IURI CORDEIRO VALADÃO

MATRIZ TRIDIMENSIONAL DE COLÁGENO TIPO I REGULANDO CÉLULAS-TRONCO DO CÂNCER DE MAMA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo 2019

IURI CORDEIRO VALADÃO

MATRIZ TRIDIMENSIONAL DE COLÁGENO TIPO I REGULANDO CÉLULAS-TRONCO DO CÂNCER DE MAMA

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Morais Freitas

Versão original

São Paulo 2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Serviço de Biblioteca e informação Biomédica

do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Cordeiro Valadão, Iuri Matriz tridimensional de Colágeno tipo I regulando células-tronco do câncer de mama / Iuri Cordeiro Valadão; orientadora Profa. Dra. Vanessa Morais Freitas. -- São Paulo, 2019. 91 p. Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

1. Células-tronco tumorais. 2. Matriz Extracelular. 3. Colágeno tipo I. 4. Rigidez. 5. Mecanotransdução. I. Morais Freitas, Profa. Dra. Vanessa, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Iuri Cordeiro Valadão
Título da Tese:	Matriz tridimensional de Colágeno tipo I regulando células-tronco do câncer de mama
Orientador(a):	Prof ^a Dr ^a Vanessa Morais Freitas
A Comissão Ju p	lgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão ública realizada a//, considerou () Aprovado(a) () Reprovado(a)
Examinador(a):	Assinatura: Nome:
Examinador(a):	Instituição: Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
Examinador(a):	Assinatura:
Presidente:	Instituição: Assinatura: Nome: Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantă, Săo Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **992/2018** referente ao projeto intitulado: *"Matriz tridimensional de colágeno tipo I regulando células-tronco do câncer de mama"* sob a responsabilidade de *luri Cordeiro Valadão* e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) *Vanessa Morais Freitas,* do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 03 de dezembro de 2018.

Luciane Valeria Sita

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita Coordenadora CEUA ICB/USP

Profa. Dra. Camila Squarzoni Dale Coordenadora CEPSH ICB/USP

DEDICATÓRA

Aos meus pais, meu irmão e à Sonila. Obrigado pelo suporte, carinho e compreensão. Amo vocês.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Prof^a. Dr^a. Vanessa Morais Freitas,

Obrigado por todos os ensinamentos, conselhos e sugestões nestes últimos 5 anos. Sou muito grato também pela sua compreensão e empatia durante os momentos mais conturbados. Apesar das dificuldades e contratempos, aprendi muito durante esse período e isso não seria possível sem você e seu suporte. Espero que eu possa, direta ou indiretamente, continuar contribuindo para o desenvolvimento da pesquisa do lab.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas do grupo (Ana, Heydi, Luciana, Maíra, Suély, Thaiomara, Rafael), à Prof. Nathalie e seus alunos (Magna, Mariana, Pereirinha e Jeffrey) e ao Prof. Ruy e seus alunos (Adriana, Basílio, Raquel, Maria Raquel, Michelle, Olga). Muito obrigado por me ajudarem e me permitirem ajudar, com execução de experimentos, protocolos, reagentes, ideias, desabafos e conversas.

À Prof^a Dr^a Telma Zorn, pelo espaço cedido para experimentos envolvendo cultura celular. Agradeço também à Fernanda e Carina, por me auxiliarem na utilização do micrótomo, e ao Raony, pelo auxílio com a utilização do aparelho de qPCR.

À Prof^a Dr^a Marilene Hohmuth Lopes e alunas, por cederem reagentes e equipamentos para a execução do projeto.

Ao Prof. José Alexandre Marzagão Barbuto e suas alunas Cecília Pessoa e Karen Steponavicius, por cederem reagentes, protocolos e compartilharem o conhecimento sobre citometria de fluxo. Agradeço especialmente à Karen, pelo auxílio na análise dos resultados.

Ao Mário Costa Cruz, pela assistência técnica durante a utilização dos microscópios de fluorescência, TIRF e confocal. Agradeço também por todos os ensinamentos e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Murilo Vieira Geraldo, pelo auxílio durante todas as etapas dos ensaios de PCR *array* e RT-qPCR, e pelas conversas sobre a vida acadêmica.

To Prof. Cynthia, for accepting me as a visiting student in her lab at Vanderbilt University. I'd also like to thank Jacob, François and Adam for helping and guiding me on performing confocal reflectance and the elastic modulus analysis of our Col I gels. Finally, thank you all for introducing me to the wonders of quantitative biology.

Ao Prof. Dr. Adriano Mesquita Alencar e seus alunos, Mariana Sacrini, Mariana Menegon, Márcia Zotti e Wagner Nishitani. Obrigado pelo auxílio na execução e

análise do ensaio de citometria óptica de torção magnética (OMTC), na tentativa de avaliarmos o módulo elástico dos géis de Col I.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci, por gentilmente ter cedido a linhagem de carcinoma embrionário humano NTERA-2.

Ao Bruno, por ter me recebido em São Paulo durante meu estágio no laboratório. Aos colegas da pensão (Gilliard, Alexandre, Paulo Henrique, Denício), por serem minhas primeiras amizades por aqui. Ao Vitor, Gláucio, João, Gustavo, Paulo, Tiego e Daniel, pelas conversas, risadas e companhia diária, formando uma verdadeira família.

A todos os amigos da época de iniciação científica, no LBCMCH-UFES. Agradeço especialmente à Prof. Leticia e à Alice, por serem minhas primeiras mentoras na pesquisa científica.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro na forma de concessão de bolsa de doutorado direto e verbas para projetos de pesquisa do laboratório. Agradeço também ao Santander, por me conceder auxílio financeiro para realização do doutorado sanduíche no laboratório da Prof^a. Dr^a. Cynthia Reinhart King, da Universidade de Vanderbilt.

RESUMO

VALADÃO, I. C. **Matriz tridimensional de colágeno tipo l regulando células-tronco do câncer de mama.** 2019. 91 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O câncer de mama é o tipo mais freqüente e o segundo mais letal no mundo. Embora ass taxas de sobrevida dos pacientes tenham aumentado consideravelmente nas últimas décadas, indicadores prognósticos desfavoráveis são associados a pacientes com diagnóstico em fase avançada e presença de metástases, frequentemente associadas à existência de células-tronco tumorais (CTT). As CTT são indiferenciadas e capazes de autorrenovação e diferenciação, o que as torna fundamentais para a manutenção da heterogeneidade celular intratumoral. As CTTs são altamente invasivas, tumorigênicas e resistentes a tratamentos convencionais, sendo frequentemente associadas ao surgimento de metástase e recidiva após tratamento. O microambiente tumoral modula as CTT por meio de células e da matriz extracelular (MEC), uma estrutura biologicamente dinâmica, complexa e que regula processos celulares como migração, invasão e diferenciação. A MEC é composta por uma grande variedade de moléculas, peptídeos e macromoléculas, sendo o colágeno seu componente mais abundante. A alta densidade mamográfica é freguentemente associada a elevada rigidez da MEC e deposição aumentada de colágeno fibrilar, principalmente colágeno tipo I (Col I), e é um dos maiores fatores de risco independentes para o desenvolvimento do câncer de mama. A alta densidade de Col I e rigidez da MEC também está associada à maior agressividade tumoral e metástase. Col I também induz o fenótipo tronco tumoral em diversos tipos celulares tumorais, embora o papel da densidade sobre este efeito seja pouco esclarecido. Nosso estudo avaliou a hipótese de a alta densidade de Col I induzir o fenótipo tronco tumoral. Cultivamos linhagens "normais" (MCF-10A) e tumorais (MDA-MB-231 e MCF-7) de mama em géis de baixa, média e alta densidade de Col I. Também cultivamos células em superfície bidimensional (2D) e em suspensão para geração de mamoesferas (ME), representando o cultivo tradicional e de enriquecimento de CTTs, respectivamente. Avaliamos os níveis do imunofenótipo tronco (CD44+CD24-), expressão gênica e proteica de marcadores de CTTs e de resposta mecânica ao substrato (mecanotransdução), bem como potencial clonogênico, autorrenovação celular e alinhamento fibrilar de géis de Col I. Alta densidade de Col I elevou os níveis da subpopulação CD44+CD24- e inibiu o alongamento celular da linhagem MDA-MB-231, porém não modulou a expressão de marcadores de CTT, bem como potencial clonogênico, autorrenovação celular e alinhamento fibrilar de géis de Col I. A alta densidade de Col I induziu aumento dos níveis totais da isoforma variante da glicoproteína CD44 (CD44v), receptor de estrógeno α (RE α) e do fator de pluripotência Sox2 em linhagem MCF-7 derivada de ME. Entretanto, os níveis nucleares dos fatores de transcrição (REg e Sox2) permaneceram inalterados. Em comum, a alta densidade de Col I não elevou os níveis nucleares do mecanotransdutor YAP em linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 derivada de ME. Concluímos que a alta densidade de Col I induz parcialmente o fenótipo molecular, mas não o funcional, de células tumorais mamárias.

