**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

**Avaliação de alterações proteômicas em diferentes modelos de indução da
transição epitelial-mesenquimal (EMT) em células de adenocarcinoma de
mama**

CAMILA DE SOUZA PALMA

**RIBEIRÃO PRETO – SP
2018**

CAMILA DE SOUZA PALMA

**Avaliação de alterações proteômicas em diferentes modelos de indução da
transição epitelial-mesenquimal (EMT) em células de adenocarcinoma de
mama**

Tese de doutoramento apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Vitor Marcel Faça

RIBEIRÃO PRETO – SP

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

PALMA, CAMILA DE SOUZA

Avaliação de alterações proteômicas em diferentes modelos de indução da transição epitelial-mesenquimal (EMT) em células de adenocarcinoma de mama. Ribeirão Preto, 2018.

151 p., II, 30cm

Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP).

Orientador: Prof. Dr. Vitor Marcel Faça

1. EMT. 2. Câncer de mama. 3. Proteômica. 4. SNAIL. 5. HDAC. 6. EGF.

FOLHA DE APROVAÇÃO

CAMILA DE SOUZA PALMA

Avaliação de alterações proteômicas em diferentes modelos de indução da transição epitelial-mesenquimal (EMT) em células de adenocarcinoma de mama.

Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Bioquímica

Aprovada em ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À minha família, por todo o amor, carinho, intensa dedicação à
minha formação e apoio fundamental para a concretização
de mais uma importante etapa da vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À vida, essa intensa, inconstante e fascinante caminhada. Por todas as alegrias, conquistas e, principalmente, pelos momentos de reavaliação, os quais servem como fontes de ensinamentos e de fortalecimento da mente e da alma.

À minha família e ao meu namorado Bruno, entre tantos outros motivos, pelo amor incondicional, compreensão, apoio em todos os momentos e incentivo, essenciais à concretização de mais uma etapa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vitor Marcel Faça, por toda a confiança depositada, incentivo ao desenvolvimento profissional, aprendizado, amizade, e pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa.

A todos do laboratório de Proteômica do Câncer e do Centro de Química de Proteínas, Ana, Silvinha, Guilherme, Virgínia, Anne, Germano e Victor, por toda a ajuda com o desenvolvimento deste trabalho e pela convivência diária agradável e alegre. Em especial às amigas Mariana, Carol, Aline, Andrea e Daniele, pela ajuda imprescindível à realização deste trabalho, por todo o apoio durante todo o processo, pelos momentos de alegria, e, principalmente, pela amizade, sem a qual toda a caminhada não seria possível.

Às minhas amigas queridas e companheiras de sempre Maryna, Camila, Rafaella, Laís, Geisa, Joana, Raquel e Damily, por toda a amizade, carinho, companheirismo, incentivo e, mesmo com a distância, continuarem representando minha base e meu apoio em todos os momentos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Em especial à Ivone, por toda a ajuda em todos os processos referentes à pós-graduação.

Aos pesquisadores, alunos e funcionários do Hemocentro de Ribeirão Preto. Em especial a todos os integrantes dos laboratórios de Citometria de fluxo, Biologia

Celular, Transferência Gênica, Biologia Molecular, Genética Molecular e Bioinformática e Biologia Funcional, pela convivência e ajuda na realização deste trabalho.

À central analítica da USP-SC e ao Prof. Emanuel Carrilho, à Prof. Sharon Pitteri da Universidade de Stanford e aos professores Marcelo Vale e Wagner fontes, da Universidade de Brasília, pelo auxílio na coleta e processamento dos dados de LC-MS/MS.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo conhecimento adquirido e experiências vivenciadas durante todo o processo.

À FAPESP (processos 2015/08693-0 e 2011/09740-1) e ao CNPq (processo 154138/2014-2) pelo auxílio financeiro e incentivo à pesquisa. Ao Centro de Terapia Celular do Hemocentro de Ribeirão Preto (CTC-CEPID Fapesp 2013/08135-2), pelo acesso à infraestrutura e auxílio financeiro.

Aos integrantes da banca examinadora, que disponibilizaram seu tempo para a análise e contribuição para este trabalho.

A todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará
ao seu tamanho original”.*

(Albert Einstein)

RESUMO

Avaliação de alterações proteômicas em diferentes modelos de indução da transição epitelial-mesenquimal (EMT) em células de adenocarcinoma de mama.

O desenvolvimento tumoral é um processo que compreende diversas etapas e consiste no desenvolvimento progressivo de células normais para um estado neoplásico através de diversas mudanças bioquímicas e fenotípicas. Entre as principais marcas do câncer estão a capacidade de invasão tecidual e metástase. A metástase é responsável por, aproximadamente, 90% das mortes causadas por câncer. Assim, os métodos mais efetivos para a melhoria dos índices de morbidade e mortalidade relacionados ao câncer são a detecção precoce, a prevenção e o tratamento da metástase. O processo de EMT, que ocorre naturalmente durante a embriogênese e reparo tecidual, está envolvido também na progressão e metástase do câncer. A EMT induz alterações celulares e microambientais complexas que resultam na aquisição de um fenótipo mesenquimal pelas células epiteliais, juntamente com um aumento das capacidades migratórias e invasivas celulares. A EMT pode ser induzida por diversos fatores extracelulares, como os fatores de crescimento TGF β , EGF, HGF e PDGF. Além disso, a superexpressão de fatores de transcrição como SNAIL, SLUG, ZEB1 e TWIST1 também é capaz de induzir a EMT *in vitro*. A fim de ampliar o conhecimento dos mecanismos envolvidos no processo de EMT a nível de proteínas, foram realizadas neste trabalho análises de alterações proteômicas em diferentes modelos de indução da EMT na linhagem de adenocarcinoma de mama MCF7, sendo eles a superexpressão do FT SNAIL, o tratamento com o inibidor de histonas deacetilases SAHA e o tratamento com o fator de crescimento EGF. A análise proteômica detalhada por LC-MS/MS das frações subcelulares de núcleo, citoplasma e membrana das células superexpressando SNAIL gerou uma lista de proteínas reguladas relacionadas com o processo de EMT e que foram avaliadas nos demais modelos de indução. Entre essas, a proteína HDAC1, que teve seus níveis diminuídos pela superexpressão de SNAIL. O tratamento da linhagem MCF7 com o inibidor de histonas deacetilases SAHA demonstrou uma correlação positiva com o aumento dos níveis de SNAIL nas células MCF7, sugerindo um *cross-talk* entre ambas as proteínas. Além disso, o

tratamento com SAHA induziu alterações celulares e proteicas que também sugerem a indução do processo de EMT nas células MCF7. Por fim, o tratamento com o fator de crescimento EGF também foi capaz de induzir a EMT nas células MCF7 e apresentou envolvimento na regulação do ciclo celular, alterações de proteínas em comum com os demais tratamentos e regulação diferencial de proteínas entre os subcompartimentos, indicando similaridades entre os processos e potenciais mecanismos de translocação subcelular. Em conclusão, este estudo relevou proteínas alvo relacionadas à EMT, abrindo possibilidades para tentar alterar processos relacionados à progressão tumoral e ao processo metastático.

Palavras-chave: EMT, câncer de mama, proteômica, SNAIL, HDAC, EGF.

ABSTRACT

Proteomic alterations in different models of epithelial-mesenchymal transition (EMT) induction in breast adenocarcinoma cells.

Tumor development is a process comprising several steps and consists in the progressive development of normal cells into a neoplastic state through various biochemical and phenotypic changes. Among the major marks of cancer are the capacity for tissue invasion and metastasis. Metastasis accounts for approximately 90% of cancer deaths. Thus, the most effective methods for improving cancer-related morbidity and mortality rates are early detection, prevention and treatment of metastasis. The EMT process, which occurs naturally during embryogenesis and tissue repair, is also involved in cancer progression and metastasis. EMT induces complex cellular and microenvironmental changes that result in the acquisition of a mesenchymal phenotype by epithelial cells, together with an increase in migratory and invasive cellular capacities. EMT can be induced by various extracellular factors, such as TGF β , EGF, HGF and PDGF. In addition, overexpression of some transcription factors such as SNAIL, SLUG, ZEB1 and TWIST1 is also capable of inducing EMT in vitro. In order to increase the knowledge of the mechanisms involved in the EMT process, we performed proteomic analysis in different models of EMT induction in the MCF7 breast adenocarcinoma cell line, which were the overexpression of SNAIL, treatment with the histone deacetylase inhibitor SAHA and treatment with the growth factor EGF. The detailed proteomic analysis by LC-MS/MS of the subcellular fractions of nucleus, cytoplasm and membrane of the overexpressing SNAIL cells generated a list of regulated proteins related to the EMT process and that were evaluated in the other models of induction. Among these, the HDAC1 protein, which had its levels decreased by SNAIL overexpression. Treatment of the MCF7 cell line with the histone deacetylase inhibitor SAHA showed a positive correlation with the increase of SNAIL levels, suggesting a cross-talk between both proteins. In addition, SAHA treatment induced cellular and protein alterations that also suggest the induction of the EMT process in MCF7 cells. Finally, the treatment with the growth factor EGF was also able to induce the EMT in MCF7 cells and showed involvement in the regulation of the cell cycle, changes in proteins in common with the other treatments and differential regulation of proteins among the

subcompartments, indicating similarities between the processes and potential mechanisms of subcellular translocation. In conclusion, this study revealed target proteins related to EMT, opening possibilities to try to alter processes related to tumor progression and metastatic process.

Keywords: EMT, breast cancer, proteomics, SNAIL, HDAC, EGF.

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CDH1	E-caderina
CDH2	N-caderina
CO ₂	Gás carbônico
CTRL	Controle
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT	Transição epitelial–mesenquimal
ER	<i>Estrogen receptor</i>
FT	Fator de transcrição
GO	<i>Gene ontology</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
IAA	Iodoacetamida
kDa	Kilo Dalton
LC-MS/MS	Espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida
MCF7	Células epiteliais de adenocarcinoma de mama
MDA-MB-231	Células epiteliais de adenocarcinoma de mama
MET	Transição mesenquimal-epitelial
miRNA	MicroRNA
PANTHER	<i>Protein Analysis Through Evolutionary Relationships</i>
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PBS	Salina tamponada com fosfato
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS-PAGE	Eletróforese em gel de poliacrilamida dodecil-sulfato de sódio
SILAC	<i>Stable Isotopic Labeling in Cell Culture</i>
SFB	Soro fetal bovino
SNAIL	<i>Zinc finger protein SNAI1</i>
SLUG	<i>Zinc finger protein SNAI2</i>
STRING	<i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TWIST1	<i>Twist-related protein 1</i>
VIM	Vimentina
ZEB1	<i>Zinc finger E-box-binding homeobox 1</i>

SÍMBOLOS

g	Grama
μg	Micrograma
ng	Nanograma
L	Litro
mL	Mililitro
μL	Microlitro
cm	Centímetro
μm	Micrometro
nm	Nanometro
M	Molar
V	Volts
pH	Log negativo da concentração de H ⁺
rpm	Rotações por minuto
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
x g	x gravidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Marcas do câncer (<i>hallmarks</i>).....	24
Figura 2. Alterações envolvidas na EMT.....	28
Figura 3. A EMT e a progressão tumoral.	29
Figura 4. Fluxograma da metodologia utilizada para a indução da EMT na linhagem MCF7 através de diferentes modelos e análise das alterações morfológicas e proteicas decorrentes.....	43
Figura 5. Morfologia das células MCF7 induzidas à EMT pela superexpressão do FT SNAIL.....	65
Figura 6. Caracterização por <i>western blotting</i> do fracionamento subcelular da linhagem MCF7.....	66
Figura 7. Experimento controle realizado para validar o uso da célula MDA-MB-231 marcada com o isótopo pesado do aminoácido lisina como uma referência para a análise proteômica quantitativa.	68
Figura 8. Diagrama de Venn das proteínas identificadas por LC-MS/MS nos subcompartimentos (núcleo, citoplasma e membrana) das células MCF7 controle e MCF7 superexpressando SNAIL.....	69
Figura 9. Classificação por ontologias gênicas das proteínas enriquecidas nas frações de núcleo, citoplasma e membrana de células MCF7-CTRL e MCF7-SNAIL.	70
Figura 10. Proteínas diferencialmente expressas nas células MCF7 superexpressando o FT SNAIL.	72
Figura 11. Validação por <i>western blotting</i> de proteínas reguladas nos compartimentos subcelulares pela superexpressão do FT SNAIL em células MCF7.	74
Figura 12. Rede de interações das proteínas diferencialmente expressas em células MCF7-SNAIL.....	76
Figura 13. Análise de ciclo celular por APC-BrdU/7-AAD (7-amino-actinomycin D) de células MCF7.	77
Figura 14. Detecção de TGF β 1 no meio condicionado de células MCF7-SNAIL por MRM.....	78
Figura 15. Morfologia das células MCF7 tratadas com diferentes concentrações do inibidor químico de histonas deacetilases SAHA (0,5-10 μ M) por um período de 24h.	79

Figura 16. Células MCF7 tratadas com diferentes concentrações de SAHA (0,5 - 10µM) por 24h.	80
Figura 17. Células MCF7 tratadas com 10 µM de SAHA por 2h e 24h.	81
Figura 18. Avaliação temporal por <i>western blotting</i> dos efeitos do tratamento de células MCF7 com SAHA 10 µM.	82
Figura 19. Avaliação temporal por MRM dos efeitos do tratamento de células MCF7 com SAHA 10 µM na expressão da proteína SNAIL.	83
Figura 20. Análise por <i>western blotting</i> dos efeitos do tratamento de células MCF7 com SAHA 10 µM nas diferentes frações subcelulares.	84
Figura 21. Análise do perfil de expressão gênica de amostras de câncer de mama do banco de dados do <i>The Cancer Genome Atlas</i> (TCGA).	85
Figura 22. Morfologia da linhagem MCF7 cultivada em meio DMEM desprovido de SFB por 24, 48 e 72h.	87
Figura 23. Morfologia da linhagem MCF7 cultivada por 48h em meio suplementado com diferentes concentrações de SFB.	88
Figura 24. Morfologia da linhagem MCF7 controle (CT, sem tratamento) ou tratada com o fator de crescimento TGFβ2 (5, 10, 20, 50 ou 100 ng/mL) por 24 ou 48h.	90
Figura 25. Morfologia da linhagem MCF7 controle (CT, sem tratamento) ou tratada com o fator de crescimento TGFβ1 (5, 10, 20, 50 ou 100 ng/mL) por 24 ou 48h.	91
Figura 26. Morfologia da linhagem MCF7 controle (CT, sem tratamento) ou tratada com o fator de crescimento EGF (5, 10, 20, 50 ou 100 ng/mL) por 24 ou 48h.	92
Figura 27. Análise por MRM da expressão de E-caderina (CDH1) nas células controle (CTRL) e tratadas com TGFβ1, TGFβ2 ou EGF, a 10 ng/mL por 48h.	93
Figura 28. Análise por <i>western blotting</i> dos efeitos do tratamento de células MCF7 com o fator de crescimento EGF (10 ng/mL) sobre a expressão das proteínas E-caderina (CDH1), SNAIL e β-catenina (CTNNB1) em diferentes períodos de tempo (0h, 2h, 4h, 8h, 16h, 24h, 48h e 72h).	94
Figura 29. Morfologia da linhagem MCF7 controle (CTRL, sem tratamento) ou tratada com o fator de crescimento EGF (10 ng/mL) por 24h e 48h.	95
Figura 30. Análise através de <i>array</i> de proteínas (PathScan® EGFR Signaling Antibody Array Kit, Cell Signaling) da ativação da via de sinalização de EGFR em células MCF7 tratadas com o fator de crescimento EGF (10 ng/mL).	97
Figura 31. Quantificação das imagens do <i>array</i> de proteínas (PathScan® EGFR Signaling Antibody Array Kit, Cell Signaling) da ativação da via de sinalização de EGFR em células MCF7 tratadas com o fator de crescimento EGF (10 ng/mL).	98

Figura 32. Confirmação por <i>western blotting</i> da ativação da via de sinalização de EGFR em células MCF7 tratadas com o fator de crescimento EGF (10 ng/mL).	100
Figura 33. Análise por western blotting dos efeitos do tratamento de células MCF7 com EGF 10 ng/mL sobre a ativação da proteína Erk1/2 nas diferentes frações subcelulares.	101
Figura 34. Análise por western blotting do efeito do tratamento de células MCF7 pelo fator de crescimento EGF nos níveis da proteína ER α (Receptor de estrógeno α).	102
Figura 35. Ensaio de migração de células MCF7 tratadas com o fator de crescimento EGF (10 ng/mL) em comparação com as células não tratadas (controle).	103
Figura 36. Análise de proliferação celular pela marcação com anticorpo anti-Ki67.	104
Figura 37. Análise <i>High Content Screening</i> da expressão das proteínas SNAIL-SLUG e HDAC1 em células MCF7 controle e tratadas com o fator de crescimento EGF 10 ng/mL por 48h.	105
Figura 38. Quantificação da expressão das proteínas SNAIL-SLUG e HDAC1 após o tratamento com o fator de crescimento EGF 10 ng/mL por 48h.	106
Figura 39. Análise por <i>High Content Screening</i> dos parâmetros morfológicos de células MCF7 controle e tratadas com o fator de crescimento EGF 10 ng/mL por 48h.	107
Figura 40. Análise por western blotting dos efeitos do tratamento de células MCF7 com o fator de crescimento EGF 10 ng/mL por 48h na regulação de proteínas.	108
Figura 41. Confirmação por MRM dos efeitos do tratamento de células MCF7 com o fator de crescimento EGF 10 ng/mL na expressão de proteínas e comparação com os níveis nas células MDA-MB-231.	109
Figura 42. Análise por western blotting dos efeitos do tratamento de células MCF7 com o fator de crescimento EGF 10 ng/mL por 48h sobre a regulação do ciclo celular.	110
Figura 43. Caracterização por western blotting do fracionamento subcelular da linhagem MCF7.	111
Figura 44. Lista de proteínas diferencialmente expressas entre os subcompartimentos de células MCF7-SNAIL em relação às células controle.	113
Figura 45. Avaliação por western blotting da expressão de proteínas entre os subcompartimentos de células MCF7 controle ou tratadas com o fator de crescimento EGF 10 ng/mL por 48h Comparação com a expressão no extrato total das mesmas células e de células MDA-MB-231.	114
Figura 46. Análise por MRM dos efeitos do tratamento de células MCF7 com o fator de crescimento EGF 10 ng/mL na expressão de proteínas nos diferentes subcompartimentos celulares.	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de anticorpos utilizados para marcação das células MCF7 e análise através de HCS.....	51
Tabela 2. Lista de anticorpos primários e suas diluições utilizados nos ensaios de <i>western blotting</i> durante o desenvolvimento do estudo.....	55

SUMÁRIO

1. Introdução.....	23
1.1. Marcas do câncer	23
1.2. Metástase do Câncer.....	25
1.3. A Transição Epitelial-Mesenquimal.....	27
1.4. Localização subcelular de proteínas e sua implicação na biologia do câncer	33
1.5. Proteômica multidimensional em biologia celular	36
2. Objetivos	40
2.1. Objetivo Geral.....	40
2.2. Objetivos Específicos.....	40
3. Material e métodos	43
3.1. Fluxograma da metodologia utilizada	43
3.2. Cultura de células de mamíferos	44
3.2.1. Cultivo celular da linhagem MCF7	44
3.2.2. Cultivo celular da linhagem MDA-MB-231	44
3.3. Modelos de indução da EMT	45
3.3.1. Superexpressão do fator de transcrição SNAIL.....	45
3.3.1.1. Transfecção em células HEK-293FT (Método Lipídios Catiônicos) para produção lentiviral	45
3.3.1.2. Transdução da linhagem celular MCF7	46
3.3.1.3. Análise por citometria de fluxo das células positivas para GFP	47
3.3.2. Tratamento com o inibidor de histonas deacetilases SAHA	47
3.3.3. Tratamento com fatores de crescimento.....	48
3.4. Ensaio de migração celular.....	48
3.5. Ensaio de proliferação celular.....	49
3.6. Ensaio de ciclo celular	50
3.7. Análise por <i>High Content Screening</i> (HCS)	50
3.8. Extração e quantificação de proteínas de extrato total	52
3.9. Fracionamento subcelular.....	52
3.9.1. Enriquecimento de frações nucleares, citoplasmáticas, de membrana e de proteínas secretadas	52
3.9.2. Experimentos de controle da separação das frações	54
3.10. <i>Western blotting</i>	54
3.11. Análise da via de sinalização de EGFR	57

3.12. Análise proteômica dirigida	58
3.12.1. Preparo da amostra para MRM.....	58
3.12.2. Desenvolvimento de métodos de MRM	58
3.13. Análise proteômica em larga escala da EMT.....	60
3.13.1. Análise proteômica por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução	60
3.14. Análise de bioinformática.....	62
3.15. Análise estatística	62
4. Resultados	64
4.1. Indução da EMT pela superexpressão do fator de transcrição SNAIL	64
4.2. Tratamento com o inibidor de histonas deacetilases SAHA	78
4.3. Tratamento com fatores de crescimento.....	86
4.3.1. Avaliação da EMT após tratamento com o fator de crescimento EGF.....	95
4.3.1.1. Análise da EMT ao nível dos subcompartimentos celulares.....	111
5. Discussão	119
6. Conclusão	135
7. Referências bibliográficas.....	137
8. Anexos	149
A. Mapas dos vetores	149
A.1. pLVWR-IRES-ZsGreen	149
A.2. pDR 8.91	150
A.3. pM2D-VSV-G	151
B. Tabela de Identificação das proteínas.....	151
C. Tabela de Quantificação de Proteínas.....	151

Introdução

1. Introdução

1.1. Marcas do câncer

O desenvolvimento tumoral é um processo que compreende diversas etapas e consiste no desenvolvimento progressivo de células normais para um estado neoplásico através de diversas mudanças bioquímicas e fenotípicas. No ano de 2000, Hanahan e Weinberg publicaram um trabalho no qual estabeleceram seis capacidades principais adquiridas pelas células durante o desenvolvimento da maioria dos tumores, embora através de diferentes mecanismos (Hanahan and Weinberg 2000). Essas capacidades ficaram conhecidas como marcas (*hallmarks*) do câncer e consistiam na autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais anti-tumorais, mecanismos de evasão da apoptose, sustentação da angiogênese, potencial replicativo ilimitado e capacidade de invasão tecidual e metástase (Hanahan and Weinberg 2000). Assim, essas seis marcas seriam compartilhadas pela maioria dos tipos tumorais e juntas forneceria uma base para a compreensão da diversidade das doenças neoplásicas (Hanahan and Weinberg 2011). No ano de 2011, os mesmos autores publicaram um segundo trabalho no qual revisaram as seis marcas do câncer e passaram a considerar que os tumores não são apenas massas proliferativas de células cancerosas, e sim tecidos complexos compostos por diferentes tipos celulares que participam de diferentes interações entre si (Hanahan and Weinberg 2011). Assim, os autores consideraram como participantes ativos do desenvolvimento tumoral as células que formam o estroma associado ao tumor, no entendimento de que é preciso também compreender as contribuições do microambiente tumoral para a tumorigênese, além

das características das células tumorais em si (Hanahan and Weinberg 2011). Dessa forma, eles enumeraram outras características essenciais ao desenvolvimento tumoral, que são a capacidade de modificar, ou reprogramar, o metabolismo celular de maneira a suportar a proliferação neoplásica; a capacidade de escapar da vigilância imunológica; a instabilidade genômica e a mutabilidade, que proporcionam alterações genéticas que dirigem a progressão tumoral; e a inflamação promovida pelo tumor, que pode suportar inadvertidamente as capacidades tumorais, manifestando consequências promotoras tumorais de respostas inflamatórias (Hanahan and Weinberg 2011). Atualmente, considera-se todas as marcas como essenciais para o entendimento da tumorigênese e da diversidade dos tumores (Figura 1).

Figura 1. Marcas do câncer (*hallmarks*).

A maioria dos tipos tumorais compartilham marcas principais que auxiliam na compreensão da tumorigênese e da diversidade dos tumores, sendo elas a evasão de supressores de crescimento, o escape da destruição imunológica, a imortalidade replicativa, a inflamação promovida pelo tumor, a sustentação de sinais proliferativos, a desregulação energética celular, a resistência à morte celular, a instabilidade genômica e a mutação, a indução da angiogênese e a ativação da invasão e metástase. Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011.

