O precipitado foi lavado com PBS e ressuspenso em solução contendo 0,1% de Triton X-100, 100 $\mu$ g/ml de PI e 50 $\mu$ g/ml de RNase livre de DNase em PBS e mantido a 37°C por 10 minutos, protegido da luz. Para a análise em citômetro de fluxo, as células foram ressuspendidas em PBS.

Foram adquiridos 10.000 eventos e analisada a fluorescência no canal FL2-H em escala linear. A análise dos dados foi realizada conforme parâmetros de ciclo celular do próprio programa.

## **2.12. Espécies reativas de oxigênio**

A marcação com CellROX consiste no uso de sondas fluorescentes para a medição de espécies reativas de oxigênio. Inicialmente, o marcador – permeável à membrana celular – é não fluorescente, devido a seu estado reduzido. Após oxidação, o marcador exibe sinal fluorescente e pode ser, então, quantificado.

$3 \times 10^5$  células foram semeadas em placas de 24 poços contendo 1mL de meio de cultura por poço. Após tratamentos, CellROX, na concentração final de 5 $\mu$ M, foi adicionado ao poço contendo meio de cultura, incubando as células a 37°C por 30 minutos, protegidas da luz. Após a marcação, as células foram lavadas três vezes com PBS e ressuspendidas em 500 $\mu$ L de PBS para leitura imediata em citômetro de fluxo.

Foram adquiridos 10.000 eventos e analisada a fluorescência no canal FL4-H, em escala logarítmica. A análise dos dados foi realizada com a sobreposição dos histogramas e comparação entre as médias geométricas de intensidade de fluorescência. Para controle experimental positivo, as células foram tratadas com Rotenona (10 $\mu$ M).

### **2.13. Células-tronco tumorais**

As populações de células-tronco tumorais foram definidas conforme os perfis de expressão das proteínas de superfície CD44 e CD24.

$3 \times 10^5$  células foram semeadas em placas de 24 poços contendo 1mL de meio de cultura por poço. Após tratamentos, as células foram removidas, lavadas três vezes com PBS e marcadas com os anticorpos anti-CD44-FITC e anti-CD24-PE diluídos em solução de bloqueio (1% de BSA em PBS) numa concentração final de 1:20 por 30 minutos, a 4°C. Para análise em citômetro de fluxo, as células foram ressuspensas em PBS.

Foram adquiridos 10.000 eventos e analisadas as fluorescências nos canais FL1-H e FL3-H em escalas logarítmicas. A análise dos dados foi realizada usando a porcentagem de células presente em cada quadrante. Para controle experimental, células marcadas com isotipos (IgG) foram consideradas como negativas para a marcação.

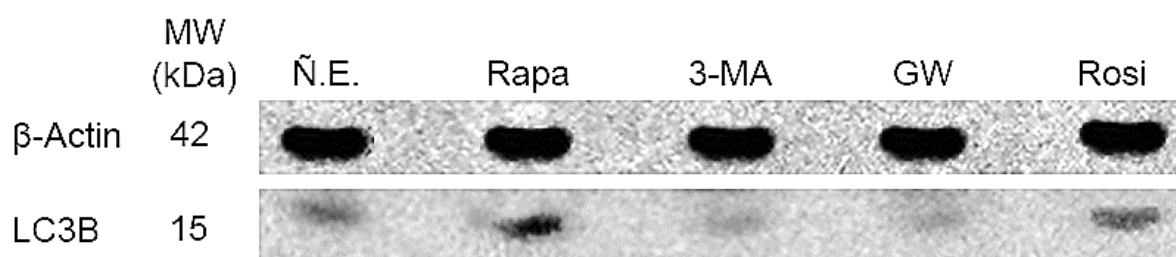
### **2.14. Análise estatística**

As análises estatísticas compreenderam os testes ANOVA, pós-teste de Bonferroni–Dunn e teste t-pareado. Experimentos feitos em triplicata, com valores de p menores do que 0,05 foram considerados significativos. Cálculos e gráficos feitos no programa GraphPad Prism 5, GraphPad Software, Inc.

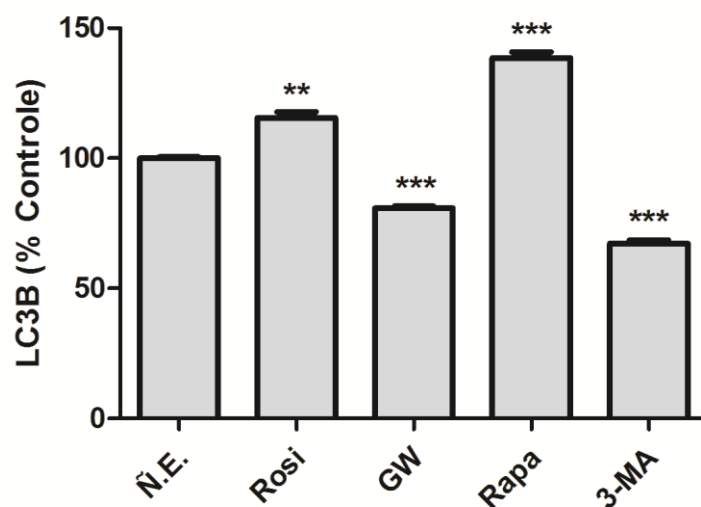
### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Regulação da autofagia por moduladores autofágicos e agonistas e antagonistas de PPAR $\gamma$

Primeiramente, foi avaliada a indução ou inibição da autofagia em células de linhagem de câncer colorretal. Células Caco-2 foram mantidas em meio de cultura por 24 horas e tratadas com moduladores autofágicos, agonistas e antagonistas de PPAR $\gamma$ . A fim de detectar a presença da molécula LC3B, marcador e constituinte específico da membrana do autofagossomo, a mesma foi marcada com anticorpo específico após separação das proteínas por eletroforese em gel. A imunodeteção mostrou um aumento na expressão proteica após a administração independente do indutor autofágico Rapamicina e do agonista de PPAR $\gamma$ , Rosiglitazona. Em contrapartida, a utilização do inibidor autofágico 3-MA e do antagonista de PPAR $\gamma$ , GW-9662, causou diminuição da expressão de LC3B em células Caco-2 (Figura 5). Os tratamentos com Rapamicina e Rosiglitazona elevaram a expressão de LC3B em 34,61% e 12%, respectivamente, enquanto os estímulos 3-MA e GW-9662 reduziram o nível de expressão em 30,77% e 17,68%, respectivamente, em relação ao controle não estimulado (Figura 6).



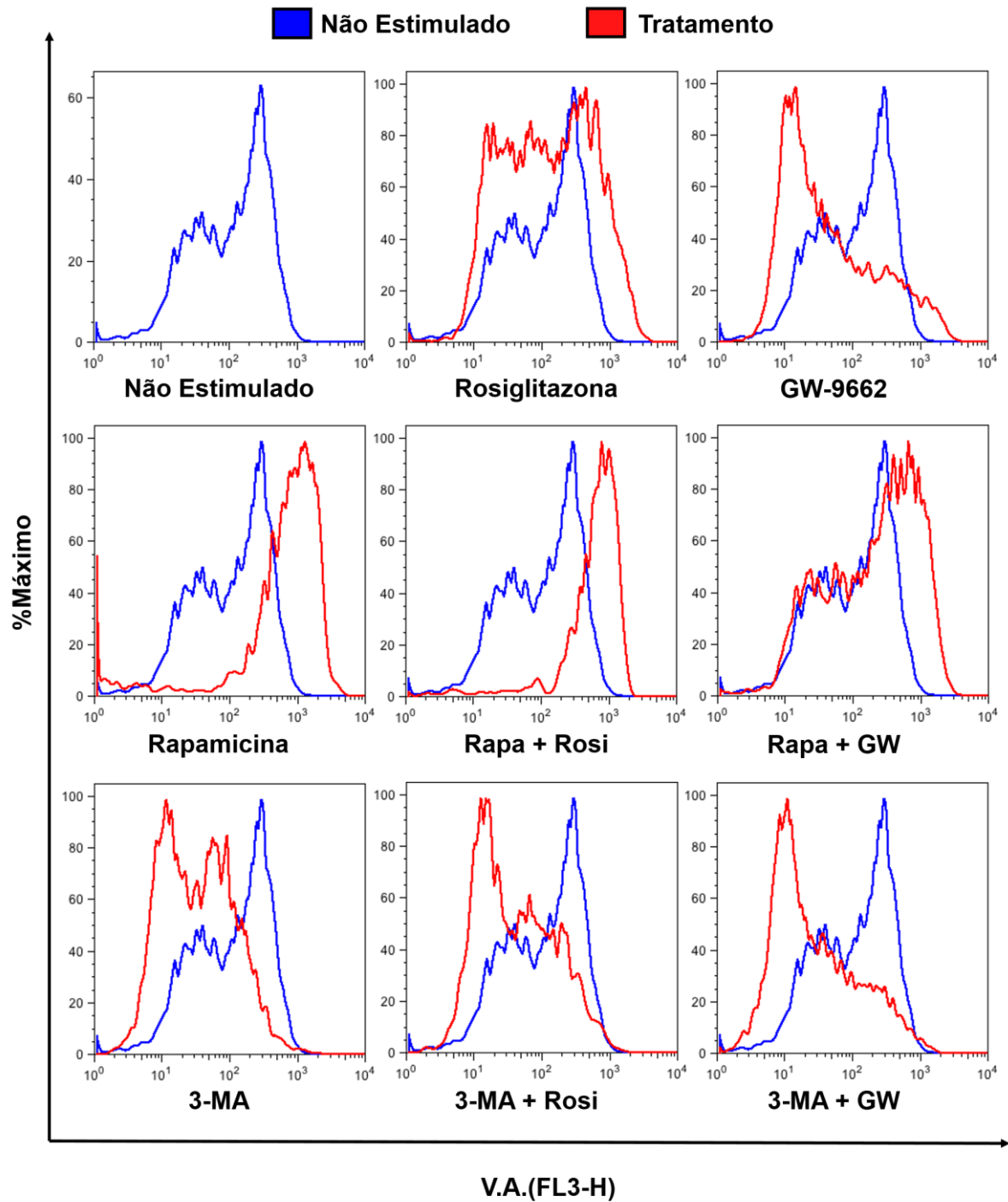
**Figura 5. Análise da expressão de LC3B em células da linhagem de câncer colorretal Caco-2.** Da esquerda para direita são mostradas células não estimuladas (Ñ.E.), células tratadas com Rapamicina (100nM), 3-MA (5mM), GW-9662 (10 $\mu$ M) e Rosiglitazona (10 $\mu$ M) por 24 horas. MW representa a massa molecular das proteínas,  $\beta$ -Actina (42kDa) foi usada como controle interno do experimento de detecção da LC3B (15kDa).



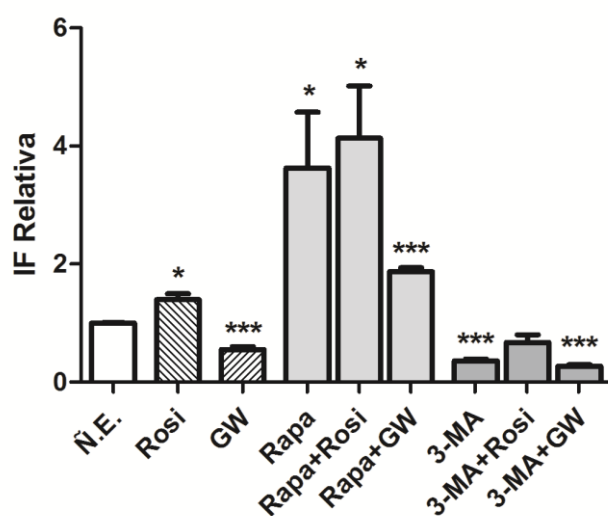
**Figura 6. Níveis de expressão de LC3B em células da linhagem de câncer colorretal Caco-2.** Quantificação dos níveis de expressão de LC3B em relação às células não estimuladas após normalização da intensidade das bandas para a intensidade de  $\beta$ -Actina correspondente. Cada coluna representa a média e desvio padrão de três repetições experimentais. \* $p < 0,05$  significativa \*\*\*  $p < 0,0001$  extremamente significativa.

O desenvolvimento de vesículas ácidas (V.A.s) no citoplasma das células é uma das características do processo autofágico. Para confirmar os resultados obtidos por imunodeteção, as células foram marcadas com Laranja de Acridina e analisadas por citometria de fluxo (Figura 7).

Os resultados da amostragem do processo autofágico por marcação com Laranja de Acridina foram altamente concordantes com os obtidos por imunodeteção. Rosiglitazona aumentou o número de vesículas ( $1,399 \pm 0,09711$  vezes), enquanto GW os reduziu ( $0,5530 \pm 0,04894$  vezes). Rapamicina aumentou a quantidade de vesículas ácidas ( $3,630 \pm 0,9445$  vezes), ao passo que 3-MA as reduziu ( $0,3638 \pm 0,02807$  vezes). Nesta etapa, foram realizados também tratamentos coestimulatórios, modulando autofagia e a ativação de PPAR $\gamma$  concomitantemente. A coestimulação não gerou diferença significativa entre a combinação de Rapamicina e Rosiglitazona ou Rapamicina e GW-9662 e a estimulação com Rapamicina desacompanhada, apenas sugerindo interpolação das vias. O mesmo padrão surgiu na comparação dos tratamentos com 3-MA (Figura 8).



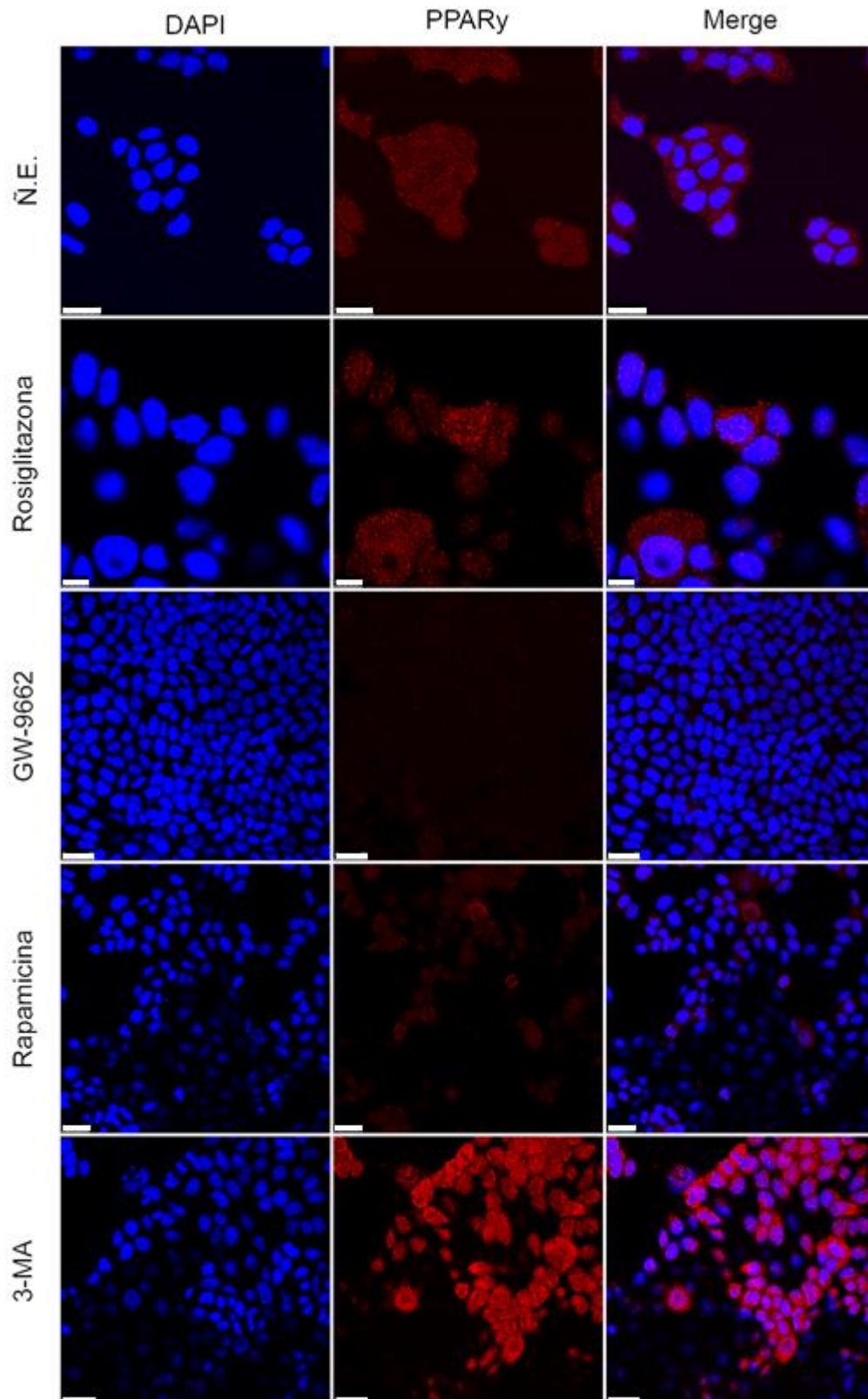
**Figura 7. Presença de vesículas ácidoicas (V.A.s) em células Caco-2.** Após tratamento com Rapamicina (100nM), 3-MA (5mM), Rosiglitazona (10µM) e GW-9662 (10µM) e coestimulações por 24 horas, a presença de V.A.s foi aferida por citometria de fluxo com marcação por Laranja de Acridina. Histogramas dos tratamentos (linha vermelha) comparados ao controle não estimulado (linha azul). Cada histograma é representativo de três experimentos independentes.



**Figura 8. Quantificação de vesículas ácidas (V.A.s) em células Caco-2.** Comparação da intensidade de fluorescência (IF) dos tratamentos, normalizados em relação as células não estimuladas. Cada coluna representa a média e desvio padrão de três repetições experimentais. \* $p < 0,05$  significativa \*\*\*  $p < 0,0001$  extremamente significativa.

### 3.2. Presença e regulação de PPAR $\gamma$ por moduladores autofágicos na linhagem Caco-2

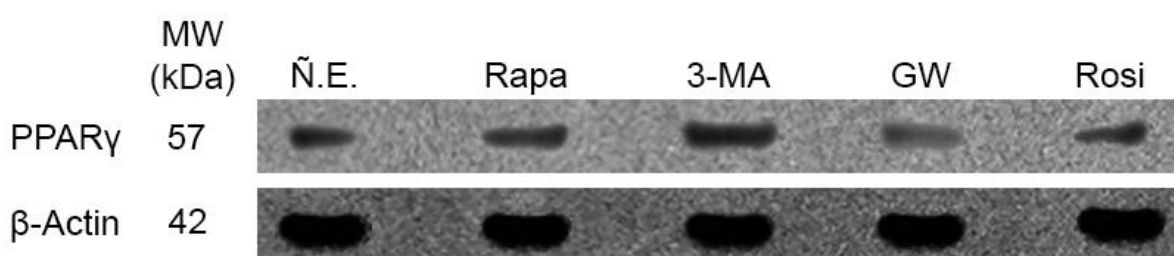
Nossos resultados sugerem que há expressão constitutiva de PPAR $\gamma$  na linhagem Caco-2 e que o tratamento com Rapamicina não causou nenhum efeito sobre a sua expressão. O tratamento com Rosiglitazona, agonista de PPAR $\gamma$  e GW-9662, antagonista de PPAR $\gamma$ , como esperado, estimularam e aboliram, respectivamente, a detecção de PPAR $\gamma$  nas células tratadas. A inibição autofágica por 3-MA, em contrapartida, induziu alta expressão de PPAR $\gamma$  em células Caco-2 (Figura 9).