Palavras-chave: Células-tronco tumorais. Matriz Extracelular. Colágeno tipo I. Rigidez. Mecanotransdução

ABSTRACT

VALADÃO, I. C. Matriz tridimensional de colágeno tipo I regulando célulastronco do câncer de mama. 2019. 91 p. PhD Thesis (Cell and Tissue Biology) -Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Breast cancer is the most frequent and second deadliest cancer type worldwide. Although patient survival rates have increased considerably in recent decades, unfavorable prognostic indicators are associated with patients with advanced disease stage at diagnosis and presence of metastases, frequently associated with the existence of cancer stem cells (CSC). CSC are undifferentiated and capable of self renewal and differentiation, making them fundamental for the maintenance of intratumoral cellular heterogeneity. CTTs are highly invasive, tumorigenic and resistant to conventional treatments, and are frequently associated with the onset of metastasis and relapse after treatment. The tumor microenvironment modulates CTT by means of cells and the extracellular matrix (ECM), a biologically complex and dynamic structure that regulates cell processes such as migration, invasion and differentiation. ECM is composed of a large variety of molecules, peptides and macromolecules, with collagen being its most abundant component. High mammographic density is often associated with high MEC stiffness and increased deposition of fibrillar collagen, mainly type I collagen (Coll I), and is one of the main independent risk factors for breast cancer development. High Coll I density and ECM stifness are also associated with increased tumor aggressiveness and metastasis. Coll I also induces tumor stemness in several tumor cell types, although the role of its density on this effect is unclear. Our study evaluated the hypothesis that high Coll I density induces the tumor stemness. We cultured normal-like- (MCF-10A) and tumoral (MDA-MB-231 and MCF-7) breast cell lines in low-, medium- and high-density Coll I gels. We also cultured cells in twodimensional (2D) surface and in suspension for the generation of mammospheres (MS), representing the traditional cell culture and CSC enrichment, respectively. We evaluated the levels of the CSC immunophenotype (CD44+CD24-), gene/protein expression of CSC markers and mechanical response to the substrate (mechanotransduction), as well as the clonogenic potential, cell self-renewal and fibrillar alignment of Col I gels. High Coll I density increased the levels of the CD44⁺CD24⁻ subpopulation and inhibited cell elongation of the MDA-MB-231 cell line, but did not modulate the expression of CSC markers as well as clonogenic potential, cell self-renewal and fibrillar alignment of Col I gels. High Coll I density increased total levels of the variant CD44 glycoprotein (CD44v), estrogen receptor α (ER α) and the pluripotency factor Sox2 in MS-derived MCF-7. However, the nuclear levels of the transcription factors (ERa and Sox2) remained unchanged. In common, high Coll I density did not increase nuclear levels of the mechanotransducer YAP in MDA-MB-231 and MS-derived cell lines. We conclude that high Coll I density partially induces the molecular stemness, but not the functional, phenotype of mammary tumor cells.

Keywords: Cancer stem cells. Extracellular Matrix. Type I Collagen. Stiffness. Mechanotransduction

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura anatômica e histológica da glândula mamária22
Figura 2 - CTT e a heterogeneidade intratumoral24
Figura 3 - Modifição da MEC na progressão tumoral e metástase
Figura 4 - Via de sinalização de Hippo32
Figura 5 - Esquematização dos modelos de cultura empregados no estudo35
Figura 6 - Fórmula para cálculo da expressão gênica relativa43
Figura 7 - Análise por citometria de fluxo dos níveis da subpopulação CD44 ⁺ CD24 ⁻ em linhagens celulares mamários cultivadas em ambiente bidimensional (2D) de placa de cultura, géis de baixa (BD), média (MD) e alta (AD) densidade de Col I, além de Matrigel
Figura 8 - Análise quantitativa dos níveis da subpopulação CD44 ⁺ CD24 ⁻ 53
Figura 9 - Análise da expressão gênica de marcadores associados ao fenótipo tronco tumoral em linhagem MDA-MB-23155
Figura 10 - Análise por immunoblotting da expressão de marcadores de CTT e mecanotransdução celular em linhagem MDA-MB-231
Figura 11 - Análise por imunofluorescência da expressão de marcadores de CTT, mecanotransdução e proliferação em linhagem MDA-MB-231
Figura 12 - Avaliação da capacidade clonogênica da linhagem MDA-MB-231 previamente cultivada em superfície 2D ou géis de Col I60
Figura 13 - Avaliação da formação de mamoesferas (ME) pela linhagem MDA-MB- 231 previamente cultivada em superfície 2D ou géis de Col I61
Figura 14 - Análise de parâmetros descritivos individuais das fibras de Col I e de células MDA-MB-231
Figura 15 - Análise da microarquitetura fibrilar de Col I por reflectância confocal65
Figura 16 - Análise da distribuição de fibras de Col I por orientação angular e razão anisotrópica dos géis

Figura	17 ·	- Anális	e da	proporção	de	fibras	de	Col	I com	ângulos	em	intervalos
próximo	os ao	o de 0º (1	moda	ı)								67

Figura 18 - Análise por immunoblotting da expressão de marcadores de CTT mamárias em células MCF-7 derivadas de mamoesferas (ME)69

Quadro 1 - Guia de técnicas, modelos de cultura e linhagens celulares utilizados estudo	no 35
Quadro 2 - Lista de primers utilizados para RT-qPCR	42
Quadro 3 - Lista de anticorpos utilizados em Imunofluorescência (IF) e Immunoblotti (IB)	ng 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
АСТВ	Actin Beta (gene)
AD	<u>A</u> lta <u>D</u> ensidade de Colágeno tipo l
ALDH1	Aldehyde Dehydrogenase 1
ANOVA	Analysis of Variance (Análise de Variância)
B2M	<i>Beta-2-Microglobulin</i> (gene)
BCA	Bicynchronic Acid (ácido bicinconínico)
BD	<u>B</u> aixa <u>D</u> ensidade de Colágeno tipo I
bFGF	Basic fibroblast growth factor (Fator de crescimento fibroblástico
	básico)
Bmi1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog (gene)
BSA	Bovine Serum Albumin (albumina sérica bovina)
CD24	Cluster of Differentiation 24
CD44	Cluster of Differentiation 44
CD44s	standard isoform of CD44 (isoforma padrão de CD44)
CD44v	variant isoforms of CD44 (isoformas variantes de CD44)
cDNA	<u>c</u> omplementary DNA (DNA complementar)
CEFAP-USP	Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa – Universidade de São
	Paulo
Col I	Colágeno tipo I
Ct	Cycle threshold
CTT	Células-tronco tumorais
DAPI	4',6- <u>Dia</u> midino-2- <u>P</u> henyl <u>i</u> ndole
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
ECL	Enhanced Chemiluminescence (reação de quimioluminescência
	potencializada)
EGF	Epidermal growth factor (fator de cresimento epidermal)
EPCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
ESPR1	Epithelial Splicing Regulatory Protein 1
FAC	Fibroblastos associados ao câncer
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanate

GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> (gene)
gDNA	<i>genomic</i> DNA (DNA genômico)
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2 (receptor 2 do fator de
	crescimento epidermal humano)
HPRT1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1 (gene)
i.e.	do latim "id est" (isto é; ou seja)
IMF	Intensidade média de fluorescência
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LATS1/2	Large tumor suppressor, homolog 1, 2
LIN28A	Lin-28 homolog A
MD	<u>M</u> édia <u>D</u> ensidade de Colágeno tipo I
ME	Mamoesferas
MEC	Matriz Extracelular
mRNA	<i>messenger RNA</i> (RNA mensageiro)
MST1/2	Mammalian STE20-like protein kinase 1 and 2
Nanog	do Irlandês "Tír na nÓg" ("Terra dos Jovens")
Oct4	Octamer-binding transcription factor 4
PBS	Phosphate buffered saline (tampão fosfato salino)
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
PE	Phycoerythrin
PMT	Photomultiplier tube (tubo fotomultiplicador)
PP2A	serine/threonine protein phosphatase 2A
PSF	Point of spread function
рҮАР	phosphorylated YAP (YAP fosforilado)
qPCR	<i>quantitative</i> PCR (PCR quantitativo)
RE	Receptor de Estrogênio
Refseq	Reference Sequence (Sequência de referência)
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay (Ensaio de Radioimunoprecipitação)
ROI	Region of interest (região de interesse)
RP	Receptor de Progesterona
RPLP0	Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0 (gene)
RT-qPCR	<i>Reverse transcriptase</i> qPCR (qPCR via transcriptase reversa)

SAV1	Salvador Family WW Domain Containing Protein 1
Sox2	(sex determining region Y)-box 2
TAZ	Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (tampão tris salino)
ТЕМ	Transição epitélio mesenquimal
TIRF	Total internal reflection fluorescence (fluorescência de reflexão
	interna total)
TNBC	Triple Negative Breast Cancer (cancer de mama triplo negativo)
UDLT	Unidade ductolobular terminal
WBP2	WW domain-binding protein 2
Wnt	wingless/int1
YAP	Yes-associated protein

LISTA DE SÍMBOLOS

≈	aproximadamente igual
%	porcentagem
°C	graus Celsius
α	alfa
β	beta
bp	<i>base pairs</i> (pares de base)
CO ₂	Dióxido de Carbono
G	gauge (calibre)
kDa	kilodalton
М	molar
mg	miligramas
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
nm	nanômetros
NP-40	Nonyl Phenoxypolyethoxylethanol
рН	potencial hidrogeniônico
μm	micrômetro
μΜ	micromolar
U	unidade de penicilina (1mg de Penicilina = 1670U)
μg	micrograma
μΙ	microlitro
rpm	rotações por minuto
σ	sigma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	.21
1.1 Epidemiologia do câncer de mama	.21
1.2 Anatomia e histologia básica da glândula mamária	.21
1.3 Classificação molecular do câncer de mama	.23
1.4 Células tronco tumorais	.23
1.4.1 Subpopulação de CTT CD44+CD24	.25
1.4.2 Perfil molecular das CTT mamárias	.25
1.5 Microambiente tumoral	.27
1.6 Colágeno e câncer de mama	.28
1.7 Mecanotransdução e câncer	.31
1.8 Densidade de colágeno, mecanotransdução e CTT	.33
2 OBJETIVOS	. 34
3 METODOLOGIA	.35
3.1 Modelo experimental	.35
3.2 Cultivo das linhagens celulares	. 36
3.3 Cultivo celular tridimensional	. 37
3.3.1 Coleta das células de superfície 2D	.37
3.3.2 Expansão de células em Matrigel	. 37
3.3.3 Dissociação de Matrigel e coleta de células	. 38
3.3.4 Expansão de células em géis de Col I	. 38
3.3.5 Dissociação de géis de Col I e coleta de células	. 39
3.3.6 Suspensão (Mamoesferas)	. 39
3.3.7 Dissociação das mamoesferas e coleta de células	.40
3.4 Análise dos níveis da subpopulação de CTT CD44+CD24- por citometria de flu	uxo 40
3.5 Análise da expressão gênica de marcadores associados ao fenótipo tronco tumoral	41
3.5.1 PCR array	.41
3.5.2 Validação por RT-qPCR	.42
3.6 Análise da expressão proteica de marcadores associados ao fenótipo tronco tumoral	43

3.6.1 Lista de anticorpos utilizados (ordem alfabética)	43
3.6.2 Immunoblotting	43
3.6.3 Imunofluorescência	45
3.7 Análise do potencial clonogênico de células cultivadas previamente em superfície 2D e géis de Col I	47
3.8 Análise do potencial de autorrenovação de células cultivadas previamente em superfície 2D e géis de Col I	47
3.9 Análise da morfologia celular e arquitetura fibrilar de Col I por imageamento de células vivas e reflectância confocal	e 48
3.9.1 Imageamento	48
3.9.2 Análise da morfologia celular e microarquitetura fibrilar de Col I	49
3.9.3 Identificação da distribuição angular das fibras de Col I	49
3.9.4 Grau de alinhamento das fibras de Col I	50
3.10 Análise estatística	50
4 RESULTADOS	51
4.1 Análise dos níveis da subpopulação de fenótipo tronco CD44 ⁺ CD24 ⁻ em linhagens células mamárias cultivadas em matrizes tridimensionais e superfície 2	D 51
4.2 Avaliação da expressão de genes relacionados ao fenótipo tronco tumoral em células MDA-MB-231	
4.3 Análise da expressão proteica de marcadores de CTT e proliferação em linhagem MDA-MB-231	56
4.3.1 Immunoblotting	56
4.3.2 Imunofluorescência	56
4.4 Análise de parâmetros funcionais das células MDA-MB-231	59
4.4.1 Clonogenicidade de células cultivadas em superfície 2D e géis de Col I	59
4.4.2 Formação de mamoesferas de células cultivadas em superfície 2D e géis de Col I	€ 59
4.5 Avaliação de parâmetros morfológicos de géis de Col I e células MDA-MB-237	1 62
4.6 Avaliação do remodelamento dos géis de Col I	64
4.6.1 Distribuição angular das fibras de Col I	64
4.7 Análise da expressão proteica de marcadores de CTT e proliferação em linhagem MCF-7	68
4.7.1 Immunoblotting	68
4.7.2 Imunofluorescência	68

5 DISCUSSÃO	71
6 CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS	81
ANEXOS	90
ANEXO A - Lista de genes analisados por "PCR array"	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer de mama

O último levantamento anual estimou aproximadamente 2,1 milhões de novos casos de câncer de mama e mais de 600 mil óbitos decorrentes da doença. Percentualmente, o câncer de mama representa cerca de 25% dos novos casos de câncer e 15% do total de mortes relacionadas à doença. Nesse cenário, o câncer de mama figura como o tipo mais incidente e o segundo mais mortal no mundo, excetuando-se o de pele não melanoma (BRAY et al., 2018). Nacionalmente, o câncer de mama também é a neoplasia mais frequente dentre as mulheres, com cerca de 60000 novos casos previstos para 2018 e representando 1/3 dos casos de câncer diagnosticados. É importante mencionar que, de cada 3 diagnósticos de câncer de mama no Brasil, 1 é realizado no estado de São Paulo (INCA, 2017). Dessa maneira, os dados epidemiológicos caracterizam o câncer de mama como um dos mais importantes problemas de saúde pública, seja em âmbito mundial, nacional ou estadual.

1.2 Anatomia e histologia básica da glândula mamária

A glândula mamária é encontrada exclusivamente em mamíferos e atua na produção e secreção do leite, que consiste em rica mistura de macromoléculas (lipídeos, proteínas, carboidratos), hormônios, anticorpos e uma gama de outras moléculas necessárias para adequada nutrição e desenvolvimento da prole após o nascimento (HASSIOTOU; GEDDES, 2013). Anatomicamente, a mama consiste de vasos (linfáticos e sanguíneos), lobos, sistema ductal e mamilo. Os lobos são constituídos de pequenos lóbulos alveolares e representam a porção produtora de leite. O sistema ductal transporta o leite dos lobos até o mamilo. Histologicamente, a glândula mamária consiste de parênquima funcional, composto pelos lobos e ductos formados por tecido epitelial, e estroma, que apresenta tecido adiposo e conjuntivo e atua na sustentação do parênquima. Mais ainda, o estroma também é alvo e promotor de mudanças profundas durante o desenvolvimento da glândula mamária e essencial para o correto funcionamento desta (MEDINA, 1996; HASSIOTOU; GEDDES, 2013).

Os ductos são formados por uma bicamada de células epiteliais. A células da camada mais interna são denominadas luminais, por estarem em contato direto com o lúmen dos ductos. Algumas dessas células passam por determinadas modificações

e tornam-se capazes de produzir leite, durante a lactação. A camada externa apresenta células com capacidade contrátil semelhante à de células musculares lisas, sendo então denominadas mioepiteliais. A camada mioepitelial externa apoia-se firmemente sobre a camada luminal e produz a membrana basal, que delimita e separa o parênquima epitelial do estroma adjacente (HASSIOTOU; GEDDES, 2013).