1.2. Metástase do Câncer

Entre as marcas do câncer descritas por Hanahan e Weinberg, está a capacidade de invasão e metástase adquirida pelas células tumorais. A metástase, responsável por, aproximadamente, 90% das mortes causadas por câncer (Mehlen and Puisieux 2006), é um processo formado por uma sequência de passos, denominada cascata de invasão-metástase (Fidler 2003, Talmadge and Fidler 2010). Essa cascata se inicia com a invasão local, seguida da extravasão de células tumorais para vasos sanguíneos e linfáticos próximos, circulação das células através dos vasos, escape das células tumorais do lúmen dos vasos para o parênquima de tecidos distantes (extravasão), formação de pequenos nódulos de células cancerosas (micrometástases) e, finalmente, crescimento das lesões até tumores macroscópicos, denominado colonização (Hanahan and Weinberg 2011).

Assim, os métodos mais efetivos para a melhoria dos índices de morbidade e mortalidade relacionadas ao câncer são a detecção precoce, a prevenção e o tratamento da metástase, a qual consiste de uma longa série de passos sequenciais e inter-relacionados, cada qual podendo ser limitante do processo. Apesar da metástase do câncer ser, na verdade, um processo bastante ineficiente, com uma estimativa de que menos de 1% das células tumorais circulantes sejam capazes de suportar o ambiente tóxico e as barreiras de se infiltrar e colonizar sítios metastáticos distantes, suas consequências são severas, o que reforça a importância do entendimento do processo para o diagnóstico e tratamento do câncer (Weiss 2000, Fidler 2003, Sethi and Kang 2011).

O passo inicial de destacamento celular do tumor primário é dependente de moléculas de adesão celular (CAMs), incluindo caderinas, integrinas, selectinas e a

superfamília de imunoglobulinas. Entre essas moléculas está a E-caderina, um mediador direto das interações célula-célula e envolvido também em vias de sinalização celular pelo complexo formado com beta-catenina. Considerado um gene supressor de tumor, a perda de E-caderina é considerada necessária, apesar de não suficiente, para que as células tumorais epiteliais se destaquem do tumor primário e ganhem motilidade (Perlikos, Harrington et al. 2013).

A disseminação e motilidade celular podem ocorrer através de alguns processos principais, entre eles a transição epitelial-mesenquimal (EMT). Nesse processo, as células adquirem a capacidade de se alongar, degradar a matriz extracelular ao redor através de enzimas secretadas, e migrarem formando projeções que interagem com ligantes específicos da matriz extracelular (Perlikos, Harrington et al. 2013).

Apesar das melhorias no diagnóstico e tratamento, a maioria das mortes causadas por câncer se devem ao fato da metástase ser resistente a terapias convencionais. A principal barreira ao tratamento da metástase é a heterogeneidade biológica das células nos tumores primários e nas metástases. Além disso, os mecanismos do processo de invasão e metástase do câncer ainda não são bem compreendidos. Dessa forma, o entendimento da metástase aos níveis celulares, moleculares e sistêmicos representa fator essencial na pesquisa do câncer (Fidler 2003).

1.3. A Transição Epitelial-Mesenquimal

A transição epitelial-mesenquimal (EMT) é um processo no qual as células epiteliais adquirem um fenótipo mesenquimal através de alterações celulares e microambientais complexas, como a diminuição de marcadores epiteliais, expressão de marcadores mesenquimais, reorganização do citoesqueleto e degradação da membrana basal, resultando na perda da polaridade apical-basal característica de células epiteliais, perda do contato entre as células e aquisição de capacidades invasivas e migratórias (Kalluri and Weinberg 2009, Thiery, Acloque et al. 2009, Zheng and Kang 2014). (Figura 2). Além disso, as células se tornam mais resistentes à apoptose, aumentam consideravelmente a produção de componentes da matriz extracelular e adquirem uma morfologia fibroblásticoide (Kalluri and Neilson 2003). Durante a EMT, ocorre a diminuição da expressão de E-caderina (CDH1) e o aumento da expressão de moléculas mesenquimais como a Vimentina e a N-caderina (CDH2), permitindo a essas moléculas serem consideradas como marcadores do processo (Zheng and Kang 2014). Dependendo dos sinais recebidos pelas células no tecido e do circuito gênico da mesma, o programa de EMT pode gerar uma série de fenótipos intermediários ao longo do eixo epitelial-mesenquimal e, quando dirige ao extremo, converte uma célula epitelial a um estado completamente mesenquimal (Zhang and Weinberg 2018) (Figura 2). Assim, essa visão difere da visão inicial que considerava a EMT como apenas uma transição binária entre os fenótipos epitelial e mesenquimal (Zhang and Weinberg 2018).

Figura 2. Alterações envolvidas na EMT.

A transição de células epiteliais com polaridade apical-basal para células mesenquimais com característica migratória, envolve a diminuição ou aumento da expressão de diversos marcadores celulares. Ao invés de ser uma troca unidirecional binária entre dois estados celulares distintos, evidências sugerem que o programa de EMT gera um espectro de diferentes fenótipos intermediários entre os extremos finais epitelial e mesenquimal. (Adaptado de Kalluri and Weinberg 2009, Zhang and Weinberg 2018).

O processo de EMT ocorre naturalmente durante o desenvolvimento embrionário e reparo tecidual, além de ter sido relacionado com a progressão tumoral e metástase (Thiery, Acloque et al. 2009, Brabletz 2012). A perda da adesão intercelular e a aquisição de capacidades migratórias e invasivas, permitem com que as células tumorais sejam capazes de se destacar do tumor primário, invadir tecidos adjacentes ou entrar na circulação sanguínea, estabelecer metástases e colonizar tecidos distantes, sendo capaz de induzir resistência à morte celular e senescência, resistência à quimioterapia e mecanismos de escape à vigilância imunológica (Thiery 2002, Cardiff 2005, Thompson, Newgreen et al. 2005, Berx, Raspé et al. 2007, revisado por Thiery, Acloque et al. 2009). A EMT é considerada um evento precoce

crítico para a invasão e metástase de muitos carcinomas (Cardiff 2005, Thompson, Newgreen et al. 2005). Além disso, a EMT se caracteriza como um processo reversível, uma vez que a transição mesenquimal-epitelial (MET) também ocorre, e é responsável por tornar as células migratórias em células novamente com um fenótipo epitelial (Kalluri and Weinberg 2009, Lamouille, Xu et al. 2014) (Figura 3).

Figura 3. A EMT e a progressão tumoral.

O processo de EMT facilita múltiplos passos da cascata invasão-metástase. A indução da EMT no tumor epitelial primário permite às células do carcinoma perderem as junções celulares, degradarem a membrana basal e suporta a disseminação dessas células através da migração e intravasamento na circulação sanguínea. A colonização de outros tecidos requer a reversão do programa de EMT e o ganho de características epiteliais, através do processo de MET. Adaptado de (Zhang and Weinberg 2018).

Durante o processo de metástase, as células cancerosas que se disseminaram do sítio inicial parecem necessitar de uma capacidade de autorrenovação, similar à exibida por células-tronco, para colonizarem o sítio secundário e formarem metástases macroscópicas (Mani, Guo et al. 2008). Dessa forma, além de permitir a disseminação de células cancerosas a partir de um tumor primário, o programa da EMT pode também promover a capacidade autorrenovativa dessas células epiteliais que passaram pelo processo, gerando células similares a células-tronco nas neoplasias (Mani, Guo et al. 2008, Morel, Lièvre et al. 2008). O programa de MET também está envolvido no desenvolvimento de tumores em sítios

secundários, sendo utilizado pelas células cancerosas para a aquisição de características epiteliais e, assim, seu estabelecimento no novo tecido.

Apesar da EMT estar relacionada a diferentes processos biológicos, elementos genéticos e bioquímicos comuns parecem direcionar esses programas. Diversos processos moleculares estão envolvidos na indução e regulação da EMT, incluindo vias interconectadas ou independentes e moléculas de sinalização (Thiery and Sleeman 2006, Kalluri and Weinberg 2009, Thiery, Acloque et al. 2009, Lamouille, Xu et al. 2014). Como resultado, diversos componentes da matriz extracelular e fatores de crescimento, incluindo TGF β (*Transforming Growth Fator Beta*) e EGF (*Epidermal Growth Fator*), ou sinais intracelulares como a sinalização de NF- κ B e WNT, são capazes de desencadear o processo de EMT (Zheng and Kang 2014). A superexpressão de alguns fatores de transcrição como SNAIL (SNAI1), SLUG (SNAI2), ZEB1, ZEB2, TWIST1 e FOXC1 é capaz também de induzir a EMT *in vitro* (Kalluri and Weinberg 2009, Thiery, Acloque et al. 2009, Lamouille, Xu et al. 2014).

O fator de transcrição SNAIL faz parte da família Snail de fatores de transcrição e é considerado um dos reguladores chave da EMT (Zheng and Kang 2014). A superexpressão de SNAIL é capaz de induzir alterações moleculares que levam à EMT *in vitro* (Vetter, Le Béche et al. 2009, Naber, Drabsch et al. 2013) e em tumores primários, sendo suficiente também para promover a recorrência tumoral *in vivo* (Moody, Perez et al. 2005). SNAIL encontra-se superexpresso em diversos tipos tumorais, e se correlaciona com a agressividade tumoral, metástase, recorrência e mau prognóstico (Blanco, Moreno-Bueno et al. 2002, Peinado, Olmeda et al. 2007). Esse efeito está relacionado parcialmente à sua habilidade em inibir diretamente a transcrição de genes relacionados à adesão celular (Thiery, Acloque

et al. 2009). Pela sua ligação a sequências E2-box do DNA (CAGGT(G/C)ACCTG) através de seus domínios dedo de zinco na extremidade carboxi-terminal, os fatores Snail podem reprimir a expressão de genes epiteliais, como E-caderina (Naber, Drabsch et al. 2013, Lamouille, Xu et al. 2014). SNAIL foi também relacionado à sobrevivência celular, regulação do ciclo celular, evasão da apoptose, e quimioresistência, e é encontrado superexpresso na região invasiva de tumores (Cano, Pérez-Moreno et al. 2000, Sugimachi, Tanaka et al. 2003, Francí, Takkunen et al. 2006).

Além das redes de vias de sinalização desencadeadas por SNAIL e outros estímulos que induzem e regulam a EMT, mecanismos epigenéticos estão também envolvidos e influenciam o processo. Mecanismos regulatórios epigenéticos, como a metilação do DNA, microRNAs e modificações na cromatina, estão envolvidos na reversibilidade do processo de EMT e na plasticidade de células tumorais (Kiesslich, Pichler et al. 2013, Tam and Weinberg 2013). Nesse contexto, modificações em histonas associadas à cromatina e, por consequência, o controle da configuração da cromatina, possuem papéis essenciais na mediação da ação de diversos reguladores transcricionais da EMT, permitindo as complexas alterações na expressão gênica que ocorrem durante o processo (Wu, Tsai et al. 2012, Tam and Weinberg 2013). O papel de SNAIL no mecanismo de regulação epigenética que governa a EMT ainda é pouco conhecido (Chen, Xu et al. 2014).

Conforme citado anteriormente, além dos fatores de transcrição envolvidos no processo de EMT, há também outros indutores e reguladores do processo, como os fatores de crescimento TGF β e EGF. Sinais indutores da EMT emanados do estroma associado ao tumor, como HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), EGF, PDGF (*Platelet-derived Growth Factor*) e TGF β , parecem ser responsáveis pela indução,

ou ativação funcional nas células tumorais, de uma série de fatores de transcrição indutores da EMT, como SNAIL, SLUG, ZEB1, TWIST1, entre outros (Jechlinger, Grünert et al. 2002, Thiery 2002, Shi and Massagué 2003, Kokudo, Suzuki et al. 2008, Medici, Hay et al. 2008, Niessen, Fu et al. 2008). Uma vez expressos e ativados, cada um desses fatores de transcrição pode agir para regular o programa da EMT. A implementação da EMT nas células depende da ativação de uma série de redes de sinalização intracelular, como Erk/MAPK, PI3K/AKT, Smads, RhoB, Beta-catenina, LEF (*Lymphoid Enhancer binding Factor*), Ras e c-Fos, assim como proteínas de superfície celular como as integrinas (Tse and Kalluri 2007).

Enquanto o papel do fator de crescimento TGF β na indução do processo de EMT e na progressão tumoral já está bem estabelecido na literatura (Zavadil and Böttinger 2005, Moustakas and Heldin 2007, Kalluri and Weinberg 2009), estudos vêm demonstrando o papel do fator de crescimento EGF na promoção da metástase do câncer, entre eles o câncer de mama. A expressão anormal de EGF e seu receptor EGFR (ErbB-1) tem sido extensivamente descrita como uma causa principal da progressão e metástase do câncer de mama (Navolanic, Steelman et al. 2003, Lo, Hsu et al. 2007, Olsen, Bechmann et al. 2012). Esses fatores podem ativar as proteínas ERK 1/2 (*Extracellular Regulated Kinase* 1/2) ou PI3K/AKT (*Phosphoinositide-3 kinase/Akt*), as quais podem potencialmente induzir a EMT em células tumorais (Kondapaka, Fridman et al. 1997, Ellerbroek, Halbleib et al. 2001, Thiery 2002, Grünert, Jechlinger et al. 2003, Christiansen and Rajasekaran 2006). Assim, o processo de EMT nessas células tumorais pode resultar no desenvolvimento a uma resistência a terapias que possuem como alvo o receptor EGFR (Thomson, Buck et al. 2005, Buck, Eyzaguirre et al. 2007, Barr, Thomson et al. 2008).

1.4. Localização subcelular de proteínas e sua implicação na biologia do câncer

As células eucarióticas são organizadas em compartimentos formados por membranas e caracterizados por conjuntos específicos de proteínas e distintos processos celulares bioquímicos. A localização subcelular das proteínas e o seu tráfego entre subcompartimentos celulares representam fatores fundamentais para a função das mesmas em diferentes organelas, uma vez que fornecem o contexto fisiológico adequado para a sua função (Hung and Link 2011). Essa relação entre a função e a localização subcelular das proteínas foi, inclusive, sugerida como uma forma de ser atingida diversidade funcional e, ao mesmo tempo, economia no design e síntese de proteínas (Butler and Overall 2009). A localização subcelular das proteínas determina o acesso das mesmas a parceiros de interação e à maquinaria de modificação pós-traducional, permitindo a integração das proteínas em redes de interação biológicas. Aproximadamente metade das proteínas geradas por uma célula precisa ser transportada para ou através de, pelo menos, uma membrana celular para atingir o seu destino funcional (Chacinska, Koehler et al. 2009).

Dada a importância da localização subcelular para a correta função proteica, a localização aberrante de proteínas contribui para a patogênese de diversas doenças humanas, entre elas doenças metabólicas, cardiovasculares, neurodegenerativas e também o câncer. A correção da localização aberrante de proteínas relacionadas a doenças é, portanto, de grande interesse para a intervenção terapêutica. Em particular, processos celulares que conectam a conformação de proteínas e a sinalização celular, assim como a importação e exportação para o núcleo, com a localização subcelular das mesmas, foram propostos como alvos terapêuticos.

A localização aberrante de proteínas pode ser causada por alguns fatores como mutações, modificações pós-traducionais, expressão alterada de proteínas carregadoras ou receptores de transporte ou mesmo pela desregulação de componentes da maquinaria de tráfego, podendo levar à inativação da proteína, desregulação de sua função ou mesmo a aquisição de uma função nociva para o organismo, podendo assim causar doenças que envolvem a biogênese, agregação de proteínas, metabolismo celular ou sinalização (Hung and Link 2011). Entre as proteínas cuja localização aberrante contribui para o desenvolvimento de diversos tipos de câncer, estão a proteína p53, que pode ter a sua localização subcelular alterada devido a modificações pós-traducionais e mutações (Fabbro and Henderson 2003), e o fator de transcrição NF- κ B (*Nuclear Fator* κ B). NF- κ B é conhecido por ser essencial aos processos inflamatórios e ao desenvolvimento de diversas doenças (Karin and Greten 2005, Luo, Kamata et al. 2005), sendo a sua localização nuclear relacionada à tumorigênese. Assim, a alteração da localização subcelular desse fator de transcrição tem sido considerada um alvo terapêutico atrativo.

A desregulação da localização de proteínas sinalizadoras e, conseqüentemente, da dinâmica espaço-temporal de sinalização também está envolvida na tumorigênese, crescimento tumoral e metástase (Kau, Way et al. 2004, Wang and Hung 2005). Diversos supressores de tumor necessitam da habilidade de se localizar no núcleo para exercer a sua função e, assim, a sua localização citoplasmática pode servir como um mecanismo de inativação que leva à proliferação celular descontrolada e à origem da doença (Fabbro and Henderson 2003, Salmena and Pandolfi 2007, Turner and Sullivan 2008). Conseqüentemente, a localização incorreta de proteínas nucleares para o citoplasma, foi proposta como

um mecanismo geral de inativação de supressores de tumor (Kau, Way et al. 2004, Salmena and Pandolfi 2007).

Além de supressores de tumor, receptores tirosina-quinases, tradicionalmente conhecidos como proteínas ligadas a membrana, são capazes também de se translocar para o núcleo. A localização nuclear de EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), por exemplo, está correlacionada com diversos tipos tumorais e foi demonstrada estar envolvida na mediação da resistência a agentes anticâncer (revisado por Hung and Link 2011).

Modificações pós-traducionais, como a sumoilação e a ubiquitinação, também estão envolvidas na localização subcelular de diversas proteínas e no desenvolvimento tumoral de alguns tipos de câncer, entre eles o câncer de mama (Sehat, Tofigh et al. 2010, Sedek and Strous 2013, Bogachek, Chen et al. 2014). O processo de sumoilação já foi descrito como relacionado, inclusive, com o processo de EMT em carcinomas (Bogachek, De Andrade et al. 2015).

Outros exemplos de alteração da localização núcleo-citoplasma que se correlacionam com a formação tumoral, progressão ou resistência a tratamentos incluem BRCA1, APC, Beta-catenina, Survivina e Ciclina D1 (Turner and Sullivan 2008, Turner, Dawson et al. 2012, Hill, Cautain et al. 2014).

Assim, como a desregulação do transporte e, consequentemente, da localização intracelular de proteínas é um fator envolvido no desenvolvimento de diversas doenças, entre elas o câncer, a identificação destas alterações podem destacar novos alvos moleculares, para o diagnóstico (ex. proteínas secretadas de forma aberrante) ou mesmo para intervenção terapêutica (ex. identificando proteínas transportadoras aberrantes), e assim contribuir para o entendimento da biologia do câncer, seu diagnóstico e tratamento.

1.5. Proteômica multidimensional em biologia celular

Um dos maiores desafios na biologia celular consiste em não somente identificar proteínas nos diversos compartimentos celulares, mas também estudar como essa localização é alterada em resposta a perturbações ou a estímulos distintos. Apesar de técnicas de imagem disponíveis atualmente permitirem análises em alta resolução, elas frequentemente estão limitadas a poucas proteínas analisadas por vez. A análise do perfil de expressão gênica, mesmo sendo um método muito confiável para a classificação e determinação do prognóstico do câncer, possui também limitações significativas, relacionadas à incapacidade de analisar mecanismos de *splicing* alternativo do RNA e de identificar modificações pós-traducionais de proteínas ou mesmo a localização subcelular das mesmas, a qual possui papel fundamental na função da proteína. Métodos proteômicos baseados em espectrometria de massas estão emergindo como uma metodologia que permite tanto a quantificação quanto a localização de proteínas dentro das células, assim como a medida de alterações temporais e dinâmicas na localização das mesmas em diferentes condições celulares (Drissi, Dubois et al. 2013).

A combinação de métodos baseados em espectrometria de massas e protocolos de fracionamento tradicionais tem sido bastante utilizada na caracterização da organização subcelular. O conteúdo proteico de compartimentos subcelulares específicos pode, assim, ser identificado seguindo estratégias específicas de enriquecimento que concentram organelas e subcompartimentos celulares. A identificação de uma proteína em um compartimento específico possibilita um melhor entendimento da função tanto da proteína quanto do compartimento. De fato, a identificação de uma proteína com função conhecida

dentro de um compartimento específico é um forte indicador de que a função está tanto presente dentro do compartimento ou que a regulação da proteína pode ocorrer dentro dele. Da mesma maneira, a identificação de uma proteína não caracterizada em um compartimento celular pode fornecer pistas para a sua função (Drissi, Dubois et al. 2013). A identificação em larga escala de proteínas com métodos proteômicos está provando ser uma abordagem fundamental para a elucidação da função das proteínas, e é uma maneira eficiente de estudar a complexidade de mecanismos envolvidos na regulação de funções celulares (Walther and Mann 2010).

O processo de fracionamento subcelular para enriquecimento de compartimentos geralmente é baseado em diferenças de coeficientes de sedimentação e densidade de organelas. Dessa forma, os subcompartimentos podem ser separados por centrifugação por gradiente de densidade em tampões que preservam a integridade da organela, e a utilização de detergentes com diferentes eficiências de solubilização pode ser usada para enriquecer frações celulares específicas (Ramsby, Makowski et al. 1994, Sawhney, Stubbs et al. 2009). A mistura complexa de proteínas gerada pelo fracionamento geralmente é ainda mais fracionada para reduzir a complexidade da amostra, e permitir a identificação de proteínas de menor abundância. Para isso pode ser utilizada a técnica de SDS-PAGE seguida por digestão em gel para a geração dos peptídeos, ou mesmo a cromatografia de exclusão de tamanho ou troca catiônica anterior à digestão enzimática. A análise em espectrometria de massas em larga escala dessas amostras fracionadas permite então a identificação e quantificação das proteínas presentes em cada compartimento (Drissi, Dubois et al. 2013).

A abordagem de fracionamento celular para enriquecimento de compartimentos específicos tem sido uma área bastante explorada nos últimos anos, e tem proporcionado a geração de extensas listas de proteínas associadas com diferentes compartimentos (Yates, Gilchrist et al. 2005). Entretanto, a análise de organelas isoladas é complexa, uma vez que muitas proteínas estão presentes em múltiplos compartimentos (Gauthier and Lazure 2008), além de haver um transporte dinâmico de proteínas entre os compartimentos celulares, fundamental à função das mesmas. Assim, a identificação de uma proteína em uma organela específica não é suficiente, sendo necessário o estudo da distribuição quantitativa das proteínas através das organelas de maneira a obter uma imagem compreensível do sistema biológico e compreender o papel da alteração de localização na regulação dos processos biológicos (Drissi, Dubois et al. 2013). A medida precisa da abundância relativa das proteínas em diferentes locais e a avaliação de alterações na localização de proteínas em diferentes compartimentos, em diferentes condições e estímulos, são assim necessárias. Portanto, como destacado anteriormente, a identificação e quantificação de proteínas com alteração de localização durante o desenvolvimento tumoral, bem como possíveis modificações pós-traducionais relacionadas a este processo, pode fornecer novas abordagens, tanto para o diagnóstico, quanto para a terapia do câncer.

Dada a importância da localização proteica subcelular e do processo de EMT no desenvolvimento e metástase do câncer, a identificação de alterações proteômicas envolvidas na EMT bem como alterações de localização proteica nos subcompartimentos celulares, pode contribuir para a elucidação de novas vias de sinalização, processos biológicos e proteínas relevantes para o diagnóstico e tratamento do câncer.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar alterações proteômicas em diferentes modelos de indução da EMT em células de adenocarcinoma de mama e identificar proteínas relevantes para o processo de metástase e que possam contribuir para o diagnóstico e prognóstico do câncer de mama.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Induzir a EMT em células de adenocarcinoma de mama MCF7 por diferentes modelos, como a superexpressão do fator de transcrição (FT) SNAIL, o tratamento com o inibidor de histonas deacetilases SAHA e o tratamento com o fator de crescimento EGF.
- ✓ Caracterizar os processos de EMT através de análises morfológicas, ensaios de *western blotting* para marcadores relevantes da EMT, ensaios de migração celular, análise de vias de sinalização e avaliação do ciclo celular.
- ✓ Realizar o fracionamento subcelular para obtenção de frações enriquecidas em proteínas de núcleo, citoplasma e membrana.
- ✓ Coletar dados proteômicos por espectrometria de massas de alta resolução acoplados a cromatografia líquida (LC-MS/MS) da fração de membrana das

células induzidas à EMT pela superexpressão do FT SNAIL e processar os dados das três frações (núcleo, citoplasma e membrana) em comparação com as células MDA-MB-231.

- ✓ Identificar proteínas relevantes para o processo de EMT e metástase pela análise proteômica quantitativa global das células induzidas à EMT pela superexpressão do FT SNAIL.
- ✓ Validar as proteínas candidatas nos demais modelos de indução da EMT através de ensaios de *western blotting* e proteômica dirigida pelo Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM).
- ✓ Identificar similaridades e diferenças na expressão de proteínas entre os diferentes modelos de indução da EMT nas células MCF7.
- ✓ Identificar proteínas potencialmente translocadas entre os subcompartimentos celulares durante a EMT.