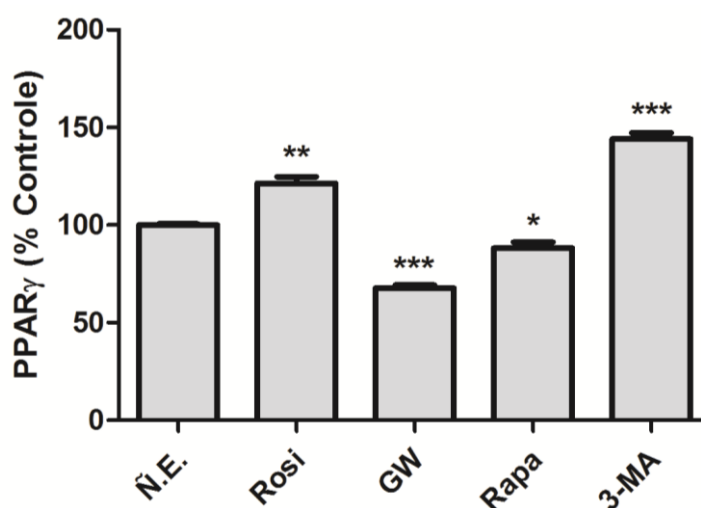
**Figura 9. Presença de PPAR $\gamma$  em células Caco-2.** Após tratamento com Rapamicina (100nM), 3-MA (5mM), Rosiglitazona (10 $\mu$ M) e GW-9662 (10 $\mu$ M) por 24 horas, as células foram marcadas com anticorpo anti-PPAR $\gamma$  (em vermelho) e observadas em microscópio confocal, com aumento de 63X. Núcleos marcados com DAPI (em azul). Barra de referência: 25  $\mu$ m.



Os resultados da análise quantitativa da expressão de PPAR $\gamma$  apontaram para um aumento na expressão de PPAR $\gamma$  na presença do agonista de PPAR $\gamma$ , Rosiglitazona, e do inibidor autofágico, 3-MA. A adição do antagonista de PPAR $\gamma$ , GW-9662, resultou em diminuição na expressão (Figura 10). O tratamento com Rapamicina gerou baixa diferença significativa, reduzindo a expressão de PPAR $\gamma$  em apenas 6,82%. Rosiglitazona e 3-MA elevaram a expressão em 17,99% e 42,33%, respectivamente, enquanto GW-9662 reduziu o nível de expressão em 34,55% em relação ao controle não estimulado (Figura 11).



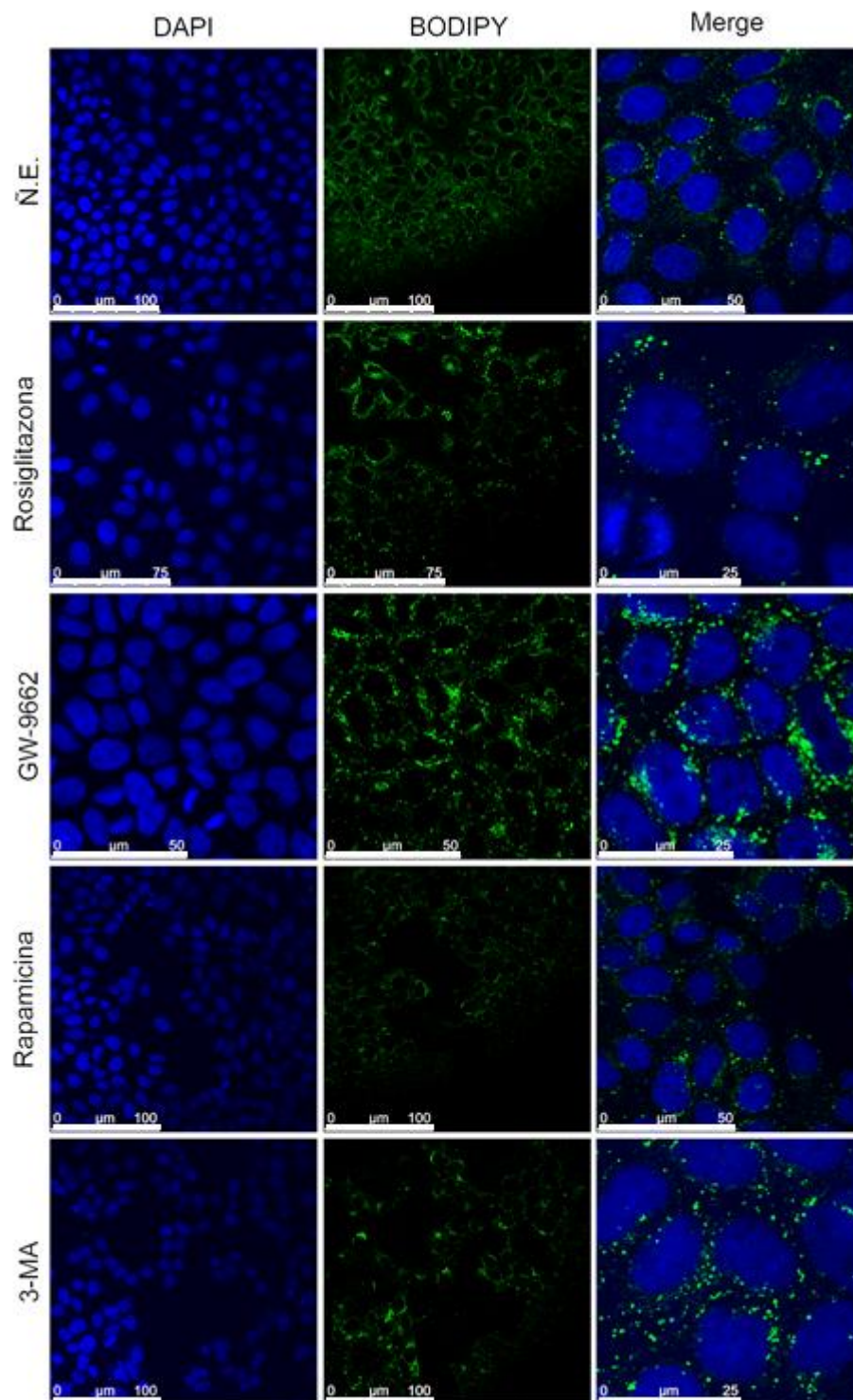
**Figura 10. Imunodeteção de PPAR $\gamma$  em células da linhagem de câncer colorretal Caco-2.** Da esquerda para a direita estão representadas as células tratadas e não estimuladas (Ñ.E.) e células Caco-2 tratadas com Rapamicina (100nM), 3-MA (5mM), GW-9662 (10 $\mu$ M) e Rosiglitazona (10 $\mu$ M) por 24 horas. MW representa a massa molecular das proteínas e  $\beta$ -Actina (42kDa) foi usada como controle interno do experimento para a detecção do PPAR $\gamma$  (15kDa) e  $\beta$ -Actina (42kDa) como controle interno do experimento.



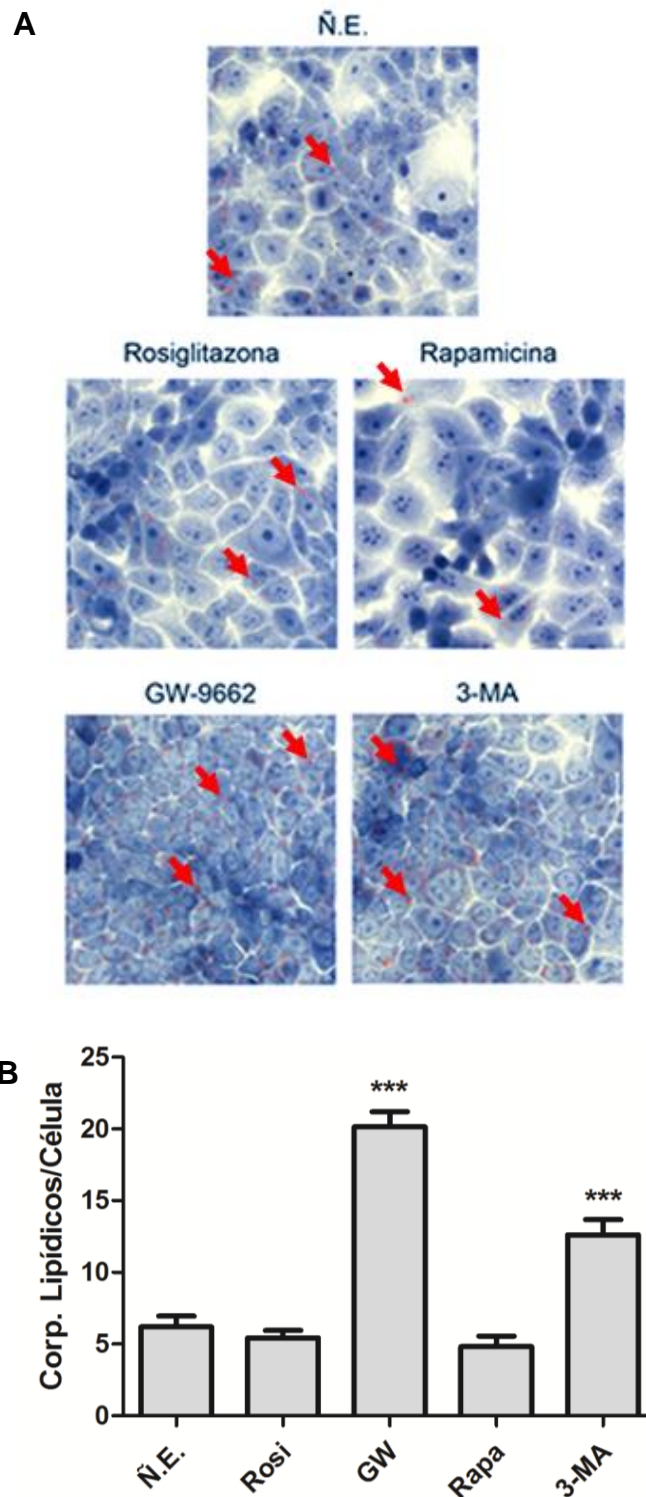
**Figura 11. Níveis de expressão de PPAR $\gamma$  em células da linhagem de câncer colorretal Caco-2.** Quantificação dos níveis de expressão de PPAR $\gamma$  em relação às células não estimuladas após normalização da intensidade das bandas para a intensidade de  $\beta$ -Actina correspondente. Cada coluna representa a média e desvio padrão de três repetições experimentais. \* $p < 0,05$  significante \*\*\*  $p < 0,0001$  extremamente significante.

### **3.2.1 Análise da produção de corpúsculo lipídico por células Caco-2**

Duas marcações distintas foram utilizadas para a determinação do número de corpúsculos lipídicos por células: marcação com BODIPY (Figura 12) e Óleo Vermelho (Figura 13A). Os tratamentos com Rosiglitazona e Rapamicina se mostraram condizentes com os níveis de expressão de PPAR $\gamma$ , não alterando a biogênese de corpúsculos lipídicos. O tratamento com 3-MA induziu o aparecimento de um grande número de corpúsculos lipídicos, bem como o tratamento com GW-9662, que produziu o maior aumento no número destas organelas, com média de 12 e 20 corpúsculos por célula, respectivamente (Figura 13B).



**Figura 12. Análise de corpúsculos lipídicos em células Caco-2 por microscopia confocal.** Após tratamento com Rapamicina (100nM), 3-MA (5mM), Rosiglitazona (10 $\mu$ M) e GW-9662 (10 $\mu$ M) por 24 horas. Em verde, corpúsculos lipídicos marcados com Bodipy® e, em azul, núcleos das células marcados com DAPI. Aumento de 63X. Barras de referência: 100 $\mu$ m e 50  $\mu$ m.



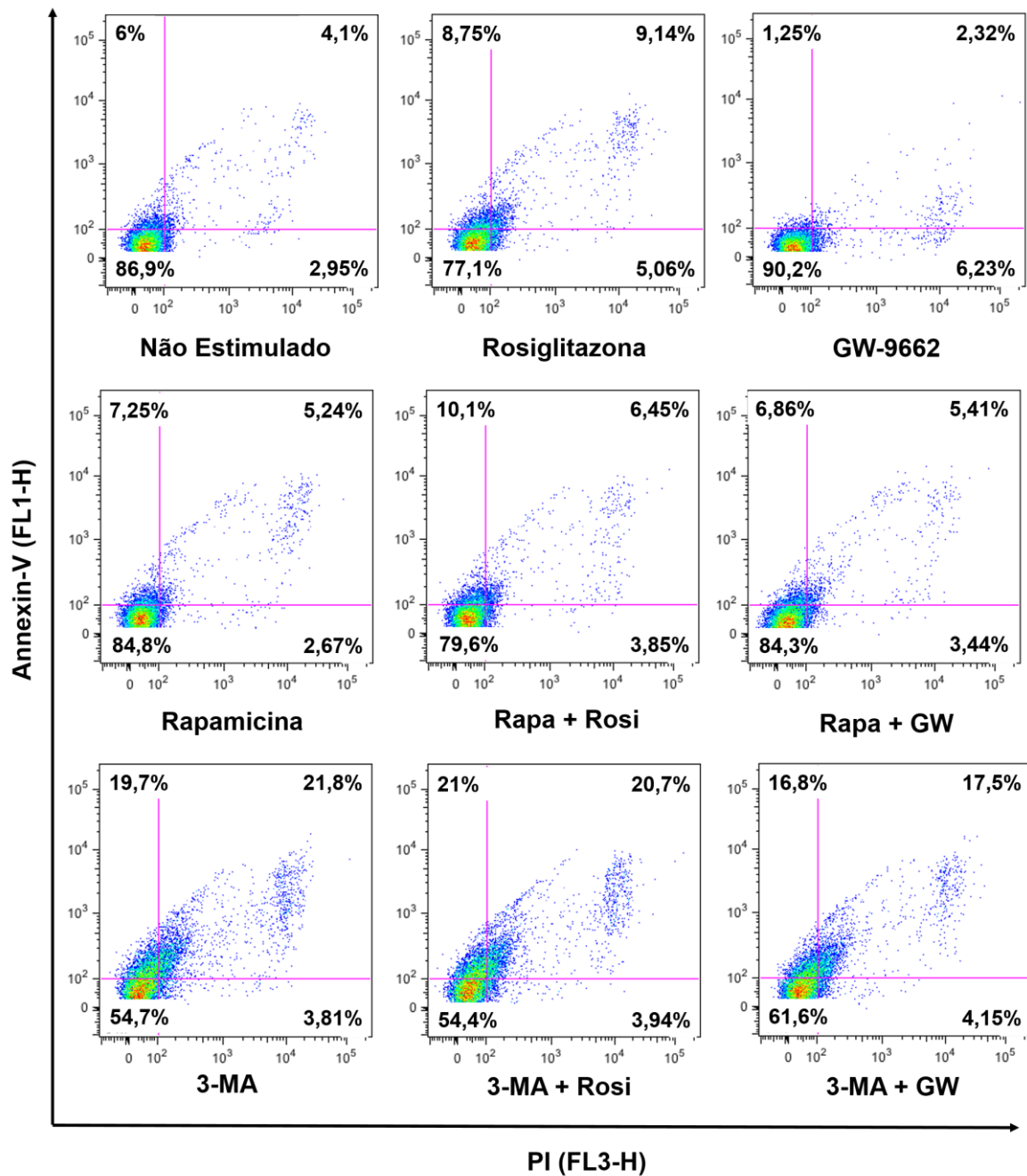
**Figura 13. Biogênese de corpúsculos lipídicos em células Caco-2.** Após tratamento com Rapamicina (100nM), 3-MA (5mM), Rosiglitazona (10 $\mu$ M) e GW-9662 (10 $\mu$ M) por 24 horas, as células foram marcadas com Oléo Vermelho. **A.** Células tratadas com Rapamicina (100nM), 3-MA (5mM), Rosiglitazona (10 $\mu$ M) e GW-9662 (10 $\mu$ M) por 24 horas, corpúsculos destacados pelas setas. Os núcleos das células foram corados com hematoxilina. **B.** Número de corpúsculos lipídicos por célula. Aumento de 20X. Cada coluna representa a média, com desvio padrão, de 50 células. \*\*\*P<0,0001 extremamente significativa.

### **3.3. Efeitos da modulação da autofagia e da ativação de PPAR $\gamma$ na viabilidade celular do câncer colorretal**

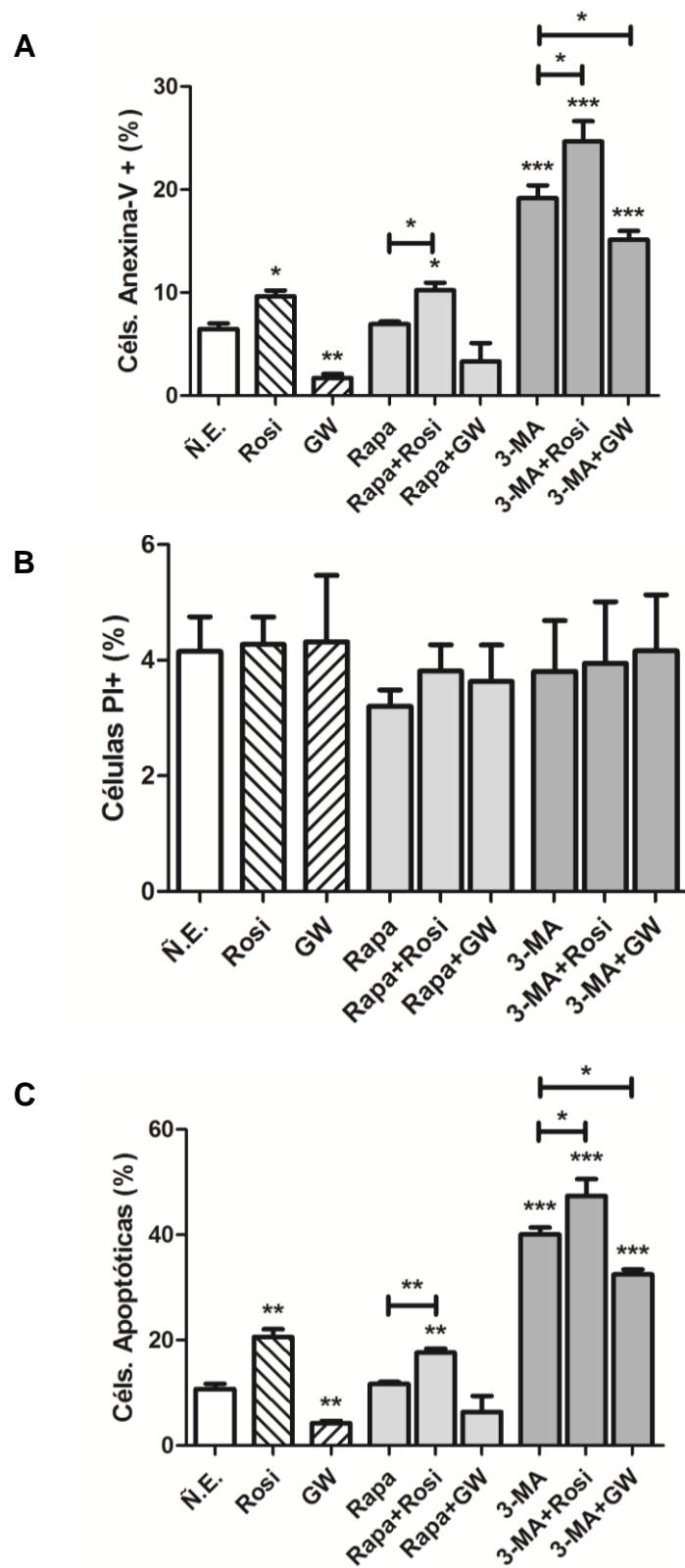
Estabelecida a relação entre o processo autofágico e a expressão/ativação de PPAR $\gamma$ , deu-se início à análise do efeito de suas modulações sobre as propriedades tumorais, a começar pela viabilidade celular. O ensaio realizado para tal foi a marcação com Anexina-V e Iodeto de Propídeo (PI) e a análise foi feita por citometria de fluxo (Figura 14).