A imensa maioria dos tipos de câncer de mama tem origem no tecido epitelial glandular, portanto referidos como adenocarcinomas. Os carcinomas mamários podem ser localizados, denominados *in situ*, ou invasivos, quando rompem a membrana basal que reveste externamente a camada mioepitelial dos ductos e lóbulos. Os ductos terminais e seus lóbulos associados são denominados coletivamente de unidades ductolobulares terminais (UDLT) (Figura 1). Os ductos e lóbulos das UDLT são tidos como os principais sítios de origem de carcinomas mamários ductal e lobular, respectivamente (DIMRI; BAND; BAND, 2005).



Figura 1 - Estrutura anatômica e histológica da glândula mamária. A unidade ductolobular terminal (UDLT) é tida como sítio de origem da maioria dos casos de câncer de mama. O sistema de ductos e lóbulos encontra-se imerso no estroma, que contém uma gama variada de proteínas fibrosas, tecido adiposo, vasos sanguíneos e células, a exemplo dos fibroblastos. Histologicamente, é possível identificar células luminais, em contato direto com o lúmen, e mioepiteliais, em contato direto com a membrana basal. Células tronco e progenitoras também são encontradas. Adaptado de (DIMRI; BAND; BAND, 2005).

1.3 Classificação molecular do câncer de mama

O câncer também pode ser classificado de acordo com a expressão combinada de marcadores específicos. Por meio da técnica de imunoistoquímica, por exemplo, avalia-se a expressão do receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano (HER2) e o marcador de proliferação celular Ki-67 (LAKHANI et al., 2012). Em destaque, o subtipo triplo negativo (*Triple Negative Breast Cancer*, TNBC) caracteriza-se pela ausência de expressão de RE, RP e HER2, além de pior prognóstico quando em comparação aos demais subtipos que apresentam esses receptores (LIEDTKE et al., 2008). Nas últimas décadas, entretanto, técnicas como microarranjo de DNA ("DNA microarray") e sequenciamento genético possibilitaram a criação de uma nova classificação para o câncer de mama, a nível molecular.

A análise dos perfis de expressão gênica do câncer de mama possibilitou classificação molecular da doença e de seus "subtipos intrínsecos", denominados luminal, basal símile (*basal-like*), normal símile (*normal-like*), e enriquecido em HER2 (*HER2-enriched*) (PEROU et al., 2000). Posteriormente, um novo subtipo foi identificado e nomeado *claudin-low*, por expressar baixos níveis de genes associados a junções de oclusão e adesão célula-célula (HERSCHKOWITZ et al., 2007). Este subtipo intrínseco geralmente apresenta pior prognóstico, perfil molecular triplo negativo (RE⁻/RP⁻/HER2⁻) e perfis gênicos com expressão enriquecida de marcadores de resposta imune ao tumor, alta invasividade e de células tronco, normais e tumorais (KOBOLDT et al., 2012).

1.4 Células tronco tumorais

As células-tronco tumorais (CTT) representam populações de células que possuem ambas as capacidades de autorrenovação e diferenciação celular, além de estarem amplamente associadas à resistência quimioterápica e, portanto, à recidiva pós tratamento. Determinadas características das CTT podem estar relacionadas à sua resistência aumentada frente a regimes quimio e radioterápicos, dentre as quais a elevada expressão de transportadores de drogas, resistência elevada a danos ao DNA e reduzida taxa proliferativa (BORST, 2012; BATLLE; CLEVERS, 2017). Pelo fenótipo imaturo e não diferenciado, por exemplo, as CTT são tidas como responsáveis pela manutenção da heterogeneidade celular intratumoral e, portanto,

capazes de recapitular a formação original do tumor ainda que isoladas das demais subpopulações representadas por células tumorais não tronco (LAPIDOT et al., 1994).

Estudos pioneiros de identificação das CTT consistiam basicamente na inoculação de subpopulações distintas de células tumorais em camundongos imunodeficientes. Em geral, apenas uma subpopulação apresentava alta capacidade de tumores (tumorigênese) contendo múltiplas subpopulações gerar (heterogeneidade intratumoral) (LAPIDOT et al., 1994; AL-HAJJ et al., 2003). Por este fenótipo não diferenciado, essa subpopulação foi denominada célula tronco tumoral. Mais recentemente, a utilização de camundongos transgênicos com rastreamento celular confirmou a existência in situ de CTT (DRIESSENS et al., 2012; SCHWITALLA et al., 2013; ZOMER et al., 2013). Estes estudos também demonstraram a existência de grande plasticidade celular tumoral. Atualmente, tem-se que o fenótipo tronco tumoral pode ser adquirido de forma dinâmica e transitória, em decorrência de fatores como níveis das subpopulações tumorais, localização espacial e estímulos do microambiente (Figura 2) (GUPTA et al., 2011; BATLLE; CLEVERS, 2017; LAMPRECHT et al., 2017; LENOS et al., 2018).



Figura 2 - CTT e a heterogeneidade intratumoral. Na visão clássica (direita), as CTT são raras, relativamente quiescentes e com características predominantemente intrínsecas. Por divisão assimétrica, dão origem a outra CTT e uma célula progenitora. Esta última divide-se rapidamente, mas não se autorrenova e eventualmente torna-se diferenciada. Células diferenciadas não se autorrenovam ou dividem, compondo basicamente toda a massa tumoral. Na visão atual (esquerda), as CTT não são necessariamente raras ou quiescentes. A existência de células progenitoras e diferenciadas também é considerada, porém com interconversão entre estes tipos celulares, bem como entre células progenitoras e CTT. Essa plasticidade celular decorre de fatores como sinais do microambiente, níveis das populações celulares e localização espacial no tumor. Adaptado de (BATLLE; CLEVERS, 2017)

1.4.1 Subpopulação de CTT CD44⁺CD24⁻

Após a comprovação experimental da existência das CTT por Lapidot e colaboradores em leucemia mielóide aguda (LAPIDOT et al., 1994), vários grupos de pesquisa relataram a existência de células com propriedades semelhantes em diversos outros tipos de câncer. Inclusive, a identificação de tais células em tumores sólidos foi feita primeiramente no câncer de mama. Al-Hajj e colaboradores avaliaram em um modelo murino a tumorigenicidade de células extraídas de tumores primários de mama. Para tanto, populações com expressões variadas de diversas moléculas de superfície celular foram injetadas em camundongos imunodeficiencites. Foi observado que, à semelhança do constatado para leucemia mielóide aguda, o potencial tumorigênico das células tumorais mamários está restrito a subpopulações específicas. Especificamente, células que expressavam a glicoproteína CD44, na ausência da CD24 (CD44⁺CD24⁻) originavam tumores quando introduzidas em camundongos imunodeficientes em proporção muito maior às demais subpopulações tumorais. Por fim, demonstrou-se que as células CD44+CD24- recuperadas de tumores induzidos mantinham a propriedade de originar novos tumores quando reinoculadas em outros animais, sendo que os novos tumores apresentavam heterogeneidade celular semelhante à do tumor primário (AL-HAJJ et al., 2003). Clinicamente, apesar de estar associada ao favorecimento de metástases à distância (ABRAHAM et al., 2005) e resistência elevada à quimioterapia (LI et al., 2008), a presença da subpopulação CD44+CD24- não parece predizer piores índices prognósticos da doença (ABRAHAM et al., 2005; BANE et al., 2013).