Material e Métodos

3. Material e métodos

3.1. Fluxograma da metodologia utilizada

Figura 4. Fluxograma da metodologia utilizada para a indução da EMT na linhagem MCF7 através de diferentes modelos e análise das alterações morfológicas e proteicas decorrentes.

3.2. Cultura de células de mamíferos

Todas as células foram cultivadas a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de ar em estufa úmida. Meio de cultura e PBS foram utilizados pré-aquecidos a 37 °C e para a contagem das células foi utilizada a câmara de Neubauer.

3.2.1. Cultivo celular da linhagem MCF7

A linhagem MCF7 (ATCC nº HTB-22™) é uma linhagem epitelial tumorigênica originada de adenocarcinoma de glândula mamária humana. As células são aderentes ao plástico e foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB, Thermo Scientific) e 100 U/mL de penicilina-estreptomicina (Gibco). A linhagem foi expandida em nosso laboratório para a formação de um banco de células, garantindo assim a possibilidade de replicação dos resultados. O processo de expansão celular foi realizado em garrafas de 75 cm² e as passagens celulares foram realizadas com solução Tripsina-EDTA 1%. A tripsina foi inativada pela adição de meio completo.

3.2.2. Cultivo celular da linhagem MDA-MB-231

A linhagem celular MDA-MB-231 (ATCC nº HTB-26™), também é uma linhagem epitelial tumorigênica originada de adenocarcinoma de glândula mamária humana aderente ao plástico. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*, Gibco) enriquecido com 10% de SFB (Thermo Scientific) e 100 U/mL de penicilina-estreptomicina

(Gibco). O processo de expansão celular foi realizado em garrafas de 75 cm² e as passagens celulares foram realizadas com solução Tripsina-EDTA 1%. A tripsina foi inativada pela adição de meio completo.

Para a análise proteômica através de LC-MS/MS, as células foram cultivadas em meio DMEM F12 contendo os isótopos pesados (¹³C₆) do aminoácido lisina (*Kit SILAC™ Advanced D-MEM/F-12 Flex*, Invitrogen) – abordagem SILAC (*Stable Isotopic Labeling in Cell Culture*). As células foram expandidas por, no mínimo, quatro gerações a fim de garantir um mínimo de 98% de incorporação dos isótopos e minimizar os erros de quantificação relativa, de acordo com o protocolo original do método (Ong, Blagoev et al. 2002).

3.3. Modelos de indução da EMT

A indução da EMT para avaliação de proteínas envolvidas na patogênese do câncer foi realizada a partir de diferentes protocolos desenvolvidos, a fim de avaliar semelhanças e diferenças entre os processos.

3.3.1. Superexpressão do fator de transcrição SNAIL

3.3.1.1. Transfecção em células HEK-293FT (Método Lipídios Catiônicos) para produção lentiviral

A monocamada de células HEK-293FT, em confluência de aproximadamente 60%, foi transfectada com os plasmídeos lentivirais utilizando-se *Lipofectamine™* – Invitrogen Life Technologies (o preparado comercial de lipídios catiônicos, lipofectamina), de acordo com as recomendações do fabricante.

Os plasmídeos virais utilizados foram o pM2D-VSV-G, que codifica o envelope do vírus da estomatite vesicular (VSV-G); o pDR 8.91, que codifica o capsídeo viral e o pLVXR, contendo o gene de interesse *SNAIL* e a proteína fluorescente verde GFP, como marcador para seleção (Anexo A).

Vinte e quatro horas antes da transfecção, um total de 2×10^6 células foi plaqueado em placas de cultura de 10 cm. O processo de transfecção foi realizado com o reagente *LipofectamineTM 2000* (Invitrogen Life Technologies) utilizando-se um total de 2 µg de DNA pDR 8.91 e pMD2.VSV-G (na proporção 4:1) e 2 µg de pLVXR-SNAIL. Após 4-6 horas da realização da transfecção, as células foram incubadas com meio fresco em 5% de CO₂ a 37°C. Após 48 e 72 horas da transfecção o sobrenadante foi coletado, filtrado (filtro 0,45 µm PVDF - Millipore) para a retirada dos restos celulares e utilizado para a transdução da linhagem celular MCF7.

3.3.1.2. Transdução da linhagem celular MCF7

Um total de 8×10^4 células foi plaqueado em placa de 6 poços (9 cm²) e no dia seguinte foi dado início ao processo de transdução. Em cada poço foi adicionado 1-2 mL de sobrenadante viral recém-coletado e 5,5 µg/ml de polibreno (Sigma Aldrich, cat #H9268) - auxilia na ligação da superfície negativa do vírus com a membrana celular. Em seguida foi realizada a incubação em câmara úmida de CO₂ por 4-6 horas. Foram realizados dois ciclos de transdução, com tempo de incubação de 24 horas. Após esse período as células foram mantidas em cultura por cinco dias para a indução da EMT e foi observada a expressão da proteína fluorescente verde GFP. Células transduzidas com partículas virais contendo o vetor pLVXR vazio, ou

seja, sem o gene de interesse, assim como células não transduzidas, foram utilizadas como controle.

3.3.1.3. Análise por citometria de fluxo das células positivas para GFP

O plasmídeo lentiviral pLVXR possui uma sequência codificadora para a proteína fluorescente verde (GFP) da *Aequorea victoria*, a qual foi utilizada para avaliação da porcentagem de células transduzidas através de citometria de fluxo (FACSCalibur – BD Biosciences). Para a análise, as células modificadas foram tripsinizadas (Tripsina/EDTA) e ressuspensas em 200 µL de PBS. Células não transduzidas foram utilizadas como controle negativo.

3.3.2. Tratamento com o inibidor de histonas deacetilases SAHA

A partir de resultados gerados pela indução da EMT através da superexpressão de SNAIL, foi desenvolvido um novo modelo indução do processo através da inibição química de histonas deacetilases (HDACs) pela utilização do reagente SAHA (*Suberoylanilide hydroxamic acid*, Sigma Aldrich, cat #SML0061), também conhecido como Vorinostat, o qual atua inibindo ambas as classes I e II de HDACs. Para isso, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 10 cm (1 x 10⁶ células por placa), cultivadas em meio contendo 10% SFB por 24h e, em seguida, foram adicionados 0,5-10 µM do inibidor. A cada 24h foi adicionado novo meio contendo o inibidor e as células foram acompanhadas por 24 ou 48h, de maneira a avaliar alterações morfológicas e proteicas decorrentes.

3.3.3. Tratamento com fatores de crescimento

A indução da EMT nas células MCF7 foi também realizada através do tratamento com fatores de crescimento. Para isso, as células foram plaqueadas em placas de 10 cm (1×10^6 células por placa), mantidas em meio de cultura contendo 10% SFB por 24h e em seguida cultivadas em meio contendo 1% de SFB por mais 24h. Em seguida, foram adicionados 5, 10, 20, 50 ou 100 ng/ml de TGF β 1 (rhTGF- β 1, R&D Systems, cat #240-B), TGF β 2 (rhTGF- β 2, R&D Systems, cat #302-B2) ou EGF (rhEGF, R&D Systems, cat #236-EG). A cada 24h foi adicionado novo meio contendo os fatores de crescimento e as células foram acompanhadas por 24, 48 ou 72h, de maneira também a avaliar alterações morfológicas e a indução do processo de EMT.

Experimentos de avaliação temporal (*timecourse*) das células durante a indução da EMT por fatores de crescimento ou pelo inibidor químico SAHA foram também realizados. Para isso, as células foram coletadas em diferentes tempos (0h, 2h, 4h, 8h, 16h, 24h, 48h e 72h) e acompanhadas quanto a expressão de proteínas relevantes para o processo de EMT.

3.4. Ensaio de migração celular

As células MCF7 induzidas à EMT e as células controle foram submetidas ao ensaio funcional de migração celular (*wound healing assay*). Para monitorar a mobilidade das células MCF7, estas foram plaqueadas em placas de cultura de 6 poços (2×10^5 células/poço) e induzidas à EMT. Após atingirem a confluência de

100% foi utilizada uma ponteira estéril de 1 mL para fazer uma falha na monocamada de células em forma de linha reta. As células desprendidas foram removidas com três lavagens com PBS e as células aderentes, induzidas ou não à EMT, foram mantidas por 48h em condições normais de cultura. Três regiões de falha em cada poço foram fotografadas no início e ao final do experimento, com o objetivo de monitorar a migração celular. O experimento foi realizado em triplicata.

3.5. Ensaio de proliferação celular

Para a análise da proliferação celular, as células MCF7 controle ou induzidas à EMT foram tripsinizadas, lavadas com PBS gelado e, em seguida, centrifugadas por 5 minutos a 300 xg. As células foram então ressuspensas com etanol gelado 80% e incubadas a -20 °C por 2 horas. Posteriormente, as células foram lavadas 2 vezes com PBS contendo 1% SFB e centrifugadas por 5 minutos a 300 xg a 5 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram então ressuspensas em 100 µL de PBS contendo 20 µL de anticorpo anti-Ki67 (FITC Mouse Anti-Ki-67 Set, BD Pharmingen™, cat #556026) e incubadas a temperatura ambiente por 20-30 minutos. Em seguida, as amostras foram lavadas com 2 mL de PBS, centrifugadas por 5 minutos a 300 xg a 5 °C, ressuspensas em 200 µL de formol 0,1% e analisadas através de citometria de fluxo em equipamento FACS Calibur (BD Biosciences). Os dados coletados foram analisados com o auxílio do software FlowJo (Tree Star Inc).

3.6. Ensaio de ciclo celular

A análise do ciclo celular foi realizada através da incorporação de BrdU (bromodeoxyuridine) detectada por citometria de fluxo utilizando o kit APC BrdU flow kit (BD Pharmingen™ APC BrdU Flow Kit, cat # 552598, Pharmingen), de acordo com as instruções do fabricante. Neste método, BrdU (uma pirimidina, análoga à timidina precursora do DNA) é incorporada pelo DNA recém-sintetizado pelas células, sendo um marcador da síntese e, conseqüentemente, da fase S do ciclo celular. O BrdU incorporado foi marcado com anticorpo anti-BrdU conjugado ao fluorocromo allophycocyanin (APC) e analisado por citometria de fluxo. As células foram incubadas com BrdU 1 μ M por 30 minutos, em seguida permeabilizadas, tratadas com DNases (já que o anticorpo só reconhece fita simples de DNA), marcadas com anti-BrdU APC, o DNA total foi corado com corante específico denominado 7-amino-actinomycin D (7-AAD), e submetidas à análise no citômetro de fluxo (FACScalibur, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Diego, CA, USA) usando o Cell Quest Software (BD BioSciences, San Diego, CA, USA).

3.7. Análise por *High Content Screening* (HCS)

Para a análise da indução da EMT através da técnica de *High Content Screening*, as células MCF7 foram plaqueadas em placas de 96 poços (4×10^3 células por poço) e mantidas em cultura em meio completo por 24h. Em seguida, o meio foi substituído por meio contendo 1% SFB e as células foram mantidas em cultivo por mais 24h para, posteriormente, ser realizado o tratamento com o fator de crescimento EGF 10 ng/mL por 48h. Posteriormente, o meio de cultura foi retirado,

os poços foram lavados duas vezes com 100 µL de PBS e as células foram fixadas com solução do formol 4% por 20 minutos. Em seguida, os poços foram lavados com PBS para adição de glicina 0,1 M por 15 minutos e foi realizado o bloqueio com a adição de SFB 1% por 30 minutos. Quando necessária, foi realizada a permeabilização celular anterior ao bloqueio, utilizando solução de triton 0,25% em PBS por 10 minutos. Posteriormente, foi realizada a incubação *overnight* com os anticorpos selecionados (Tabela 1). No dia seguinte, foram adicionados os anticorpos secundários específicos marcados com Dylight488 ou Dylight594 e os marcadores de núcleo (Hoechst 33342) e citoplasma (CellMask® Blue) por 45 minutos (Tabela 1). Para a obtenção das imagens, foi utilizado o microscópio de fluorescência invertido automatizado do sistema de HCS ImageXpress.e a análise foi realizada utilizando o software Cell Profiler, no qual foi realizada a segmentação do núcleo e citoplasma e as quantificações dos anticorpos, além da análise dos parâmetros morfológicos celulares, como área, compacidade, excentricidade, quantidade de células vizinhas, solidez e área de contato celular.

Tabela 1. Lista de anticorpos utilizados para marcação das células MCF7 e análise através de HCS.

Anticorpos e diluições
anti-mouse IgG (1:300, conjugated with DyLight488, Thermo Scientific, #35503)
anti-rabbit IgG (1:300, conjugated with DyLight594, #35561)
Hoechst 33342 (1µM, Thermo Fisher, #H1399)
CellMask®Blue (0,1:1000, Life Technologies, #H32720)
HDAC1 (1:100, Camundongo, Monoclonal, Cell Signaling, #5356)
SNAIL/SLUG (1:500, Coelho, Policlonal, Abcam, #ab180714)

3.8. Extração e quantificação de proteínas de extrato total

As linhagens celulares induzidas ou não à EMT foram submetidas à extração de proteínas totais e análise através de *western blotting* e monitoramento de reações múltiplas (MRM) para caracterização do processo.

Para isso, as placas de células (10 cm) tratadas e controle foram raspadas com o auxílio de um *cell scraper* e lavadas três vezes com PBS. O pellet foi ressuspenso em 150 µL de tampão de extração (uréia 8M e tris 0,1M, pH 8,0) contendo inibidores de proteases (Sigma Aldrich, cat #P8340) e fosfatases (ortovanadato de sódio, Sigma Aldrich, cat #S6508). Foram realizados 3 ciclos de sonicação em sonicador de banho (UltraSonic Cleaner 750, Unique, São Paulo, Brasil) a 45 W por 5 minutos cada, intercalando-se com agitação em vórtex e resfriamento da amostra em banho de gelo. Não foi observado aquecimento das amostras. As amostras foram centrifugadas a 20.000 xg por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi coletado e quantificado através do método de Bradford (Quick Start Bradford Kit, Biorad), de acordo com as instruções do fabricante.

3.9. Fracionamento subcelular

3.9.1. Enriquecimento de frações nucleares, citoplasmáticas, de membrana e de proteínas secretadas

As células MCF7 induzidas à EMT foram também submetidas ao fracionamento subcelular para obtenção de frações enriquecidas em proteínas de

membrana, citoplasma e núcleo, de maneira a avaliar possíveis alterações de compartimentos celulares decorrentes da indução do processo.

O fracionamento subcelular foi preparado conforme descrito por ADAM e cols. (Adam, Yang et al. 2008). Aproximadamente 1×10^7 células foram lavadas 3 vezes com tampão PBS gelado e raspadas da placa com auxílio do *cell scraper* em tampão hipotônico M (HEPES 50 mM pH 7,4, NaCl 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EDTA 0,1 mM, Na_3VO_4 1 mM, NaF 1 mM e $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ 1 mM) contendo inibidores de proteases (Sigma Aldrich, cat # P8340) e fosfatases (ortovanadato de sódio, Sigma Aldrich, cat #S6508). As amostras foram agitadas por 20 segundos, passadas por uma seringa 20 vezes e homogeneizadas (Homogeneizador, Modelo D-130, Biosystems) por 30 segundos. O *pellet* nuclear foi sedimentado por centrifugação a 500 xg durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi centrifugado a 16.000 xg por 20 minutos a 4 °C. Este sobrenadante coletado foi denominado fração citoplasmática e o *pellet* foi tratado com tampão A (ácido 2-(*N*-morpholino)-etano sulfônico 25 mM, NaCl 150 mM, pH 6.5) contendo Triton X-100 1% (v/v), inibidores de proteases e fosfatases, incubado por 60 minutos a 4°C e depois centrifugado a 16.000 xg por 20 minutos a 4°C. Este sobrenadante coletado foi denominado fração de membrana. A extração das proteínas do *pellet* nuclear foi realizada em solução de lise contendo uréia 8 M/CHAPS 2% e inibidores de protease e fosfatase. Foram feitos 3 ciclos de sonicação em sonicador de banho (UltraSonic Cleaner 750, Unique) a 45 W por 5 minutos cada, intercalando-se a agitação em vórtex e resfriamento da amostra em banho de gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20.000 xg por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante, contendo a mistura de proteínas nucleares, foi coletado.

Para a análise das proteínas secretadas, o meio de cultura das placas de células MCF7 induzidas ou não à EMT foi coletado e foram adicionados inibidores de protease e fosfatase. Em seguida, o meio de cultura foi centrifugado a 300 xg por 5 minutos e o sobrenadante foi coletado, filtrado em filtro de 0,45 µm, e armazenado em freezer até o momento do preparo da amostra para análise.

3.9.2. Experimentos de controle da separação das frações

As frações oriundas dos subcompartimentos celulares foram caracterizadas através de experimentos de *western blotting* utilizando anticorpos específicos para proteínas relacionadas a compartimentos celulares específicos, como a proteína LYN (Cell Signaling cat #2732), associada à membrana plasmática; Fibrillarin (Cell Signaling cat #2639), que está associada à fração nuclear e GAPDH (Cell Signaling, cat #2118), um marcador citoplasmático, assim como análise através de MRM para detecção de peptídeos específicos representativos de proteínas associadas aos subcompartimentos celulares.

3.10. Western blotting

Para a análise através de *western blotting*, as linhagens celulares induzidas ou não à EMT foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% ou 7,5% e transferidas para membranas de PVDF (GE) em sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BioRad).

A transferência foi realizada em tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% por 1 hora, sob voltagem constante de 100 V e à 4°C. Para bloquear sítios não

específicos, as membranas foram incubadas em tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1%, pH 7,6 (TBS-T) com 5% (m/v) de leite desnatado em pó por 1h de acordo com as instruções do fabricante do anticorpo. Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes por 10 minutos com TBS-T e incubadas com os anticorpos primários na diluição adequada *overnight* a 4°C sob agitação (Tabela 2). Em seguida, as membranas foram novamente lavadas 3 vezes por 10 minutos com TBS-T e incubadas por 1h à temperatura ambiente sob agitação com os anticorpos secundários na diluição 1:2000 (#7074 ou #7076, Cell Signaling). A detecção foi realizada utilizando o *kit* ECL Prime *Western Blotting Detection Reagents* (GE), de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 2. Lista de anticorpos primários e suas diluições utilizados nos ensaios de *western blotting* durante o desenvolvimento do estudo.

Anticorpo	Fonte	P/M (*)	Código	Peso (kDa)	Fabricante	Diluição
Acetil-histona H2B (Lys20)	Coelho	P	#2571	14	Cell Signaling	1:1000
ACTB (Beta-actina)	Coelho	M	#4970	45	Cell signaling	1:1000
AKT	Coelho	P	#9272	60	Cell signaling	1:1000
p-AKT (Ser 473)	Coelho	M	#4060	60	Cell signaling	1:1000
ARHGDIB (D4 GDI)	Coelho	M	#ab181252	23	Abcam	1:1000
ARPC2	Coelho	M	#ab133315	34	Abcam	1:1000
CAV1 (Caveolina 1)	Coelho	M	#3267	21,24	Cell signaling	1:1000
CDH1 (E-caderina)	Coelho	M	#3195	135	Cell signaling	1:1000
CDK1 (CDC2)	Camundongo	M	#9116	34	Cell signaling	1:1000
CNN3	Coelho	P	#ab204365	36	Abcam	1:250
CTNNB1 (Beta-Catenina)	Coelho	M	#8480	92	Cell signaling	1:1000
EGFR	Coelho	M	#2646	175	Cell signaling	1:1000

p-EGFR (Tyr1068)	Coelho	M	#3777	175	Cell signaling	1:1000
ERα	Coelho	M	#8644	66	Cell signaling	1:1000
Fibrillarin	Coelho	M	#2639	37	Cell signaling	1:1000
GAPDH	Coelho	M	#2118	37	Cell signaling	1:1000
G6PD	Coelho	M	#12263	58	Cell signaling	1:1000
HDAC1	Coelho	P	#2062	62	Cell signaling	1:500
HER2/ErbB2	Coelho	M	#4290	185	Cell signaling	1:1000
ITGB1 (Integrina β1)	Coelho	M	#9699	115,135	Cell signaling	1:1000
LGALS1 (Galectina 1)	Coelho	M	#12936	15	Cell signaling	1:1000
LONP1	Coelho	P	HPA002192	120	Sigma Aldrich	1:200
LYN	Coelho	M	#2796	56	Cell signaling	1:1000
MARCKS	Coelho	M	#5607	75	Cell signaling	1:1000
MEK 1/2	Coelho	M	#8727	45	Cell signaling	1:1000
p-MEK 1/2 (Ser 217/221)	Coelho	M	#3958	45	Cell signaling	1:1000
p21 Waf1/Cip1	Coelho	M	#2947	21	Cell signaling	1:1000
p27 Kip1	Coelho	M	#3686	27	Cell signaling	1:1000
p-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Coelho	M	#4370	44,42	Cell signaling	1:1000
PRDX3	Coelho	P	#ab73349	23	Abcam	1:1000
p-Rb (Ser807/811)	Coelho	M	#8516	110	Cell signaling	1:1000
SNAIL	Coelho	M	#3879	29	Cell signaling	1:500
SOD2	Coelho	M	#13194	22	Cell signaling	1:1000
TJP1 (ZO-1)	Coelho	M	#8193	220	Cell signaling	1:1000
β-Tubulina	Coelho	M	#2128	55	Cell signaling	1:1000

3.11. Análise da via de sinalização de EGFR

As células MCF7 tratadas com o fator de crescimento EGF 10 ng/mL e as células controle (não tratadas) foram submetidas à análise da ativação da via de sinalização de EGFR através do *array* de proteínas da via (*PathScan® EGFR Signaling Antibody Array Kit*, #12622, Cell Signaling), de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente, 100 µL de *Array Blocking Buffer* foram aplicados em cada poço da placa do *array* e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente, em um shaker orbital. Em seguida, o tampão foi retirado e foram adicionadas 75 µg de proteína total de cada amostra de células MCF7 tratadas com o fator de crescimento EGF 10 ng/mL (0h, 15 min, 24 e 48h) e não tratadas (controle), e a placa foi incubada *overnight* a 4 °C. Posteriormente, as amostras foram removidas e foram realizadas quatro lavagens de 5 minutos cada com 100 µL de *Array Wash Buffer* em cada poço. Em seguida, foram adicionados 75 µL de *Detection Antibody Cocktail A* para o sub-array A e 75 µL de *Detection Antibody Cocktail B* para o sub-array B, e a placa foi mantida a temperatura ambiente por 1h em shaker orbital. Após a incubação, foram realizadas novamente quatro lavagens de 5 minutos cada com 100 µL de *Array Wash Buffer* em cada poço e foram adicionados 75 µL de *HRP-linked Streptavidin* em cada poço. A placa foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente em shaker orbital e posteriormente foram realizadas mais quatro lavagens com o *Array Wash Buffer*, conforme descrito anteriormente. A detecção foi realizada utilizando o *kit ECL Prime Western Blotting Detection Reagents* (GE), de acordo com as instruções do fabricante.

3.12. Análise proteômica dirigida

As linhagens epiteliais de mama induzidas ou não à EMT e fracionadas em subcompartimentos celulares, assim como o extrato total celular, foram avaliadas por espectrometria de massas dirigida, através da metodologia de monitoramento de reações múltiplas (MRM).

3.12.1. *Preparo da amostra para MRM*

As amostras fracionadas nos subcompartimentos celulares (20 µg cada) e extrato total celular (50-200 µg cada) foram, inicialmente, reduzidas pela adição de Dithiothreitol (DTT) na proporção 1:1 (massa de proteínas:massa de DTT) por 30 min à 37 °C. Em seguida, foi realizada a alquilação com Iodoacetamida (IAA) na proporção 1:3 (massa de proteínas:massa de IAA) à temperatura ambiente por 30 minutos no escuro. As amostras foram então diluídas com solução de Tris 100 mM, pH 8,5, para redução da concentração de uréia na solução (1,5 M) e adição de tripsina na proporção 1:25 (enzima:substrato) *overnight* por 18h a 37 °C. As amostras foram purificadas em colunas de extração de fase-reversa (Oasis – Waters), conforme instruções do fabricante, secas em Speedvac e reconstituídas em solução de 5% acetonitrila/0,1% ácido fórmico para análise por MRM.

3.12.2. *Desenvolvimento de métodos de MRM*

A mistura de peptídeos resultante da digestão com tripsina foi analisada através da metodologia de MRM, para detecção de alterações na localização de

proteínas específicas nos subcompartimentos celulares obtidos no processo de fracionamento, assim como a expressão no extrato total celular.