Os tratamentos com Rosiglitazona e GW-9662 mostraram resultados opostos. A estimulação com Rosiglitazona causou um aumento no número de células positivas para Anexina-V, de  $6,467\% \pm 0,5486\%$  para  $9,647\% \pm 0,5579\%$ , enquanto a inibição com GW-9662 causou uma redução neste número para  $1,710\% \pm 0,3968\%$ . Quanto à modulação autofágica, apenas a inibição da mesma pelo uso de 3-MA acarretou em aumento da marcação por Anexina-V, de  $6,467\% \pm 0,5486\%$  para  $19,17\% \pm 1,241\%$ . A coestimulação com Rosiglitazona ou GW-9662 juntamente com 3-MA provocou mudanças significativas na marcação, elevando a positividade para Anexina-V (em relação ao 3-MA sozinho) quando usado em conjunto com Rosiglitazona ( $24,65\% \pm 1,989\%$ ). No entanto, a marcação para Anexina V foi reduzida para a o uso combinado de 3-MA com GW-9662 ( $15,15\% \pm 0,8282\%$ ) (Figura 15A). Nenhum dos tratamentos afetou a integridade da membrana celular, como mostra o gráfico de marcação de PI nas células tratadas (Figura 15B).

No cálculo de número total de células apoptóticas (positivas apenas para Anexina-V e duplo-positivas), o padrão anterior se manteve, com a inibição autofágica sendo responsável pela menor viabilidade celular e mostrando atuação conjunta com a ativação de PPAR $\gamma$  sobre este mecanismo celular (Figura 15C).



**Figura 14. Morte celular de células Caco-2.** Após tratamento com Rapamicina (100nM), 3-MA (5mM), Rosiglitazona (10µM) e GW-9662 (10µM) e coestimulações por 24 horas. Porcentagem de células representantes das populações de cada quadrante está representada em porcentagem. Imagem é representativa de três experimentos independentes.

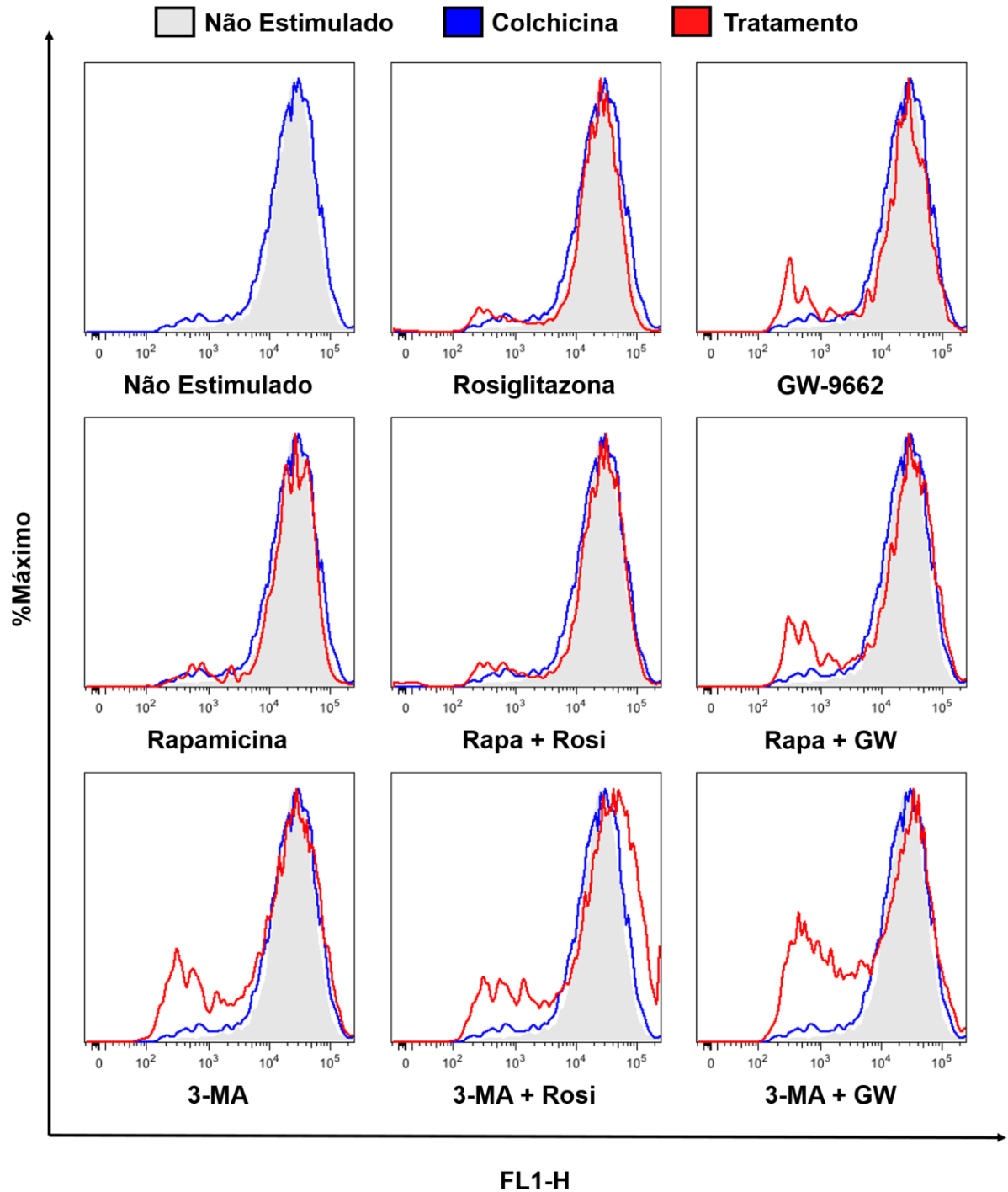


**Figura 15. Quantificação da morte celular.** **A.** Porcentagem de células positivas para Anexina-V e negativas para PI. **B.** Porcentagem de células negativas para Anexina-V e positivas para PI **C.** Porcentagem de células apoptóticas, incluindo positivas somente para Anexina-V e duplo-positivas. Cada coluna representa a média e desvio padrão de três repetições experimentais. \* $p < 0.05$  significante \*\*\*  $p < 0.0001$  extremamente significante.

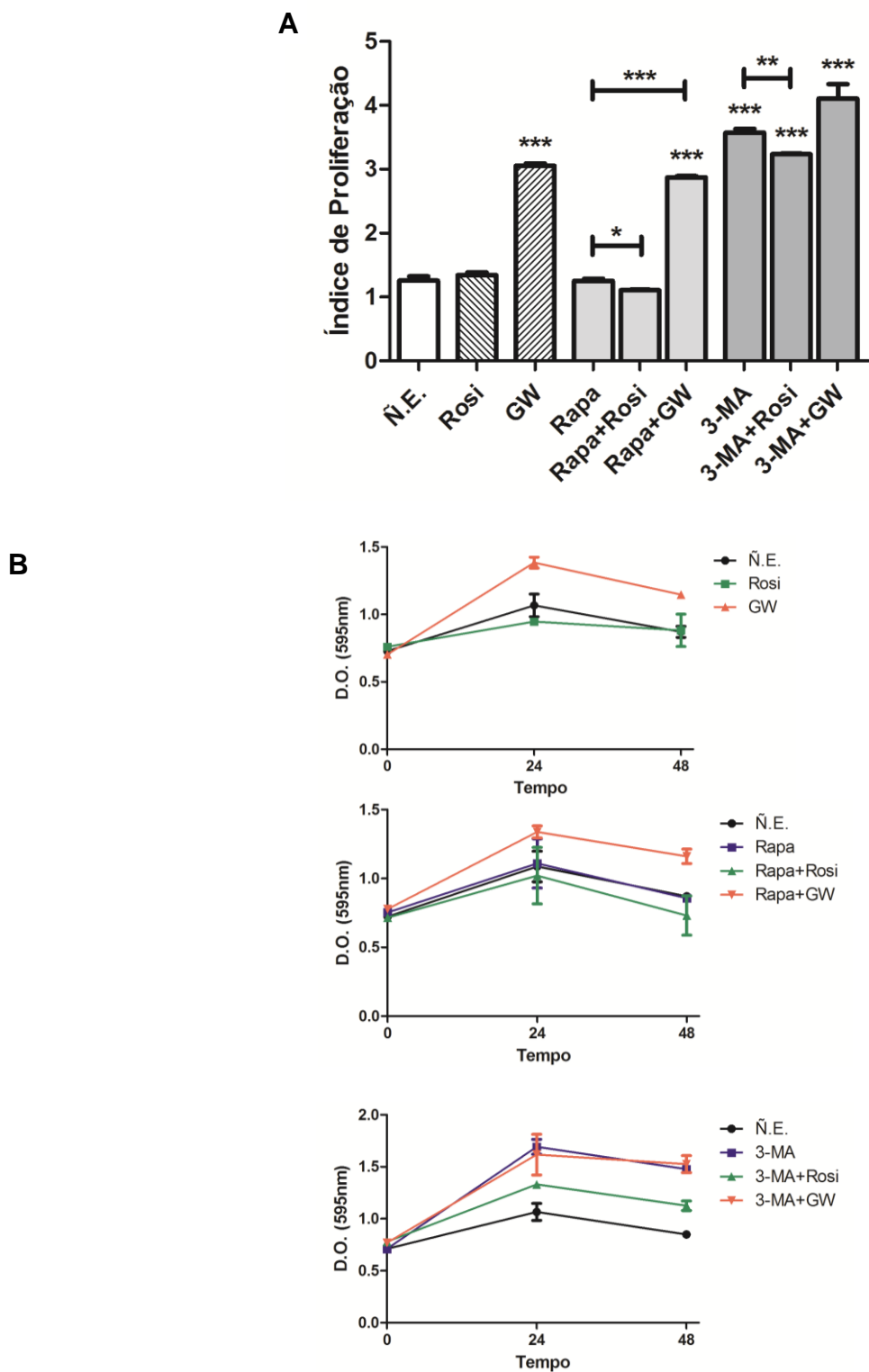
### **3.4. Mudanças na capacidade proliferativa de células de câncer colorretal induzidas por modulação autofágica e ativação de PPAR $\gamma$**

Para a determinação da capacidade proliferativa, utilizou-se CFSE. O resultado está representado na figura 16. Dentre os tratamentos e coestimulações, apenas a utilização de GW-9662 e 3-MA mostraram diferenças significativas na proliferação das células Caco-2. Ambos provocaram um aumento no índice de proliferação celular, ou seja, no número médio de divisões pelas quais as células passam, de  $1,256 \pm 0,06544$  para  $3,057 \pm 0,03276$  no caso do uso de GW e para  $3,572 \pm 0,05984$  no caso d uso de 3-MA. O uso de Rosiglitazona mostrou uma pequena diminuição na proliferação quando utilizada juntamente com um segundo estímulo. Em conjunto com Rapamicina, o índice caiu para  $1,107 \pm 0,007954$ , enquanto com 3-MA, elevou-se a  $3,235 \pm 0,01141$  (Figura 17A). Com o objetivo de reforçar os resultados obtidos por CFSE, foi realizada a análise de proliferação com Cristal Violeta para os tempos de 0, 24 e 48 horas. Corroborando os resultados anteriores, células tratadas com GW-9662 e 3-MA apresentaram um aumento na sua proliferação enquanto o estímulo de PPAR $\gamma$  com Rosiglitazona só se mostrou capaz de alterar tal potencial em conjunto com outros estímulos (Figura 17B).





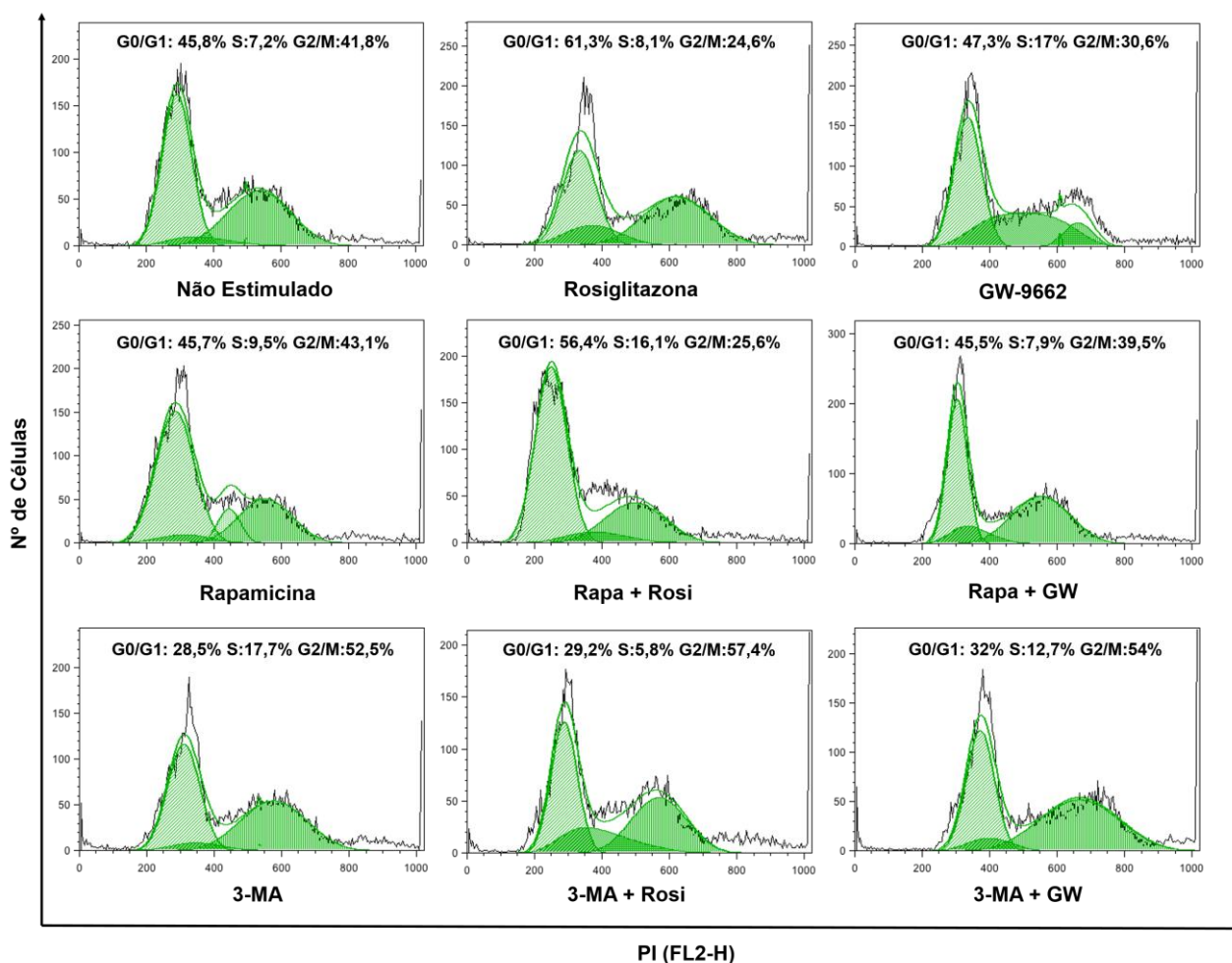
**Figura 16. Padrões de proliferação de células Caco-2 sob diferentes esquemas de indução e inibição do PPAR $\gamma$  e da autofagia.** Células Caco-2 tratadas com Rapamicina (100nM), 3-MA (5mM), Rosiglitazona (10 $\mu$ M) e GW-9662 (10 $\mu$ M) e coestimulações por 24 horas seguida de marcação com CFSE. Nos histogramas células não estimuladas em cinza, tratadas com Colchicina (em azul) e estimuladas/inibidas com os respectivos tratamentos (em vermelho). Imagem representativa de três experimentos.



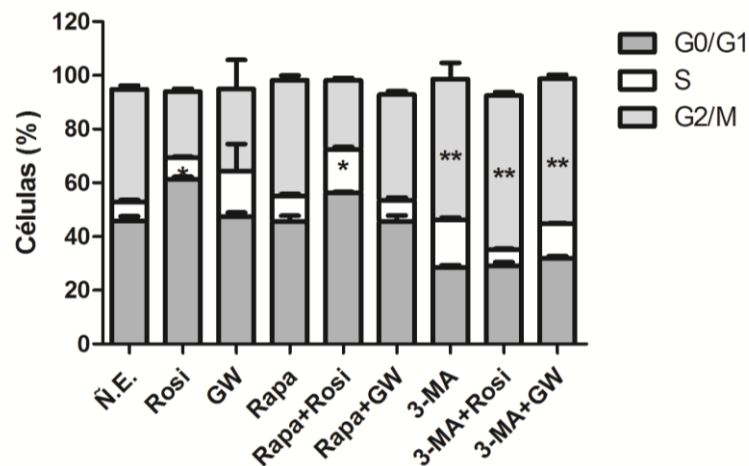
**Figura 17. Quantificação de proliferação celular medida por citometria de fluxo. A.** Índice de proliferação dos tratamentos. **B.** Absorbância da incorporação de cristais de violeta nos três tempos experimentais (0, 24 e 48 horas). Cada imagem é representativa de três experimentos independentes. Cada coluna representa a média e desvio padrão de três repetições experimentais. \* $p < 0,05$  significante \*\*\*  $p < 0,0001$  extremamente significante.

### 3.5. Análise do ciclo celular de células Caco-2 após modulação da autofagia e do PPAR $\gamma$

Dentre os diferentes tratamentos, apenas Rosiglitazona e 3-MA demonstraram capacidade de alterar a distribuição nos diferentes pontos do ciclo celular (Figura 18). Rosiglitazona causou parada do ciclo celular em G0/G1, elevando a porcentagem de células nesta fase de 45,8% a 63,1%, enquanto 3-MA causou aumento da porcentagem de células em S e G2/M, elevando a porcentagem de células nestas fase de 7,2% a 17,7% e de 41,8% a 52,5% (Figura 19).