1.4.2 Perfil molecular das CTT mamárias

Após o primeiro relato da existência das CTT em câncer de mama, diversos outros trabalhos contribuíram para melhor caracterização e compreensão acerca da importância destas na homeostasia tumoral. Neste contexto, a glicoproteína EPCAM (LIM et al., 2009), bem como as Integrinas α 6 (LIM et al., 2009), β 1 (ZHANG et al., 2008) e β 3 (VAILLANT et al., 2008), além do marcador enzimático Aldeído Desidrogenase 1 (ALDH1) (GINESTIER et al., 2007) identificam outras subpopulações de CTT mamárias. A heterogeneidade fenotípica das CTT pode ser justificada, por exemplo, pelos diferentes modelos de estudo utilizados nos trabalhos supracitados. A presença das CTT em pacientes com câncer de mama também foi importante para a identificação dos marcadores de maior relevância clínica. Park e colaboradores

avaliaram a heterogeneidade de marcadores relacionados às CTT em relação aos diferentes subtipos moleculares e histológicos do câncer de mama. A população de células ALDH1⁺ apresentou-se mais frequente nos subtipos basal símile e HER2⁺ quando em comparação ao subtipo luminal. Ainda, o típico fenótipo CD44⁺CD24⁻ foi detectado em cerca de 70% das amostras de tumor analisadas e em todos os tumores do tipo basal símile (PARK et al., 2010). Portanto, a hipótese de que existem diversas subpopulações de CTT no câncer de mama deve ser considerada.

Marcadores de pluripotência são fundamentais na manutenção do estado indiferenciado de células tronco normais. Fatores de transcrição como Nanog, Sox2 e Oct4 regulam uma maquinaria molecular complexa envolvida em processos biológicos como diferenciação, desenvolvimento e manutenção da pluripotência (YOUNG, 2011). Estudos recentes indicam que esses fatores de transcrição atuam não apenas na manutenção do fenótipo de células tronco, mas também de células tumorais. É sabido que a expressão de Sox2 em células tumorais mamárias é necessária para autorrenovação e formação de colônias em suspensão, habilidades marcadamente pronunciadas em CTT. Sox2 também é crucial em estágios iniciais da formação de tumores *in vivo* (LEIS et al., 2012; STOLZENBURG et al., 2012). Células que expressam conjuntamente Sox2 e Oct4 apresentam maior perfil de CTT, evidenciado por maior proporção de divisão assimétrica, formação de colônias, autorrenovação e tumorigenicidade em camundongos (TANG et al., 2015). Por fim, a redução dos níveis de Nanog em células tumorais mamárias resulta em perda do fenótipo tronco tumoral *in vivo* (JETER et al., 2009).

Como mencionado anteriormente, a geração de metástase está relacionada a péssimo prognóstico do câncer de mama. A metástase ocorre pela aquisição de fenótipo invasivo pelas células tumorais, fundamentalmente por meio do fenômeno de transição epitélio mesenquimal (TEM). Inicialmente, durante o processo de TEM, as células epiteliais perdem suas junções célula-célula (i.e.¹, junções oclusivas, aderentes, desmossomos e tipo Gap) e a típica polaridade apico basal. Molecularmente, essa etapa resulta na perda de marcadores epiteliais, como Ocludina, *Zonula Occludens-1* e E-caderina. Em seguida, as células apresentam reorganização de seu citoesqueleto, com aquisição das capacidades de migração e invasão evidenciadas pela formação de variadas protrusões celulares e degradação e remodelamento do estroma adjacente. Essas células, agora com

26

fenótipo mesenquimal, passam a expressar altos níveis de marcadores como Ncaderina, Vimentina e Snai1, além de proteases que degradam a matriz extracelular (MEC) e deposição diferenciada de componentes fibrilares do estroma, como colágeno e fibronectina (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014). Essas células agora possuem um fenótipo mesenquimal invasivo, sendo capazes de ganhar a corrente sanguínea e, eventualmente, extravasar e estabelecer-se em um novo sítio para formação de tumor. Estudos recentes indicam que o perfil mesenquimal e tronco tumoral são molecularmente semelhantes. Em relação ao câncer de mama, células que são induzidas à TEM passam também a expressar marcadores e comportamento funcional de CTT (MANI et al., 2008). Além disso, a subpopulação de CTT CD44⁺CD24⁻ é mais frequentemente encontrada na porção frontal e invasiva do tumor mamário, com expressão elevada do marcador mesenguimal Vimentina, sugerindo fenótipo invasivo (LIU et al., 2014). Esses indícios indicam que células altamente migratórias e invasivas teriam também a capacidade de divisão assimétrica, necessárias para a manutenção da heterogeneidade e homeostasia tumoral no sítio metastático. Ainda, as CTT participam ativamente do estabelecimento do nicho metastático por meio da interação com demais populações celulares do microambiente local. Essa interação ocorre, por exemplo, pela expressão ou liberação de determinadas moléculas ou microvesículas (LIU et al., 2011; JAISWAL et al., 2013). Dessa forma, as CTT não apenas migrariam para sítios inerentemente mais aptos à instalação de um novo tumor, mas também contribuiriam decisivamente para a formação de um microambiente propício ao seu estabelecimento (SHIOZAWA et al., 2013). Finalmente, é importante frisar que a associação entre metástase e CTT mamárias é de fundamental importância clínica, uma vez que pouco mais de 25% das pacientes com metástase à distância sobrevive por pelo menos 5 anos após diagnóstico (NOONE AM, HOWLADER N, KRAPCHO M, MILLER D, BREST A, YU M, RUHL J, TATALOVICH Z, MARIOTTO A, LEWIS DR, CHEN HS, FEUER EJ, 2018).

1.5 Microambiente tumoral

Outro fator de extrema importância na manutenção da homeostasia tumoral é a contribuição proveniente do microambiente, seja em fenômenos iniciais, como a tumorigênese, ou tardios, a exemplo da metástase. Dentre os tipos celulares não tumorais mais associados a efeitos oncomodulatórios estão as células endoteliais, células do sistema imune e fibroblastos associados ao câncer (FAC). Inclusive, a comunicação entre este tipo celular e as células tumorais pode levar à aquisição do fenótipo tronco por estas últimas (PLAKS; KONG; WERB, 2015). Entretanto, a forma pela qual os componentes não celulares do estroma contribuem para a manutenção do fenótipo tronco tumoral permanece menos esclarecida.

Dá-se o nome de Matriz Extracelular (MEC) ao conjunto dos componentes não celulares do estroma. A MEC é constituída por uma combinação extremamente complexa de macromoléculas (glicoproteínas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, proteínas fibrilares) e diversas classes de moléculas biologicamente ativas, como fatores de crescimento, hormônios, citocinas, quimiocinas e proteases. Por sua ampla variedade biológica de componentes, a MEC é moduladora essencial de diversos processos celulares, como crescimento, nutrição, divisão, migração e invasão. Enquanto todos os tipos celulares são fontes extremamente importantes de moléculas bioativas, o fibroblasto é o principal responsável pela deposição das proteínas fibrosas da MEC. As proteínas fibrosas mais comuns na MEC são a elastina, que confere resistência e elasticidade aos tecidos, e o colágeno, que é a proteína mais abundante no organismo humano e desempenha uma série de funções, que variam desde a sustentação mecânica das células até a modulação de processos celulares como crescimento, migração e diferenciação (THEOCHARIS et al., 2016).

1.6 Colágeno e câncer de mama

No câncer de mama, o colágeno apresenta importância considerável. O colágeno fibrilar, especialmente o colágeno tipo I (Col I), é componente majoritário da MEC e contribui enormemente para a rigidez da glândula mamária. A alta densidade de Col I induz a proliferação de células epiteliais mamárias *in vitro* (PROVENZANO et al., 2008). Clinicamente, a elevada deposição de colágeno no estroma mamário está associada à maior densidade mamográfica (i.e. densidade da mama avaliada por mamografia) (HUO et al., 2015). Por sua vez, a elevada densidade mamográfica é um dos maiores fatores de risco independentes associados ao desenvolvimento do câncer de mama (BOYD et al., 2007). Além desta associação, o colágeno também parece contribuir para a progressão e metástase da doença. Utilizando um modelo de camundongo transgênico, Provenzano e colaboradores (PROVENZANO et al., 2008) avaliaram o efeito da densidade elevada de Col I sobre a gênese e desenvolvimento de tumores mamários. Para tanto, foram utilizados camundongos com tumores espontâneos na glândula mamária com alta deposição de Col I. Estes camundongos

apresentaram formação de tumores mais precocemente, com células tumorais mais migratórias, agressivas e metastáticas, quando em comparação aos camundongos com deposição normal de Col I. Recentemente, resultados semelhantes foram observados quando células tumorais mamárias foram injetadas em glândulas mamárias com alta deposição de Col I (BARCUS et al., 2017; SHEA et al., 2018). Por fim, a associação entre deposição de Col I tumoral e metástase tem relevância clínica. Pacientes com metástase no linfonodo apresentam maiores níveis de deposição de Col I no tumor mamário (KAKKAD et al., 2012).