Para isso, peptídeos proteotípicos, representando as proteínas de interesse foram selecionados para monitoramento por MRM. Para a escolha dos peptídeos proteotípicos foram considerados critérios de massa/carga, sequência, qualidade de ionização e fragmentação por CID (*collision induced dissociation*). A presença de aminoácido de interesse específico, que possa facilitar, por exemplo, a marcação isotópica, também foi considerado como critério de seleção de peptídeos proteotípicos. Foram, ainda, utilizados como referência bancos de dados específicos e disponíveis publicamente como o SRMATlas (www.srmatlas.org), de iniciativa do Systems Biology Institute. Neste tipo de banco, são possíveis comparações de nossos dados com dados para as mesmas proteínas/peptídeos obtidos em outros laboratórios e a partir de outras amostras, a fim de dirigir a melhor escolha dos íons derivados das fragmentações dos peptídeos proteotípicos (transições) para monitoramento quantitativo eficiente. Utilizamos ainda dados obtidos da análise proteômica de larga escala das alterações durante a EMT promovida pela superexpressão do fator de transcrição SNAIL (Palma et al, 2016). Vários dos peptídeos proteotípicos selecionados foram adquiridos comercialmente, marcados isotopicamente [$^{13}\text{C}_6$ $^{15}\text{N}_2$ Lys ou $^{13}\text{C}_6$ $^{15}\text{N}_2$ Arg] para serem utilizados como padrões internos. Os dados foram coletados em um espectrômetro de massas XevoTQS-Triplo Quadrupolo acoplado a Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência (UPLC-MS/MS). A intensidade dos íons fragmentos principais produzidos por CID para os peptídeos proteotípicos foram utilizadas para quantificação relativa das proteínas nas amostras. Todo este processo foi auxiliado pelo *software open source* Skyline

(MacLean, Tomazela et al. 2010), voltado para o desenvolvimento de ensaios e análise de dados MRM.

3.13. Análise proteômica em larga escala da EMT

3.13.1. Análise proteômica por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução

A aquisição dos dados proteômicos das frações de núcleo e citoplasma das células induzidas à EMT pela superexpressão de SNAIL, desenvolvidos durante o período de mestrado da aluna, foi realizada em instrumentos disponíveis na Central Analítica do Instituto de Química de São Carlos – USP, sob coordenação do Professor Dr. Emanuel Carrilho (Palma 2014). A aquisição dos dados da fração de membrana das mesmas células, desenvolvido durante o período de doutorado, foi realizada no laboratório da Professora Sharon Pitteri, Universidade de Stanford.

Resumidamente, os extratos enriquecidos de proteínas de membrana foram separados por SDS-PAGE e o gel foi cortado em 6 fragmentos que foram individualmente digeridos por tripsina utilizando protocolo de digestão *in-situ* (Palma 2014). As frações peptídicas foram ressolubilizadas em 15 µL de solução contendo ACN 3%, ácido fórmico 0,1% e uréia 0,5M. Dez microlitros (10 µL) de cada amostra foram injetados individualmente em sistema de cromatografia líquida capilar (ThermoScientific), utilizando coluna de 25 centímetros (75 µm ID). A cromatografia foi desenvolvida com gradiente linear de 5 a 35% de acetonitrila/ácido fórmico 0,1% por 90 minutos a um fluxo de 250 nL/min. O sistema cromatográfico foi acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução do tipo LTQ-Orbitrap Elite (Thermo-Finnigan) para aquisição de dados.

Os espectros foram adquiridos em modo dependente de dados na faixa de m/z de 400 a 1800 e os 10 íons mais abundantes de carga +2 ou +3 de cada espectro MS foram selecionados para fragmentação por CID (dissociação induzida por colisão) e análise MS/MS. Uma janela de exclusão de 45 segundos foi utilizada para eliminar redundância de sequenciamento de peptídeos abundantes. Os parâmetros do espectrômetro de massas foram: tensão de capilaridade de 2,5KV, temperatura de capilar 200°C, resolução de 100.000 e FT-target valor de 2.000.000.

Os dados foram processados pelo pacote de processamento de dados proteômicos *Labkey Server* (Rauch, Bellew et al. 2006) que fornece automaticamente a lista de proteínas identificadas e também a quantificação relativa de experimentos SILAC. Como banco de dados foi utilizado o *Swiss Prot Human Proteome* (V. Dez 2014) para identificação dos peptídeos e dos grupos de proteínas.

A análise quantitativa baseou-se nos peptídeos contendo lisinas com isótopos leve e pesado. As informações quantitativas foram extraídas automaticamente usando o programa “Q3”, desenvolvido para obter a relação de quantificação para cada par de peptídeos identificados por MS/MS que contém lisina (Faca, Coram et al. 2006). Ao final, foi computada a média das razões dos peptídeos pesado/leve observado para cada proteína. Também foram obtidos os desvios-padrão para aquelas proteínas que apresentaram mais que uma razão quantitativa.

Para geração das listas de identificação e quantificação de proteínas, o critério de qualidade dos peptídeos identificados foi obtido pelo algoritmo Peptide Prophet (Keller, Nesvizhskii et al. 2002). Somente peptídeos que atingiram uma taxa de erro inferior a 1% foram agrupados na sequência das proteínas utilizando-se o algoritmo Protein Prophet (Nesvizhskii, Keller et al. 2003), que também resolveu o problema de inferência de proteínas.

3.14. Análise de bioinformática

A partir dos dados de identificação e quantificação das proteínas, foram realizadas análises de enriquecimento de classes funcionais, funções moleculares e compartimentos celulares utilizando ontologias gênicas, ou análise de redes de proteínas. Para tal, foram utilizados softwares disponíveis gratuitamente, como String (<http://string-db.org/>)(Franceschini, Szklarczyk et al. 2013) e Panther (<http://www.pantherdb.org/>)(Mi, Muruganujan et al. 2013). Também foi acessado o banco de dados *Human Protein Atlas* (www.proteinatlas.org) (Uhlen, Oksvold et al. 2010), para avaliação imunohistoquímica de algumas proteínas detectadas como reguladas pela indução da EMT quanto a sua presença em cortes histológicos de câncer de mama e tecido epitelial normal de mama. O banco de dados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA, <https://cancergenome.nih.gov/>) também foi utilizado para avaliação da expressão e correlação gênica em amostras clínicas de câncer.

3.15. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software* Graphpad Prism, versão 6.0 (Graphpad Prism Software Incorporation). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de experimentos em triplicata. O teste “t” de Student, foi utilizado para comparação entre um único grupo tratado e seu respectivo controle. Os resultados com valor de $*p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

4. Resultados

4.1. Indução da EMT pela superexpressão do fator de transcrição SNAIL

O primeiro tipo de indução da EMT utilizado neste trabalho foi realizado através da superexpressão do FT SNAIL (SNAI1), um dos reguladores chave do processo. Esse procedimento, desenvolvido e padronizado durante o período de mestrado da aluna e aprofundado durante o doutorado, utilizou-se dos vetores lentivirais pLVXR-SNAIL, pLVXR-Empty (vetor vazio) e também os vetores pM2D-VSV-G (codifica o envelope viral) e pDR 8.91 (codifica o capsídeo viral) (Anexo A).

Inicialmente foi realizada a produção das partículas lentivirais contendo o FT SNAIL através da transfecção de células HEK-293FT pelo método de lipídeos catiônicos. Posteriormente, o sobrenadante celular, onde estão presentes os vírus produzidos, foi coletado para ser utilizado imediatamente nas transduções da linhagem celular MCF7. Foram realizados dois ciclos de transdução e as células foram mantidas em cultura por um período de cinco dias para a indução da EMT. A expressão de GFP foi utilizada para avaliação do processo de transdução através das técnicas de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência (Figura 5).

Figura 5. Morfologia das células MCF7 induzidas à EMT pela superexpressão do FT SNAIL

As células MCF7 foram transduzidas por vetores lentivirais para a superexpressão do FT SNAIL (SNAIL1) e cultivadas por um período de 5 dias. A proteína fluorescente GFP foi utilizada para avaliação da transdução. Após a superexpressão de SNAIL, é possível observar alterações morfológicas nas células, com a aquisição de um formato mais fibroblastóide. MCF7-CTRL: células MCF7 controle, não transduzidas; MCF7-EMPTY: células MCF7 transduzidas com o vetor vazio; MCF7-SNAIL: células MCF7 transduzidas pelo vetor contendo o FT SNAIL.

Conforme demonstrado pela Figura 5, após a superexpressão do FT SNAIL, as células tiveram uma alteração de morfologia, adquirindo um formato mais fibroblastóide e havendo uma diminuição do contato intercelular.

Após a indução e caracterização do processo de EMT, realizado através de *western blotting* para marcadores epiteliais e mesenquimais, PCR em tempo real, ensaio de migração e análise da morfologia celular (Palma 2014, Palma, Grassi et al. 2016, Palma, Grassi et al. 2016), foi realizada uma análise proteômica quantitativa global das proteínas presentes em diferentes frações subcelulares (Palma, Grassi et al. 2016). Para isso, foi utilizada a metodologia SILAC (*Stable*

Isotope Labeling by Amino Acids in Cell culture), na qual uma linhagem de referência foi selecionada – MDA-MB-231 – e cultivada em meio contendo os isótopos pesados do aminoácido lisina ($^{13}\text{C}_6$ LYS). Após a incorporação do aminoácido nas proteínas celulares, o extrato de proteínas foi coletado, quantificado e misturado em quantidades iguais (300 μg) com os extratos proteicos das células MCF7-CTRL e MCF7-SNAIL. Posteriormente, os extratos foram submetidos ao fracionamento subcelular para obtenção de frações enriquecidas em proteínas de núcleo, citoplasma e membrana, para análise global através de espectrometria de massas. A qualidade do fracionamento subcelular foi confirmada através de *western blotting* utilizando anticorpos específicos para cada compartimento (Figura 6).

Figura 6. Caracterização por *western blotting* do fracionamento subcelular da linhagem MCF7. Anticorpos anti-β-tubulina, marcação para citoplasma, anti-histona H2B acetilada (Lys 20), marcação para núcleo e anti-Lyn, marcação para membrana. Núcleo: fração enriquecida em proteínas de núcleo; Citoplasma: fração enriquecida em proteínas de citoplasma; Membrana: fração enriquecida em proteínas de membrana.

Para validar nossa estratégia proteômica de utilização do extrato total de MDA marcado com isótopo pesado servir como uma referência quantitativa, um experimento controle foi realizado (Figura 7). Para isso, uma versão resumida do *workflow* experimental foi utilizada para avaliar a estratégia quantitativa. Um total de

50 µg de extrato total de células MDA-MB-231 marcadas com o isótopo pesado do aminoácido lisina ($^{13}\text{C}_6$) foi misturado com 50 µg de células MDA-MB-231 marcadas com o isótopo leve, crescidas em meio DMEM comum. O experimento foi analisado em duplicata no mesmo sistema de LC-MS/MS e utilizando os mesmos parâmetros experimentais. Um outro controle foi realizado de maneira a comparar as células MDA-MB-231 marcadas com o isótopo pesado com as células MCF7 cultivadas em meio DMEM comum (isótopo leve). As razões das proteínas identificadas em ambas as duplicatas foram comparadas considerando a amostra MDA-MB-231 pesada como referência, e a análise revelou que mais de 95% das proteínas de ambos os experimentos apresentaram uma variação de expressão abaixo de 2 (aumentadas ou diminuídas). Além disso, algumas das proteínas que apresentaram uma variação superior a 2 (aumentadas ou diminuídas) representam contaminantes comuns, como queratinas e proteínas do soro como transferrina ou alpha-2-glycoprotein.

A abordagem proteômica utilizada permitiu não somente a comparação das proteínas alteradas após a indução da EMT pela superexpressão do FT SNAIL, mas também a comparação dessas células com as células MDA-MB-231, as quais são consideradas mais agressivas e apresentam uma morfologia fibroblastóide. Assim, foram comparadas as proteínas diferencialmente expressas tanto nas células MCF7-SNAIL quanto nas células MDA-MB-231 em comparação com as células MCF7 controle (não induzidas à EMT).

Figura 7. Experimento controle realizado para validar o uso da célula MDA-MB-231 marcada com o isótopo pesado do aminoácido lisina como uma referência para a análise proteômica quantitativa.

Razão em Log2 das proteínas identificadas por LC-MS/MS em dois experimentos independentes: MDA-MB-231 leve/MDA-MB-231 pesada e MCF7 leve/MDA-MB-231 pesada.

Para a coleta dos dados por LC-MS/MS das células das células MCF7-CTRL e MCF7-SNAIL, as frações enriquecidas em proteínas de núcleo, citoplasma e membrana foram fracionadas através de SDS-PAGE e as raias, referentes a cada amostra, foram divididas em 6 pedaços cada, gerando um total de 36 frações para análise proteômica quantitativa global subsequente. Após a digestão em gel das amostras com a utilização de tripsina, as mesmas foram analisadas através de LC-MS/MS. O preparo e coleta dos dados das frações de núcleo e citoplasma foram realizados durante o período de mestrado da aluna (Palma 2014), enquanto a coleta dos dados da fração de membrana foi realizada durante o período de doutorado. Ao todo, aproximadamente 600.000 scans de MS/MS foram coletados, proporcionando a identificação confiável de 4298 proteínas (representadas por nomes únicos de

genes) (Anexo B) com menos de 1% de *False Discovery Rate* (FDR), distribuídas entre as frações conforme a Figura 8 a seguir. Como pode ser observado, somente 43% de todas as proteínas foram identificadas nos 3 subproteomas, e as proteínas detectadas em amostras únicas contribuíram em 8 a 18% com mais identificações.

Figura 8. Diagrama de Venn das proteínas identificadas por LC-MS/MS nos subcompartimentos (núcleo, citoplasma e membrana) das células MCF7 controle e MCF7 superexpressando SNAIL. A metodologia de fracionamento permitiu a identificação confiável de 4298 proteínas com menos de 1% FDR, distribuídas entre as subfrações celulares de núcleo, citoplasma e membrana. Núcleo: fração enriquecida em proteínas de núcleo; Citoplasma: fração enriquecida em proteínas de citoplasma; Membrana: fração enriquecida em proteínas de membrana.

Os dados gerados foram também classificados através da análise de ontologias gênicas (*Gene Ontology*) e foram observadas distribuições diferenciais de anotações entre as amostras, sugerindo um complementariedade entre as frações (Figura 9). Como exemplo, proteínas mitocondriais demonstram-se enriquecidas na fração nuclear, conforme esperado, enquanto proteínas do retículo endoplasmático, membrana nuclear e vesículas ligadas à membrana estão enriquecidas na fração de membrana. Outras anotações específicas de subcompartimentos, como

citoesqueleto ou cromossomo, também se encontram enriquecidas nas respectivas frações de citoplasma e núcleo.

Figura 9. Classificação por ontologias gênicas das proteínas enriquecidas nas frações de núcleo, citoplasma e membrana de células MCF7-CTRL e MCF7-SNAIL.

As anotações de subcompartimentos celulares apresentam-se enriquecidas nas frações esperadas. Núcleo: fração enriquecida em proteínas de núcleo; Citoplasma: fração enriquecida em proteínas de citoplasma; Membrana: fração enriquecida em proteínas de membrana.

A análise quantitativa das proteínas identificadas utilizou critérios rigorosos e identificou 348 proteínas diferencialmente expressas entre as células MCF7-SNAIL e controle nos três subcompartimentos celulares (Anexo C). Apenas proteínas que foram observadas através de, pelo menos, 2 peptídeos foram consideradas, assim como apenas proteínas quantificadas em ambas as amostras e que apresentaram alterações superiores a 2 vezes em pelo menos um dos subcompartimentos analisados.

Das 348 proteínas reguladas pela superexpressão do FT SNAIL, 65 delas se mostraram diferencialmente expressas tanto nas células MCF7-SNAIL quanto nas células MDA-MB-231. Essas proteínas foram selecionadas e agrupadas de acordo com o seu padrão de expressão nos subcompartimentos de núcleo, citoplasma e

membrana, tanto das células MCF7-SNAIL quanto das células MDA-MB-231 (Figura 10, painel esquerdo). Os grupos 1 e 2 (C1 e C2) representam proteínas com aumento ou diminuição de expressão nos três subcompartimentos analisados; os grupos 3 e 4 (C3 e C4) contêm proteínas com aumento ou diminuição de expressão nas frações de núcleo e citoplasma, respectivamente; os grupos 5 e 6 (C5 e C6) representam proteínas com aumento ou diminuição de expressão nas frações de núcleo e membrana, respectivamente. Já os grupos 7 e 8 (C7 e C8) apresentam proteínas diferencialmente expressas entre os subcompartimentos, como ITGB1, CDK1 e ARPC2. A distribuição de abundância das proteínas baseada em *spectral counts* foi também associada às proteínas diferencialmente expressas, mostrando uma clara diferença de abundância das proteínas entre os diferentes subcompartimentos celulares (Figura 10, painel central).

De maneira a complementar essas análises, foi realizada uma busca no banco de dados de imunohistoquímica do *Human Protein Atlas* das proteínas diferencialmente expressas, para avaliar o seu nível de expressão em amostras de tecido de mama normal e tumoral (Figura 10, painel direito). Várias proteínas que tiveram sua expressão diminuída após a superexpressão do FT SNAIL, como HDAC1, estão altamente expressas em tecido normal de mama, podendo potencialmente representar proteínas supressoras de metástase. Proteínas com intensa marcação imunohistoquímica em tecido tumoral de mama estão irregularmente distribuídas entre as proteínas reguladas por SNAIL. Entretanto, na seleção de proteínas para validação e potencial correlação com a metástase, as informações do *Human Protein Atlas* foram consideradas altamente relevantes, uma vez que tanto o aumento quanto a diminuição de expressão de proteínas podem representar processos importantes para a progressão do câncer.

Figura 10. Proteínas diferencialmente expressas nas células MCF7 superexpressando o FT SNAIL.

De um total de 348 proteínas diferencialmente expressas, 65 delas se mostraram diferencialmente expressas tanto nas células MCF7-SNAIL quanto nas células MDA-MB-231. Essas proteínas são potencialmente mais relacionadas ao fenótipo agressivo/migratório e metastático. Os grupos (painel esquerdo) indicam proteínas *up* ou *down* reguladas por SNAIL em um ou mais subproteomas (C1-C6) e diferencialmente expressas em diferentes subproteomas (C7 e C8). A distribuição de abundância das proteínas entre os diferentes subproteomas foi estimada com base nos *spectral counts* (painel central). Dados de imunohistoquímica de tecidos de mama normal e tumoral obtidos do banco de dados do *Human Protein Atlas* (painel direito) foram utilizados como um indicador externo da relevância da regulação das proteínas identificadas em nossa análise. A escala 0-100% se refere à percentagem da marcação imunohistoquímica nas amostras de tecido de mama e a cor do gradiente

representa a intensidade da marcação: alta (azul escuro), média (azul), baixa (azul claro), não detectado (branco) ou não disponível (cinza), de acordo com os dados do *Human Protein Atlas*. MCF7-CTRL, células não transduzidas; MCF7-Empty, células transduzidas com o vetor vazio; MCF7-SNAIL, células transduzidas com o vetor expressando SNAIL; Ns, núcleo MCF7-SNAIL; Nm, núcleo MDA-MB-231; Cs, citoplasma MCF7-SNAIL; Cm, citoplasma MDA-MB-231; Ms, membrana MCF7-SNAIL; Mm, membrana MDA-MB-231; Adp, adipócitos; Grn, células glandulares; Myo, células mioepiteliais; HI, *high* (alto); MID, *medium* (médio); LO, *low* (baixo); NO, não detectado; N/A, não disponível.

Além da análise externa através dos dados do *Human Protein Atlas*, foi realizada também uma análise por *western blotting* para validação de um conjunto de proteínas diferencialmente expressas e para as quais havia anticorpos de alta qualidade disponíveis comercialmente (Figura 11, A). Os níveis das proteínas diferencialmente expressas nos subcompartimentos foram medidos em amostras de extrato total, e os resultados concordam com a análise proteômica quantitativa apresentada. Além disso, foi realizada também a validação de um conjunto de proteínas por *western blotting* em amostras dos subcompartimentos celulares enriquecidos (Figura 11, B). ITGB1, CDK1, SOD2 e HDAC1 apresentaram marcação concordante com a regulação apresentada pela análise proteômica quantitativa assim como com a estimativa da quantidade de proteína fornecida pelos *spectral counts*, com mostrado na Figura 10.

Figura 11. Validação por *western blotting* de proteínas reguladas nos compartimentos subcelulares pela superexpressão do FT SNAIL em células MCF7.

A) Ensaio de *western blotting* (extrato total celular) de proteínas concordantemente alteradas nos subproteomas de células MCF7 superexpressando o FT SNAIL. B) Ensaio de *western blotting* de um conjunto de proteínas diferencialmente expressas nos subproteomas de células MCF7 superexpressando o FT SNAIL. Em cada raia do gel foram adicionados 5 µg de proteínas baseada na quantificação pelo método de Bradford. MCF7-CTRL, células não transduzidas; MCF7-Empty, células transduzidas com o vetor vazio; MCF7-SNAIL, células transduzidas com o vetor expressando SNAIL; Núcleo, fração enriquecida em proteínas de núcleo; Citoplasma, fração enriquecida em proteínas de citoplasma; Membrana, fração enriquecida em proteínas de membrana.

O conjunto total das 384 proteínas diferencialmente expressas após a indução da EMT pela superexpressão do FT SNAIL foi analisado quanto a sua interação em uma rede através do software STRING, de maneira a identificar interações principais

e conjuntos de processos celulares coordenados. Três principais processos celulares foram identificados como enriquecidos nesse conjunto de proteínas ($p < 10^{-5}$): 1) metabolismo energético (fosforilação oxidativa); 2) ciclo celular e 3) ligação de cromatina e remodelamento de cromatina. O primeiro processo é bem descrito durante eventos como a EMT, uma vez que a deficiência na via glicolítica e o estresse oxidativo aumentam a produção de ATP e a desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (ROS) na cadeia transportadora de elétrons/ vias de fosforilação oxidativa (Wang, Li et al. 2010). O controle do ciclo celular, assim como o remodelamento da cromatina, são também importantes durante a EMT e, dessa forma, as proteínas envolvidas em ambos os processos foram selecionadas e utilizadas para gerar uma rede mais simplificada (Figura 12). A análise da rede indicou dois nós principais, representados pelas proteínas CDK1 e HDAC1. CDK1 teve sua expressão diminuída na fração citoplasmática, conforme demonstrado pela análise proteômica quantitativa e por *western blotting*. HDAC1, detectada principalmente na fração nuclear, teve sua expressão diminuída em ambas as frações nuclear e citoplasmática. (Figuras 10 e 11).

Figura 12. Rede de interações das proteínas diferencialmente expressas em células MCF7-SNAIL

A análise pelo software STRING-DB indica que as proteínas diferencialmente expressas estão envolvidas nos processos de ciclo celular e remodelamento da cromatina ($p < 10^{-5}$). A rede indica dois nós principais, nas proteínas CDK1 e HDAC1.

Conforme sugerido pela análise da rede de interações, a superexpressão do FT SNAIL apresenta impacto sobre o ciclo celular. Dessa forma, foi realizado um ensaio de ciclo celular através da análise da incorporação de BrdU por citometria de fluxo e pôde ser observado que as células induzidas à EMT pela superexpressão do FT SNAIL apresentaram um aumento da população nas fases G0-G1 e uma diminuição na fase S, confirmando o controle deste FT no ciclo celular (Figura 13).

Figura 13. Análise de ciclo celular por APC-BrdU/7-AAD (7-amino-actinomycin D) de células MCF7.

A superexpressão do FT SNAIL induziu um aumento na população G0+G1. MCF7-CTRL, células não transduzidas; MCF7-Empty, células transduzidas com o vetor vazio; MCF7-SNAIL, células transduzidas com o vetor expressando SNAIL.

Por fim, na análise das proteínas secretadas pelas células, foi detectada também a regulação de TGF β 1, um dos principais ativadores do programa de EMT. Após a superexpressão de SNAIL nas células MCF7, houve um aumento na secreção deste fator de crescimento pelas células em relação às células controle (Figura 14). TGF β 1 foi detectado no meio condicionado de células MCF7-SNAIL em uma concentração de ~2 ng/mL de meio condicionado (24 h). Células MCF7 controle e transduzidas com o vetor vazio (MCF7-Empty) tiveram níveis de TGF β 1 abaixo de 1 ng/mL.

Figura 14. Detecção de TGFβ1 no meio condicionado de células MCF7-SNAIL por MRM.