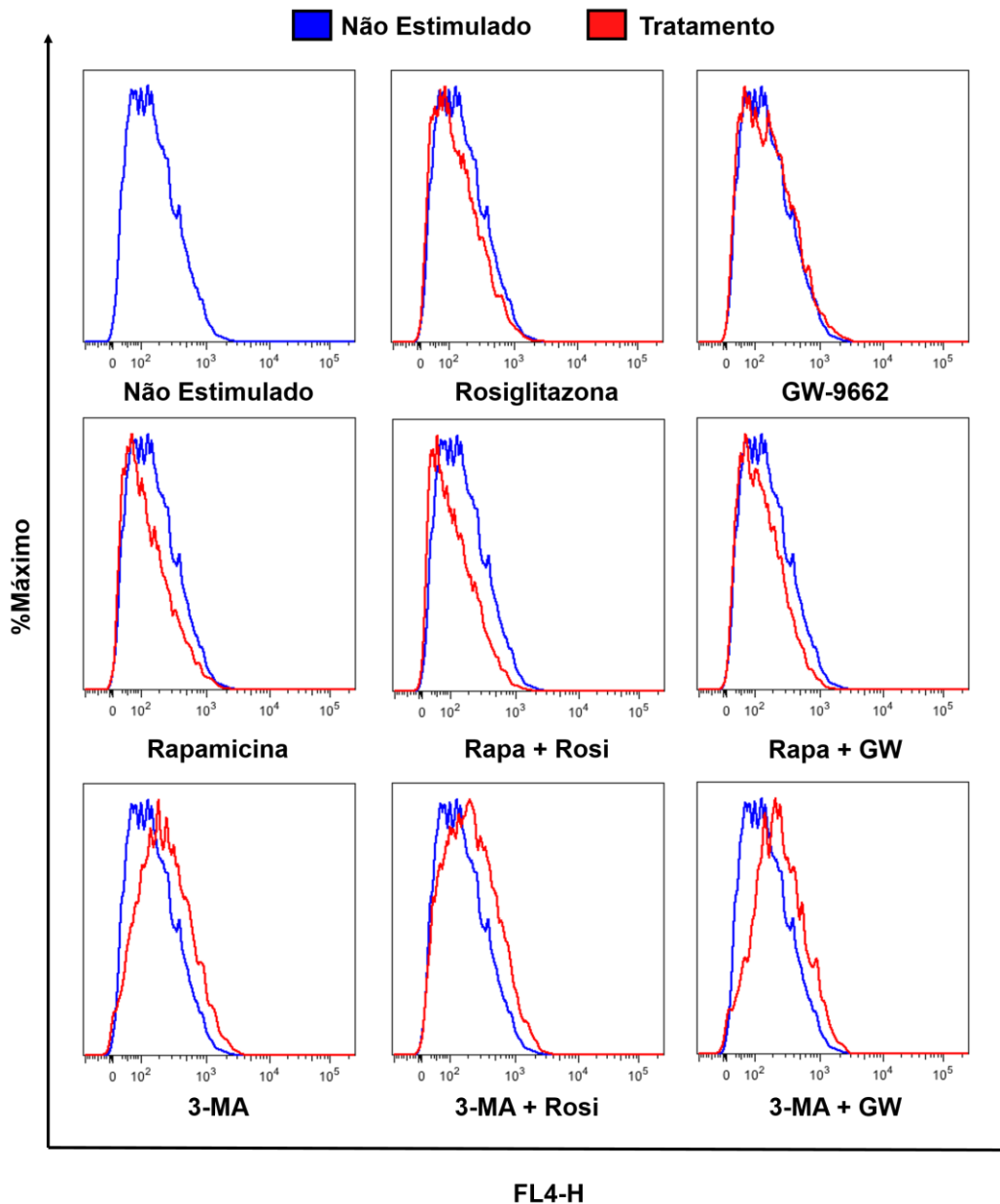
**Figura 18. Variação na distribuição de células em diferentes etapas do ciclo celular.** Efeito do tratamento com Rapamicina (100nM), 3-MA (5mM), Rosiglitazona (10 $\mu$ M) e GW-9662 (10 $\mu$ M) e coestimulações por 24 horas, sobre células da linhagem Caco-2. Representação dos picos referentes aos diferentes estágio do ciclo celular pelo tracejado verde. Cada imagem é representativa de três experimentos.



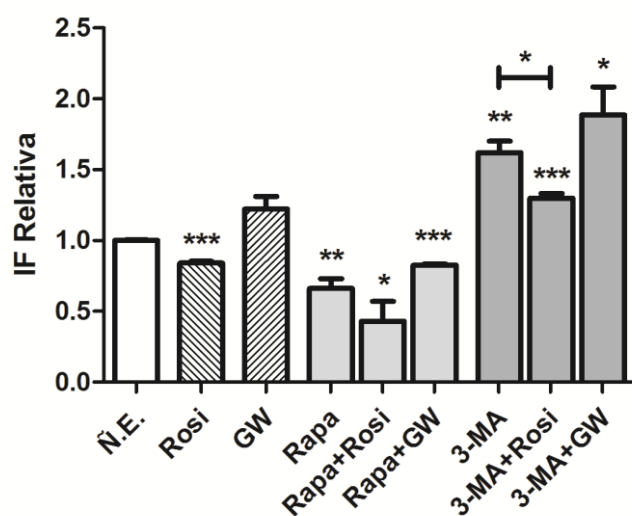
**Figura 19. Quantificação da distribuição de células em diferentes pontos do ciclo celular.** Porcentagem de células em cada etapa do ciclo. Cada coluna representa a média, com desvio padrão de três experimentos. \* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$  significativamente diferente.

### 3.6. Ação de moduladores autofágicos e da atividade de PPAR $\gamma$ na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Cada tratamento foi plotado em histograma e comparado ao controle não estimulado (Figura 20). A estimulação com Rosiglitazona causou diminuição nos níveis de ROS intracelular para  $0,8398 \pm 0,01384$  vezes, ao passo que o estímulo com GW-9662 não mostrou diferença significativa para este tipo de modulação. Os moduladores autofágicos Rapamicina e 3-MA acarretaram em diminuição e aumento dos níveis, de  $1,000 \pm 0,005773$  para  $0,6616 \pm 0,06926$  e  $1,620 \pm 0,07975$ , respectivamente. Com exceção da utilização conjunta de 3-MA e Rosiglitazona, que reduziu a quantidade de ROS quando comparada ao estímulo de 3-MA por si só (de  $1,620 \pm 0,07975$  para  $1,300 \pm 0,03185$ ), as outras coestimulações não mostraram diferenças significativas (Figura 21).



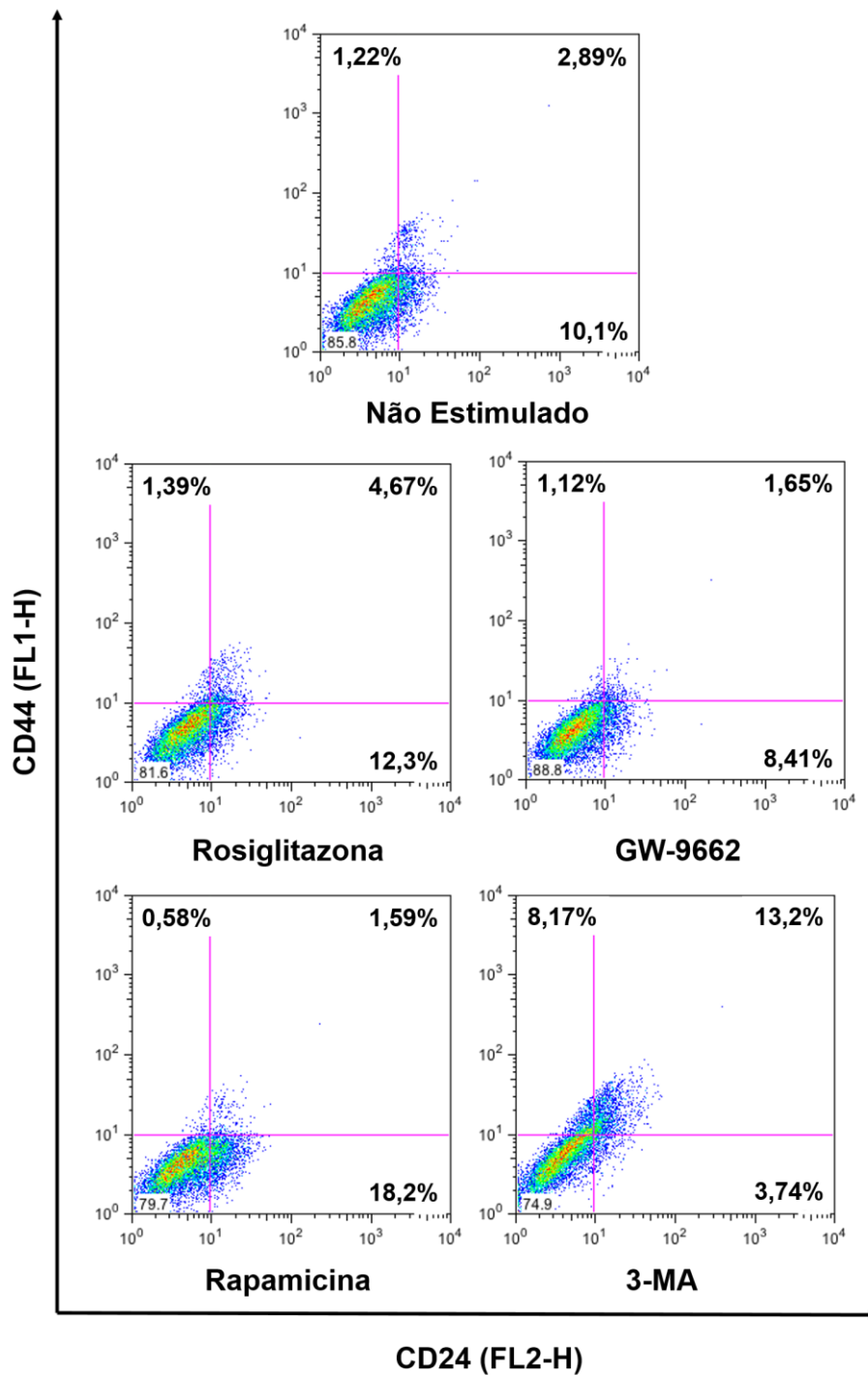
**Figura 20. Análise das alterações da quantidade de produção de espécies reativas de oxigênio em células Caco-2.** Tratamento com Rapamicina (100nM), 3-MA (5mM), Rosiglitazona (10 $\mu$ M) e GW-9662 (10 $\mu$ M) e coestimulações por 24 horas. Os histogramas mostram as curvas das células não estimuladas (em azul) e estimuladas com os respectivos tratamentos (em vermelho). Cada imagem é representativa de três experimentos independentes.



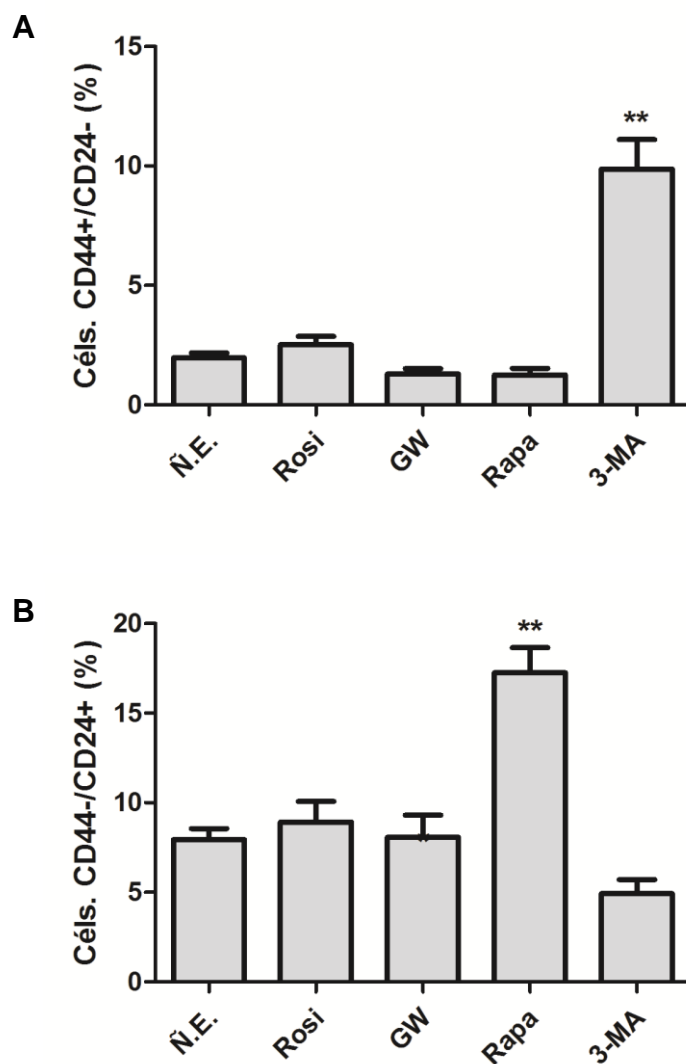
**Figura 21. Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio.** Intensidade de fluorescência relativa normalizada pelo controle não estimulado. Cada coluna representa a média, com desvio padrão de três experimentos. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  e \*\*\* $P < 0.0001$  significativamente diferente.

### 3.7. Análise da população de células-tronco tumorais após regulação da autofagia e da expressão de PPAR $\gamma$

Na análise dos resultados, estímulos relacionados à atividade de PPAR $\gamma$ , Rosiglitazona e GW-9662, não modificaram o perfil de células tronco tumorais, traduzido pela ausência de mudança significativa na porcentagem destas populações. Já a aplicação de moduladores autofágicos alteraram o perfil de células tronco tumoral induzindo o seu deslocamento para o fenótipo epitelial (CD44-/CD24+) com o uso de Rapamicina, de 7,940%  $\pm$  0,6219% para 17,25%  $\pm$  1,403% e um fenótipo mais mesenquimal (CD44+/CD24-) com o uso de 3-MA, de 1,973%  $\pm$  0,2074% para 9,870%  $\pm$  1,241% (Figuras 21 e 23).



**Figura 22. Determinação dos fenótipos CD44 e CD24 em células Caco-2.** Células tratadas com Rapamicina (100nM), 3-MA (5mM), Rosiglitazona (10 $\mu$ M) e GW-9662 (10 $\mu$ M) por 24 horas. Perfil e distribuição das populações CD44 positivas, CD24 positivas e duplo negativas e positivas. Cada imagem é representativa de três experimentos independentes.



**Figura 23. Quantificação dos fenótipos CD44 e CD24 em células Caco-2 após modulação da autofagia e do PPAR $\gamma$ .** Porcentagem dos fenótipos **A.** mesenquimal (CD44+/CD24-) e **B.** epitelial (CD44-/CD24+) e de cada tratamento. Cada coluna representa a média, com desvio padrão de três experimentos independentes. \*\*p<0,01 significativamente diferente.

### 3.8. Compilação dos resultados

Os resultados se encontram compilados na Tabela 1 para melhor visualização.



Análise	Estímulos			
	Rosi	GW	Rapamicina	3-MA
LC3B	↑	↓	↑	↓
Vesículas Acídicas	↑	↓	↑	↓
PPAR $\gamma$	↑	↓↓	↓	↑↑
Corpúsculos Lipídicos	-	↑	-	↑
Células Apoptóticas	↑	↓	-	↑↑
Proliferação Celular	#	↑	-	↑
Ciclo Celular	G0/G1	-	-	S e G2/M
ROS	↓	-	↓	↑
Células-tronco Tumorais	-	-	CD44-/CD24+	CD44+/CD24-

**Tabela 1. Compilação dos resultados.** Efeitos de cada tratamento sobre cada parâmetro analisado.

## **4. DISCUSSÃO**

### **4.1. Autofagia e PPAR $\gamma$ no câncer colorretal**

O sistema imune, responsável pela manutenção da homeostase tecidual e pela proteção do organismo da infecção de patógenos externos, há muito tempo vem sendo associado à progressão de diversas doenças. No século XIX, Rudolf Virchow propôs uma correlação entre neoplasias, células do sistema imune e inflamação, na qual tais aspectos teriam influência direta no desenvolvimento de tumores (BALKWILL, MANTOVANI, 2001). Dados clínicos mostram que a exposição a infecções e inflamação crônica está intimamente relacionada à maiores riscos de câncer (FINCH, CRIMMINS, 2004; SMITH, KANG, 2013). Os impactos da inflamação no estabelecimento e progressão tumoral foram vastamente descritos, sendo considerados até processos essenciais para a tumorigênese, direta ou indiretamente (MANTOVANI, 2008; BRISO, 2013; IKUTA, 2013; SCHWITALLA, 2013).

Seria esperado que a inflamação, como parte da resposta imunológica, reduzisse os riscos de desenvolvimento de câncer, como o faz em casos como psoríase (NICKOLOFF, BEN-NERIAH, PIKARSKY, 2005). Tal padrão, contudo, não é regra para todos os tipos de câncer. Um exemplo dos efeitos pró tumorigênicos da inflamação aguda são as doenças inflamatórias intestinais (DII), nas quais o processo inflamatório exagerado aumenta os riscos de desenvolvimento de câncer associado a colite (WALDNER, NEURATH, 2009; SUNKARA, 2011). No câncer colorretal, a inflamação aciona a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que por sua vez podem causar danos ao DNA, induzir o silenciamento de genes supressores de tumor (MEIRA, 2008) e ativar o complexo do inflamassoma e a produção de citocinas inflamatórias, como IL-1 $\beta$  (SCHRODER, TSCHOPP, 2010; LATZ, XIAO, STUTZ, 2013).

A manutenção da homeostase intestinal depende, portanto, do balanço entre a inflamação e a tolerância a mesma, envolvendo uma variedade de vias. Uma delas é a autofagia, responsável pela regulação metabólica e imunidade inata (BOYA, REGGIORI, CODOGNO, 2013; DERETIC, 2012). A via metabólica autofágica se encontra ativa na maioria das células de tecidos humanos, nas quais desempenha papel importante no desenvolvimento e diferenciação de células embrionárias e na

manutenção da homeostase de células adultas (MIZUSHIMA, LEVINE, 2010; YANG, KLIONSKY, 2010). Qualquer desregulação no processo autofágico pode levar à patogênese e inflamação crônica, resultando no desenvolvimento tumoral (RANDALL-DEMLLO, CHIEPPA, ERI, 2013; MCCARTHY, 2014).

No câncer, a autofagia possui um papel dualístico, funcionando tanto como supressora de tumores, quanto como um fator de sobrevivência do mesmo (YANG, 2011; RAO, 2014). Na supressão tumoral, a autofagia atua na remoção de proteínas e organelas danificadas, reduzindo a probabilidade de condições de estresse celular, como a produção excessiva de ROS pelas mitocôndrias (MATHEW, 2009; NAVARRO-YEPES, 2014). Eventos de inflamação crônica também são impedidos, via remoção por autofagia de complexos ativos do inflamassoma (SHI, 2012). O papel da autofagia como fator de sobrevivência do tumor está relacionado principalmente à tolerância ao estresse excessivo, fator habitual em células com metabolismo alterado, como as de câncer (DEGENHARDT, 2006; SCHAAF, 2013). Hipóxia e privação de nutrientes são comuns em microambientes cancerígenos, devido à alta taxa de proliferação e à alta demanda energética das células tumorais, tornando a indução da autofagia para reciclagem de nutrientes e ATP uma estratégia para sobrevivência do câncer (YANG, 2011; SELVAKUMARAN, 2013).

Muito é discutido se as vias da autofagia e aquelas ativadas por PPAR $\gamma$  estão conectadas e relacionadas à sobrevivência e a outros aspectos tumorigênicos do câncer colorretal. Como reguladores centrais do metabolismo, estas vias parecem desempenhar papel chave na progressão e desenvolvimento do câncer e os detalhes de sua modulação são úteis para possíveis tratamentos. Tendo isso em mente, fomos investigar as funções da autofagia e do PPAR $\gamma$  no câncer colorretal, verificando se há interposição das duas vias, assim como os efeitos de suas modulações nas propriedades no modelo *in vitro* do câncer colorretal.

Nosso dados sugerem que pode ocorrer regulação da via autofágica por agonistas e antagonistas de PPAR $\gamma$  e como provavelmente as vias possam atuar em conjunto para a ativação do fluxo autofágico em células da linhagem Caco-2 (Figuras 5 e 7).