A organização fibrilar do colágeno também sofre alterações durante a progressão tumoral. Como mencionado anteriormente, as células tumorais com fenótipo mesenquimal invasivo aumentam a produção de proteases que clivam a matriz extracelular, inicialmente da membrana basal e em seguida da matriz adjacente (i.e. intersticial). Esse processo é potencializado pelos FAC que, além de também secretarem proteases, aumentam a deposição, *cross-linking* (reticulação) e linearização do Col I. O *cross-linking* consiste basicamente de ligações covalentes entre resíduos específicos da estrutura fibrilar de Col I. Em camundongos, é sabido que a indução de *cross-linking* do Col I eleva a rigidez do tumor mamário e é acompanhada de progressão tumoral. Além disso, ocorre maior linearização das fibras de Col I especialmente na periferia do tumor, facilitando a invasão das células tumorais no estroma adjacente (Figura 3) (PROVENZANO et al., 2006; LEVENTAL et al., 2009).



Figura 3 - Modifição da MEC na progressão tumoral e metástase. Componentes da MEC da glândula mamária normal são significativamente alterados no câncer de mama. Células tumorais e fibroblastos ativados (FAC) aumentam a produção de MEC fibrosa. A membrana basal ao redor do epitélio da glândula mamária é degradada por proteases da MEC, como MMPs, heparanase e outras. O aumento da deposição e *cross-linking* de colágeno enrijece a MEC. Isto, associado ao aumento da produção de fibrobronectina e peptídeos bioativos da MEC (i.e. matriquinas) tornam as células tumorais mais agressivas e invasivas. Algumas dessas células podem originar metástases. Para isso, entram em vasos (intravasamento), se disseminam, saem (extravasamento) e estabelecem nova colônia em locais distantes. Para esse estabelecimento, também é necessário preparo do novo microambiente por células tumorais e componentes celulares e acelulares do estroma local. Adaptado de (INSUA-RODRÍGUEZ; OSKARSSON, 2016)

Em pacientes humanos, a deposição alterada de colágeno provoca mudança gradual na rigidez da glândula mamária afetada pelo processo tumoral. O tumor invasivo apresenta rigidez superior à do tumor localizado (*in situ*), enquanto este é mais rígido que a glândula mamária normal (SAMANI; ZUBOVITS; PLEWES, 2007). Também seguem essa tendência a deposição, retidão e orientação do colágeno perpendicularmente à periferia tumoral (ACERBI et al., 2015). Em comparação à porção central do tumor, a porção invasiva apresenta maior rigidez e proporção de fibras colágenas lineares (ACERBI et al., 2015). Essas observações apresentam relevância clínica. Conklin e colaboradores (CONKLIN et al., 2011) demonstraram que a deposição elevada de fibras de Col I lineares e alinhadas perpendicularmente à

periferia tumoral está associada a menor sobrevida e maior chance de recidiva em pacientes com câncer de mama.

1.7 Mecanotransdução e câncer

A células também percebem e respondem à variação de rigidez que acompanha a progressão tumoral. Para tanto, as células realizam mecanotransdução, que consiste na conversão de estímulos mecânicos em sinais bioquímicos e, consequentemente, modulação de processos biológicos. Mecanisticamente, os estímulos mecânicos alteram a conformação de proteínas mecanossenssíveis distribuídas pela membrana, citoesqueleto e núcleo. Dessa forma, reorganização do citoesqueleto е modulação da expressão gênica são moduladas por mecanotransdução, interferindo diretamente em diversos processos celulares, como migração, invasão e diferenciação (WANG, 2017). Ainda que a contração, compreensão sobre a mecanotransdução esteja em expansão há décadas, a descoberta do "elo" entre a mecanocepção e a modulação da expressão gênica é relativamente recente. Dupont e colaboradores identificaram que a modulação na rigidez e arquitetura do microambiente celular é acompanhada de alteração na translocação nuclear e regulação transcricional de YAP e TAZ (DUPONT et al., 2011). Atualmente, sabe-se que sinais mecânicos como esticamento, tensão e fluxo sanguíneo também modulam a ativadade de YAP e TAZ (MA et al., 2019).

YAP/TAZ são coativadores transcricionais e modulam a via de sinalização de Hippo, envolvida na regulação de processos biológicos como crescimento, especificação e autorrenovação celular, bem como controle do tamanho de órgãos e regeração tecidual. Em adição aos sinais mecânicos, a via de Hippo é regulada por fatores de crescimento e estresse, além de proteínas associadas à polarização e adesão celular. Em humanos, a via de Hippo consiste basicamente de uma cascata de proteínas quinases, com destaque para MST1/2 e LATS1/2. Na via ativa, YAP/TAZ é fosforilado e não acessa o núcleo. Na via inativa, YAP encontra-se desfosforilado e acessa o núcleo para otimizar a transcrição dos genes da via (Figura 4) (MA et al., 2019). Como exemplo, o aumento da rigidez do substrato celular provoca translocação nuclear e atividade de YAP/TAZ (DUPONT et al., 2011). Apesar de pouco esclarecido, sabe-se que esse processo envolve agrupamento de receptores de proteínas da MEC (Integrinas) na membrana e remodelamento do citoesqueleto celular (MA et al., 2019).



Figura 4 - Via de sinalização de Hippo. A via de Hippo integra vários tipos de sinais para modular a localização e atividade de YAP/TAZ. Hormônios e privação de glicose modulam por meio do receptor de membrana GPCR e da quinase AMPK, respectivamente. Em contrapartida, a modulação por junções oclusivas e aderentes é independente das quinases da via de Hippo. A rigidez elevada provoca tensão e remodelamento de F-actina, levando à inativação de LATS1/2 e consequente translocação nuclear de YAP/TAZ. Adicionalmente, esse remodelamento pode resultar em maior abertura de poros nucleares e permissividade à entrada de YAP/TAZ. Setas retas, achatadas e tracejadas indicam ativação, inibição e regulação indireta, respectivamente. Adaptado de (MA et al., 2019).

A via de Hippo apresenta-se desregulada em diversos tipos de câncer. Nestes, a translocação nuclear de YAP/TAZ controla diversas características, como proliferação descontrolada, inibição da apoptose, reprogramação metabólica, formação de vasos (neoangiogênese), TEM e geração de CTT (MA et al., 2019). YAP/TAZ induzem o fenótipo tronco tumoral em modelos *in vitro* e *in vivo* de câncer de mama (CORDENONSI et al., 2011; KIM et al., 2015b), além de apresentarem atividade aumentada em estágios avançados da doença e metástases (CORDENONSI et al., 2011).

1.8 Densidade de colágeno, mecanotransdução e CTT

O enriquecimento de colágeno no estroma mamário está associado à gênese, progressão e invasão de células tumorais. É razoável, portanto, supor que tal enriquecimento resulte na indução do fenótipo tronco tumoral. Empregando modelos *in vitro*, alguns estudos indicaram o Col I como indutor de CTT em carcinoma colorretal (KIRKLAND, 2009) e glioma (MOTEGI et al., 2014). No caso do câncer de mama, entretanto, o Col I já foi apontado tanto como indutor absoluto (CHEN et al., 2012) quanto parcial (REYNOLDS et al., 2017) do fenótipo tronco tumoral. Além disso, ainda que modelos *in vivo* sugiram correlação positiva entre densidade de Col I, mecanotransdução e fenótipo tronco tumoral (PANG et al., 2016; SHEA et al., 2018), ainda não é possível confimar uma relação causa-efeito entre estas variáveis.

2 OBJETIVOS

Com o intuito de melhor compreendermos o efeito da alta densidade de Col I sobre o fenótipo tronco tumoral e mesenquimal, cultivamos células tumorais mamárias em géis de densidades variadas de Col I. Em seguida, optamos por:

- Avaliar os níveis da subpopulação CD44⁺CD24⁻ de fenótipo tronco mamário;

 Avaliar a expressão gênica e proteica de marcadores associados ao fenótipo tronco tumoral;

- Avaliar o potencial clonogênico e de autorrenovação de células extraídas dos géis;

- Avaliar a morfologia celular e arquitetura fibrilar dos géis de Col I;

3 METODOLOGIA





Figura 5 - Esquematização dos modelos de cultura empregados no estudo. Após cultivo celular por 7 dias, procedemos com a realização dos experimentos citados na tabela abaixo.