De maneira a mostrar que as células MCF7-SNAIL secretam TGFβ1, um ensaio de MRM para monitorar o peptídeo ALDTNYCFSSTEK foi desenvolvido utilizando TGFβ1 (R&D system) como padrão. As cinco melhores transições foram consideradas para a quantificação. Como mostrado no painel esquerdo, TGFβ1 foi detectado no meio condicionado de células MCF7-SNAIL em uma concentração de ~2 ng/mL de meio condicionado (24 h). Células MCF7 controle e transduzidas com o vetor vazio (MCF7-Empty) tiveram níveis de TGFβ1 abaixo de 1 ng/mL.

4.2. Tratamento com o inibidor de histonas deacetilases SAHA

Conforme mostrado na Figura 12, a enzima HDAC1 representa um dos principais centros da rede de interação das proteínas reguladas pela superexpressão do FT SNAIL nas células MCF7. Essa proteína também apresenta concordância de regulação na comparação com as células MDA-MB-231. De maneira a avaliar e aprofundar a análise do papel das histonas deacetilases e da regulação epigenética no processo de EMT, foi utilizado o inibidor químico de histonas deacetilases SAHA (*Suberoylanilide hydroxamic acid*, Vorinostat) para tratamento das células MCF7. Com a inibição da atividade das histonas deacetilases, foi simulado o efeito da superexpressão do FT SNAIL na diminuição da expressão de HDAC1 nas células MCF7.

Após o tratamento com o inibidor SAHA em diferentes concentrações por um período de 24h as células MCF7 apresentaram alteração na morfologia, comparável com as alterações observadas pela superexpressão do FT SNAIL, apresentando um formato mais fibroblastóide e perda de aderência intercelular (Figura 14).

Figura 15. Morfologia das células MCF7 tratadas com diferentes concentrações do inibidor químico de histonas deacetilases SAHA (0,5-10 μ M) por um período de 24h.

O tratamento com SAHA induziu alterações morfológicas nas células MCF7 em todas as concentrações analisadas, no período de 24h de tratamento.

Para testar se o tratamento com o inibidor SAHA tinha efeitos sobre a regulação do FT SNAIL, foi realizado um ensaio com diferentes concentrações do inibidor durante 24h e os níveis da proteína SNAIL foram medidos através de *western blotting* (Figura 16). Como demonstrado na Figura 16, os níveis da proteína SNAIL são proporcionais à concentração de SAHA, indicando uma correlação inversa entre a atividade de HDAC1 e os níveis de SNAIL. Os níveis das proteínas HDAC1, AKT e AKT fosforilada (Ser 473) também foram avaliados e comparados

com os níveis nas células MCF7-SNAIL e MDA-MB-231. Os níveis de HDAC1 não foram alterados pelo tratamento com SAHA, enquanto nas células MCF7-SNAIL é possível observar uma diminuição nos níveis dessa proteína e nas células MDA-MB-231 não foi possível observar sua expressão.

De maneira a testar se outras vias que regulam o ciclo celular e controlam o crescimento celular também são alteradas pelo tratamento com o inibidor, foi testada a ativação da proteína AKT. A inibição de HDAC1 por doses maiores de SAHA, possui um efeito na ativação de AKT após 24h de tratamento, avaliado pela presença da proteína fosforilada (Ser 473), mas que é bastante inferior ao observado nas células MCF7-SNAIL (Figura 16). Já nas células MDA-MB-231 a ativação de AKT não foi observada. Entretanto, o tratamento com SAHA apresentou um efeito maior na ativação de AKT quando avaliados estágios iniciais do tratamento (2h) (Figura 17).

Figura 16. Células MCF7 tratadas com diferentes concentrações de SAHA (0,5 - 10μM) por 24h. O aumento nos níveis da proteína SNAIL foi proporcional à concentração de SAHA. A inibição de HDACs por doses mais altas de SAHA aumentaram a expressão de proteína AKT fosforilada (Ser-473) durante 24h de tratamento. A ativação de AKT foi maior nas células MCF7-SNAIL, enquanto nas

células MDA-MB-231 não foi observada ativação dessa proteína. MCF7-CTRL, células não tratadas; MCF7-SAHA, células tratadas com o inibidor SAHA; MCF7-SNAIL, células superexpressando SNAIL.

Figura 17. Células MCF7 tratadas com 10 μ M de SAHA por 2h e 24h.

O tratamento com SAHA induziu uma maior ativação de AKT (pAKT Ser 473) durante os estágios iniciais do tratamento (2h). MCF7-CTRL, células não tratadas; MCF7-SAHA, células tratadas com o inibidor SAHA; MCF7-SNAIL, células superexpressando SNAIL.

Além do aumento na expressão de SNAIL ter se mostrado dependente da concentração de SAHA, ele também é dependente do tempo de tratamento (Figura 18). A expressão de CDH1, um dos principais marcadores do fenótipo epitelial e da transição epitelial-mesenquimal também foi avaliada e foi possível observar uma significativa diminuição em seus níveis de expressão após o tempo de 24h de tratamento. Esses dados, juntamente com a análise da morfologia celular apresentada anteriormente, sugerem uma indução do processo de EMT após o tratamento com o inibidor SAHA nas células MCF7.

Figura 18. Avaliação temporal por *western blotting* dos efeitos do tratamento de células MCF7 com SAHA 10 μ M.

O tratamento com SAHA induziu uma diminuição da expressão da proteína CDH1 (marcador epitelial) e um aumento na expressão da proteína SNAIL (marcador mesenquimal) ao longo do tempo. A quantificação das bandas foi realizada utilizando o *software* ImageJ e a proteína GAPDH foi utilizada como marcador endógeno.

A expressão de SNAIL nas células MCF7 tratadas com SAHA foi analisada também através do Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM). Para isso, foi utilizado um peptídeo sintético padrão como referência e a área do pico foi quantificada através do *software* Skyline. Como controle endógeno foi utilizada a proteína GAPDH (Figura 19).

Figura 19. Avaliação temporal por MRM dos efeitos do tratamento de células MCF7 com SAHA 10 μ M na expressão da proteína SNAIL.

O tratamento com SAHA induziu o aumento progressivo da expressão da proteína SNAIL ao longo do tempo. A proteína GAPDH foi utilizada como marcador endógeno.

Além das análises do extrato proteico total celular, o fracionamento subcelular para obtenção das frações enriquecidas em proteínas de núcleo, citoplasma e membrana também foi realizado para as células MCF7 tratadas com SAHA. Através da técnica de *western blotting*, foi possível observar a presença de SNAIL em todas as frações analisadas após o tratamento com SAHA, apresentando maiores níveis nas frações de núcleo e citoplasma (Figura 20), enquanto nas células controle não foi possível observar expressão da proteína. A proteína ITGB1 também foi analisada através de *western blotting* para as frações subcelulares, e um aumento na expressão dessa proteína também foi observado, especificamente na fração

enriquecida em proteínas de membrana (Figura 20). Esses dois resultados concordam com os dados encontrados para as células MCF7-SNAIL (Figura 11).

Figura 20. Análise por western blotting dos efeitos do tratamento de células MCF7 com SAHA 10 µM nas diferentes frações subcelulares.

O tratamento com SAHA induziu um aumento da expressão de SNAIL em todas as frações analisadas, principalmente na fração nuclear, e também um aumento da expressão de ITGB1 principalmente na fração de membrana. MCF7-CTRL+DMSO, células tratadas com o veículo DMSO; MCF7-CTRL, células não tratadas; MCF7-SAHA, células tratadas com o inibidor SAHA 10 µM por 24h.

Por fim, foi realizada, em colaboração com o Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática do Hemocentro de Ribeirão Preto, uma busca no banco de dados do TCGA (*The Human Genomic Atlas*) de maneira a avaliar os níveis de expressão gênica de *SNAIL* e *HDAC1* em amostras clínicas de câncer de mama. Além da expressão de ambos os genes, foi avaliada também a expressão de outros genes marcadores do processo de EMT, como *OCN* (Ocludina), *FOXC2* (Forkhead box protein C2), *CDH2* (N-caderina), *ITGB6* (Integrina Beta 6), *FN1* (Fibronectina), *MMP3* (Matriz metaloproteinase 3), *SNAIL2* (*SLUG*), *MMP2* (Matriz metaloproteinase 2) e *VIM* (Vimentina). Um heatmap gerado considerando quatro grupos distintos: 1) baixo *SNAIL*/alto *HDAC1*; 2) alto *SNAIL*/baixo *HDAC1*; 3) alto *SNAIL*/alto *HDAC1*; 4) baixo *SNAIL*/baixo *HDAC1*. As amostras foram selecionadas com base nos níveis de expressão de *SNAIL* e *HDAC1*, tendo um número total de 75 amostras por grupo (Figura 21).

Figura 21. Análise do perfil de expressão gênica de amostras de câncer de mama do banco de dados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA).

As amostras foram selecionadas com base na expressão dos genes *SNAIL* e *HDAC1* e o heatmap foi formado a partir de quatro grupos: 1) baixo *SNAIL*/alto *HDAC1*; 2) alto *SNAIL*/baixo *HDAC1*; 3) alto *SNAIL*/alto *HDAC1*; 4) baixo *SNAIL*/baixo *HDAC1*.

Conforme demonstrado pela Figura 21, a análise de amostras de câncer de mama no banco de dados do TCGA mostra que, as amostras consideradas com uma alta expressão de *SNAIL* (*SNAI1*) e baixa expressão de *HDAC1* (Grupo 2) apresentam também uma alta expressão dos marcadores do fenótipo mesenquimal, como *CDH2*, *VIM*, *FN1*, *MMP2*, *MMP3* e *ITGB6*, assim como uma baixa expressão de *OCN*, marcador do fenótipo epitelial. O oposto é observado nas amostras consideradas com uma baixa expressão de *SNAIL* e alta expressão de *HDAC1* (Grupo 1), as quais possuem uma baixa expressão dos marcadores mesenquimais e uma alta expressão do marcador epitelial. Nota-se que, no grupo considerado com alta expressão de *SNAIL* e alta expressão de *HDAC1* (Grupo 3), há uma diluição das amostras que possuem alta expressão de marcadores mesenquimais e baixa expressão do marcador epitelial. Esses resultados reforçam, a nível de expressão gênica e nível clínico, a correlação observada entre *SNAIL* e *HDAC1* ao nível de proteínas e *in vitro*, e enfatiza a importância da baixa expressão de *HDAC1* para o genótipo mesenquimal. Além disso, os resultados demonstram que, no Grupo 2 (alto *SNAIL*/baixo *HDAC1*), o qual apresenta elevada expressão de marcadores mesenquimais, há um menor número de amostras positivas para receptor de estrógeno (ER), o qual sabe-se estar relacionado com a agressividade tumoral.

4.3. Tratamento com fatores de crescimento

A literatura demonstra que, além da superexpressão de fatores de transcrição, a EMT pode ser induzida pelo tratamento com fatores de crescimento, em uma variedade de tipos celulares (Kalluri and Weinberg 2009, Grassi, Palma et al. 2017, Zhang and Weinberg 2018). Os fatores de crescimento podem ativar vias

que levam à regulação dos FT envolvidos na EMT e dos marcadores dos fenótipos epitelial e mesenquimal. De maneira a avaliar o seu papel nas células tumorais de mama e tendo como base a utilização de fatores de crescimento pelo nosso grupo de pesquisa para a indução da EMT em células de ovário (Grassi, Palma et al. 2017), as células MCF7 foram tratadas com os fatores de crescimento TGF β 1, TGF β 2 e EGF, e seus efeitos foram avaliados.

Inicialmente, a linhagem celular MCF7, foi cultivada em diferentes concentrações de soro fetal bovino (SFB), de maneira a avaliar as condições a serem utilizadas para o tratamento com os fatores de crescimento. Para o tratamento das células com fatores de crescimento, indica-se a remoção do SFB do meio de cultura 24h antes do início do tratamento, de maneira a serem evitadas interferências advindas do mesmo. Dessa forma, a linhagem MCF7 foi cultivada em meio DMEM (comumente utilizado pela literatura para esse tipo celular) desprovido de SFB, e sua morfologia foi acompanhada ao longo de 72h (Figura 22).

Figura 22. Morfologia da linhagem MCF7 cultivada em meio DMEM desprovido de SFB por 24, 48 e 72h.

As células MCF7 apresentaram grande alteração morfológica e elevada taxa de morte celular quando cultivadas na ausência de SFB. Comparação com condição padrão de cultivo (10% SFB).

Foi verificada uma grande alteração na morfologia celular já nas 24h iniciais do cultivo da linhagem em meio desprovido de SFB em relação ao cultivo padrão em 10% SFB. Tais alterações morfológicas se tornaram mais evidentes ao longo das 72h de cultivo, juntamente com elevada taxa de morte celular (Figura 22).

Assim, foram testadas diferentes concentrações de SFB no meio de cultura - 0,5%, 1%, 2% e 5% - de maneira a verificar se uma baixa concentração de soro poderia evitar o comprometimento celular. Foi verificado que com 1% de SFB no meio de cultura, as células apresentaram menor taxa de morte celular e menor alteração morfológica do que aquelas cultivadas na ausência de SFB (Figura 23).

Figura 23. Morfologia da linhagem MCF7 cultivada por 48h em meio suplementado com diferentes concentrações de SFB.

As células MCF7 foram cultivadas em meio contendo 0%, 0,5%, 1%, 2%, 5% ou 10% SFB. A concentração de 1% SFB induziu menor alteração morfológica e menor taxa de mortalidade celular do que as condições 0% e 0,5% SFB.

Dessa forma, foi escolhida a condição de 1% de SFB no meio de cultivo para o tratamento das células MCF7 com os fatores de crescimento.

Para a indução da EMT, a linhagem MCF7 foi submetida ao tratamento com diferentes fatores de crescimento para avaliação da resposta mediante o tempo e dose empregados. Os fatores de crescimento utilizados foram TGF β 1 (rhTGF- β 1, R&D Systems, cat # 240-B), TGF β 2 (rhTGF- β 2, R&D Systems, cat # 302-B2) e EGF (rhEGF, R&D Systems, cat # 236-EG), tendo sido testadas tanto concentrações mais baixas dos fatores, como 5 e 10 ng/ml, quanto concentrações mais elevadas como 50 ou 100 ng/mL, conforme indicações da literatura (Vergara, Valente et al. 2011, Lv, Kong et al. 2013, Gao, Yan et al. 2015, Li, Qi et al. 2015, Mahdi, Cheng et al. 2015, Kim, Kong et al. 2016, Grassi, Palma et al. 2017). Quanto ao tempo, foram testados os tempos de 24 e 48h para os três fatores. Dessa forma, foram testadas as condições de indução da EMT em concentrações crescentes dos fatores de crescimento - 5, 10, 20, 50 e 100 ng/mL - e as possíveis alterações de morfologia celular foram verificadas através de microscopia (Figuras 24-26).

Figura 24. Morfologia da linhagem MCF7 controle (CT, sem tratamento) ou tratada com o fator de crescimento TGFβ2 (5, 10, 20, 50 ou 100 ng/mL) por 24 ou 48h.

Figura 25. Morfologia da linhagem MCF7 controle (CT, sem tratamento) ou tratada com o fator de crescimento TGF β 1 (5, 10, 20, 50 ou 100 ng/mL) por 24 ou 48h.

Figura 26. Morfologia da linhagem MCF7 controle (CT, sem tratamento) ou tratada com o fator de crescimento EGF (5, 10, 20, 50 ou 100 ng/mL) por 24 ou 48h.

Apesar do tratamento com concentrações crescentes dos fatores de crescimento, não foram observadas maiores alterações de morfologia celular com concentrações mais elevadas dos fatores TGF β 1, TGF β 2 e EGF. Dessa forma, optou-se por utilizar a concentração de 10 ng/mL que já havia sido estabelecida pelo

grupo de pesquisa para indução da EMT em células de câncer de ovário (Grassi, Palma et al. 2017) como condição padrão para o tratamento. Essa concentração é, portanto, consideravelmente menor àquelas comumente encontradas na literatura, e visa, assim, se aproximar mais da concentração fisiológica de EGF disponível na circulação (40 pM – 240 pg/mL) (Marquèze-Pouey, Mailfert et al. 2014), apesar de ainda ser superior a esta.

Através da análise por MRM das amostras tratadas com os fatores de crescimento, foi possível observar uma diminuição da expressão da proteína CDH1, um dos principais marcadores do fenótipo epitelial, após o tratamento com os três fatores de crescimento por um período de 48h (Figura 27).

Figura 27. Análise por MRM da expressão de E-caderina (CDH1) nas células controle (CTRL) e tratadas com TGFβ1, TGFβ2 ou EGF, a 10 ng/mL por 48h.

O tratamento com os fatores de crescimento induziu a diminuição na expressão de CDH1 nas células MCF7. O gráfico representa a média das triplicatas de injeção das amostras e seus respectivos desvios padrão.

Dada a escassez na literatura sobre os efeitos do fator de crescimento EGF na indução do processo de EMT e a experiência do grupo de pesquisa na utilização deste fator para a indução do processo, optou-se por aprofundar a análise sobre o tratamento com este fator de crescimento nas células MCF7, na concentração de 10 ng/mL.

Dessa forma, foi realizada, inicialmente, uma avaliação temporal da expressão de proteínas relevantes ao processo de EMT no tratamento com EGF 10 ng/ml (Figura 28). Através da análise por *western blotting*, foi observada uma diminuição na expressão da proteína CDH1 ao longo do tempo, um aumento na expressão no fator de transcrição SNAIL, um dos reguladores-chave do processo de EMT a partir do tempo de 2h e uma alteração na expressão da proteína Beta-catenina (CTNNB1) durante os períodos analisados, tendo apresentado um aumento principalmente nos períodos de 4h, 8h e 16h (Figura 28).

Figura 28. Análise por *western blotting* dos efeitos do tratamento de células MCF7 com o fator de crescimento EGF (10 ng/mL) sobre a expressão das proteínas E-caderina (CDH1), SNAIL e β -catenina (CTNNB1) em diferentes períodos de tempo (0h, 2h, 4h, 8h, 16h, 24h, 48h e 72h).

Foram aplicados 15 μ g de proteína total em cada raia, com base na quantificação pelo reagente de Bradford. Foi observada uma diminuição na expressão de CDH1 e aumento na expressão de SNAIL e CTNNB1 (β -catenina) após o tratamento com EGF. CT, MCF7 controle; 0h, MCF7 após 24h em meio com 1% SFB; 2h, 4h, 8h, 16h, 24h, 48h, e 72h, MCF7 tratada com 10 ng/mL de EGF em diferentes períodos de tempo.

A partir desses resultados, optou-se por utilizar o tempo de 48h de tratamento das células MCF7 com o fator de crescimento EGF a 10 ng/mL, uma vez que esse período de tratamento apresentou uma significativa diminuição na expressão de CDH1 e uma viabilidade de cultivo, considerando o número de células na placa e a baixa concentração de SFB no meio de cultura.

4.3.1. Avaliação da EMT após tratamento com o fator de crescimento EGF

O tratamento das células MCF7 com o fator de crescimento EGF (10 ng/mL) induziu alterações morfológicas celulares evidenciadas a partir de 24h de tratamento, tendo induzido uma diminuição do contato intercelular e a aquisição de um formato mais fibroblastóide pelas células (Figuras 26 e 29).

Figura 29. Morfologia da linhagem MCF7 controle (CTRL, sem tratamento) ou tratada com o fator de crescimento EGF (10 ng/mL) por 24h e 48h.

O tratamento com o fator de crescimento EGF induziu alterações na morfologia celular tanto após 24h quanto 48h de tratamento.

Após a determinação das condições de cultivo para a indução da EMT nas células MCF7 com o fator de crescimento EGF, foi realizado um ensaio de *array* de proteínas da via de sinalização de EGFR de maneira a avaliar temporalmente quais alvos da via estavam sendo ativados pelo tratamento com o fator de crescimento. Para isso, as células foram tratadas com EGF 10 ng/mL por diferentes períodos de tempo - 15 minutos, 24h ou 48h – e submetidas à avaliação pelo *array* de proteínas, tendo sido analisadas um total de 24 proteínas da via (Figuras 30 e 31).

Figura 30. Análise através de *array* de proteínas (PathScan® EGFR Signaling Antibody Array Kit, Cell Signaling) da ativação da via de sinalização de EGFR em células MCF7 tratadas com o fator de crescimento EGF (10 ng/mL).

O array é dividido em duas partes, A e B. Foram aplicados 75 µg de proteína total em cada spot, com base na quantificação pelo reagente de Bradford. CTRL, MCF7 controle; 0h: MCF7 após 24h em meio contendo 1% SFB; 15 min, 24h e 48h: MCF7 tratada com 10 ng/mL EGF em diferentes períodos de tempo em meio contendo 1% SFB.

Sub-Array A

Sub-Array B

Figura 31. Quantificação das imagens do *array* de proteínas (PathScan® EGFR Signaling Antibody Array Kit, Cell Signaling) da ativação da via de sinalização de EGFR em células MCF7 tratadas com o fator de crescimento EGF (10 ng/mL).

CTRL, MCF7 controle; 0h: MCF7 após 24h em meio contendo 1% SFB; 15 min, 24h e 48h: MCF7 tratada com 10 ng/mL EGF em diferentes períodos de tempo em meio contendo 1% SFB.

A partir da análise do *array* de proteínas da via de EGFR, foi possível observar a sinalização da via através da ativação, principalmente, das proteínas MEK 1/2 (Ser 221), MEK 1/2 (Ser 217/221), AKT (Ser 473) e ERK 1/2 (Thr 202/Tyr 204) após o tratamento com o fator de crescimento EGF. Interessantemente, não foi possível observar aumento na expressão do receptor de EGFR, tanto total quanto nas formas fosforiladas (Figuras 30 e 31).

A ativação de AKT, MEK 1/2 e ERK 1/2 demonstrada pelo *array* de proteínas, foi confirmada através de *western blotting*, no qual foi possível também observar um ligeiro aumento de p-EGFR (Tyr 1068) após o tratamento com EGF (Figura 32).

Figura 32. Confirmação por *western blotting* da ativação da via de sinalização de EGFR em células MCF7 tratadas com o fator de crescimento EGF (10 ng/mL).

Foram aplicados 40 µg de proteína total em cada raia, com base na quantificação pelo reagente de Bradford. CTRL, MCF7 controle; 0h, MCF7 após 24h em meio contendo 1% SFB; 15 min, 24h e 48h, MCF7 tratada com 10 ng/mL EGF em diferentes períodos de tempo.

A ativação de ERK1/2 foi também avaliada nos subcompartimentos celulares, sendo possível observar que o aumento demonstrado no extrato celular total de proteínas após o tratamento com EGF está localizado principalmente na fração citoplasmática celular (Figura 33).

Figura 33. Análise por western blotting dos efeitos do tratamento de células MCF7 com EGF 10 ng/mL sobre a ativação da proteína Erk1/2 nas diferentes frações subcelulares.

O tratamento com EGF induziu um aumento da expressão da forma fosforilada de Erk1/2 (p-p44/42 MAPK Thr202/Tyr204) principalmente na fração citoplasmática. CTRL, MCF7 controle; EGF, MCF7 tratada com 10 ng/mL de EGF por 48h.

Além da análise da via de sinalização de EGFR, foi realizada também uma avaliação através de *western blotting* do nível de expressão do receptor de estrógeno (ER α) após o tratamento das células MCF7 com o fator de crescimento EGF 10 ng/mL por 48h. Enquanto a linhagem celular MDA-MB-231 possui um fenótipo triplo negativo, a linhagem MCF7 é positiva para o receptor de estrógeno. Conforme demonstrado pela Figura 34 a seguir, foi observada uma diminuição no nível de expressão do receptor ER α após o tratamento com EGF, enquanto nas células MDA-MB-231 não foi observada expressão desse receptor. Essa diminuição na expressão de ER α se correlaciona com dados anteriores nos quais foi possível observar um menor número de amostras positivas para ER no grupo que possui alta expressão de SNAIL e baixa expressão de HDAC1 (Figura 21). A diminuição nos níveis de receptor de estrógeno se correlaciona com o aumento da agressividade

tumoral, tendo como exemplo a comparação entre as linhagens celulares MCF7 e MDA-MB-231.

Figura 34. Análise por western blotting do efeito do tratamento de células MCF7 pelo fator de crescimento EGF nos níveis da proteína ERα (Receptor de estrógeno α).

O tratamento com EGF induziu uma diminuição nos níveis da proteína ERα nas células MCF7. A linhagem celular MDA-MB-231, tipo triplo-negativo, não apresenta expressão de ERα.