O ensaio de imunodeteção demonstrou que a ativação de PPAR $\gamma$  por Rosiglitazona eleva os níveis de autofagia em células tratadas e, de maneira oposta,

o antagonista de PPAR $\gamma$ , GW-9662 reduziu a autofagia observada, o que é condizente com resultados encontrados em células de linhagens de câncer de mama e carcinoma hepatocelular (ZHOU, 2009; KANG, CHANG, MAURIZI, 2012). Foram observados efeitos significativos dos reguladores de PPAR $\gamma$  na autofagia, assim como o que se obteve com o uso de Rapamicina e 3-MA, que atuam diretamente nesta via (Figura 6). Apesar de Rosiglitazona e GW-9662 poderem influenciar processo autofágico, a coestimulação com Rapamicina ou 3-MA não alterou o número de vesículas acídicas intracelulares de maneira significativa diferente do que fora observado com estes estímulos sozinhos (Figura 8), sugerindo que a autofagia não requer, necessariamente, ativação de PPAR $\gamma$ .

De acordo com estudos anteriores, a ativação de PPAR $\gamma$  por Rosiglitazona causa regulação positiva do gene da fosfatase homóloga a tensina (PTEN) em células Caco-2 e também em outros tipos celulares (PATEL, 2001; MAHMOOD, 2011). PTEN é conhecida como um gene supressor de tumores que modula diversas funções celulares - incluindo migração, sobrevivência e proliferação (DI CRISTOFANO, PANDOLFI, 2000; SONG, SALMENA, PANDOLFI, 2012; DRAKE, MACLEOD, 2014) - antagonizando a cascata de sinalização mediada por fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Como resultado da inibição de PI3K por PTEN, há também a inibição consequente da proteína quinase Akt, reguladora da atividade de mTOR, que é o alvo da Rapamicina. A inibição da sinalização PI3K-Akt-mTOR, portanto, inativa mTOR e torna possível, assim, a iniciação do processo autofágico. Provavelmente a ativação de PPAR $\gamma$  por Rosiglitazona, poderia levar ao desencadeamento do processo autofágico dessa maneira. Os resultados obtidos nos ensaios de inibição de PPAR $\gamma$  por GW-9662 suportam esta hipótese. A não observação de diferenças significantes nos ensaios de coestimulação poderia ser explicada pelo fato de que os estímulos administrados para controle da autofagia agem a jusante em relação a ativação de PPAR $\gamma$  e PTEN, conforme demonstrado em estudos anteriores interligando a via de sinalização de PTEN e da macroautofagia (ARICO, 2001; ERRAFIY, 2013). O uso de Rapamicina tem como função o bloqueio de mTOR, agindo de maneira independente a via PI3K-Akt-mTOR e dando início à autofagia. Já o inibidor autofágico 3-MA age sobre a molécula fosfatidilinositol 3-quinase de classe III (PI3K III).

Na via autofágica, existem dois mecanismos regulatórios principais. Um envolvendo PI3K-Akt-mTOR e outro envolvendo PI3K III (CHEN, 2013). O complexo

Beclina-1/PI3K III é crucial para a localização e ancoragem de outras proteínas relacionadas à autofagia na membrana pré-autofagossomal (SHINTANI, KLIONSKY, 2004; MOLEJON, 2013) e, com o bloqueio de sua formação por 3-MA, mesmo que o primeiro mecanismo induza a autofagia, a montagem do autofagossomo não ocorre (SHI, 2012; KANG, 2014). Assim, mesmo que Rosiglitazona ative e GW-9662 antagonize o PPAR $\gamma$ , Rapamicina e 3-MA é que ditam o controle da via autofágica em si.

Neste trabalho, demonstramos a existência de efeitos regulatórios de moduladores de PPAR $\gamma$  na autofagia. Trabalhos anteriores demonstraram uma estreita relação entre a disponibilidade de nutrientes sinalizada por mTOR e a ação de PPAR $\gamma$  na adipogênese (KIM, CHEN, 2004; GUNTUR, 2010). No entanto, outros trabalhos, estabelecem a função de mTOR apenas como potencializador da cascata desencadeada por PPAR $\gamma$ , sem alteração nos níveis de RNA mensageiro de PPAR $\gamma$  (BLANCHARD, 2012), e também como regulador da trans-ativação de PPAR $\gamma$  (KIM; CHEN, 2004). Dessa maneira, torna-se interessante a análise dos efeitos da modulação de mTOR e outras moléculas da via autofágica frente a expressão e ativação de PPAR $\gamma$ .

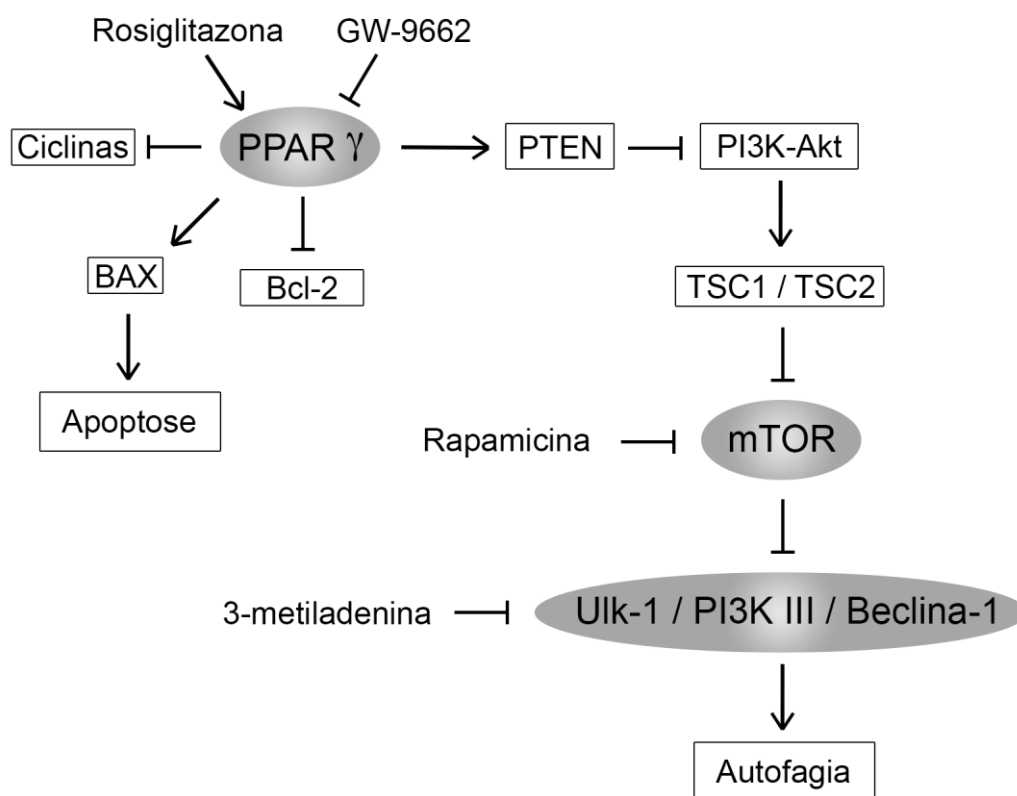
A análise da expressão do PPAR $\gamma$  por Western blot (Figura 10) revelou a ação esperada dos moduladores de PPAR $\gamma$ . Rosiglitazona aumentou os níveis de expressão proteica, enquanto GW-9662 os reduziu em relação as células não estimuladas. Não foi observada diferença nos níveis de PPAR $\gamma$  detectados em células tratadas com Rapamicina, sugerindo que a molécula mTOR e a indução da via autofágica não colaboram para a modulação de PPAR $\gamma$  (Figuras 9 e 11). Por outro lado, o bloqueio de PI3K III pela utilização de 3-MA promoveu um aumento intenso nos níveis de PPAR $\gamma$  (Figuras 9, 10 e 11). Não há registro de interação ou regulação de PPAR $\gamma$  pela molécula PI3K III, permanecendo desconhecida a sinalização intracelular responsável pelo aumento de PPAR $\gamma$  que fora observado. A elevada expressão, contudo, não foi acompanhada de translocação de PPAR $\gamma$  para o interior do núcleo, evento essencial para o controle da expressão gênica por este fator de transcrição (Figura 9). É possível que a alta expressão seja explicada por um controle da autofagia sobre a quantidade de proteínas PPAR $\gamma$  presentes na célula, como é feito com agregados proteicos que precisam ser removidos (LAMARK, JOHANSEN, 2012).

Para confirmação dos dados obtidos através do Western Blot, foram realizados dois ensaios diferentes para a avaliação da biogênese de corpúsculos lipídicos nas células da linhagem Caco-2. O mecanismo de biogênese de corpúsculos lipídicos envolve a ativação de PPAR $\gamma$ , que regula diretamente a expressão de genes que participam das vias de captação de ácidos graxos e de armazenamento lipídico (BOZZA, VIOLA, 2010; KIMMEL, SZTALRYD, 2014). Assim sendo, a presença e a quantidade de corpúsculos lipídicos em uma célula pode ser indiretamente relacionada com a expressão de PPAR $\gamma$  da mesma.

No presente trabalho, a biogênese dos corpúsculos lipídicos observada nas células Caco-2 foi diferente do que já havia sido descrito (ACCIOLY, 2008; CHATEAU, 2005). Nossos dados sugerem uma relação inversa entre a expressão de PPAR $\gamma$  e a biogênese dos corpúsculos lipídicos, conforme foi observado nas amostras tratadas com GW-9662. Da mesma forma, não foi observada diferença detectável no número de corpúsculos lipídicos nas amostras tratadas com Rosiglitazona, tanto na avaliação por microscopia confocal (Figura 12), quanto na avaliação por microscopia de luz (Figura 13A). Células tratadas com Rapamicina não apresentaram diferença significativa em número e tamanho dos corpúsculos lipídicos quando comparadas com o controle não tratado, enquanto que o tratamento com 3-MA resultou em um aumento significativo do número de corpúsculos lipídicos por célula (Figura 13B). O aumento no número de corpúsculos lipídicos resultante da inibição autofágica não pode ser relacionado ao aumento dos níveis de PPAR $\gamma$  após o tratamento com 3-MA conforme mostrados nas figuras 9, 10 e 11. A regulação das vias de captação de ácidos graxos e de armazenamento lipídico (BOZZA, VIOLA, 2010; AHMADIAN, 2013) depende da translocação de PPAR $\gamma$  para dentro do núcleo, o que, em nossos resultados, não foi observado (Figura 9), o que indica não haver ativação de PPAR $\gamma$ . Provavelmente algum outro fator responsável pela translocação do PPAR $\gamma$  foi inibido pelo uso de 3-MA. Como explicação plausível, a biogênese de corpúsculos lipídicos em células Caco-2 pode ser regulada por um processo responsável pela degradação de lipídios armazenados denominado lipofagia. Nesse tipo de metabolismo lipídico, triglicerídeos e colesterol são direcionados aos autofagossomos e entregues aos lisossomos para degradação (LIU, CZAJA, 2013; DUGAIL, 2014; VAN ZUTPHEN, 2014). Visto que ambos estímulos (GW-9662 e 3-MA) resultaram em diminuição dos níveis autofágicos,

a alta presença de corpúsculos lipídicos pode estar associada a redução do fluxo autofágico nessas células.

Nossos dados também sugerem a existência de sobreposições entre a via autofágica e as vias controladas por PPAR $\gamma$  na linhagem de câncer colorretal Caco-2. Provavelmente, o controle exercido por PPAR $\gamma$  sobre PTEN influencia, também, diretamente a via PI3K-Akt-mTOR, ponto de controle inicial da via autofágica. O segundo ponto de controle estudado neste trabalho envolve a proteína PI3K III, crucial no processo de localização e formação da membrana do autofagossomo. No entanto, a via de sinalização pela qual essa mesma molécula é capaz de alterar a expressão de PPAR $\gamma$  celular, permanece não identificada. Combinados, nossos dados sugerem a interação e controle das vias pelo modelo proposto na figura 24. Resumidamente, alterações em uma das partes envolvidas acarretam em modificações metabólicas correspondentes e podem, como resultado, interferir no estabelecimento e na progressão tumoral.



**Figura 24. Interação das vias de ativação/inibição de PPAR $\gamma$  e da via autofágica.** O controle da autofagia por PPAR $\gamma$  pode ser dado através da modulação de PTEN, resultando em sinalização da via PI3K-Akt-mTOR. Interações positivas são indicadas por setas e negativas, por linhas.

#### **4.2. Envolvimento da autofagia e do metabolismo lipídico em aspectos tumorigênicos do câncer colorretal**

A segunda parte do trabalho se ateve a investigar como a ativação ou inibição da via autofágica e do PPAR $\gamma$  pode interferir com determinadas propriedades tumorais como viabilidade/morte celular, proliferação celular, perfil de ciclo celular, produção de ROS e balanço da população de células tronco tumorais. Tais propriedades podem afetar a progressão, sobrevivência e agressividade do câncer, conforme visto pontualmente por diferentes autores (SATO, 2007; WANG, DUBOIS, 2008; PARK, KWAK, 2012; ZHENG, 2012). Outros trabalhos levantaram a possibilidade da utilização destas vias como marcadores para o câncer colorretal (GIRNUN, 2009; ROELOFS, 2014), sem relatar, porém, aspectos da ação conjunta destas vias.

Quanto à morte celular (Figura 14), os resultados obtidos são semelhantes aos já encontrados na literatura. A ativação de PPAR $\gamma$  causa diminuição na viabilidade celular do câncer colorretal, aumentando o número de células apoptóticas. O efeito contrário é produzido por GW-9662. A indução autofágica promovida pela Rapamicina não mostra acréscimo ou decréscimo de viabilidade, ao passo que a inibição da autofagia por 3-MA é responsável por maior número de células apoptóticas, (máximo observado de 40% das células apoptóticas). As coestimulações apresentaram efeitos aditivos ou redutivos de acordo com os efeitos independentes das drogas administradas (Figura 15).

A indução de apoptose por regulação de PPAR $\gamma$  pode ser explicada por diversos mecanismos, ao passo que a ativação PPAR $\gamma$  leva à regulação positiva de PTEN (PATEL, 2001; PI, 2013), regulação negativa de survivina e do inibidor de apoptose ligado ao X (XIAP), ambas proteínas inibidores de apoptose (QIAO, 2008; WANG, 2012). A ativação de PPAR $\gamma$  também leva a supressão de NF- $\kappa$ B (BAN, 2010) e aumento da expressão de Bax concomitantemente com prejuízo da expressão de Bcl-2 (LEE, 2006; LIU, 2013). Já a consequência do uso de 3-MA – aumento da apoptose – vai de encontro a estudos que consideram a autofagia como uma via de relevante papel na sobrevivência no câncer colorretal (ZHENG, 2012). Resultado semelhante havia sido descrito por outro estudo envolvendo diversas linhagens de câncer colorretal, no qual foi sugerido que a supressão autofágica pode ser fatal para



o câncer colorretal, visto que a disponibilidade energética diminui (SATO, 2007). No entanto, a modulação de PPAR $\gamma$  e da autofagia podem influenciar a morte celular por vias de sinalização aparentemente independentes, o que valida os resultados coestimulatórios obtidos.

Outra marca característica de células cancerígenas, além da inibição da morte celular, é aumento da capacidade proliferativa, que geralmente se relaciona também com a apoptose. Analisando a proliferação celular (Figura 16), a presença de GW-9662, antagonista de PPAR $\gamma$ , causou aumento da proliferação das células Caco-2, enquanto a presença de Rosiglitazona não alterou o perfil proliferativo, assim como o tratamento com Rapamicina. Novamente, 3-MA aumentou intensamente a proliferação celular (Figura 17A). Dados estes confirmados pela técnica com uso de cristais violeta (Figura 17B).

O aumento proliferativo pós estimulação com GW-9662 difere do padrão encontrado na literatura para células Caco-2. A presença do antagonista já havia sido descrita como inibidora da proliferação celular, sugerindo, porém que o efeito inibitório se dava devido a uma via independente de PPAR $\gamma$  (LEA, SURA, DESBORDES, 2004; ZANG, LIU, 2006). Os resultados obtidos com as amostras tratadas com Rosiglitazona só demonstraram diminuição expressiva da proliferação celular quando no ensaio havia também o estímulo modulador da autofagia, o que foi condizente com os resultados de morte celular. A estimulação com 3-MA, contradizendo os resultados obtidos de morte celular, induz proliferação nas células Caco-2. A via regulada por PI3K III (inibida por 3-MA) se encontra a jusante da molécula mTOR, proteína central no metabolismo de diversas vias (YANG, 2007, HAY, SONENBERG, 2004). Uma possível explicação para o aumento da proliferação celular é que pode ocorrer a ativação de um mecanismo compensatório devido ao bloqueio de PI3K III por 3-MA. A ausência de resposta ao comando mediado por mTOR – devido ao impedimento da progressão da autofagia – pode, por sua vez, elicitar uma reação na qual a expressão de mTOR é aumentada pela célula ou mTOR pode se associar a outras moléculas ativando vias alternativas com o objetivo de prosseguir com o comando inicial. A regulação positiva da atividade de mTOR resulta em vantagens no crescimento celular, atuando em vários processos biológicos, incluindo proliferação e sobrevivência (INOKI, 2005; JEWELL, GUAN, 2013; DAI, 2013). Mecanismos compensatórios envolvendo vias reguladas por mTOR já foram descritos, inclusive em

estudos envolvendo terapias antitumorais (BURCHERT, 2005; CHEN, 2013). Uma outra hipótese levantada por nós, é que essa modulação se deve a um efeito chamado proliferação induzida por apoptose. Trabalhos recentes com diversos modelos revelaram que células apoptóticas são capazes de estimular uma maior proliferação celular em células vizinhas sobreviventes (FAN, 2014). Já que a análise de proliferação celular se dá apenas em células vivas, é possível afirmar que a proliferação celular aumentada observada nas células tratadas com 3-MA possa se dar em resposta a um estímulo recebido das células apoptóticas.

As mudanças no perfil proliferativo não causaram, necessariamente, alteração no ciclo celular (Figura 18). Ressaltando o efeito antitumoral e indutor de apoptose da Rosiglitazona, foi observada uma discreta retenção do ciclo celular em G0/G1 após estimulação, condizente com a supressão da expressão de Ciclina D1 descrita em trabalhos anteriores (CHEN, XU, 2005; ZHAO, 2014). Células tratadas com GW-9662 e Rapamicina não apresentaram diferenças significativas para o perfil de fases do ciclo celular, enquanto 3-MA gerou retenção das células na fase G2/M, sugerindo que a não remoção de elementos celulares por autofagia nestas células pode perturbar eventos dentro das fases de segregação cromossômica. Da mesma forma, células tratadas com combinações de drogas contendo 3-MA afetaram igualmente a fase G2/M. O uso de 3-MA combinado com Rosiglitazona manteve as células retidas em G2/M, o que sugere a manutenção da sua atividade como agente de interferência com processos ligados as fases da segregação cromossômica. De forma inesperada, 3-MA quando combinado com Rosiglitazona reverteu o efeito observado para Rosiglitazona prevalecendo a retenção das células na fase G2/M (Figura 19).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células tratadas (Figura 20) produziu resultados apreciáveis com a maioria dos estímulos. Rosiglitazona e Rapamicina reduziram a produção de ROS, enquanto 3-MA causou um aumento de 1,5 vezes na quantidade de ROS intracelular. A adição de GW-9662 não promoveu diferenças significativas nestes índices, nem com sua aplicação sozinho, nem em coestimulações (Figura 21). Diversos tratamentos contra o câncer colorretal utilizam indutores de ROS, demonstrando, geralmente, efeitos proapoptóticos (SREEVALSAN, SAFE, 2013; GAO, 2013). Em concordância com estes estudos, 3-MA, causou também, em nossos ensaios, aumento do número de células apoptóticas, gerando grande aumento de ROS. Inesperadamente, Rosiglitazona reduziu os níveis

intracelulares de ROS, o que sugere que a indução de morte celular gerada pela ativação de PPAR $\gamma$  possa estar relacionada a outras vias de sinalização, como a regulação positiva de Bax e de inibidores de quinases dependentes de ciclina (CDK) e a diminuição de níveis CDK e Ciclina D1 (CHEN, 2005; CHEN, HARRISON, 2005; CHEN, XU, 2005, ZHAO, 2014). Os níveis de ROS também são controlados por autofagia, geralmente pelo mecanismo de retroalimentação negativa (AZAD, CHEN, GIBSON, 2009; GIBSON, 2013), portanto, a inibição da autofagia pode gerar, por consequência, maiores níveis de ROS e levar à apoptose.