	Quadro 1 – Guia de técnicas	, modelos de cultura e linhagens celulares utilizadas no 🤅	estudo
--	-----------------------------	--	--------

Quadro 1 – Guia de técnicas, modelos de cultura e linhagens celulares utilizadas no estudo			
Objetivo	Modelos de cultura utilizados	Técnicas	Linhagem celular utilizada
Análise dos níveis	2D		MCF-10A
da subpopulaçao CD44+CD24 ⁻	Col I Matrigel	Citometria de fluxo	MCF-7 MDA-MB-231
Avaliar a expressão de marcadores de CTT	2D Col I Mamoesferas	PCR <i>array</i> , RT-qPCR Imunofluorescência (IF) <i>Immunoblotting</i> (IB)	MDA-MB-231 MCF-7 (IF,IB)
Avaliar capacidade de proliferação e autorrenovação	2D Col I Mamoesferas	Ensaio clonogênico Ensaio de formação de mamoesferas	MDA-MB-231
Avaliar morfologia celular e arquitetura fibrilar de Col I	Col I	Imageamento de células vivas Reflectância confocal	MDA-MB-231

3.2 Cultivo das linhagens celulares

A linhagem celular MCF-10 foi isolada de tecido mamário fibrocístico humano e em cultura originou espontaneamente a linhagem imortalizada MCF-10A. MCF-10A é uma linhagem epitelial não tumorigênica e é fenotipicamente semelhante às células do epitélio mamário normal (SOULE et al., 1990). As linhagens MCF-7 (SOULE et al., 1973) e MDA-MB-231 (CAILLEAU et al., 1974) foram derivadas de efusões pleurais de pacientes com carcinoma mamário metastático. A linhagem MCF-7 expressa marcadores de células luminais, apresenta morfologia poligonal e características de células epiteliais mamárias diferenciadas, como capacidade de formar colônias de células justapostas e expressão do receptor de estrógeno. Por sua vez, a linhagem MDA-MB-231 apresenta aspecto fusiforme, expressa marcadores mesenquimais (Vimentina) e fenótipo molecular triplo negativo (RE⁻/RP⁻/HER2⁻). A linhagem NTERA2 foi isolada de amostra de carcinoma embrionário humano (PLEASURE; LEE, 1993) e utilizada como controle positivo da expressão dos marcadores de pluripotência Sox2 e Nanog.

As linhagens MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 foram obtidas comercialmente do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brasil). A linhagem NTERA-2 foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci (Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, FUNDHERP, Brasil). As células foram mantidas em placas de cultura de 100mm (Corning®, EUA) a 37°C, em estufa contendo 5% de CO₂. MCF-10A foi cultivada em meio DMEM/F-12 (Sigma®, EUA) suplementado com 5% (v/v) de soro de cavalo (Gibco®, EUA), 20ng/ml de fator de crescimento epidérmico (EGF), 0,5µg/ml de hidrocortisona (Sigma®, EUA), 10µg/ml de insulina (Sigma®, EUA), 100ng/ml de toxina colérica (Sigma®, EUA) e antibióticos Penicilina-Estreptomicina (Gibco®, EUA) 100U-µg/mL. As linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e NTERA-2 foram cultivadas em meio DMEM/F-12 (Sigma®, EUA) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil; Gibco®, EUA) e Penicilina-Estreptomicina 100U-µg/mL. O crescimento celular foi monitorado diariamente com auxílio de microscópio invertido de contraste de fase, e o meio de cultura trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular. Ao atingirem subconfluência (~70-80%), as células foram subcultivadas, congeladas ou utilizadas em experimentos. Para congelamento, as células (10⁶/ml) foram inicialmente adicionadas a criotubos (Sigma, EUA) em solução composta de 90% de meio de cultura completo
e 10% do crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, EUA). Os criotubos foram colocados em recipientes de congelamento Mr. Frosty™ (ThermoFisher, EUA) a -80°C por 1 dia e em seguida armazenados em tanque de nitrogênio líquido.

3.3 Cultivo celular tridimensional

3.3.1 Coleta das células de superfície 2D

Células subconfluentes em placas de 100mm foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salino (PBS) 1X e deslocadas com auxílio de Tripsina (Sigma, EUA) 0,05% (w/v) suplementada com EDTA 0,5mM. Em seguida, as placas permaneceram por 2 (MDA-MB-231, MCF-7) ou 15 (MCF-10A) minutos a 37°C em estufa de CO₂, para otimizar a atividade da tripsina. Depois, meio de cultura completo foi adicionado às placas, para inativação da tripsina. As células foram coletadas em tubos cônicos, centrifugadas a 800 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos e o pellet de células foi ressuspendido em meio de cultura completo. A concentração de células na suspensão foi determinada manualmente, por meio de contagem em câmara de Neubauer, ou automaticamente, com uso do contador de células automatizado Countess™ II (ThermoFisher, EUA). As etapas a seguir correspondem ao preparo de Matrigel e géis de Col, bem como sua incorporação com células. Em comum, todas as etapas foram realizadas a 4ºC, para prevenir polimerização antecipada das matrizes. Ainda, as concentrações finais de Matrigel e Col I foram determinadas desconsiderando-se o volume de suspensão celular, por este ser proporcionalmente negligenciável (<3% do volume final da matriz).

3.3.2 Expansão de células em Matrigel

O Matrigel consiste em membrana basal reconstituída de sarcoma murino. Sua composição e rigidez (PASZEK et al., 2005) se assemelham às da membrana basal associada ao tecido epitelial mamário saudável (Figura 1).

Para inclusão das células em Matrigel, alíquotas de Matrigel (BD Biosciences, EUA) ~11mg/ml e suspensão de células foram misturadas em proporção volumétrica de 35:1, a 4°C. Após homogeneização breve da mistura, alíquotas (175µl/poço) foram rapidamente adicionados em poços de placa de cultura de 24 poços. As placas foram levadas à estufa de CO₂ a 37°C por 1 hora, para permitir polimerização da matriz, antes da adição de meio de cultura completo (500µL/poço). Células em Matrigel

(Figura 5) foram cultivadas por 7 dias, com renovação de meio de cultura completo a cada dois dias.

3.3.3 Dissociação de Matrigel e coleta de células

Para a coleta das células em Matrigel, todas as etapas foram realizadas a 4°C. Após remoção do meio de cultura, o Matrigel foi lavado três vezes com PBS gelado. Alíquota (500µL) de solução não enzimática (Cell Recovery Solution, Corning®, EUA) foi adicionada aos poços e o Matrigel foi triturado mecanicamente com auxílio de ponteira. O conteúdo do poço foi coletado e adicionado em microtubo previamente lavado com solução de albumina sérica bovina (BSA, Amresco®, EUA) 0,5% (m/v) em PBS, com intuito de prevenir a adesão celular à superfície do microtubo. Os tubos foram mantidos sob leve agitação e monitorados a cada 15 minutos para confirmação da dissolução/despolimerização do Matrigel. Após dissolvição completa do Matrigel (~1 hora), as células foram centrifugadas a 800rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* de células foi lavado com PBS 1X e centrifugado, sendo esta etapa realizada mais duas vezes. O *pellet* resultante foi utilizado em experimentos subsequentes.

3.3.4 Expansão de células em géis de Col I

O cultivo em géis de densidades variadas de Col I busca mimetizar o progressivo acúmulo de Col I do estroma mamário durante desenvolvimento do câncer de mama. Utilizamos géis com densidade de Col I igual a 1,5 (<u>Baixa Densidade; BD</u>), 3,0 (<u>Média Densidade; MD</u>) e 4,5 (<u>Alta Densidade, AD</u>) mg/ml, cuja rigidez corresponde à da glândula normal, tumor localizado e tumor invasivo, respectivamente (PASZEK et al., 2005; LEVENTAL et al., 2009).