De maneira a dar continuidade na caracterização do processo de indução da EMT com o fator de crescimento EGF, foi realizado um ensaio de migração para avaliar a capacidade migratória das células MCF7 após o tratamento com o fator de crescimento (Figura 35). Para isso, as células foram cultivadas até atingirem uma confluência de 90-100%, mantidas em meio contendo 1% SFB por 24h e, em seguida, realizada uma falha na monocamada de células com auxílio de uma ponteira. Em seguida as células foram tratadas com EGF 10 ng/mL e a área da falha foi fotografada após 24 e 48h de tratamento. A porcentagem da área invadida pelas células foi calculada com o auxílio do *software* Cell Profiler.

Figura 35. Ensaio de migração de células MCF7 tratadas com o fator de crescimento EGF (10 ng/mL) em comparação com as células não tratadas (controle).

A) Imagens representativas do ensaio de migração nos tempos de 0, 24 e 48 horas. B) Gráfico de barras representa a média $\pm$ desvio padrão da porcentagem da área invadida pelas células MCF7 tratadas ou não com o fator de crescimento EGF 10 ng/mL nos tempos de 0, 24 e 48 horas. CTRL, MCF7 controle; 0h, MCF7 após 24h em meio contendo 1% SFB; 24h e 48h, MCF7 tratada com EGF 10 ng/mL por 24 ou 48 horas, respectivamente. Resultados estatisticamente significativos (**p<0,001).

Como pode ser observado, houve um aumento significativo da área invadida pelas células após o tratamento com o fator de crescimento EGF, tanto após 24 quanto 48h de tratamento, indicando um aumento da capacidade migratória das mesmas.

Pelo fato de EGF ser um fator de crescimento, foi avaliada também a capacidade proliferativa dessas células após o tratamento com o fator através da marcação com o anticorpo anti-Ki67 e avaliação da fluorescência por citometria de fluxo, em ambos os períodos de tratamento (24h e 48h) (Figura 36).

Figura 36. Análise de proliferação celular pela marcação com anticorpo anti-Ki67.

O tratamento com EGF 10 ng/mL não induziu alterações estatisticamente significativas na proliferação das células MCF7 tanto com 24 quanto 48h de tratamento. CTRL, MCF7 controle; EGF, MCF7 tratada com EGF 10 ng/mL por 24 ou 48h. Resultados não significativos estatisticamente (ns $p > 0,05$).

Através da análise da marcação da proteína Ki67 foi possível observar que o tratamento com EGF 10 ng/mL não induziu alterações estatisticamente significativas na proliferação das células MCF7 tanto após 24h quanto 48h de tratamento. Assim, pode-se inferir, juntamente com o ensaio de migração descrito anteriormente, que o tratamento com EGF é capaz de induzir um aumento da capacidade migratória das células MCF7, uma das principais características do processo de EMT.

A indução da EMT pelo fator de crescimento EGF foi, também, avaliada através da ferramenta de *High Content Screening*, tanto para parâmetros morfológicos celulares quanto para a marcação dos anticorpos anti-SNAIL/SLUG e anti-HDAC1 (Figuras 37 a 39).

Figura 37. Análise *High Content Screening* da expressão das proteínas SNAIL-SLUG e HDAC1 em células MCF7 controle e tratadas com o fator de crescimento EGF 10 ng/mL por 48h. O tratamento com EGF induziu um aumento na expressão das proteínas SNAIL-SLUG e HDAC1 nas células MCF7.

Figura 38. Quantificação da expressão das proteínas SNAIL-SLUG e HDAC1 após o tratamento com o fator de crescimento EGF 10 ng/mL por 48h.

O tratamento com EGF induziu um aumento na expressão das proteínas SNAIL-SLUG e HDAC1 nas células MCF7. Mean, média; Median, mediana; Intens, intensidade; Integ, integrada; Cyto, citoplasma; Nucl, núcleo, HDAC, HDAC1; CTRL, MCF7 controle; EGF, MCF7 tratada com EGF 10 ng/mL por 48h.

Conforme demonstrado pelas Figuras 37 e 38, pode-se verificar que, após o tratamento com EGF, houve um aumento na expressão de SNAIL-SLUG em ambas as frações analisadas, núcleo e citoplasma, o que corrobora os dados anteriores e indica a indução da EMT pelo fator de crescimento EGF. De maneira contrária ao observado no modelo de superexpressão de SNAIL, foi verificado um aumento de HDAC1 após o tratamento com EGF, principalmente na fração nuclear.

Através da análise dos parâmetros celulares de área, compacidade, excentricidade, células vizinhas, solidez e área de contato celular (Figura 39), pode-se verificar que houve uma alteração em todos os parâmetros analisados após o

tratamento com EGF 10 ng/mL por 48h. As diferenças mais expressivas se referem ao aumento da área celular, diminuição no número de células vizinhas e diminuição da área de contato celular, corroborando alterações morfológicas decorrentes da indução do processo de EMT nas células.

Figura 39. Análise por *High Content Screening* dos parâmetros morfológicos de células MCF7 controle e tratadas com o fator de crescimento EGF 10 ng/mL por 48h.

Todos os parâmetros analisados – área, compacidade, excentricidade, vizinhos, solidez e área de contato celular – foram alterados pelo tratamento com EGF. *Cell Area*, área celular; *Cell Compactness*, compacidade celular; *Cell Excentricity*, excentricidade celular; *Cell Neighbors*, quantidade de células vizinhas; *Cell Solidity*, solidez celular; *Cell Touching Area*, área de contato celular; CTRL, MCF7 controle; EGF, MCF7 tratada com EGF 10 ng/mL por 48h. Resultados estatisticamente significativos (* $p < 0,05$).

A regulação de proteínas pelo tratamento com o fator de crescimento EGF foi verificada também através da técnica de *western blotting* (Figura 40). O tratamento com EGF induziu uma diminuição dos níveis de CDH1 e CAV1 (Caveolina 1) e um aumento nos níveis de VIM (Vimentina) e SNAIL. Quanto às proteínas G6PD

(Glicose-6-Fosfato Desidrogenase) e CTNNB1 (Beta-catenina), não foram observadas alterações na expressão a nível do extrato total de proteínas.

Figura 40. Análise por western blotting dos efeitos do tratamento de células MCF7 com o fator de crescimento EGF 10 ng/mL por 48h na regulação de proteínas.

O tratamento com EGF induziu uma diminuição na expressão de CDH1 (E-caderina) e CAV1 (Caveolina 1) e um aumento na expressão de VIM (Vimentina) e SNAIL. Não foram observadas alterações na expressão das proteínas CTNNB1 (Beta-catenina) e G6PD (Glicose-6-Fosfato Desidrogenase). CTRL, MCF7 controle; EGF, MCF7 tratada com EGF 10 ng/mL por 48h; 1 e 2, replicatas biológicas.

A diminuição na expressão de CDH1 foi também confirmada pela técnica de MRM (Figura 41), utilizando peptídeos proteotípicos representativos da proteína. Foi confirmada também a diminuição na expressão de CAV1 e não foram observadas alterações na expressão de G6PD, assim como na análise por *western blotting*. A proteína GAPDH está apresentada como marcador endógeno. Em paralelo a essas análises, foi verificada também a expressão dessas proteínas na linhagem MDA-MB-231, tendo sido observada uma baixa expressão das proteínas CDH1 e G6PD e uma expressão da proteína CAV1 similar aos níveis da célula MCF7 tratada com EGF (Figura 41).

Figura 41. Confirmação por MRM dos efeitos do tratamento de células MCF7 com o fator de crescimento EGF 10 ng/mL na expressão de proteínas e comparação com os níveis nas células MDA-MB-231.

O tratamento com EGF induziu uma diminuição nos níveis de CDH1 (E-caderina) e CAV1 (Caveolina 1). Não foram observadas alterações nos níveis de G6PD (Glicose-6-fosfato Desidrogenase). A

proteína GAPDH está apresentada como um marcador endógeno. Os gráficos representam a média de triplicatas de injeção de uma duplicata biológica, com seus respectivos desvios padrão.

A caracterização do processo de indução da EMT nas células MCF7 pelo tratamento com EGF foi também incluído a análise do ciclo celular através *western blotting* para marcadores característicos das fases do ciclo, como p-Rb, p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} e CDK1 (Figura 42). Uma diminuição nos níveis das proteínas p21 e p27 e um aumento da proteína CDK1 foram observados após o tratamento com EGF 10 ng/mL por 48h, indicando uma regulação do ciclo celular pelo fator de crescimento. A regulação de CDK1 foi verificada nos subcompartimentos celulares, demonstrando que o aumento nos níveis da proteína ocorreu principalmente na fração enriquecida em proteínas de membrana (Figura 42).

Figura 42. Análise por western blotting dos efeitos do tratamento de células MCF7 com o fator de crescimento EGF 10 ng/mL por 48h sobre a regulação do ciclo celular.

O tratamento induziu uma diminuição na expressão de p21 e p27 e um aumento na expressão de CDK1, principalmente na fração de membrana, indicando uma regulação do ciclo celular por EGF. CTRL, MCF7 controle; EGF, MCF7 tratada com EGF 10 ng/mL por 48h.

4.3.1.1. Análise da EMT ao nível dos subcompartimentos celulares

A etapa seguinte da análise da indução da EMT pelo fator de crescimento EGF incluiu a avaliação da distribuição de proteínas e de sua expressão entre os subcompartimentos celulares enriquecidos em proteínas de núcleo, citoplasma e membrana.

Para isso, foi realizada, inicialmente, uma confirmação da eficiência do fracionamento subcelular através de *western blotting*, utilizando marcadores específicos de cada subcompartimento celular, Fibrillarin (núcleo), GAPDH (citoplasma) e LYN (membrana) (Figura 43). As frações enriquecidas em proteínas de núcleo, citoplasma ou membrana foram também comparadas com o extrato total das células MCF7 controle, células MCF7 tratadas com EGF e também com as células MDA-MB-231. Como pode ser observado na Figura 43, houve um enriquecimento das proteínas em seus respectivos compartimentos subcelulares, indicando a eficiência e a qualidade do procedimento.

Figura 43. Caracterização por western blotting do fracionamento subcelular da linhagem MCF7. Anticorpos anti-Fibrillarin, marcação para núcleo, anti-GAPDH, marcação para citoplasma, e anti-Lyn, marcação para membrana. Núcleo: fração enriquecida em proteínas de núcleo; Citoplasma: fração enriquecida em proteínas de citoplasma; Membrana: fração enriquecida em proteínas de membrana; CTRL, MCF7 controle; EGF, MCF7 tratada com EGF 10 ng/mL por 48h; MDA-MB-231, células MDA-MB-231 não tratadas.

Após a confirmação do enriquecimento subcelular, foi analisada a expressão de proteínas de interesse nas células MCF7-EGF, selecionadas a partir da análise da superexpressão do FT SNAIL. Além das proteínas já destacadas anteriormente (Figura 10), foi selecionado um novo conjunto de proteínas que se mostraram diferencialmente expressas entre os subcompartimentos celulares das células MCF7-SNAIL, e que podem representar potenciais translocações subcelulares. Essas proteínas foram selecionadas a partir da análise proteômica global, estando presentes em pelo menos dois dos subcompartimentos celulares analisados e apresentando aumento ou diminuição de expressão a partir de 1,5 vezes em relação à célula controle. As proteínas foram também pesquisadas quanto à sua localização subcelular no banco de dados do *Human Protein Atlas* (Figura 44).

Proteína	Núcleo	Citoplasma	Membrana	Localização Subcelular (<i>Human Protein Atlas</i>)	
ARHGDIB	0,6	0,5	2,57	Citosol	
PLS1	0,37	0,54	1,5	ND	
CNN3	0,22	1,6	0,55	Filamentos de actina / Citosol	
CALD1	0,63	1,93	1,62	Membrana plasmática / Filamentos actina	
ITGB1	1,47	0,51	2,14	Membrana plasmática / Sítios de adesão focal / RE	
KRT16	1,57	ND	0,28	Filamentos intermediários	
SRPRB	3,32	ND	0,55	Membrana plasmática	
HLA-DRA	1,59	ND	0,62	ND	
G6PD	1,75	1,25	0,4	Citosol / Vesículas / Microtúbulo	
VDAC3	1,71	ND	0,37	Mitocôndria	
ACSL4	0,55	1,29	2,08	Golgi / Mitocôndria	
KRT10	0,61	0,9	1,55	ND	
KRT6A	ND	0,63	1,76	Filamentos intermediários	
DHX29	ND	1,58	0,27	Citosol	
SOD2	0,7	1,87	0,31	ND	
CRABP2	2,4	0,5	ND	Citosol / Nucleoplasma	
CTTN	1,58	0,5	0,73	Golgi / Vesículas / Membrana plasmática / Citoplasma	
CDK1	2,14	0,56	1,38	Citosol / Núcleo	
SARNP	1,46	0,24	1,03	Núcleo	
TSNAX	1,49	0,47	0,98	Nucleoplasma / Citosol	
LONP1	0,63	1,57	ND	Núcleo / Mitocôndria	
RPS15	0,63	1,61	0,86	RE / Citosol	
PRDX3	0,65	1,64	0,8	ND	
DAK	0,55	1,77	ND	Núcleo / Citosol	
ARPC2	0,47	1,86	1,26	Citosol / Golgi	
SHMT1	0,65	2,05	ND	Núcleo / Citosol	
CKAP5	0,41	2,2	ND	Membrana plasmática / Citosol / Nucléolo	
XPNPEP1	0,33	3,75	1,25	Citosol	
VPS37B	0,26	2,84	ND	ND	UP ($\geq 1,5$)
ARHGAP1	0,47	1,5	ND	Vesículas	DOWN ($\leq 0,67$)

Figura 44. Lista de proteínas diferencialmente expressas entre os subcompartimentos de células MCF7-SNAIL em relação às células controle.

A superexpressão de SNAIL induziu a regulação diferencial de proteínas entre os subcompartimentos de núcleo, citoplasma e membrana. As proteínas foram pesquisadas quanto à sua localização subcelular no banco de dados do *Human Protein Atlas*. Vermelho, proteínas com aumento de expressão em uma razão igual ou superior a 1,5 (MCF7-SNAIL/MCF7-CTRL); Verde, proteínas com diminuição de expressão em uma razão igual ou inferior a 0,67 (MCF7-SNAIL/MCF7-CTRL); ND, não detectado.

A partir dessa lista de proteínas diferencialmente reguladas, algumas delas foram analisadas no modelo de indução da EMT pelo fator de crescimento EGF, de

maneira a identificar similaridades e diferenças entre os dois modelos. Inicialmente, foi realizada uma análise através de *western blotting* para os anticorpos disponíveis (Figura 45). Foi observada uma expressão diferencial entre os subcompartimentos para quase todas as proteínas analisadas. Notavelmente, a proteína ITGB1 apresentou aumento na expressão na fração de membrana após o tratamento com o fator de crescimento EGF, da mesma forma que os modelos de indução da EMT pela superexpressão do FT SNAIL e pelo tratamento com o inibidor de histonas deacetilases SAHA (Figuras 11 e 20).

Figura 45. Avaliação por western blotting da expressão de proteínas entre os subcompartimentos de células MCF7 controle ou tratadas com o fator de crescimento EGF 10 ng/mL por 48h. Comparação com a expressão no extrato total das mesmas células e de células MDA-MB-231.

O tratamento das células MCF7 com o fator de crescimento EGF induziu a regulação de diversas proteínas também reguladas pela superexpressão de SNAIL, sendo essa regulação evidenciada pela análise dos subcompartimentos celulares.

A expressão de algumas dessas proteínas entre os diferentes subcompartimentos celulares foi avaliada também através da técnica de MRM (Figura 46). Conforme demonstrado pela Figura 46, houve uma confirmação da regulação de LONP1 nos três subcompartimentos celulares, tendo apresentado uma diminuição de expressão nas frações de núcleo e citoplasma e aumento na fração de membrana. A expressão da proteína PRDX3 também foi confirmada, com diminuição na expressão nos compartimentos de núcleo e citoplasma.

Figura 46. Análise por MRM dos efeitos do tratamento de células MCF7 com o fator de crescimento EGF 10 ng/mL na expressão de proteínas nos diferentes subcompartimentos celulares.

O tratamento com EGF induziu uma alteração diferencial nos níveis das proteínas LONP1 e PRDX3 (Peroxiredoxina 3) entre os subcompartimentos celulares. A proteína GAPDH está apresentada como

um marcador endógeno. Os gráficos representam a média de triplicatas de injeção das amostras, com seus respectivos desvios padrão.

Contrapondo a expressão entre os subcompartimentos celulares e a análise do extrato proteico total celular (Figura 45), é possível observar a importância do processo de fracionamento subcelular. Este, evidencia a regulação das proteínas, a qual pode não ser observada na análise do extrato proteico total, e sua localização dentro das células, a qual possui influência na função das proteínas.

Conforme pode ser observado pelas Figuras 45 e 46, o tratamento com o fator de crescimento EGF induziu a regulação diferencial de algumas proteínas entre os diferentes subcompartimentos, como as proteínas LONP1, PRDX3 e ARPC2, as quais apresentaram diminuição nas frações de núcleo e citoplasma e aumento na fração de membrana. As mesmas proteínas também apresentaram variação de expressão entre os subcompartimentos na análise das células MCF7-SNAIL, apresentando também diminuição na fração de núcleo, porém aumento na fração de citoplasma (Figura 44). Essas proteínas podem representar potenciais eventos de translocação subcelular em comum entre os tratamentos.

Discussão

5. Discussão

O desenvolvimento tumoral é um processo que compreende diversas etapas e consiste no desenvolvimento progressivo de células normais para um estado neoplásico através de diversas mudanças bioquímicas e fenotípicas. As principais características compartilhadas pela maioria dos tumores, descritas por Hanahan e Weinberg (2011), são denominadas marcas do câncer (*hallmarks*) e consistem na autossuficiência em sinais de crescimento; insensibilidade a sinais anti-tumorais; mecanismos de evasão da apoptose; sustentação da angiogênese; potencial replicativo ilimitado; capacidade de modificar, ou reprogramar, o metabolismo celular de maneira a suportar a proliferação neoplásica; capacidade de escapar da vigilância imunológica; instabilidade genômica e mutabilidade, que proporcionam alterações genéticas que dirigem a progressão tumoral; inflamação promovida pelo tumor, que pode suportar inadvertidamente as capacidades tumorais, e, por fim, a invasão tecidual e metástase (Hanahan and Weinberg 2011).

A metástase, responsável por, aproximadamente, 90% das mortes causadas por câncer (Mehlen and Puisieux 2006), é um processo formado por uma sequência de passos, denominados cascata de invasão-metástase (Fidler 2003, Talmadge and Fidler 2010), a qual permite às células tumorais migrarem e invadirem vasos sanguíneos e colonizarem locais distantes (Hanahan and Weinberg 2011). Assim, os métodos mais efetivos para a melhoria dos índices de morbidade e mortalidade relacionados ao câncer são a detecção precoce, a prevenção e o tratamento da metástase.

A disseminação e a motilidade celular podem ocorrer através de alguns processos principais, entre eles a transição epitelial-mesenquimal (EMT). A EMT é um processo no qual as células epiteliais adquirem um fenótipo mesenquimal

através de alterações celulares e microambientais complexas, como a diminuição de marcadores epiteliais, expressão de marcadores mesenquimais, reorganização do citoesqueleto e degradação da membrana basal, resultando na perda da polaridade apical-basal característica de células epiteliais, perda do contato entre as células e aquisição de capacidades invasivas e migratórias (Kalluri and Weinberg 2009, Thiery, Acloque et al. 2009, Zheng and Kang 2014). Além disso, as células se tornam mais resistentes à apoptose, aumentam consideravelmente a produção de componentes da matriz extracelular e adquirem uma morfologia fibroblastóide (Kalluri and Neilson 2003).

Alguns fatores são considerados reguladores chave do processo de EMT, como SNAIL (Moody, Perez et al. 2005, Vetter, Le Béhec et al. 2009, Naber, Drabsch et al. 2013, Lamouille, Xu et al. 2014, Zheng and Kang 2014). A superexpressão deste fator de transcrição é encontrada em diversos tipos tumorais, se correlaciona com a agressividade tumoral (Blanco, Moreno-Bueno et al. 2002, Peinado, Olmeda et al. 2007) e promove a recorrência tumoral (Moody, Perez et al. 2005). Neste estudo, buscou-se, inicialmente, utilizar proteômica para identificar reguladores adicionais da EMT, dependentes da superexpressão de SNAIL, na linhagem de adenocarcinoma de mama MCF7, uma vez que as principais proteínas reguladoras da EMT induzida por SNAIL podem potencialmente representar alvos para redução da metástase e progressão tumoral. Além disso, este estudo buscou também avaliar alterações proteômicas em outros modelos de indução da EMT, como o tratamento com o inibidor de histonas deacetilases SAHA e o tratamento com o fator de crescimento EGF nas células MCF7.

Inicialmente, após a transdução das células MCF7 com o FT SNAIL, foi realizada uma caracterização detalhada do processo de EMT antes da realização da

análise proteômica. As análises morfológicas, ensaio de migração celular e a avaliação de expressão gênica de genes relacionados ao processo foram desenvolvidas durante o período de mestrado da aluna, e confirmam a aquisição de um fenótipo fibroblastóide com capacidade migratória pelas células superexpressando SNAIL (Palma 2014, Palma, Grassi et al. 2016).

De maneira a avaliar alterações proteômicas quantitativas detalhadas durante a indução do processo de EMT pela superexpressão de SNAIL, foi realizado o procedimento de fracionamento subcelular para obtenção de frações enriquecidas em proteínas de núcleo, citoplasma e membrana seguido de GEL-LC-MS/MS (Dreger 2003, Thomé, dos Santos et al. 2012). A análise quantitativa baseada na estratégia proteômica SILAC padrão não foi compatível com as células MCF7-SNAIL, uma vez que houve significativa diminuição na proliferação celular com o cultivo nesse meio. Para permitir uma análise quantitativa detalhada e acurada, foi desenvolvida uma nova abordagem na qual foi utilizada o extrato proteico da célula de referência MDA-MB-231 marcada com o isótopo pesado do aminoácido lisina ($^{13}\text{C}_6$) e este foi adicionado em ambas as células MC7-SNAIL e MCF7-controle antes do fracionamento subcelular. O método foi uma adaptação da abordagem super-SILAC (Geiger, Cox et al. 2010), e o racional para essa abordagem consiste na capacidade de comparar as células agressivas e migratórias MDA-MB-231, representativas de um estágio mais avançado da progressão do câncer de mama, com as células MCF7, representativas de estágios mais iniciais da progressão tumoral e que estão adquirindo características migratórias e invasivas através da EMT. Assim, proteínas com regulação similar na comparação MCF7-SNAIL/MCF7-controle e MDA-MB-231/MCF7-controle foram inicialmente priorizadas e estão

potencialmente relacionadas com a agressividade, capacidade migratória e fenótipo metastáticos das células induzidas à EMT pela superexpressão de SNAIL.

A coleta dos dados proteômicos por LC-MS/MS das frações subcelulares enriquecidas em proteínas de núcleo e citoplasma dessas células também foi realizada durante o período de mestrado da aluna, tendo sido identificadas as principais proteínas aumentadas ou diminuídas pela indução da EMT nas duas frações subcelulares e os processos de endocitose, adesão celular, fosforilação oxidativa e vias metabólicas como os principais processos celulares relacionados às proteínas reguladas pela superexpressão de SNAIL nesses subcompartimentos (Palma 2014). Durante o período de doutorado, foi realizada a coleta dos dados proteômicos da fração de membrana das células, e os três subproteomas foram processados em conjunto de maneira a identificar alterações de expressão proteica entre os subcompartimentos e correlações entre ambas as linhagens celulares utilizadas no estudo.

Diversos exemplos demonstram o significativo enriquecimento de proteínas em uma única fração, suportando a importância do fracionamento subcelular para a clara demonstração da regulação das proteínas. Em termos de potenciais processos celulares governando a expressão diferencial em diferentes subcompartimentos, são destacadas as translocações núcleo-citoplasma e outros eventos de transporte de proteínas. Como descrito na literatura, a localização de proteínas é altamente dinâmica e garante a correta fisiologia celular, uma vez que as proteínas podem possuir diferentes funções e interações em diferentes locais (Wang and Hung 2005). Esse processo possui grande importância durante a EMT, e a proteína SNAIL é um dos exemplos, uma vez que modificações pós-traducionais que são iniciadas por

vias de sinalização controlam sua localização e degradação e, consequentemente, a sua atividade (Zhou, Deng et al. 2004).