A análise da marcação com CD44 e CD24 teve como objetivo detectar os diferentes perfis de expressão destas moléculas na superfície celular. De acordo com a presença ou ausência de tais proteínas, pode ser estabelecido um perfil epitelial ou mesenquimal para a população de células. Nosso resultados sugerem (Figura 22), que a modulação do PPAR $\gamma$  em células Caco-2 não altera o perfil de expressão de CD44 e CD24. No entanto, a regulação da via autofágica mostrou diferenças significativas para a expressão destes marcadores. O tratamento com Rapamicina induziu um perfil de células CD44-/CD24+, enquanto o uso de 3-MA levou a um perfil CD44+/CD24- (Figura 23). O perfil CD44+/CD24- (induzido pelo 3-MA) classifica populações celulares com características de células mesenquimais, com maior plasticidade fenotípica, maior taxa de proliferação, menor expressão de proteínas de adesão, o que contribuiria com sua maior capacidade metastática, levando a um pior prognóstico para o doente (OLIVEIRA, 2013; CAMERLINGO, 2014). Desta forma podemos supor que esta doença, em suas fases terminais, apresenta um maior população de células tronco tumorais, a qual pode ter se estabelecido, pelo menos parcialmente, pela inibição da autofagia por mecanismos ainda não descritos. Por outro lado, as células CD44-/CD24+ apresentam um caráter epitelial, com maior taxa de expressão de proteínas de adesão, menor plasticidade fenotípica e portanto relacionadas a um fenótipo global menos agressivo para o câncer (GRACZ, 2013; ZHANG, 2012). Alguns estudos, contudo, questionam a ideia de que marcadores conhecidos de superfície, como CD44, CD24 e CD133 isoladamente tenham êxito na identificação de células tronco tumorais (MURARO, 2012).

## 5. CONCLUSÕES

O conjunto de dados obtidos em nosso trabalho sugere que ambas as vias – autofágica e reguladas por PPAR $\gamma$  – determinam alterações fenotípicas em células da linhagem de câncer colorretal Caco-2, em maior ou menor escala, dependendo da característica observada, estando envolvida na regulação da morte, proliferação e ciclo celular, bem como na produção de ROS e no equilíbrio da população de células-tronco tumorais.

A ativação de PPAR $\gamma$  por Rosiglitazona demonstrou, de maneira geral, propriedades antitumorais, que são inibidas ou até mesmo revertidas com o uso do antagonista de PPAR $\gamma$ , como o GW-9662. Foram obtidos resultados surpreendentes com os estudos da via da autofagia, principalmente com o uso do inibidor de PI3K III, 3-MA. Pontualmente, as coestimulações geraram diferenças significativas quando comparadas à ação dos respectivos estímulos de maneira independente, potencializando ou reprimindo a resposta desencadeada e sugerindo que as duas vias não só regulam uma a outra, como também podem atuar em conjunto na definição de algumas propriedades relacionadas ao estabelecimento e progressão tumoral do câncer colorretal.

Observamos também uma relação entre as vias do metabolismo lipídico controlado por PPAR $\gamma$  com a autofagia em células de câncer colorretal. A utilização de agonistas de PPAR $\gamma$  demonstrou efeito direto da via de metabolismo lipídico sobre a morte, proliferação e o ciclo celular, corroborado pela inversão dos efeitos nos ensaios com uso de antagonistas de PPAR $\gamma$ . Tais dados reiteram o padrão de atividade antitumoral do PPAR $\gamma$  nas células tumorais do cólon e reto.

A ativação de PPAR $\gamma$  produziu uma resposta indutora de autofagia, com aumento da expressão de LC3B e de vesículas acídicas intracelulares. A inibição autofágica - por bloqueio de PI3K III – gerou um aumento na expressão de PPAR $\gamma$ , evidenciando um provável novo mecanismo de controle da expressão desse fator de transcrição nuclear.

O controle da autofagia no câncer colorretal se consolida, mais uma vez, como fator fundamental na sobrevivência do tumor. Diversos dados não clínicos mostram que tanto sua inibição quanto indução possuem potencial significativo a serem aplicadas na clínica. A maioria dos estudos atuais aponta a inibição autofágica – por

3-MA, Cloroquina, Bafilomicina e outros compostos – como potencializadora da ação de quimioterápicos contra o câncer colorretal, impedindo a ação citoprotetora da autofagia. O presente trabalho contudo, ressalta que, apesar da morte celular ser maior em células com o fluxo autofágico comprometido, as mesmas apresentam efeitos “colaterais” preocupantes que podem levar a polarização das células para o perfil mesenquimal de células tronco tumorais, envolvidas com a maior agressividade do tumor. A interferência causada pela inibição da autofagia pode alterar o microambiente tumoral e fazer com que determinadas células cancerígenas respondam a esse estresse assumindo um fenótipo mais agressivo.

Neste trabalho apresentamos uma proposta para o funcionamento do controle exercido pelo fator de transcrição nuclear PPAR $\gamma$  sobre a autofagia e vice-versa em células da linhagem de câncer colorretal Caco-2. Nosso modelo poderá contribuir com o entendimento das redes de sinalização que controlam o metabolismo lipídico e autofágico em células tumorais. Além disso, apresentamos evidências que sugerem uma reavaliação criteriosa sobre o uso de moléculas da via da autofagia como possíveis alvos terapêuticos para inibição deste processo. Mais estudos são imprescindíveis para um entendimento mais profundo destas vias e da sua relação com a tumorigênese e com a manutenção do tumor, tendo em vista as consequências e efeitos colaterais variados de sua modulação.

## **6. PERSPECTIVAS**

Diante da necessidade de mais estudos envolvendo os eventos autofágicos e a regulação do metabolismo lipídico no câncer colorretal, temos como perspectivas:

- Identificar componentes que interligam as duas vias, de modo a entender a regulação completa de uma pela outra;
- Avaliar a conexão entre inibição de PI3K III e elevação dos níveis de expressão de PPAR $\gamma$  (EM ANDAMENTO);
- Quantificar as mudanças na expressão de PTEN e mTOR sob as condições aqui testadas (EM ANDAMENTO);

- Avaliar a ligação entre inibição da autofagia e expressão de marcadores de fenótipo mesenquimais nas células Caco-2;
- Checar no modelo *in vivo* de indução do câncer colorretal se as vias aqui descritas estão ativas nas fases de estabelecimento e de metástase neste tipo de tumor.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCIOLY, M. T. et al. Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. **Cancer research**, v. 68, n. 6, p. 1732–40, 15 mar. 2008.

ADAMSON, E. D. Oncogenes in development. **Development (Cambridge, England)**, v. 99, n. 4, p. 449–71, abr. 1987.

AHMADIAN, M. et al. PPAR $\gamma$  signaling and metabolism: the good, the bad and the future. **Nature medicine**, v. 19, n. 5, p. 557–66, maio 2013.

ALI, Z. et al. Epigenetic deregulations in gastric cancer. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 13, n. 1, p. 40–51, jan. 2013.

AOKI, K. et al. Colonic polyposis caused by mTOR-mediated chromosomal instability in Apc<sup>+</sup>/Delta716 Cdx2<sup>+/-</sup> compound mutant mice. **Nature genetics**, v. 35, n. 4, p. 323–30, dez. 2003.

ARICO, S. et al. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 38, p. 35243–6, 21 set. 2001.

AZAD, M. B.; CHEN, Y.; GIBSON, S. B. Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 4, p. 777–90, abr. 2009.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v. 357, n. 9255, p. 539–45, 17 fev. 2001.

BALKWILL, F. R.; MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. **Seminars in cancer biology**, v. 22, n. 1, p. 33–40, fev. 2012.

BALMAIN, A. et al. How many mutations are required for tumorigenesis? implications from human cancer data. **Molecular Carcinogenesis**, v. 7, n. 3, p. 139–146, 1993.

- BAN, J. O. et al. Suppression of NF-kappaB and GSK-3beta is involved in colon cancer cell growth inhibition by the PPAR agonist troglitazone. **Chemico-biological interactions**, v. 188, n. 1, p. 75–85, 6 out. 2010.
- BARDHAN, K.; LIU, K. Epigenetics and colorectal cancer pathogenesis. **Cancers**, v. 5, n. 2, p. 676–713, jan. 2013.
- BARRETT, C. L. et al. Transcriptome sequencing of tumor subpopulations reveals a spectrum of therapeutic options for squamous cell lung cancer. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e58714, jan. 2013.
- BERNSTEIN, C. et al. DNA Damage, DNA Repair and Cancer, New Research Directions in DNA Repair, Prof. Clark Chen (Ed.), 2013.
- BETIN, V. M. S. et al. Autophagy facilitates organelle clearance during differentiation of human erythroblasts: evidence for a role for ATG4 paralogs during autophagosome maturation. **Autophagy**, v. 9, n. 6, p. 881–93, 1 jun. 2013.
- BITTO, A. et al. Flavocoxid, a dual inhibitor of COX-2 and 5-LOX of natural origin, attenuates the inflammatory response and protects mice from sepsis. **Critical care (London, England)**, v. 16, n. 1, p. R32, 22 fev. 2012.
- BLANCHARD, P.-G. et al. Major involvement of mTOR in the PPAR $\gamma$ -induced stimulation of adipose tissue lipid uptake and fat accretion. **Journal of lipid research**, v. 53, n. 6, p. 1117–25, jun. 2012.
- BOYA, P.; REGGIORI, F.; CODOGNO, P. Emerging regulation and functions of autophagy. **Nature cell biology**, v. 15, n. 7, p. 713–20, jul. 2013.
- BOZZA, P. T.; VIOLA, J. P. B. Lipid droplets in inflammation and cancer. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 82, n. 4-6, p. 243–50, 2010.
- BRISO, E. M. et al. Inflammation-mediated skin tumorigenesis induced by epidermal c-Fos. **Genes & development**, v. 27, n. 18, p. 1959–73, 15 set. 2013.
- BURCHERT, A et al. Compensatory PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance development. **Leukemia**, v. 19, n. 10, p. 1774–82, out. 2005.



- CAI, Z. et al. Significance of mTOR signaling and its inhibitor against cancer stem-like cells in colorectal cancer. **Annals of surgical oncology**, v. 21, n. 1, p. 179–88, jan. 2014.
- CAMERLINGO, R. et al. The role of CD44+/CD24-/low biomarker for screening, diagnosis and monitoring of breast cancer. **Oncology reports**, v. 31, n. 3, p. 1127–32, mar. 2014.
- CARIO, E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. **Gut**, v. 54, n. 8, p. 1182–93, ago. 2005.
- CASÁS-SELVES, M.; DEGREGORI, J. How cancer shapes evolution, and how evolution shapes cancer. **Evolution**, v. 4, n. 4, p. 624–634, dez. 2011.
- CHATEAU, D. et al. Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein B48-containing lipoproteins by Caco-2 cells. **Journal of cellular physiology**, v. 202, n. 3, p. 767–76, mar. 2005.
- CHEN, A.; XU, J. Activation of PPAR $\{\gamma\}$  by curcumin inhibits Moser cell growth and mediates suppression of gene expression of cyclin D1 and EGFR. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 288, n. 3, p. G447–56, mar. 2005.
- CHEN, F. et al. Ciglitazone-induced p27 gene transcriptional activity is mediated through Sp1 and is negatively regulated by the MAPK signaling pathway. **Cellular signalling**, v. 17, n. 12, p. 1572–7, dez. 2005.
- CHEN, F.; HARRISON, L. E. Ciglitazone-induced cellular anti-proliferation increases p27kip1 protein levels through both increased transcriptional activity and inhibition of proteasome degradation. **Cellular signalling**, v. 17, n. 7, p. 809–16, jul. 2005.
- CHEN, X. et al. Dual inhibition of PI3K and mTOR mitigates compensatory AKT activation and improves tamoxifen response in breast cancer. **Molecular cancer research : MCR**, v. 11, n. 10, p. 1269–78, out. 2013.
- CHEN, Y.; KLIONSKY, D. J. The regulation of autophagy - unanswered questions. **Journal of cell science**, v. 124, n. Pt 2, p. 161–70, 15 jan. 2011.

CHEN, Z. et al. Downregulation of Beclin 1 and impairment of autophagy in a small population of colorectal cancer. **Digestive diseases and sciences**, v. 58, n. 10, p. 2887–94, out. 2013.

CHEUNG, Z. H.; IP, N. Y. Autophagy deregulation in neurodegenerative diseases - recent advances and future perspectives. **Journal of neurochemistry**, v. 118, n. 3, p. 317–25, ago. 2011.

CHOI, A. M. K.; RYTER, S. W.; LEVINE, B. Autophagy in human health and disease. **The New England journal of medicine**, v. 368, n. 7, p. 651–62, 14 fev. 2013.

CHOI, J.-H. et al. Chloroquine enhances the chemotherapeutic activity of 5-fluorouracil in a colon cancer cell line via cell cycle alteration. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 120, n. 7, p. 597–604, jul. 2012.

CUERVO, A. M. Autophagy: in sickness and in health. **Trends in cell biology**, v. 14, n. 2, p. 70–7, fev. 2004.

DABBS, D. J.; SILVERMAN, J. F. Immunohistochemical Workup of Metastatic Carcinoma of Unknown Primary. **Pathology Case Reviews**, v. 6, n. 4, p. 146–153, jul. 2001.

DAI, N. et al. mTOR complex 2 phosphorylates IMP1 cotranslationally to promote IGF2 production and the proliferation of mouse embryonic fibroblasts. **Genes & development**, v. 27, n. 3, p. 301–12, 1 fev. 2013.

DAI, Y.; WANG, W.-H. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and colorectal cancer. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 2, n. 3, p. 159–64, 15 mar. 2010.

DEGENHARDT, K. et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. **Cancer cell**, v. 10, n. 1, p. 51–64, jul. 2006.

DEMETRIUS, L. A.; COY, J. F.; TUSZYNSKI, J. A. Cancer proliferation and therapy: the Warburg effect and quantum metabolism. **Theoretical biology & medical modelling**, v. 7, p. 2, jan. 2010.

DENG, L. et al. A novel mouse model of inflammatory bowel disease links mammalian target of rapamycin-dependent hyperproliferation of colonic epithelium to

inflammation-associated tumorigenesis. **The American journal of pathology**, v. 176, n. 2, p. 952–67, fev. 2010.

DERETIC, V. Autophagy as an innate immunity paradigm: expanding the scope and repertoire of pattern recognition receptors. **Current opinion in immunology**, v. 24, n. 1, p. 21–31, fev. 2012.

DI CRISTOFANO, A; PANDOLFI, P. P. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. **Cell**, v. 100, n. 4, p. 387–90, 18 fev. 2000.

DON, A. S. A.; ZHENG, X. F. S. Recent clinical trials of mTOR-targeted cancer therapies. **Reviews on recent clinical trials**, v. 6, n. 1, p. 24–35, jan. 2011.

DRAKE, L. E.; MACLEOD, K. F. Tumour suppressor gene function in carcinoma-associated fibroblasts: from tumour cells via EMT and back again? **The Journal of pathology**, v. 232, n. 3, p. 283–8, fev. 2014.

DUBUQUOY, L. et al. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 124, n. 5, p. 1265–76, maio 2003.

DUGAIL, I. Lysosome/lipid droplet interplay in metabolic diseases. **Biochimie**, v. 96, p. 102–5, jan. 2014.

DUFOUR, M. et al. Targeting the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Cancer Therapy: Lessons from Past and Future Perspectives. **Cancers**, v. 3, n. 2, p. 2478–500, jan. 2011.

EKBOM, A. et al. Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. **Lancet**, v. 336, n. 8711, p. 357–9, 11 ago. 1990.

EKSTRAND, A. I. et al. Frequent alterations of the PI3K/AKT/mTOR pathways in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Familial cancer**, v. 9, n. 2, p. 125–9, jun. 2010.

ERRAFIY, R. et al. PTEN Increases Autophagy and Inhibits the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Glioma Cells Independently of its Lipid Phosphatase Activity. **PLoS one**, v. 8, n. 12, p. e83318, jan. 2013.

ESKELINEN, E.-L. The dual role of autophagy in cancer. **Current opinion in pharmacology**, v. 11, n. 4, p. 294–300, ago. 2011.

ESTELLER, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. **Nature reviews. Genetics**, v. 8, n. 4, p. 286–98, abr. 2007.

FAN, Y. et al. Genetic Models of Apoptosis-Induced Proliferation Decipher Activation of JNK and Identify a Requirement of EGFR Signaling for Tissue Regenerative Responses in Drosophila. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 1, p. e1004131, 30 jan. 2014.

FANG, J.; ZHANG, H.; JIN, S. Epigenetics and cervical cancer: from pathogenesis to therapy. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, 20 fev. 2014.

FEINBERG, A. P. The epigenetics of cancer etiology. **Seminars in cancer biology**, v. 14, n. 6, p. 427–32, dez. 2004.

FENG, Z. et al. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 23, p. 8204–9, 7 jun. 2005.

FERLAY, J. et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**; 2013.

FIDLER, I. J. Critical determinants of metastasis. **Seminars in cancer biology**, v. 12, n. 2, p. 89–96, abr. 2002.

FIMIA, G. M.; PIACENTINI, M. Regulation of autophagy in mammals and its interplay with apoptosis. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 67, n. 10, p. 1581–8, maio 2010.

FINCH, C. E.; CRIMMINS, E. M. Inflammatory exposure and historical changes in human life-spans. **Science (New York, N.Y.)**, v. 305, n. 5691, p. 1736–9, 17 set. 2004.

FOERSCH, S. et al. Endomicroscopic Imaging of COX-2 Activity in Murine Sporadic and Colitis-Associated Colorectal Cancer. **Diagnostic and therapeutic endoscopy**, v. 2013, p. 250641, jan. 2013.

FOULDS, L. The natural history of cancer. **Journal of chronic diseases**, 8.1, p. 2-37, 1958.

FUCCI, A. et al. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in the esophageal, gastric, and colorectal cancer. **PPAR research**, v. 2012, p. 242498, jan. 2012.

FUJISAKA, Y. et al. A Phase 1 clinical study of temsirolimus (CCI-779) in Japanese patients with advanced solid tumors. **Japanese journal of clinical oncology**, v. 40, n. 8, p. 732–8, ago. 2010.

FUJISHITA, T. et al. Inhibition of the mTORC1 pathway suppresses intestinal polyp formation and reduces mortality in ApcDelta716 mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 36, p. 13544–9, 9 set. 2008.

FUNDERBURK, S. F.; WANG, Q. J.; YUE, Z. The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. **Trends in cell biology**, v. 20, n. 6, p. 355–62, jun. 2010.

GAO, X. et al. ROS mediate proapoptotic and antisurvival activity of oleanane triterpenoid CDDO-Me in ovarian cancer cells. **Anticancer research**, v. 33, n. 1, p. 215–21, jan. 2013.

GARCÍA-MAURIÑO, S.; ALCAIDE, A.; DOMÍNGUEZ, C. Pharmacological control of autophagy: therapeutic perspectives in inflammatory bowel disease and colorectal cancer. **Current pharmaceutical design**, v. 18, n. 26, p. 3853–73, jan. 2012.

GIALELI, C.; THEOCHARIS, A. D.; KARAMANOS, N. K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. **The FEBS journal**, v. 278, n. 1, p. 16–27, jan. 2011.

GIBSON, S. B. Investigating the role of reactive oxygen species in regulating autophagy. **Methods in enzymology**, v. 528, p. 217–35, jan. 2013.

GIRNUN, G. PPARG: a new independent marker for colorectal cancer survival. **Gastroenterology**, v. 136, n. 4, p. 1157–60, abr. 2009.

GOMES, A. et al. Promoter hypermethylation of DNA repair genes MLH1 and MSH2 in adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the lung. **Revista portuguesa de pneumologia**, v. 20, n. 1, p. 20–30, [s.d.].

GRACZ, A. D. et al. Brief report: CD24 and CD44 mark human intestinal epithelial cell populations with characteristics of active and facultative stem cells. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 31, n. 9, p. 2024–30, set. 2013.

GRADY, W. M.; MARKOWITZ, S. D. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 3, n. 37, p. 101–28, jan. 2002.

GRANELL, S. et al. Sequestration of mutated alpha1-antitrypsin into inclusion bodies is a cell-protective mechanism to maintain endoplasmic reticulum function. **Molecular biology of the cell**, v. 19, n. 2, p. 572–86, fev. 2008.

GRAY, E. et al. The PPAR- $\gamma$  agonist pioglitazone protects cortical neurons from inflammatory mediators via improvement in peroxisomal function. **Journal of neuroinflammation**, v. 9, p. 63, jan. 2012.

GRIVENNIKOV, S. I. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. **Seminars in immunopathology**, v. 35, n. 2, p. 229–44, mar. 2013.

GUAN, Y. Peroxisome proliferator-activated receptor family and its relationship to renal complications of the metabolic syndrome. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 15, n. 11, p. 2801–15, nov. 2004.

GULHATI, P. et al. Targeted inhibition of mammalian target of rapamycin signaling inhibits tumorigenesis of colorectal cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 15, n. 23, p. 7207–16, 1 dez. 2009.

GUNTUR, K. V. P. et al. Map4k4 negatively regulates peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma protein translation by suppressing the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in cultured adipocytes. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 9, p. 6595–603, 26 fev. 2010.

HACKENBERG, T. et al. Catalase and NO CATALASE ACTIVITY1 promote autophagy-dependent cell death in Arabidopsis. **The Plant cell**, v. 25, n. 11, p. 4616–26, nov. 2013.

HAFNER, C.; REICHLER, A.; VOGT, T. New indications for established drugs: combined tumor-stroma-targeted cancer therapy with PPARgamma agonists, COX-2 inhibitors, mTOR antagonists and metronomic chemotherapy. **Current cancer drug targets**, v. 5, n. 6, p. 393–419, set. 2005.

HALL, A. The cytoskeleton and cancer. **Cancer metastasis reviews**, v. 28, n. 1-2, p. 5–14, jun. 2009.

HANADA, T. et al. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 52, p. 37298–302, 28 dez. 2007.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.

HANAUER, S. B. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. **Inflammatory bowel diseases**, v. 12 Suppl 1, p. S3–9, jan. 2006.

HARTNETT, L.; EGAN, L. J. Inflammation, DNA methylation and colitis-associated cancer. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 4, p. 723–31, abr. 2012.

HAY, N.; SONENBERG, N. Upstream and downstream of mTOR. **Genes & development**, v. 18, n. 16, p. 1926–45, 15 ago. 2004.

HE, C.; KLIONSKY, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. **Annual review of genetics**, v. 43, p. 67–93, jan. 2009.

HECKER, E. et al. Carcinogenesis - A Comprehensive Survey, Vol. 7. **New York: Raven Press**, 1982.

HELGASON, G. V.; HOLYOAKE, T. L.; RYAN, K. M. Role of autophagy in cancer prevention, development and therapy. **Essays in biochemistry**, v. 55, p. 133–51, jan. 2013.

HERVOUET, E. et al. DNA Methylation and Apoptosis Resistance in Cancer Cells. **Cells**, v. 2, n. 3, p. 545–573, 18 jul. 2013.

HIPPERT, M. M.; O'TOOLE, P. S.; THORBURN, A. Autophagy in cancer: good, bad, or both? **Cancer research**, v. 66, n. 19, p. 9349–51, 1 out. 2006.

HOSOKAWA, N. et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. **Molecular biology of the cell**, v. 20, n. 7, p. 1981–91, abr. 2009.

HØYER-HANSEN, M.; JÄÄTTELÄ, M. Autophagy: an emerging target for cancer therapy. **Autophagy**, v. 4, n. 5, p. 574–80, jul. 2008.

IKUTA, T. et al. ASC-associated inflammation promotes cecal tumorigenesis in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 7, p. 1620–7, jul. 2013.

INCA. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2013.

INOKI, K. et al. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. **Nature cell biology**, v. 4, n. 9, p. 648–57, set. 2002.

INOKI, K. et al. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. **Microbiology and Molecular ...**, v. 69, n. 1, p. 79–100, 2005.

ITAKURA, E.; MIZUSHIMA, N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. **Autophagy**, v. 6, n. 6, p. 764–76, ago. 2010.

JESS, T. et al. Cancer risk in inflammatory bowel disease according to patient phenotype and treatment: a Danish population-based cohort study. **The American journal of gastroenterology**, v. 108, n. 12, p. 1869–76, dez. 2013.

JEWELL, J. L.; GUAN, K.-L. Nutrient signaling to mTOR and cell growth. **Trends in biochemical sciences**, v. 38, n. 5, p. 233–42, maio 2013.

JIANG, J. et al. Inhibition of the prostaglandin receptor EP2 following status epilepticus reduces delayed mortality and brain inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 9, p. 3591–6, 26 fev. 2013.



JOHNSON, S. M. et al. Novel expression patterns of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway components in colorectal cancer. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 210, n. 5, p. 767–76, 776–8, maio 2010.

JONES, P. A; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nature reviews. Genetics**, v. 3, n. 6, p. 415–28, jun. 2002.

JUNG, C. H. et al. mTOR regulation of autophagy. **FEBS letters**, v. 584, n. 7, p. 1287–95, 2 abr. 2010.

JUNG, C. H. et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. **Molecular biology of the cell**, v. 20, n. 7, p. 1992–2003, abr. 2009.

KABEYA, Y. et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. **The EMBO journal**, v. 19, n. 21, p. 5720–8, 1 dez. 2000.

KAMADA, Y. et al. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. **The Journal of cell biology**, v. 150, n. 6, p. 1507–13, 18 set. 2000.

KANDOTH, C. et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. **Nature**, v. 502, n. 7471, p. 333–9, 17 out. 2013.

KANG, J. H.; CHANG, Y.-C.; MAURIZI, M. R. 4-O-carboxymethyl ascochlorin causes ER stress and induced autophagy in human hepatocellular carcinoma cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 19, p. 15661–71, 4 maio 2012.

KANG, Y.-L. et al. The cytoprotective role of autophagy in puromycin aminonucleoside treated human podocytes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 443, n. 2, p. 628–34, 10 jan. 2014.

KAPPELMAN, M. D. et al. Risk of Cancer in Patients With Inflammatory Bowel Diseases: A Nationwide Population-based Cohort Study With 30 Years of Follow-up Evaluation. **Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association**, v. 12, n. 2, p. 265–273.e1, mar. 2014.

KELLY, D. et al. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. **Nature immunology**, v. 5, n. 1, p. 104–12, jan. 2004.

KIM, J. E.; CHEN, J. regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. **Diabetes**, v. 53, n. 11, p. 2748–56, nov. 2004.

KIM, J.; KLIONSKY, D. J. Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. **Annual review of biochemistry**, v. 69, p. 303–42, jan. 2000.

KIMMEL, A. R.; SZTALRYD, C. Perilipin 5, a lipid droplet protein adapted to mitochondrial energy utilization. **Current opinion in lipidology**, 15 fev. 2014.

KIMURA, T. et al. Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy. **Cancer research**, v. 73, n. 1, p. 3–7, 1 jan. 2013.

KIRCHNER, T. et al. Metaplasia, intraepithelial neoplasia and early cancer of the stomach are related to dedifferentiated epithelial cells defined by cytokeratin-7 expression in gastritis. **Virchows Archiv**, v. 439, n. 4, p. 512–522, 5 fev. 2014.

KLIONSKY, D. J. et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. **Developmental cell**, v. 5, n. 4, p. 539–45, out. 2003.

KNAEVELSRUD, H.; SIMONSEN, A. Fighting disease by selective autophagy of aggregate-prone proteins. **FEBS letters**, v. 584, n. 12, p. 2635–45, 18 jun. 2010.

KONDO, Y. et al. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. 9, p. 726–34, set. 2005.

KOSARY, C. L. FIGO stage, histology, histologic grade, age and race as prognostic factors in determining survival for cancers of the female gynecological system: an analysis of 1973-87 SEER cases of cancers of the endometrium, cervix, ovary, vulva, and vagina. **Seminars in surgical oncology**, v. 10, n. 1, p. 31–46, 2006.

KUMA, A. et al. Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 21, p. 18619–25, 24 maio 2002.

- LAKSHMI, P. T. V.; SUBHASHINI S. In silico sequence specific analysis of RBB2 RTK alterations responsible for neuroectodermal tumors of Homo sapiens. **Journal of Bioinformatics and Sequence Analysis** Vol. 2(6), pp. 75-84, December 2010.
- LAMARK, T.; JOHANSEN, T. Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy. **International journal of cell biology**, v. 2012, p. 736905, jan. 2012.
- LANE, H.; O'REILLY, T.; WOOD, J. M. U.S. Patent No. 8,436,010. Washington, DC: U.S. **Patent and Trademark Office**, 2013.
- LANGHORST, J. et al. Activated innate immune system in irritable bowel syndrome? **Gut**, v. 56, n. 9, p. 1325–6, set. 2007.
- LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 6, p. 397–411, jun. 2013.
- LEA, M. A; SURA, M.; DESBORDES, C. Inhibition of cell proliferation by potential peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma agonists and antagonists. **Anticancer research**, v. 24, n. 5A, p. 2765–71, 2004.
- LEE, C. J. et al. Pioglitazone, a synthetic ligand for PPARgamma, induces apoptosis in RB-deficient human colorectal cancer cells. **Apoptosis : an international journal on programmed cell death**, v. 11, n. 3, p. 401–11, mar. 2006.
- LEGAKIS, J. E.; YEN, W.-L.; KLIONSKY, D. J. A cycling protein complex required for selective autophagy. **Autophagy**, v. 3, n. 5, p. 422–32, 2007.
- LEVINE, B.; YUAN, J. Autophagy in cell death: an innocent convict? **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 10, p. 2679–88, out. 2005.
- LI, D. et al. Regulation of DNA methyltransferase 1 transcription in BRCA1-mutated breast cancer: A novel crosstalk between E2F1 motif hypermethylation and loss of histone H3 lysine 9 acetylation. **Molecular cancer**, v. 13, n. 1, p. 26, 6 fev. 2014.
- LI, H. et al. Inhibition of autophagy enhances apoptosis induced by the PI3K/AKT/mTor inhibitor NVP-BEZ235 in renal cell carcinoma cells. **Cell biochemistry and function**, v. 31, n. 5, p. 427–33, jul. 2013.
- LIN, Z. et al. Chronic mTOR activation promotes cell survival in Merkel cell carcinoma. **Cancer letters**, v. 344, n. 2, p. 272–81, 28 mar. 2014.

LIU, B. et al. Autophagic pathways as new targets for cancer drug development. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 9, p. 1154–64, set. 2010.

LIU, F. et al. Suppression of autophagy by FIP200 deletion leads to osteopenia in mice through the inhibition of osteoblast terminal differentiation. **Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 28, n. 11, p. 2414–30, nov. 2013.

LIU, H. et al. Down-regulation of autophagy-related protein 5 (ATG5) contributes to the pathogenesis of early-stage cutaneous melanoma. **Science translational medicine**, v. 5, n. 202, p. 202ra123, 11 set. 2013.

LIU, K.; CZAJA, M. J. Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. **Cell death and differentiation**, v. 20, n. 1, p. 3–11, jan. 2013.

LIU, L. et al. HMGB1-induced autophagy promotes chemotherapy resistance in leukemia cells. **Leukemia**, v. 25, n. 1, p. 23–31, jan. 2011.

LIU, Y. et al. Combinational effect of PPAR $\gamma$  agonist and RXR agonist on the growth of SGC7901 gastric carcinoma cells in vitro. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 34, n. 4, p. 2409–18, ago. 2013.

LOKODY, I. Epigenetics: Senescent cells: poised for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 1, p. 11–11, 23 dez. 2013.

LOPEZ-RIVERA, E. et al. Inducible Nitric Oxide Synthase Drives mTOR Pathway Activation and Proliferation of Human Melanoma by Reversible Nitrosylation of TSC2. **Cancer research**, v. 74, n. 4, p. 1067–78, 15 fev. 2014.

LORIN, S. et al. Autophagy regulation and its role in cancer. **Seminars in cancer biology**, v. 23, n. 5, p. 361–79, out. 2013.

MAHMOOD, D. F. D. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces apoptosis and inhibits autophagy of human monocyte-derived macrophages via induction of cathepsin L: potential role in atherosclerosis. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 33, p. 28858–66, 19 ago. 2011.

MAIURI, M. C. et al. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, n. 9, p. 741–52, set. 2007.

MAHMOOD, D. F. D. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces apoptosis and inhibits autophagy of human monocyte-derived macrophages via induction of cathepsin L: potential role in atherosclerosis. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 33, p. 28858–66, 19 ago. 2011.

MALUMBRES, M. miRNAs and cancer: an epigenetics view. **Molecular aspects of medicine**, v. 34, n. 4, p. 863–74, [s.d.].

MANN, S. S.; HAMMARBACK, J. A. Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 15, p. 11492–7, 15 abr. 1994.

MANNINEN, P. et al. The risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel diseases in Finland: a follow-up of 20 years. **Journal of Crohn's & colitis**, v. 7, n. 11, p. e551–7, 1 dez. 2013.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436–44, 24 jul. 2008.

MARQUEZ, R. T.; XU, L. Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. **American journal of cancer research**, v. 2, n. 2, p. 214–21, jan. 2012.

MASSEY, D. C. O.; PARKES, M. Genome-wide association scanning highlights two autophagy genes, ATG16L1 and IRGM, as being significantly associated with Crohn's disease. **Autophagy**, v. 3, n. 6, p. 649–51, 2007.

MATHEW, R. et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. **Cell**, v. 137, n. 6, p. 1062–75, 12 jun. 2009.

MATHEW, R.; KARANTZA-WADSWORTH, V.; WHITE, E. Role of autophagy in cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 7, n. 12, p. 961–7, dez. 2007.

MCALPINE, F. et al. Regulation of nutrient-sensitive autophagy by uncoordinated 51-like kinases 1 and 2. **Autophagy**, v. 9, n. 3, p. 361–73, mar. 2013.

MCCARTHY, N. Autophagy: Directed development. **Nature reviews. Cancer**, v. 14, n. 2, p. 74–5, fev. 2014.

MCFARLAND, C. D. et al. Impact of deleterious passenger mutations on cancer progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 8, p. 2910–5, 19 mar. 2013.

MEHRPOUR, M. et al. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. **Cell research**, v. 20, n. 7, p. 748–62, jul. 2010.

MEIRA, L. B. et al. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 7, p. 2516–25, jul. 2008.

MENG, X. et al. A new hypothesis for the cancer mechanism. **Cancer metastasis reviews**, v. 31, n. 1-2, p. 247–68, jun. 2012.

MERCER, C. A.; KALIAPPAN, A.; DENNIS, P. B. A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. **Autophagy**, v. 5, n. 5, p. 649–62, jul. 2009.

MESCHINI, S. et al. Autophagy: Molecular mechanisms and their implications for anticancer therapies. **Current cancer drug targets**, v. 11, n. 3, p. 357–79, mar. 2011.

MICHOR, F.; IWASA, Y. Linear Model of Colon Cancer Initiation. **Cell Cycle**, v. 3, n. 3, p. 356–360, 1 mar. 2004.

MITELMAN, F.; MERTENS, F.; JOHANSSON, B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. **Nature genetics**, v. 15 Spec No, p. 417–74, abr. 1997.

MIZUSHIMA, N. Autophagy: process and function. **Genes & development**, v. 21, n. 22, p. 2861–73, 15 nov. 2007.

MIZUSHIMA, N. Physiological functions of autophagy. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 335, p. 71–84, jan. 2009.

MIZUSHIMA, N. et al. A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 51, p. 33889–92, 18 dez. 1998.

MIZUSHIMA, N. et al. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. **Journal of cell science**, v. 116, n. Pt 9, p. 1679–88, 1 maio 2003.

MIZUSHIMA, N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. **Current opinion in cell biology**, v. 22, n. 2, p. 132–9, abr. 2010.

MIZUSHIMA, N.; LEVINE, B. Autophagy in mammalian development and differentiation. **Nature cell biology**, v. 12, n. 9, p. 823–30, set. 2010.

MOLEJON, M. I. et al. 819 The Pancreatitis Associated Protein VMP1 Regulates Autophagy Induction Through the Interaction With the Tumor Suppressor Protein Beclin 1. **Gastroenterology**, 144(5), S-143. 2013.

MORIMOTO, R. I.; CHRISTEN, Y. (EDS.). **Protein Quality Control in Neurodegenerative Diseases**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.

MORIMURA, T. et al. Attenuation of endoplasmic reticulum stress in Pelizaeus-Merzbacher disease by an anti-malaria drug, chloroquine. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, 12 fev. 2014.

MORSELLI, E. et al. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1793, n. 9, p. 1524–32, set. 2009.

MÜNZ, C. Autophagy in cellular transformation, survival and communication with the tumor microenvironment. **Seminars in cancer biology**, v. 23, n. 5, p. 299–300, out. 2013.

MURARO, M. G. et al. CD133+, CD166+CD44+, and CD24+CD44+ phenotypes fail to reliably identify cell populations with cancer stem cell functional features in established human colorectal cancer cell lines. **Stem cells translational medicine**, v. 1, n. 8, p. 592–603, ago. 2012.

MURROW, L.; DEBNATH, J. Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. **Annual review of pathology**, v. 8, p. 105–37, 24 jan. 2013.

NAISH, J., REVEST, P., COURT, D. S. Medical Sciences. **Elsevier Health Sciences UK**, Sep 21, 2009

NAVARRO-YEPES, J. et al. Oxidative stress, redox signaling and autophagy: Cell death vs Survival. **Antioxidants & redox signaling**, 2 fev. 2014.

NGUYEN, D. X.; BOS, P. D.; MASSAGUÉ, J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 4, p. 274–84, abr. 2009.