Diversas proteínas diferencialmente expressas observadas nas análises proteômica das células MCF7-SNAIL e posteriormente verificadas por *western blotting* já foram descritas como relacionadas à EMT e progressão tumoral. Entre elas, diversas proteínas foram mensuradas em amostras clínicas de câncer de mama e tecido normal de mama por imunohistoquímica no banco de dados do *Human Protein Atlas* (Figura 10). Algumas dessas proteínas são muito abundantes no tecido normal de mama como MATR3 (Matrin-3), CPSF7 (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor Subunit 7), DX39B (Spliceosome RNA Helicase DDX39B) e HDAC1 (Histone Deacetylase 1), e apresentaram diminuição de expressão durante a EMT induzida por SNAIL e também no fenótipo agressivo das células MDA-MB-231. MATR3 possui papel na transcrição, pode interagir com outras proteínas da matriz nuclear e se liga a RNAm (Salton, Elkon et al. 2011). CPFS7 é um componente do complexo do fator de clivagem Im que possui um papel fundamental no processamento de pre-RNAm 3', se liga a substratos de RNAm clivados e poliadenilados e é um alvo de miR-26b, o qual é um potente regulador do comportamento tumoral em tumores positivos para receptores de estrógeno (Verghese, Drury et al. 2013). DX39B (BAT1) é parte do complexo TREX que está envolvido na exportação nuclear de RNAm e tem sido correlacionado com a agressividade tumoral (Guo, Hakimi et al. 2005, Masuda, Das et al. 2005). HDAC1 tem sido extensivamente associada à regulação epigenética de diversos processos, especialmente o câncer (Lakshmaiah, Jacob et al. 2014). De fato, HDAC1 tem sido recentemente descrita como um repressor de metástase (Gong, Qu et al. 2014). Juntos, esses dados sugerem que importantes processos envolvendo ácidos

nucleicos estão sob regulação da superexpressão de SNAIL e podem atuar como repressores da EMT e até mesmo repressores tumorais.

Além disso, a detecção do aumento dos níveis de TGF β 1 no meio condicionado das células MCF-SNAIL representa um aumento na secreção desse fator de crescimento no meio extracelular. Os fatores de transcrição SNAIL e SLUG são capazes de ativar a via de sinalização de TGF β em células de câncer de mama (Dhasarathy, Phadke et al. 2011), enquanto a produção de TGF β também estimula o aumento da expressão de SNAIL, SLUG e ZEB1 (Gupta and Srivastava 2014). Esse *feedback* positivo é particularmente importante para a sustentação da EMT. Entretanto, conforme demonstrado neste trabalho, vias adicionais de *cross-talk* entre proteínas estão também se tornando evidentes (Lamouille, Xu et al. 2014, Lindsey and Langhans 2014).

Conforme demonstrado na Figura 12, a ligação e remodelamento da cromatina e o controle do ciclo celular foram as principais redes alteradas pela superexpressão de SNAIL nos dados proteômicos de larga escala. A correlação entre esses dois importantes processos celulares é sugerida em nossos dados pelo *link* entre as proteínas HDAC1 e CDK1. Há evidências de que CDK1 é a quinase responsável pela fosforilação de alguns parceiros de ligação de HDAC1 (Guo and Friedman 2011), mas informações adicionais na literatura são escassas. Assim, neste estudo foram avaliados os efeitos de SNAIL no ciclo celular e no controle epigenético de maneira independente.

SNAIL é responsável, em alguma extensão, pela diminuição da capacidade proliferativa celular. De fato, foi observada uma redução na capacidade de proliferação das células MCF7 após a superexpressão de SNAIL. Resultados adicionais foram obtidos pelo ensaio de incorporação de BrdU, demonstrando uma

parada no ciclo celular nas fases G0/G1. Tem sido demonstrado que, além do fato de SNAIL reduzir o crescimento tumoral, ele também promove a invasividade e resistência à morte celular (Barrallo-Gimeno and Nieto 2005). SNAIL impede a transição da fase inicial para a fase final de G1 pela manutenção de baixos níveis de ciclina D e pode bloquear a transição G1/S pela manutenção de altos níveis de p21. SNAIL também promove a resistência aos efeitos letais da parada do ciclo celular pela ativação da via PI3K/AKT. A conversão para um fenótipo mesenquimal implica que uma profunda reorganização do citoesqueleto pode ser incompatível com um estado altamente proliferativo (Vega, Morales et al. 2004). Interessantemente, a migração de linfócitos e células de hepatoma ocorre apenas na fase G1 (Vega, Morales et al. 2004). Consequentemente, a proliferação celular não é essencial à malignidade tumoral, apesar de um aumento na divisão celular ser essencial à formação tumoral e progressão.

Em nossos dados, foi observado que tanto a superexpressão de SNAIL quanto a inibição de HDACs em células MCF7 pelo tratamento com SAHA induziram a fosforilação de AKT. O tratamento com SAHA também apresentou um efeito dose-dependente no aumento dos níveis de SNAIL. Além de promover a resistência à morte celular, a atividade de AKT também está envolvida em diversos outros processos celulares, como a regulação do estresse oxidativo (Azad, Chen et al. 2009). De fato, um dos principais processos regulados nos nossos dados proteômicos foi a fosforilação oxidativa, o que podem também explicar e/ou reforçar os altos níveis de fosforilação de AKT nas células MCF7-SNAIL, mesmo após cinco dias em cultura. Da mesma maneira, a ativação de AKT nas células tratadas com SAHA pode estar relacionada ao mesmo processo. Diversos trabalhos mostraram que inibidores de HDACs podem estimular a geração de espécies reativas de

oxigênio, a qual pode por sua vez ativar AKT pela inibição de PTEN (*Phosphatase tensin homologue*) (Azad, Chen et al. 2009).

Os efeitos de SNAIL nas alterações epigenéticas durante a EMT e o câncer ainda são pouco claros. Apesar de SNAIL ser capaz de induzir efeitos de longo prazo em seus alvos transcricionais, foi demonstrado que ele se liga ao promotor de seus alvos de uma maneira transiente. Isso pode ser causado pelo recrutamento de cofatores adicionais que liberam SNAIL de seu sítio de ligação ou ele pode ser liberado pelas próprias alterações na cromatina (Javaid, Zhang et al. 2013). Evidências demonstram que SNAIL interage com complexos repressores e pode causar modificações bivalentes em histonas, permitindo a genes afetados serem susceptíveis à reativação (Kiesslich, Pichler et al. 2013). SNAIL pode recrutar o complexo Sin3A-HDAC1-HDAC2 para o promotor de E-caderina, promovendo a sua repressão (Peinado, Ballestar et al. 2004). Foi demonstrado que a inativação de HDACs pode também induzir a EMT pelo aumento nos níveis de SNAIL, promovendo a sua acetilação e, assim, inibindo a sua ubiquitinação (Jiang, Wang et al. 2013). Além de induzir o aumento de SNAIL, a inibição de HDAC1 pode também promover a expressão transcricional desse FT e a sua translocação nuclear (Jiang, Wang et al. 2013). Neste estudo, foi mostrado o processo oposto. A superexpressão de SNAIL induziu uma diminuição nos níveis de HDAC1 durante a indução de EMT. Notavelmente, não foi observado apenas o *cross-talk* entre SNAIL e HDAC1, reforçado pela análise de expressão gênica no banco de dados do TCGA, mas ambos SNAIL e HDAC1 também aumentaram a expressão de efetores importantes da progressão tumoral, como ITGB1. De fato, a atividade de ITGB1 e o aumento de sua expressão tem sido correlacionada com a malignidade e agressividade tumoral em diferentes tipos de câncer (Kurozumi, Goto et al. 2015, Zhang and Zou 2015).

Apesar de toda a informação sobre mecanismos epigenéticos na regulação da EMT, ainda não é conhecido como os modificadores de cromatina e as marcas de histona regulam esse processo (Wu, Tsai et al. 2012).

Em adição aos dois modelos já discutidos de indução da EMT, foi avaliada também a indução do processo pelo tratamento com o fator de crescimento EGF (*Epidermal Growth Factor*). Sinais indutores da EMT emanados do estroma associado ao tumor, como HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), EGF, PDGF (*Platelet-derived Growth Factor*) e TGF β , parecem ser responsáveis pela indução ou ativação funcional nas células tumorais de uma série de fatores de transcrição indutores da EMT, como SNAIL, SLUG, ZEB1, TWIST, entre outros (Jechlinger, Grünert et al. 2002, Thiery 2002, Shi and Massagué 2003, Kokudo, Suzuki et al. 2008, Medici, Hay et al. 2008, Niessen, Fu et al. 2008). Uma vez expressos e ativados, cada um desses fatores de transcrição pode agir para regular o programa da EMT. A implementação da EMT nas células depende da ativação de uma série de redes de sinalização intracelular, como ERK/MAPK, PI3K/AKT, Smads, RhoB, Beta-catenina, LEF (*Lymphoid Enhancer binding Factor*), Ras e c-Fos, assim como proteínas de superfície celular como as integrinas (Tse and Kalluri 2007).

Estudos vêm demonstrando o papel do fator de crescimento EGF na promoção da metástase do câncer, entre eles o câncer de mama. A expressão anormal de EGF e seu receptor EGFR (ErbB-1) tem sido extensivamente descrita como uma causa principal da progressão e metástase do câncer de mama (Navolanic, Steelman et al. 2003, Lo, Hsu et al. 2007, Olsen, Bechmann et al. 2012). Esses fatores podem ativar as proteínas ERK 1/2 (*Extracellular Regulated Kinase 1/2*) ou PI3K/AKT (*Phosphoinositide-3 kinase/Akt*), as quais podem potencialmente induzir a EMT em células tumorais (Kondapaka, Fridman et al. 1997, Ellerbroek,

Halbleib et al. 2001, Thiery 2002, Grünert, Jechlinger et al. 2003, Christiansen and Rajasekaran 2006).

De fato, o tratamento com o fator de crescimento EGF 10 ng/mL por 48h foi capaz de induzir alterações morfológicas características do processo de EMT nas células MCF7, assim como promoveu a regulação de proteínas chave do processo, como a diminuição de E-caderina (CDH1) e aumento das proteínas Vimentina e SNAIL, verificadas através de ensaios de *western blotting*, análise por *High Content Screening* e MRM. A análise por HCS permitiu também verificar alterações em diversos parâmetros morfológicos celulares, como aumento da área celular, diminuição no número de células vizinhas e diminuição da área de contato celular. Associado a isso, através dos ensaios de migração e proliferação celular, foi possível observar um aumento na capacidade migratória dessas células após o tratamento com EGF, denotando mais uma vez a aquisição de um fenótipo mesenquimal migratório pelas mesmas.

Através da análise da via de sinalização de EGFR pelo array de proteínas e pela técnica de western blotting, foi possível observar a ativação principalmente das proteínas AKT (Ser473), MEK 1/2 (Ser 221) e (Ser217/221) e ERK 1/2 (Thr 202/Tyr204), sendo esta última detectada principalmente na fração citoplasmática. O receptor de EGR, EGFR, pertence à família ErbB de receptores tirosina quinase (RTK), a qual consiste em quatro proteínas transmembrana, ErbB1/EGFR, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3, e ErbB4/HER4 (Kyriakopoulou, Kefali et al. 2018). EGFR constitui um importante promotor de doenças, entre elas o câncer, assim como é um alvo validado de drogas. É bem estabelecido que EGFR está desregulado ou mutado em diversas malignidades epiteliais, como o câncer de cólon, de pulmão e o de mama (Harari 2004, Boopathy, Lynn et al. 2018). Especificamente no câncer de

mama, entre os vários subtipos, EGFR é mais frequentemente expresso nos tipos triplo negativo e inflamatório, os quais são altamente agressivos, e seu perfil de expressão é inversamente proporcional com o status do receptor de estrógeno (ER) (Kyriakopoulou, Kefali et al. 2018). Enquanto a linhagem MDA-MB-231 é uma linhagem triplo negativa, a linhagem MCF7 é positiva para o receptor de estrógeno (ER). Após o tratamento com o fator de crescimento EGF foi possível observar uma diminuição nos níveis desse receptor nas células MCF7, o que pode estar correlacionado com o aumento da agressividade tumoral induzida pelo processo de EMT. Na análise do banco de dados genômicos do TCGA, também foi observado um menor número de amostras positivas para ER na condição alto SNAIL/baixo HDAC1 em relação aos demais grupos, sugerindo um evento em comum entre ambos os tipos de indução da EMT (tratamento com EGF e superexpressão de SNAIL).

A ativação da via de EGFR inicia uma ampla rede de moléculas de sinalização como Ras-ERK/MAPK, AKT, Src Stat e PKC. A ativação de ERK/MAPK é um dos principais nós de sinalização celular, e possui uma variedade de substratos, transmitindo, principalmente, sinais de crescimento e proliferação. MEK 1 é uma quinase que, após a ativação da via EGFR, é fosforilada por Raf e, por sua vez, fosforila a quinase ERK nos sítios Thr202 e Tyr 204, promovendo a sua ativação (Shaul and Seger 2007). AKT é também uma outra importante quinase *downstream* de EGFR, sendo ativada por diversos RTKs e possuindo um grande número de sinais intracelulares, podendo, conforme descrito anteriormente, gerar uma resistência à morte celular. Vale ressaltar que a ativação de AKT representa também um dos eventos em comum entre os três tipos de indução da EMT, possuindo uma ativação sustentada mesmo após vários dias de cultivo.

Assim como no modelo de indução da EMT pela superexpressão de SNAIL, o tratamento das células MCF7 com o fator de crescimento EGF, induziu alterações em proteínas importantes relacionadas ao ciclo celular. Foi observada uma diminuição nos níveis das proteínas p21^{Waf1/Cip1} e p27^{Kip1}, e um aumento nos níveis de CDK1, principalmente na fração enriquecida em proteínas de membrana. A transição de uma fase para outra do ciclo celular ocorre de uma forma bastante ordenada e é regulada por diferentes proteínas chave chamadas de ciclinas dependentes de quinase (CDKs), uma família de proteínas serina/treonina quinases ativadas em pontos específicos do ciclo celular. Foram identificadas até o momento nove CDKs e destas, cinco são ativas durante o ciclo celular, ou seja, durante G1 (CDK4, CDK6 e CDK2), G2 e M (CDK1) (van den Heuvel and Harlow 1993). Na fase tardia de G2 e início de M, o complexo CDK1-ciclina A se forma para promover a entrada em M, que ainda é regulada pelo complexo CDK1-ciclina B (Malumbres and Barbacid 2005).

A atividade das CDKs pode ser neutralizada por proteínas inibidoras do ciclo celular, chamadas inibidoras de CDK (CDKI), as quais se ligam às CDKs sozinhas ou no complexo CDK-ciclina. A família Cip/Kip, formada por p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} e p57^{Kip2}, é responsável por inibir o complexo CDK1-ciclina B, podendo promover a retenção nuclear do complexo em resposta ao estresse (Charrier-Savournin, Château et al. 2004). Dessa forma, o aumento nos níveis de CDK1 observados em nossos resultados pode estar relacionado à diminuição nos níveis das CDKIs p21 e p27. Enquanto os níveis de expressão de CDK1 são baixos ou não detectados em amostras de tecido normal de mama presentes no banco de dados do *The Human Protein Atlas*, no tecido de câncer de mama a expressão desta proteína é detectada em níveis médios a altos, podendo estar correlacionada com o desenvolvimento

tumoral. De fato, um alto nível de expressão de CDK1 está associado com um mau prognóstico no câncer epitelial de ovário (Xi, Huang et al. 2015) e é descrito como um importante alvo de inibição para o tratamento do câncer (Canavese, Santo et al. 2012).

Além das alterações já discutidas induzidas pelo tratamento com EGF nas células MCF7, a análise dos subcompartimentos celulares revelou também alterações diferenciais de proteínas selecionadas entre as frações enriquecidas em proteínas de núcleo, citoplasma e membrana. Da lista de proteínas selecionadas a partir dos dados de regulação das células MCF7-SNAIL, as proteínas CDH1, ITGB1, G6PD, LONP1, ARPC2 e PRDX3 apresentaram regulação em apenas um dos subcompartimentos ou regulação diferencial entre os três subcompartimentos analisados. Vale ressaltar, que o aumento na expressão de ITGB1, especificamente na fração de membrana, foi um outro ponto em comum entre os três modelos de indução da EMT analisados. Conforme discutido anteriormente, o aumento da expressão de ITGB1, tem sido correlacionada com a malignidade e agressividade tumoral em diferentes tipos de câncer (Kurozumi, Goto et al. 2015, Zhang and Zou 2015).

As proteínas ARPC2, LONP1 e PRDX3 foram as principais proteínas que apresentaram regulação diferencial entre os subcompartimentos, tanto no modelo de superexpressão de SNAIL quanto no tratamento de células MCF7 com o fator de crescimento EGF. ARPC2 (*Actin-related protein 2/3 complex subunit 2*) está envolvida com a regulação do citoesqueleto, um dos principais eventos da EMT. O citoesqueleto, formado pelo citoesqueleto de actina, a rede de microtúbulos e os filamentos intermediários, provém estrutura e força mecânica necessárias para o processo de EMT. A reorganização dinâmica do citoesqueleto de actina é um pré-

requisito para a morfologia, migração e invasão de células tumorais; a rede de microtúbulos fornece a força motriz durante a migração celular e os filamentos intermediários são reorganizados, com uma diminuição de redes ricas em citoqueratinas para redes ricas em vimentina, acompanhada por um grande aumento na motilidade celular (Sun, Fang et al. 2015).

PRDX3 (*Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial*), um membro da família de Peroxirredoxinas, é responsável pela neutralização de espécies reativas de oxigênio, sendo seu gene descrito como um alvo de c-Myc necessário para manter a função normal mitocondrial (Wonsey, Zeller et al. 2002). A regulação de PDRX3 foi demonstrada estar relacionada com a tumorigênese, estando superexpressa em diversos tipos de tumores, como próstata, mama e pulmão, e promovendo a sobrevivência celular pela proteção contra o estresse oxidativo (Whitaker, Patel et al. 2013).

LONP1 (*Lon protease homolog, mitochondrial*), uma serino protease altamente conservada durante a evolução, está envolvida na degradação de proteínas danificadas e oxidadas da matriz mitocondrial, no correto enovelamento de proteínas importadas na mitocôndria e na manutenção do DNA mitocondrial (Pinti, Gibellini et al. 2015), se localizando na matriz mitocondrial. A expressão de LONP1 é induzida por diversos estímulos, como hipóxia e espécies reativas de oxigênio, promovendo proteção contra o estresse celular. O aumento na expressão de LONP1 está relacionado à progressão tumoral, favorecendo a troca entre um metabolismo respiratório para um glicolítico, e contribuindo assim para a sobrevivência tumoral e para a transição epitelial mesenquimal (Pinti, Gibellini et al. 2015). Por outro lado, a diminuição na expressão de LONP1 é associada ao envelhecimento e senescência celular. A análise de sua distribuição mostra que aproximadamente 90% de LONP1

está presente solúvel na matriz mitocondrial, e o restante está associado com a membrana interna mitocondrial (Pinti, Gibellini et al. 2015).

Em conclusão, nossos estudos de indução da EMT pela superexpressão do FT SNAIL, pelo tratamento com o inibidor de histonas deacetilases SAHA e pelo tratamento com o fator de crescimento EGF nas células de adenocarcinoma de mama MCF7 mostraram alterações importantes relacionadas à morfologia celular e importantes marcadores da EMT e progressão tumoral, além de ter revelado novos alvos diferencialmente expressos entre os subcompartimentos celulares e alterações em comum entre os três tipos de indução. Esses novos resultados podem representar avanços significativos no entendimento dos mecanismos de aquisição de um fenótipo maligno que favorecem a metastatização de um tumor, iniciado pela transição epitelial-mesenquimal. Além disso, o conhecimento de processos e regulações em comum entre diferentes modelos progressão tumoral pode revelar moléculas chave que podem auxiliar no desenho de novas estratégias para a inibição da metástase do câncer, podendo potencialmente aumentar a sobrevida e a qualidade de vida das pacientes.

Conclusão

6. Conclusão

Neste estudo foi realizada a avaliação proteômica de diferentes modelos de indução da EMT nas células de adenocarcinoma de mama MCF7. Esses modelos consistiram na superexpressão do fator de transcrição SNAIL, no tratamento com o inibidor de histonas deacetilases SAHA e no tratamento com o fator de crescimento EGF. Os três tipos de tratamento induziram alterações morfológicas e proteicas consistentes com a aquisição de um fenótipo mesenquimal pelas células, demonstrando a indução do processo de EMT. Além disso, o fracionamento subcelular para geração de frações enriquecidas em proteínas de núcleo, citoplasma e membrana se revelou essencial para a análise da regulação de proteínas, tendo revelado novos alvos diferencialmente expressos entre os subcompartimentos celulares e alterações em comum entre os três tipos de indução. Esses resultados podem representar avanços significativos no entendimento dos mecanismos de aquisição de um fenótipo maligno que favorecem a metastatização de um tumor, iniciado pela transição epitelial-mesenquimal, abrindo possibilidades para tentar alterar processos relacionados à progressão tumoral e ao processo metastático.

Referências Bibliográficas

7. Referências bibliográficas

- Adam, R. M., W. Yang, D. Di Vizio, N. K. Mukhopadhyay and H. Steen (2008). "Rapid preparation of nuclei-depleted detergent-resistant membrane fractions suitable for proteomics analysis." BMC Cell Biol **9**: 30.
- Azad, M. B., Y. Chen and S. B. Gibson (2009). "Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment." Antioxid Redox Signal **11**(4): 777-790.
- Barr, S., S. Thomson, E. Buck, S. Russo, F. Petti, I. Sujka-Kwok, A. Eyzaguirre, M. Rosenfeld-Franklin, N. W. Gibson, M. Miglarese, D. Epstein, K. K. Iwata and J. D. Haley (2008). "Bypassing cellular EGF receptor dependence through epithelial-to-mesenchymal-like transitions." Clin Exp Metastasis **25**(6): 685-693.
- Barrallo-Gimeno, A. and M. A. Nieto (2005). "The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer." Development **132**(14): 3151-3161.
- Berx, G., E. Raspé, G. Christofori, J. P. Thiery and J. P. Sleeman (2007). "Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer." Clin Exp Metastasis **24**(8): 587-597.
- Blanco, M. J., G. Moreno-Bueno, D. Sarrio, A. Locascio, A. Cano, J. Palacios and M. A. Nieto (2002). "Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas." Oncogene **21**(20): 3241-3246.
- Bogachek, M. V., Y. Chen, M. V. Kulak, G. W. Woodfield, A. R. Cyr, J. M. Park, P. M. Spanheimer, Y. Li, T. Li and R. J. Weigel (2014). "Sumoylation pathway is required to maintain the basal breast cancer subtype." Cancer Cell **25**(6): 748-761.
- Bogachek, M. V., J. P. De Andrade and R. J. Weigel (2015). "Regulation of epithelial-mesenchymal transition through SUMOylation of transcription factors." Cancer Res **75**(1): 11-15.
- Boopathy, G. T. K., J. L. S. Lynn, S. Wee, J. Gunaratne and W. Hong (2018). "Phosphorylation of Mig6 negatively regulates the ubiquitination and degradation of EGFR mutants in lung adenocarcinoma cell lines." Cell Signal **43**: 21-31.
- Brabletz, T. (2012). "To differentiate or not--routes towards metastasis." Nat Rev Cancer **12**(6): 425-436.
- Buck, E., A. Eyzaguirre, S. Barr, S. Thompson, R. Sennello, D. Young, K. K. Iwata, N. W. Gibson, P. Cagnoni and J. D. Haley (2007). "Loss of homotypic cell adhesion by epithelial-mesenchymal transition or mutation limits sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition." Mol Cancer Ther **6**(2): 532-541.