NICKOLOFF, B. J.; BEN-NERIAH, Y.; PIKARSKY, E. Inflammation and cancer: is the link as simple as we think? **The Journal of investigative dermatology**, v. 124, n. 6, p. x–xiv, jun. 2005.

NISHINO, I. Autophagic vacuolar myopathy. **Seminars in pediatric neurology**, v. 13, n. 2, p. 90–5, jun. 2006.

NOVAK, K. Epigenetics Changes in Cancer Cells. **Medscape General Medicine**, v. 6, n. 4, 2004.

NOWELL, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science (New York, N.Y.)**, v. 194, n. 4260, p. 23–8, 1 out. 1976.

O'CONNOR, P. M. et al. Mechanisms by which inflammation may increase intestinal cancer risk in inflammatory bowel disease. **Inflammatory bowel diseases**, v. 16, n. 8, p. 1411–20, ago. 2010.

OHSUMI, Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 2, n. 3, p. 211–6, mar. 2001.

OKAMOTO, I. et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of RAD001 (everolimus) administered daily to Japanese patients with advanced solid tumors. **Japanese journal of clinical oncology**, v. 40, n. 1, p. 17–23, jan. 2010.

OLIVEIRA, L. R. et al. CD44+/CD133+ immunophenotype and matrix metalloproteinase-9: Influence on prognosis in early-stage oral squamous cell carcinoma. **Head & neck**, 1 nov. 2013.

OTOMO, C. et al. Structure of the human ATG12~ATG5 conjugate required for LC3 lipidation in autophagy. **Nature structural & molecular biology**, v. 20, n. 1, p. 59–66, jan. 2013.



PAN, P.-Y.; YUE, Z. Genetic causes of Parkinson's disease and their links to autophagy regulation. **Parkinsonism & related disorders**, v. 20 Suppl 1, p. S154–7, jan. 2014.

PANDURANGAN, A. K. Potential Targets for Prevention of Colorectal Cancer: a Focus on PI3K/Akt/mTOR and Wnt Pathways. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 4, p. 2201–2205, 30 abr. 2013.

PANG, X. et al. PPAR $\gamma$ 1 phosphorylation enhances proliferation and drug resistance in human fibrosarcoma cells. **Experimental cell research**, v. 322, n. 1, p. 30–8, 10 mar. 2014.

PARK, J.-I.; KWAK, J.-Y. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in colorectal cancer. **PPAR research**, v. 2012, n. C, p. 876418, jan. 2012.

PATEL, L. et al. Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPAR  $\gamma$  agonists are mediated via upregulation of PTEN. p. 764–768, 2001.

PATTINGRE, S. et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. **Cell**, v. 122, n. 6, p. 927–39, 23 set. 2005.

PERLMUTTER, D. H. Autophagic disposal of the aggregation-prone protein that causes liver inflammation and carcinogenesis in alpha-1-antitrypsin deficiency. **Cell death and differentiation**, v. 16, n. 1, p. 39–45, jan. 2009.

PI, W.-F. et al. Troglitazone upregulates PTEN expression and induces the apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells under hypoxic conditions. **International journal of molecular medicine**, v. 32, n. 5, p. 1101–9, nov. 2013.

PIANA, S. et al. Papillary thyroid microcarcinoma with fatal outcome: evidence of tumor progression in lymph node metastases: report of 3 cases, with morphological and molecular analysis. **Human pathology**, v. 44, n. 4, p. 556–65, abr. 2013.

PODOLSKY, D. K. Inflammatory bowel disease. **The New England journal of medicine**, v. 325, n. 13, p. 928–37, 26 set. 1991.

PORTELA, A. et al. DNA methylation determines nucleosome occupancy in the 5'-CpG islands of tumor suppressor genes. **Oncogene**, v. 32, n. 47, p. 5421–8, 21 nov. 2013.

PURANDARE, N. C. et al. Biospectroscopy insights into the multi-stage process of cervical cancer development: probing for spectral biomarkers in cytology to distinguish grades. **The Analyst**, v. 138, n. 14, p. 3909–16, 21 jul. 2013.

QIAO, L. et al. Down-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis synergistically enhanced peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand-induced growth inhibition in colon cancer. **Molecular cancer therapeutics**, v. 7, n. 7, p. 2203–11, jul. 2008.

R. DASS, C. Metabolic Shift in Cancer Cells Treated with Chemotherapy Autophagy and Cancer Chemoresistance. **Journal of Postgenomics Drug & Biomarker Development**, v. 03, n. 01, 2013.

RANDALL-DEMLLO, S.; CHIEPPA, M.; ERI, R. Intestinal Epithelium and Autophagy: Partners in Gut Homeostasis. **Frontiers in immunology**, v. 4, n. September, p. 301, jan. 2013.

RAO, S. et al. A dual role for autophagy in a murine model of lung cancer. **Nature communications**, v. 5, p. 3056, 20 jan. 2014.

RAO, S. et al. Autophagy in non-small cell lung carcinogenesis: A positive regulator of antitumor immunosurveillance. **Autophagy**, v. 10, n. 3, 7 jan. 2014.

RESENDE, R. R.; ULRICH, H. (EDS.). **Trends in Stem Cell Proliferation and Cancer Research**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free radical biology & medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603–16, 1 dez. 2010.

ROELOFS, H. M. J. et al. Over-expression of COX-2 mRNA in colorectal cancer. **BMC gastroenterology**, v. 14, p. 1, jan. 2014.

ROVITO, D. et al. Omega-3 PUFA ethanolamides DHEA and EPEA induce autophagy through PPAR $\gamma$  activation in MCF-7 breast cancer cells. **Journal of cellular physiology**, v. 228, n. 6, p. 1314–22, jun. 2013.

RUBIO, N. et al. Spatiotemporal autophagic degradation of oxidatively damaged organelles after photodynamic stress is amplified by mitochondrial reactive oxygen species. **Autophagy**, v. 8, n. 9, p. 1312–24, set. 2012.

RYTER, S. W.; CLOONAN, S. M.; CHOI, A. M. K. Autophagy: a critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. **Molecules and cells**, v. 36, n. 1, p. 7–16, jul. 2013.

SAEZ, E. et al. Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation. **Nature medicine**, v. 4, n. 9, p. 1058–61, set. 1998.

SAMADDER, N., et al. "8 Prevalence and Predictors of Missed or Interval Colorectal Cancer: A Population-based Study in Utah." **Gastroenterology** 144.5, 2013

SARKAR, S.; RAVIKUMAR, B.; RUBINSZTEIN, D. C. Autophagic clearance of aggregate-prone proteins associated with neurodegeneration. **Methods in enzymology**, v. 453, p. 83–110, jan. 2009.

SASAKI, K. et al. Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. **BMC cancer**, v. 10, p. 370, jan. 2010.

SATO, K. et al. Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation. **Cancer research**, v. 67, n. 20, p. 9677–84, 15 out. 2007.

SATO, M.; SATO, K. Dynamic regulation of autophagy and endocytosis for cell remodeling during early development. **Traffic (Copenhagen, Denmark)**, v. 14, n. 5, p. 479–86, maio 2013.

SCHAAF, M. B. E. et al. The autophagy associated gene, ULK1, promotes tolerance to chronic and acute hypoxia. **Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology**, v. 108, n. 3, p. 529–34, set. 2013.

SCHOEN, R. E. et al. Colorectal-cancer incidence and mortality with screening flexible sigmoidoscopy. **The New England journal of medicine**, v. 366, n. 25, p. 2345–57, 21 jun. 2012.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821–32, 19 mar. 2010.

SCHWITALLA, S. et al. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. **Cell**, v. 152, n. 1-2, p. 25–38, 17 jan. 2013.

SEBASTIAN, S. et al. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: results of the 3rd ECCO pathogenesis scientific workshop (I). **Journal of Crohn's & colitis**, v. 8, n. 1, p. 5–18, jan. 2014.

SEER Training Modules, Cancer Classification. **U.S. National Institutes of Health, National Cancer Institute**. 10/02/2014. <<http://training.seer.cancer.gov/>>.

SELARU, F. M. et al. Epigenetic events in gastrointestinal cancer. **The American journal of gastroenterology**, v. 104, n. 8, p. 1910–2, ago. 2009.

SELVAKUMARAN, M. et al. Autophagy inhibition sensitizes colon cancer cells to antiangiogenic and cytotoxic therapy. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 19, n. 11, p. 2995–3007, 1 jun. 2013.

SETON-ROGERS, S. Epigenetics: Methylation in the driver's seat? **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 3, p. 149–149, 22 fev. 2013.

SHANG, L. et al. Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 12, p. 4788–93, 22 mar. 2011.

SHI, C.-S. et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 $\beta$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. **Nature immunology**, v. 13, n. 3, p. 255–63, jan. 2012.

SHI, Y. et al. Autophagy protects against oxaliplatin-induced cell death via ER stress and ROS in Caco-2 cells. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e51076, jan. 2012.

SHINTANI, T.; KLIONSKY, D. J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. **Science (New York, N.Y.)**, v. 306, n. 5698, p. 990–5, 5 nov. 2004.

SHRESTHA, U. K.; XIA, B. Role of Peroxisome Proliferator Activated Receptor-gamma and its Ligands in Inflammatory Bowel Disease. **Journal of Advances in Internal Medicine**, v. 1, n. 1, 10 fev. 2012.

SLATER, A. A. et al. DNA methylation profiling distinguishes histological subtypes of renal cell carcinoma. **Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society**, v. 8, n. 3, p. 252–67, mar. 2013.

SLATTERY, M. L. et al. Genetic variation in a metabolic signaling pathway and colon and rectal cancer risk: mTOR, PTEN, STK11, RPKAA1, PRKAG2, TSC1, TSC2, PI3K and Akt1. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 9, p. 1604–11, set. 2010.

SMITH, H. A.; KANG, Y. Acute infection induces a metastatic niche: a double menace for cancer patients. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 19, n. 17, p. 4547–9, 1 set. 2013.

SNIPPERT, H. J. et al. Biased competition between Lgr5 intestinal stem cells driven by oncogenic mutation induces clonal expansion. **EMBO reports**, v. 15, n. 1, p. 62–9, 1 jan. 2014.

SONG, M. S.; SALMENA, L.; PANDOLFI, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 13, n. 5, p. 283–96, maio 2012.

SREEVALSAN, S.; SAFE, S. Reactive Oxygen Species and Colorectal Cancer. **Current Colorectal Cancer Reports**, v. 9, n. 4, p. 350–357, 4 out. 2013.

SRIDHAR, S. et al. Autophagy and disease: always two sides to a problem. **The Journal of pathology**, v. 226, n. 2, p. 255–73, jan. 2012.

STEEN, H. B. The origin of oncogenic mutations: where is the primary damage? **Carcinogenesis**, v. 21, n. 10, p. 1773–6, out. 2000.

STELLA, G. M. et al. Oncogenes in non-small-cell lung cancer: emerging connections and novel therapeutic dynamics. **The lancet. Respiratory medicine**, v. 1, n. 3, p. 251–61, maio 2013.

STEPHENS, P. J. et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. **Cell**, v. 144, n. 1, p. 27–40, 7 jan. 2011.

SU, W. et al. Differential expression, distribution, and function of PPAR-gamma in the proximal and distal colon. **Physiological genomics**, v. 30, n. 3, p. 342–53, 20 ago. 2007.

SUI, X. et al. p53 signaling and autophagy in cancer: A revolutionary strategy could be developed for cancer treatment. **Autophagy**, v. 7, n. 6, p. 565–571, 1 jun. 2011.

SUNKARA, S. et al. Chronic Inflammation and Malignancy in Ulcerative Colitis. **Ulcers**, v. 2011, p. 1–8, 2011.

SUZUKI, K. et al. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. **The EMBO journal**, v. 20, n. 21, p. 5971–81, 1 nov. 2001.

TABERNERO, J. et al. Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 26, n. 10, p. 1603–10, 1 abr. 2008.

TANAKA, T. et al. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats. **Cancer research**, v. 61, n. 6, p. 2424–8, 15 mar. 2001.

TASSA, A. et al. Class III phosphoinositide 3-kinase--Beclin1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C2C12 myotubes. **The Biochemical journal**, v. 376, n. Pt 3, p. 577–86, 15 dez. 2003.

TAVASSOLY, I. et al. Dynamical Modeling of the Interaction between Autophagy and Apoptosis in Mammalian Cells: A Systems Pharmacology Framework. **Quantitative Biology - Molecular Networks**. 2013.

THOMAS, R. M.; SOBIN, L. H. Gastrointestinal cancer. **Cancer**, v. 75, n. 1 Suppl, p. 154–70, 1 jan. 1995.

THOMPSON, S. L.; COMPTON, D. A. Chromosomes and cancer cells. **Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology**, v. 19, n. 3, p. 433–44, abr. 2011.

TODD, R.; WONG, D. T. Oncogenes. **Anticancer research**, v. 19, n. 6A, p. 4729–46, 1999.

TRAVIS, W. D. et al. Histological Typing of Lung and Pleural Tumours. **Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg**, 1999.

TURCOTTE, S.; GIACCIA, A. J. Targeting cancer cells through autophagy for anticancer therapy. **Current opinion in cell biology**, v. 22, n. 2, p. 246–51, abr. 2010.

- VALASTYAN, S.; WEINBERG, R. A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 275–92, 14 out. 2011.
- VALTORTA, E. et al. KRAS gene amplification in colorectal cancer and impact on response to EGFR-targeted therapy. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 133, n. 5, p. 1259–65, 1 set. 2013.
- VAN LOMMEL, A. T.L. From cells to organs: a histology textbook and atlas. **Springer**. ISBN 978-1-4020-7257-4, 2002
- VAN ZUTPHEN, T. et al. Lipid droplet autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular biology of the cell**, v. 25, n. 2, p. 290–301, jan. 2014.
- VOGELSTEIN, B. et al. Cancer genome landscapes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6127, p. 1546–58, 29 mar. 2013.
- WALDNER, M. J.; NEURATH, M. F. Colitis-associated cancer: the role of T cells in tumor development. **Seminars in immunopathology**, v. 31, n. 2, p. 249–56, jul. 2009.
- WANG, C. et al. Novel synergistic antitumor effects of rapamycin with bortezomib on hepatocellular carcinoma cells and orthotopic tumor model. **BMC cancer**, v. 12, p. 166, jan. 2012.
- WANG, D. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  confers resistance to peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ -induced apoptosis in colorectal cancer cells. **Oncogene**, v. 31, n. 8, p. 1013–23, 23 fev. 2012.
- WANG, D.; DUBOIS, R. N. Peroxisome proliferator-activated receptors and progression of colorectal cancer. **PPAR research**, v. 2008, p. 931074, jan. 2008.
- WANG, S. S. et al. Alterations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer. **Science (New York, N.Y.)**, v. 282, n. 5387, p. 284–7, 9 out. 1998.
- WEI, Y. et al. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. **Molecular cell**, v. 30, n. 6, p. 678–88, 20 jun. 2008.
- WEINBERG, R. A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. **Cancer research**, v. 49, n. 14, p. 3713–21, 15 jul. 1989.
- WEINBERG, R. The Biology of Cancer. New York: Garland Science, 2006.

WEINSTEIN, I. B.; JOE, A. K. Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. **Nature clinical practice. Oncology**, v. 3, n. 8, p. 448–57, ago. 2006.

WHITE, E. et al. Role of autophagy in suppression of inflammation and cancer. **Current opinion in cell biology**, v. 22, n. 2, p. 212–7, abr. 2010.

WHITE, E.; DIPAOLA, R. S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 15, n. 17, p. 5308–16, 1 set. 2009.

WOHL, P. et al. Epithelial markers of colorectal carcinogenesis in ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 19, n. 14, p. 2234–41, jan. 2013.

YACHIDA, S. et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. **Nature**, v. 467, n. 7319, p. 1114–7, 28 out. 2010.

YANG, Q.; GUAN, K.-L. Expanding mTOR signaling. **Cell research**, v. 17, n. 8, p. 666–81, ago. 2007.

YANG, Z. J. et al. Autophagy modulation for cancer therapy. **Cancer biology & therapy**, v. 11, n. 2, p. 169–76, 15 jan. 2011.

YANG, Z. J. et al. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. **Molecular cancer therapeutics**, v. 10, n. 9, p. 1533–41, set. 2011.

YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. An overview of the molecular mechanism of autophagy. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 335, p. 1–32, jan. 2009.

YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. Eaten alive: a history of macroautophagy. **Nature cell biology**, v. 12, n. 9, p. 814–22, set. 2010.

YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. **Current opinion in cell biology**, v. 22, n. 2, p. 124–31, abr. 2010.

ZANG, C.; LIU, H. Dual PPAR $\alpha/\gamma$  Ligand TZD18 Either Alone or in Combination with Imatinib Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis of Human CML Cell Lines. **Cell Cycle**, v. 5, n. 19, p. 2237–2243, 1 out. 2006.



ZEESTRATEN, E. C. M. et al. Addition of interferon- $\alpha$  to the p53-SLP<sup>®</sup> vaccine results in increased production of interferon- $\gamma$  in vaccinated colorectal cancer patients: a phase I/II clinical trial. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 132, n. 7, p. 1581–91, 1 abr. 2013.

ZENG, X.-J. et al. [Effects of PPAR-gamma on the proliferation and glycolysis metabolism of prostate cancer cells]. **Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology**, v. 18, n. 8, p. 692–6, ago. 2012.

ZHAI, H. et al. Inhibition of autophagy and tumor growth in colon cancer by miR-502. **Oncogene**, v. 32, n. 12, p. 1570–9, 21 mar. 2013.

ZHANG, Y.-J. et al. Combined inhibition of Dnmt and mTOR signaling inhibits formation and growth of colorectal cancer. **International journal of colorectal disease**, v. 24, n. 6, p. 629–39, jun. 2009.

ZHANG, Y. et al. Epithelial mesenchymal transition correlates with CD24+CD44+ and CD133+ cells in pancreatic cancer. **Oncology reports**, v. 27, n. 5, p. 1599–605, maio 2012.

ZHANG, Y.-J. et al. mTOR signaling pathway is a target for the treatment of colorectal cancer. **Annals of surgical oncology**, v. 16, n. 9, p. 2617–28, set. 2009.

ZHAO, B. et al. Addressing Genetic Tumor Heterogeneity through Computationally Predictive Combination Therapy. **Cancer discovery**, v. 4, n. 2, p. 166–74, fev. 2014.

ZHAO, H. et al. PPAR $\gamma$ -dependent pathway in the growth-inhibitory effects of K562 cells by carotenoids in combination with rosiglitazone. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1840, n. 1, p. 545–55, jan. 2014.

ZHENG, H.-Y. et al. Autophagy enhances the aggressiveness of human colorectal cancer cells and their ability to adapt to apoptotic stimulus. **Cancer biology & medicine**, v. 9, n. 2, p. 105–10, jun. 2012.

ZHENG, Y. et al. Chloroquine inhibits colon cancer cell growth in vitro and tumor growth in vivo via induction of apoptosis. **Cancer investigation**, v. 27, n. 3, p. 286–92, mar. 2009.

ZHOU, J. et al. PPARgamma activation induces autophagy in breast cancer cells. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 41, n. 11, p. 2334–42, nov. 2009.

ZISMAN, T. L.; RUBIN, D. T. Colorectal cancer and dysplasia in inflammatory bowel disease. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 14, n. 17, p. 2662–9, 7 maio 2008.

ZUBAIR, A.; FRIERI, M. Role of nuclear factor- $\kappa$ B in breast and colorectal cancer. **Current allergy and asthma reports**, v. 13, n. 1, p. 44–9, fev. 2013.