- Butler, G. S. and C. M. Overall (2009). "Proteomic identification of multitasking proteins in unexpected locations complicates drug targeting." Nat Rev Drug Discov **8**(12): 935-948.
- Canavese, M., L. Santo and N. Raje (2012). "Cyclin dependent kinases in cancer: potential for therapeutic intervention." Cancer Biol Ther **13**(7): 451-457.
- Cano, A., M. A. Pérez-Moreno, I. Rodrigo, A. Locascio, M. J. Blanco, M. G. del Barrio, F. Portillo and M. A. Nieto (2000). "The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression." Nat Cell Biol **2**(2): 76-83.
- Cardiff, R. D. (2005). "Epithelial to Mesenchymal Transition Tumors: Fallacious or Snail's Pace?" Clin Cancer Res **11**(24 Pt 1): 8534-8537.
- Chacinska, A., C. M. Koehler, D. Milenkovic, T. Lithgow and N. Pfanner (2009). "Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms." Cell **138**(4): 628-644.
- Charrier-Savournin, F. B., M. T. Château, V. Gire, J. Sedivy, J. Piette and V. Dulic (2004). "p21-Mediated nuclear retention of cyclin B1-Cdk1 in response to genotoxic stress." Mol Biol Cell **15**(9): 3965-3976.
- Chen, J., H. Xu, X. Zou, J. Wang, Y. Zhu, H. Chen, B. Shen, X. Deng, A. Zhou, Y. E. Chin, F. J. Rauscher, C. Peng and Z. Hou (2014). "Snail recruits Ring1B to mediate transcriptional repression and cell migration in pancreatic cancer cells." Cancer Res **74**(16): 4353-4363.
- Christiansen, J. J. and A. K. Rajasekaran (2006). "Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis." Cancer Res **66**(17): 8319-8326.
- Dhasarathy, A., D. Phadke, D. Mav, R. R. Shah and P. A. Wade (2011). "The transcription factors Snail and Slug activate the transforming growth factor-beta signaling pathway in breast cancer." PLoS One **6**(10): e26514.
- Dreger, M. (2003). "Proteome analysis at the level of subcellular structures." Eur J Biochem **270**(4): 589-599.
- Drissi, R., M. L. Dubois and F. M. Boisvert (2013). "Proteomics methods for subcellular proteome analysis." FEBS J **280**(22): 5626-5634.
- Ellerbroek, S. M., J. M. Halbleib, M. Benavidez, J. K. Warmka, E. V. Wattenberg, M. S. Stack and L. G. Hudson (2001). "Phosphatidylinositol 3-kinase activity in epidermal growth factor-stimulated matrix metalloproteinase-9 production and cell surface association." Cancer Res **61**(5): 1855-1861.
- Fabbro, M. and B. R. Henderson (2003). "Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling." Exp Cell Res **282**(2): 59-69.

- Faca, V., M. Coram, D. Phanstiel, V. Glukhova, Q. Zhang, M. Fitzgibbon, M. McIntosh and S. Hanash (2006). "Quantitative analysis of acrylamide labeled serum proteins by LC-MS/MS." J Proteome Res **5**(8): 2009-2018.
- Fidler, I. J. (2003). "The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited." Nat Rev Cancer **3**(6): 453-458.
- Franceschini, A., D. Szklarczyk, S. Frankild, M. Kuhn, M. Simonovic, A. Roth, J. Lin, P. Minguez, P. Bork, C. von Mering and L. J. Jensen (2013). "STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration." Nucleic Acids Res **41**(Database issue): D808-815.
- Francí, C., M. Takkunen, N. Dave, F. Alameda, S. Gómez, R. Rodríguez, M. Escrivà, B. Montserrat-Sentís, T. Baró, M. Garrido, F. Bonilla, I. Virtanen and A. García de Herreros (2006). "Expression of Snail protein in tumor-stroma interface." Oncogene **25**(37): 5134-5144.
- Gao, J., Q. Yan, J. Wang, S. Liu and X. Yang (2015). "Epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 is mediated by AP1-dependent EpCAM expression in MCF-7 cells." J Cell Physiol **230**(4): 775-782.
- Gauthier, D. J. and C. Lazure (2008). "Complementary methods to assist subcellular fractionation in organellar proteomics." Expert Rev Proteomics **5**(4): 603-617.
- Geiger, T., J. Cox, P. Ostasiewicz, J. R. Wisniewski and M. Mann (2010). "Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue." Nat Methods **7**(5): 383-385.
- Gong, C., S. Qu, X. B. Lv, B. Liu, W. Tan, Y. Nie, F. Su, Q. Liu, H. Yao and E. Song (2014). "BRMS1L suppresses breast cancer metastasis by inducing epigenetic silence of FZD10." Nat Commun **5**: 5406.
- Grassi, M. L., C. d. S. Palma, C. H. Thome, G. P. Lanfredi, A. Poersch and V. M. Faca (2017). "Proteomic analysis of ovarian cancer cells during epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by epidermal growth factor (EGF) reveals mechanisms of cell cycle control." Journal of Proteomics **151**: 2-11.
- Grünert, S., M. Jechlinger and H. Beug (2003). "Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(8): 657-665.
- Guo, H. and A. D. Friedman (2011). "Phosphorylation of RUNX1 by cyclin-dependent kinase reduces direct interaction with HDAC1 and HDAC3." J Biol Chem **286**(1): 208-215.
- Guo, S., M. A. Hakimi, D. Baillat, X. Chen, M. J. Farber, A. J. Klein-Szanto, N. S. Cooch, A. K. Godwin and R. Shiekhataar (2005). "Linking transcriptional elongation and messenger RNA export to metastatic breast cancers." Cancer Res **65**(8): 3011-3016.

- Gupta, P. and S. K. Srivastava (2014). "HER2 mediated de novo production of TGF β leads to SNAIL driven epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer." Mol Oncol **8**(8): 1532-1547.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Harari, P. M. (2004). "Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology." Endocr Relat Cancer **11**(4): 689-708.
- Hill, R., B. Cautain, N. de Pedro and W. Link (2014). "Targeting nucleocytoplasmic transport in cancer therapy." Oncotarget **5**(1): 11-28.
- Hung, M. C. and W. Link (2011). "Protein localization in disease and therapy." J Cell Sci **124**(Pt 20): 3381-3392.
- Javaid, S., J. Zhang, E. Anderssen, J. C. Black, B. S. Wittner, K. Tajima, D. T. Ting, G. A. Smolen, M. Zubrowski, R. Desai, S. Maheswaran, S. Ramaswamy, J. R. Whetstine and D. A. Haber (2013). "Dynamic chromatin modification sustains epithelial-mesenchymal transition following inducible expression of Snail-1." Cell Rep **5**(6): 1679-1689.
- Jechlinger, M., S. Grünert and H. Beug (2002). "Mechanisms in epithelial plasticity and metastasis: insights from 3D cultures and expression profiling." J Mammary Gland Biol Neoplasia **7**(4): 415-432.
- Jiang, G. M., H. S. Wang, F. Zhang, K. S. Zhang, Z. C. Liu, R. Fang, H. Wang, S. H. Cai and J. Du (2013). "Histone deacetylase inhibitor induction of epithelial-mesenchymal transitions via up-regulation of Snail facilitates cancer progression." Biochim Biophys Acta **1833**(3): 663-671.
- Kalluri, R. and E. G. Neilson (2003). "Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis." J Clin Invest **112**(12): 1776-1784.
- Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." J Clin Invest **119**(6): 1420-1428.
- Karin, M. and F. R. Greten (2005). "NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression." Nat Rev Immunol **5**(10): 749-759.
- Kau, T. R., J. C. Way and P. A. Silver (2004). "Nuclear transport and cancer: from mechanism to intervention." Nat Rev Cancer **4**(2): 106-117.
- Keller, A., A. I. Nesvizhskii, E. Kolker and R. Aebersold (2002). "Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search." Anal Chem **74**(20): 5383-5392.
- Kiesslich, T., M. Pichler and D. Neureiter (2013). "Epigenetic control of epithelial-mesenchymal-transition in human cancer." Mol Clin Oncol **1**(1): 3-11.

- Kim, J., J. Kong, H. Chang, H. Kim and A. Kim (2016). "EGF induces epithelial-mesenchymal transition through phospho-Smad2/3-Snail signaling pathway in breast cancer cells." Oncotarget **7**(51): 85021-85032.
- Kokudo, T., Y. Suzuki, Y. Yoshimatsu, T. Yamazaki, T. Watabe and K. Miyazono (2008). "Snail is required for TGFbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells." J Cell Sci **121**(Pt 20): 3317-3324.
- Kondapaka, S. B., R. Fridman and K. B. Reddy (1997). "Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells." Int J Cancer **70**(6): 722-726.
- Kurozumi, A., Y. Goto, R. Matsushita, I. Fukumoto, M. Kato, R. Nishikawa, S. Sakamoto, H. Enokida, M. Nakagawa, T. Ichikawa and N. Seki (2015). "Tumor-suppressive microRNA-223 inhibits cancer cell migration and invasion by targeting ITGA3/ITGB1 signaling in prostate cancer." Cancer Sci.
- Kyriakopoulou, K., E. Kefali, Z. Piperigkou, H. Bassiony and N. K. Karamanos (2018). "Advances in targeting epidermal growth factor receptor signaling pathway in mammary cancer." Cell Signal **51**: 99-109.
- Lakshmaiah, K. C., L. A. Jacob, S. Aparna, D. Lokanatha and S. C. Saldanha (2014). "Epigenetic therapy of cancer with histone deacetylase inhibitors." J Cancer Res Ther **10**(3): 469-478.
- Lamouille, S., J. Xu and R. Derynck (2014). "Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(3): 178-196.
- Li, L., L. Qi, Z. Liang, W. Song, Y. Liu, Y. Wang, B. Sun, B. Zhang and W. Cao (2015). "Transforming growth factor- β 1 induces EMT by the transactivation of epidermal growth factor signaling through HA/CD44 in lung and breast cancer cells." Int J Mol Med **36**(1): 113-122.
- Lindsey, S. and S. A. Langhans (2014). "Crosstalk of Oncogenic Signaling Pathways during Epithelial-Mesenchymal Transition." Front Oncol **4**: 358.
- Lo, H. W., S. C. Hsu, W. Xia, X. Cao, J. Y. Shih, Y. Wei, J. L. Abbruzzese, G. N. Hortobagyi and M. C. Hung (2007). "Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression." Cancer Res **67**(19): 9066-9076.
- Luo, J. L., H. Kamata and M. Karin (2005). "IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy." J Clin Invest **115**(10): 2625-2632.
- Lv, Z. D., B. Kong, J. G. Li, H. L. Qu, X. G. Wang, W. H. Cao, X. Y. Liu, Y. Wang, Z. C. Yang, H. M. Xu and H. B. Wang (2013). "Transforming growth factor- β 1 enhances the invasiveness of breast cancer cells by inducing a Smad2-dependent epithelial-to-mesenchymal transition." Oncol Rep **29**(1): 219-225.
- MacLean, B., D. M. Tomazela, N. Shulman, M. Chambers, G. L. Finney, B. Frewen, R. Kern, D. L. Tabb, D. C. Liebier and M. J. MacCoss (2010). "Skyline: an open

source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments." Bioinformatics **26**(7): 966-968.

Mahdi, S. H., H. Cheng, J. Li and R. Feng (2015). "The effect of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition on the expression of intracellular calcium-handling proteins in T47D and MCF-7 human breast cancer cells." Arch Biochem Biophys **583**: 18-26.

Malumbres, M. and M. Barbacid (2005). "Mammalian cyclin-dependent kinases." Trends Biochem Sci **30**(11): 630-641.

Mani, S. A., W. Guo, M. J. Liao, E. N. Eaton, A. Ayyanan, A. Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C. C. Zhang, M. Shipitsin, L. L. Campbell, K. Polyak, C. Brisken, J. Yang and R. A. Weinberg (2008). "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells." Cell **133**(4): 704-715.

Marquèze-Pouey, B., S. Mailfert, V. Rouger, J. M. Goillaud and D. Marguet (2014). "Physiological epidermal growth factor concentrations activate high affinity receptors to elicit calcium oscillations." PLoS One **9**(9): e106803.

Masuda, S., R. Das, H. Cheng, E. Hurt, N. Dorman and R. Reed (2005). "Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing." Genes Dev **19**(13): 1512-1517.

Medici, D., E. D. Hay and B. R. Olsen (2008). "Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3." Mol Biol Cell **19**(11): 4875-4887.

Mehlen, P. and A. Puisieux (2006). "Metastasis: a question of life or death." Nat Rev Cancer **6**(6): 449-458.

Mi, H., A. Muruganujan and P. D. Thomas (2013). "PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees." Nucleic Acids Res **41**(Database issue): D377-386.

Moody, S. E., D. Perez, T. C. Pan, C. J. Sarkisian, C. P. Portocarrero, C. J. Sterner, K. L. Notorfrancesco, R. D. Cardiff and L. A. Chodosh (2005). "The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence." Cancer Cell **8**(3): 197-209.

Morel, A. P., M. Lièvre, C. Thomas, G. Hinkal, S. Ansieau and A. Puisieux (2008). "Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition." PLoS One **3**(8): e2888.

Moustakas, A. and C. H. Heldin (2007). "Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression." Cancer Sci **98**(10): 1512-1520.

Naber, H. P., Y. Drabsch, B. E. Snaar-Jagalska, P. ten Dijke and T. van Laar (2013). "Snail and Slug, key regulators of TGF- β -induced EMT, are sufficient for the induction of single-cell invasion." Biochem Biophys Res Commun **435**(1): 58-63.

- Navolanic, P. M., L. S. Steelman and J. A. McCubrey (2003). "EGFR family signaling and its association with breast cancer development and resistance to chemotherapy (Review)." Int J Oncol **22**(2): 237-252.
- Nesvizhskii, A. I., A. Keller, E. Kolker and R. Aebersold (2003). "A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry." Anal Chem **75**(17): 4646-4658.
- Niessen, K., Y. Fu, L. Chang, P. A. Hoodless, D. McFadden and A. Karsan (2008). "Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization." J Cell Biol **182**(2): 315-325.
- Olsen, D. A., T. Bechmann, B. Østergaard, P. A. Wamberg, E. H. Jakobsen and I. Brandslund (2012). "Increased concentrations of growth factors and activation of the EGFR system in breast cancer." Clin Chem Lab Med **50**(10): 1809-1818.
- Palma, C. d. S. (2014). Alterações proteômicas durante a transição epitelial-mesenquimal de células de câncer de mama induzidas pela superexpressão do fator de transcrição SNAI1. Mestrado, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
- Palma, C. d. S., M. L. Grassi, C. H. Thome, G. A. Ferreira, D. Albuquerque, M. T. Pinto, F. U. Ferreira Melo, S. Kashima, D. T. Covas, S. J. Pitteri and V. M. Faca (2016). "Proteomic Analysis of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) Reveals Cross-talk between SNAIL and HDAC1 Proteins in Breast Cancer Cells." Molecular & Cellular Proteomics **15**(3): 906-917.
- Palma, C. S., M. L. Grassi, C. H. Thomé, G. A. Ferreira, D. Albuquerque, M. T. Pinto, F. U. Melo, S. Kashima, D. T. Covas, S. J. Pitteri and V. M. Faca (2016). "Proteomic analysis of epithelial to mesenchymal transition reveals crosstalk between SNAIL and HDAC1 in breast cancer cells." Mol Cell Proteomics.
- Peinado, H., E. Ballestar, M. Esteller and A. Cano (2004). "Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex." Mol Cell Biol **24**(1): 306-319.
- Peinado, H., D. Olmeda and A. Cano (2007). "Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?" Nat Rev Cancer **7**(6): 415-428.
- Perlikos, F., K. J. Harrington and K. N. Syrigos (2013). "Key molecular mechanisms in lung cancer invasion and metastasis: a comprehensive review." Crit Rev Oncol Hematol **87**(1): 1-11.
- Pinti, M., L. Gibellini, Y. Liu, S. Xu, B. Lu and A. Cossarizza (2015). "Mitochondrial Lon protease at the crossroads of oxidative stress, ageing and cancer." Cell Mol Life Sci **72**(24): 4807-4824.
- Ramsby, M. L., G. S. Makowski and E. A. Khairallah (1994). "Differential detergent fractionation of isolated hepatocytes: biochemical, immunochemical and two-dimensional gel electrophoresis characterization of cytoskeletal and noncytoskeletal compartments." Electrophoresis **15**(2): 265-277.

- Rauch, A., M. Bellew, J. Eng, M. Fitzgibbon, T. Holzman, P. Hussey, M. Igra, B. Maclean, C. W. Lin, A. Detter, R. Fang, V. Faca, P. Gafken, H. Zhang, J. Whiteaker, J. Whitaker, D. States, S. Hanash, A. Paulovich and M. W. McIntosh (2006). "Computational Proteomics Analysis System (CPAS): an extensible, open-source analytic system for evaluating and publishing proteomic data and high throughput biological experiments." J Proteome Res **5**(1): 112-121.
- Salmena, L. and P. P. Pandolfi (2007). "Changing venues for tumour suppression: balancing destruction and localization by monoubiquitylation." Nat Rev Cancer **7**(6): 409-413.
- Salton, M., R. Elkon, T. Borodina, A. Davydov, M. L. Yaspo, E. Halperin and Y. Shiloh (2011). "Matrin 3 binds and stabilizes mRNA." PLoS One **6**(8): e23882.
- Sawhney, S., R. Stubbs and K. Hood (2009). "Reproducibility, sensitivity and compatibility of the ProteoExtract subcellular fractionation kit with saturation labeling of laser microdissected tissues." Proteomics **9**(16): 4087-4092.
- Sedek, M. and G. J. Strous (2013). "SUMOylation is a regulator of the translocation of Jak2 between nucleus and cytosol." Biochem J **453**(2): 231-239.
- Sehat, B., A. Tofigh, Y. Lin, E. Trocmé, U. Liljedahl, J. Lagergren and O. Larsson (2010). "SUMOylation mediates the nuclear translocation and signaling of the IGF-1 receptor." Sci Signal **3**(108): ra10.
- Sethi, N. and Y. Kang (2011). "Unravelling the complexity of metastasis - molecular understanding and targeted therapies." Nat Rev Cancer **11**(10): 735-748.
- Shaul, Y. D. and R. Seger (2007). "The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions." Biochim Biophys Acta **1773**(8): 1213-1226.
- Shi, Y. and J. Massagué (2003). "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus." Cell **113**(6): 685-700.
- Sugimachi, K., S. Tanaka, T. Kameyama, K. Taguchi, S. Aishima, M. Shimada and M. Tsuneyoshi (2003). "Transcriptional repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma." Clin Cancer Res **9**(7): 2657-2664.
- Sun, B. O., Y. Fang, Z. Li, Z. Chen and J. Xiang (2015). "Role of cellular cytoskeleton in epithelial-mesenchymal transition process during cancer progression." Biomed Rep **3**(5): 603-610.
- Talmadge, J. E. and I. J. Fidler (2010). "AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective." Cancer Res **70**(14): 5649-5669.
- Tam, W. L. and R. A. Weinberg (2013). "The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer." Nat Med **19**(11): 1438-1449.
- Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." Nat Rev Cancer **2**(6): 442-454.

- Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." Nat Rev Cancer **2**(6): 442-454.
- Thiery, J. P., H. Acloque, R. Y. Huang and M. A. Nieto (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease." Cell **139**(5): 871-890.
- Thiery, J. P., H. Acloque, R. Y. Huang and M. A. Nieto (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease." Cell **139**(5): 871-890.
- Thiery, J. P. and J. P. Sleeman (2006). "Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(2): 131-142.
- Thompson, E. W., D. F. Newgreen and D. Tarin (2005). "Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition?" Cancer Res **65**(14): 5991-5995; discussion 5995.
- Thomson, S., E. Buck, F. Petti, G. Griffin, E. Brown, N. Ramnarine, K. K. Iwata, N. Gibson and J. D. Haley (2005). "Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cell lines and xenografts to epidermal growth factor receptor inhibition." Cancer Res **65**(20): 9455-9462.
- Thomé, C. H., G. A. dos Santos, G. A. Ferreira, P. S. Scheucher, C. Izumi, A. M. Leopoldino, A. M. Simão, P. Ciancaglini, K. T. de Oliveira, A. Chin, S. M. Hanash, R. P. Falcão, E. M. Rego, L. J. Greene and V. M. Faça (2012). "Linker for activation of T-cell family member2 (LAT2) a lipid raft adaptor protein for AKT signaling, is an early mediator of alkylphospholipid anti-leukemic activity." Mol Cell Proteomics **11**(12): 1898-1912.
- Tse, J. C. and R. Kalluri (2007). "Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment." J Cell Biochem **101**(4): 816-829.
- Turner, J. G., J. Dawson and D. M. Sullivan (2012). "Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer." Biochem Pharmacol **83**(8): 1021-1032.
- Turner, J. G. and D. M. Sullivan (2008). "CRM1-mediated nuclear export of proteins and drug resistance in cancer." Curr Med Chem **15**(26): 2648-2655.
- Uhlen, M., P. Oksvold, L. Fagerberg, E. Lundberg, K. Jonasson, M. Forsberg, M. Zwahlen, C. Kampf, K. Wester, S. Hober, H. Wernerus, L. Björling and F. Ponten (2010). "Towards a knowledge-based Human Protein Atlas." Nat Biotechnol **28**(12): 1248-1250.
- van den Heuvel, S. and E. Harlow (1993). "Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control." Science **262**(5142): 2050-2054.
- Vega, S., A. V. Morales, O. H. Ocaña, F. Valdés, I. Fabregat and M. A. Nieto (2004). "Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death." Genes Dev **18**(10): 1131-1143.
- Vergara, D., C. M. Valente, A. Tinelli, C. Siciliano, V. Lorusso, R. Acierno, G. Giovino, A. Santino, C. Storelli and M. Maffia (2011). "Resveratrol inhibits the

epidermal growth factor-induced epithelial mesenchymal transition in MCF-7 cells." Cancer Lett **310**(1): 1-8.

Verghese, E. T., R. Drury, C. A. Green, D. L. Holliday, X. Lu, C. Nash, V. Speirs, J. L. Thorne, H. H. Thygesen, A. Zougman, M. A. Hull, A. M. Hanby and T. A. Hughes (2013). "MiR-26b is down-regulated in carcinoma-associated fibroblasts from ER-positive breast cancers leading to enhanced cell migration and invasion." J Pathol **231**(3): 388-399.

Vetter, G., A. Le Béhec, J. Muller, A. Muller, M. Moes, M. Yatskou, Z. Al Tanoury, O. Poch, L. Vallar and E. Friederich (2009). "Time-resolved analysis of transcriptional events during SNAI1-triggered epithelial to mesenchymal transition." Biochem Biophys Res Commun **385**(4): 485-491.

Walther, T. C. and M. Mann (2010). "Mass spectrometry-based proteomics in cell biology." J Cell Biol **190**(4): 491-500.

Wang, S. C. and M. C. Hung (2005). "Cytoplasmic/nuclear shuttling and tumor progression." Ann N Y Acad Sci **1059**: 11-15.

Wang, Z., Y. Li and F. H. Sarkar (2010). "Signaling mechanism(s) of reactive oxygen species in Epithelial-Mesenchymal Transition reminiscent of cancer stem cells in tumor progression." Curr Stem Cell Res Ther **5**(1): 74-80.

Weiss, L. (2000). "Metastasis of cancer: a conceptual history from antiquity to the 1990s." Cancer Metastasis Rev **19**(3-4): I-XI, 193-383.

Whitaker, H. C., D. Patel, W. J. Howat, A. Y. Warren, J. D. Kay, T. Sangan, J. C. Marioni, J. Mitchell, S. Aldridge, H. J. Luxton, C. Massie, A. G. Lynch and D. E. Neal (2013). "Peroxiredoxin-3 is overexpressed in prostate cancer and promotes cancer cell survival by protecting cells from oxidative stress." Br J Cancer **109**(4): 983-993.

Wonsey, D. R., K. I. Zeller and C. V. Dang (2002). "The c-Myc target gene PRDX3 is required for mitochondrial homeostasis and neoplastic transformation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(10): 6649-6654.

Wu, C. Y., Y. P. Tsai, M. Z. Wu, S. C. Teng and K. J. Wu (2012). "Epigenetic reprogramming and post-transcriptional regulation during the epithelial-mesenchymal transition." Trends Genet **28**(9): 454-463.

Xi, Q., M. Huang, Y. Wang, J. Zhong, R. Liu, G. Xu, L. Jiang, J. Wang, Z. Fang and S. Yang (2015). "The expression of CDK1 is associated with proliferation and can be a prognostic factor in epithelial ovarian cancer." Tumour Biol **36**(7): 4939-4948.

Yates, J. R., A. Gilchrist, K. E. Howell and J. J. Bergeron (2005). "Proteomics of organelles and large cellular structures." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(9): 702-714.

Zavadil, J. and E. P. Böttinger (2005). "TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions." Oncogene **24**(37): 5764-5774.

Zhang, L. and W. Zou (2015). "Inhibition of integrin $\beta 1$ decreases the malignancy of ovarian cancer cells and potentiates anticancer therapy via the FAK/STAT1 signaling pathway." Mol Med Rep **12**(6): 7869-7876.

Zhang, Y. and R. A. Weinberg (2018). "Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities." Front Med.

Zheng, H. and Y. Kang (2014). "Multilayer control of the EMT master regulators." Oncogene **33**(14): 1755-1763.

Zhou, B. P., J. Deng, W. Xia, J. Xu, Y. M. Li, M. Gunduz and M. C. Hung (2004). "Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition." Nat Cell Biol **6**(10): 931-940.

Anexos

8. Anexos

A. Mapas dos vetores

A.1. pLVXR-IRES-ZsGreen

A.2. pDR 8.91

A.3. *pMD2-VSV-G*

B. Tabela de Identificação das proteínas

C. Tabela de Quantificação de Proteínas