Os géis de Col I foram produzidos a partir de solução estoque comercial de colágeno tipo I extraído de cauda de rato (Corning® Collagen I, High Concentration, Rat Tail, cat. 354249, EUA), que possui concentração variável (8-11mg/ml), de acordo com o lote. Os géis foram compostos de tampão de reconstituição, para manutenção de pH fisiológico (7,2-7,4), meio DMEM/F-12, para fornecimento de nutrientes básicos (glicose, aminoácidos, vitaminas) e Col I de cauda de rato. Inicialmente, tampão de reconstituição 10X (Bicarbonato de Sódio 0,26M, HEPES 0,2M; pH 7,2) foi misturado a meio DMEM/F-12 10X e homogeneizado brevemente. Em outros tubos, Col I estoque foi diluído em volumes diferentes de ácido acético 0,02M, para variação da

concentração final de Col I. O Col I diluído foi então adicionado e homogeneizado à mistura de tampão de reconstituição e DMEM/F-12, em proporção volumétrica final de 8:1:1. Após breve homogeneização, alíquotas (175µI) foram rapidamente adicionadas em poços de placa de cultura de 24 poços. Em seguida, as placas foram levadas à estufa de CO₂ a 37°C por 1 hora, para permitir polimerização da matriz. Mesmo após a polimerização dos géis, algumas células migram e aderem ao fundo da placa, constituindo um modelo parcialmente tridimensional de cultura celular. Para prevenir esse evento, os géis polimerizados foram deslocados do fundo da placa com auxílio de uma ponteira, anteriormente à adição meio de cultura completo (500µL). Os géis de Col I suspensos (Figura 5) foram cultivados por 7 dias, com renovação de meio de cultura a cada 2 dias.

3.3.5 Dissociação de géis de Col I e coleta de células

Após remoção do meio de cultura, os géis foram lavados três vezes com PBS 1X e divididos em pequenos pedaços com auxílio de estilete estéril. Os géis fragmentados foram adicionados em microtubos contendo 500µL de solução de enzima colagenase tipo I (Worthington-Biochem®, EUA) 2mg/ml em meio de cultura completo, a 37°C. Os géis foram agitados a 37°C, sendo ressuspendidos a cada 10 minutos com auxílio de ponteira, para auxiliar em sua fragmentação. Após dissociação completa dos géis (~30 minutos), as células foram centrifugadas a 800rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* de células foi lavado com PBS 1X e centrifugado, sendo esta etapa repetida mais duas vezes. O *pellet* resultante foi utilizado em experimentos subsequentes.

3.3.6 Suspensão (Mamoesferas)

Quando cultivadas em superfícies não aderentes e com meio suplementado com fatores de crescimento definidos, algumas células epiteliais mamárias proliferam e originam colônias suspensas de células em formato esférico, denominadas mamoesferas. A capacidade de geração de mamoesferas é atribuída a células não diferenciadas e com fenótipo tronco (DONTU et al., 2003). Neste contexto, o ensaio de formação de mamoesferas é comumente utilizado para enriquecimento do fenótipo tronco tumoral, bem como avaliação deste fenótipo em determinada população celular. *Pellet*s de células obtidos de superfície 2D (seção 3.3.1) ou géis de Col I (3.3.5) foram ressuspendidos em meio DMEM/F-12. As células foram desagregadas mecanicamente, com auxílio de seringa com agulha de calibre 26G (BD Biosciences®, EUA). A suspensão foi aspirada e expelida pela seringa, de 1 a 3 vezes, a depender do grau de agregação celular observado ao microscópio após cada repetição do processo. A suspensão de células individualizadas foi centrifugada a 800rpm por 5 minutos. O *pellet* resultante foi ressuspendido em meio de cultura de mamoesferas, contendo fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) 20ng/mL, fator de crescimento epidermal (EGF) 20ng/mL (Sigma®, EUA), suplemento B-27[™] (Gibco®, EUA) 1X e Penicilina-Estreptomicina 100U-µg/mL em meio DMEM/F-12. Alíquotas de 2mL contendo 5x10³ células foram adicionadas a poços de placas de 6 poços de baixa adesão celular (Costar® Ultra-Low Attachment Plate, Corning®, EUA). As placas foram incubadas em estufa de CO₂ e mantidas por 10 dias sem qualquer tipo de manipulação, de modo a prevenir a formação de esferóides por agregação celular e que poderiam ser confundidos com mamoesferas.

3.3.7 Dissociação das mamoesferas e coleta de células

Após cultivo, mamoesferas foram coletadas e adicionadas em tubo cônico. Os poços foram posteriormente lavados com PBS 1X para coleta de eventuais mamoesferas remanescentes. As mamoesferas foram centrifugadas a 400rpm por 5 minutos e o *pellet* resultante foi ressuspendido em Tripsina. Após agitação (5 minutos, 37°C), a suspensão de células foi dissociada mecanicamente com auxílio de seringa acoplada a agulha 26G. Em seguida, a suspensão celular foi passada por um filtro estéril de poro 40µm (Cell Strainer, Corning®, EUA) acoplado a tubo cônico. Por fim, a suspensão de células individualizadas foi centrifugada (800rpm, 5 minutos) e o *pellet* resultante utilizado em experimentos subsequentes.

3.4 Análise dos níveis da subpopulação de CTT CD44⁺CD24⁻ por citometria de fluxo

Células foram adicionadas a placas de 60mm (superfície 2D; 5x10³ céls/placa) ou poços de placa de 24 poços (Matrigel e géis de Col I; 25x10³ céls/gel). O inóculo de células ideal para ambientes 2D e 3D foi determinado para se atingir subconfluência após cultivo por 7 dias nos diferentes modelos. As células foram coletadas, dissociadas, contabilizadas e alíquotas de suspensão celular (2x10⁵ céls) foram adicionadas a dois microtubos e centrifugadas (11000 rpm, 20 segundos, 18°C).

O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em tampão de marcação, composto de BSA 0,5% (m/v) em BSA. Após duas repetições da última etapa, foi adicionada a um dos microtubos uma mistura de anticorpos anti-CD44 conjugado ao fluorocromo FITC (cat. 555478, BD Biosciences, EUA) e anti-CD24 conjugado ao fluorocromo PE (cat. 555428, BD Biosciences, EUA), ambos em diluição 1:50. Outro microtubo recebeu apenas o diluente dos anticorpos (PBS-BSA 0,5%), sendo considerado o controle negativo e utilizado na determinação da autofluorescência celular. Dois microtubos adicionais, contendo *beads* magnéticas (BD[™] CompBead, EUA), receberam apenas um dos dois anticorpos e foram utilizados para compensação dos lasers do citômetro. Todos os microtubos foram incubados por 20 minutos, a 4ºC e abrigo da luz. Depois, as células foram lavadas e centrifugadas com tampão de marcação, por três vezes. Por fim, os *pellets* de células foram fixados com tampão de marcação contendo Paraformaldeído 2% (m/v) e armazenados em geladeira por 1 a 5 dias, até o momento da análise. As amostras foram lidas em citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, EUA) do Centro de Facilidade Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP-USP). Os ajustes de lasers do equipamento e leitura das amostras foram feitas em workstation software FACSDIVA™ (BD Biosciences, EUA), sob supervisão do técnico responsável. Os softwares FlowJo v8.7 (LLC, EUA) e FCSalyzer v.0.9.13- α (Dr. Sven Mostböck, Boehringer Ingelheim®, Alemanha) foram utilizados na compensação final e determinação dos quadrantes populacionais.

3.5 Análise da expressão gênica de marcadores associados ao fenótipo tronco tumoral

3.5.1 PCR array

Após cultivo por 7 dias, o RNA total de células em superfície 2D (5x10³/placa) e géis de Col I (25x10³/gel) foi extraído e isolado por meio do kit RNeasy Mini (Qiagen, EUA), de acordo com protocolo do fabricante. Células em géis de Col I foram inicialmente coletadas para extração do RNA. A quantificação do RNA total foi realizada por leitura de absorbância em 260nm e 280nm no espectrofotômetro Epoch (BioTek, EUA) e a integridade do RNA e eventual contaminação com DNA genômico (gDNA) foi verificada através de corrida em gel de agarose e análise de bandas em transiluminador UV BioDoc-It (UVP, EUA). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado com o kit RT² First Strand e misturado com RT² SYBR Green *mastermix*.

A mistura foi adicionada aos poços das placas do kit RT² Profiler[™] PCR Array Human Cancer Stem Cells (cat. 330231, Qiagen, EUA). Basicamente, o PCR *array* consiste de placa com 96 poços contendo: *primers* (1 par/poço) para amplificação de genes associados ao fenótipo tronco tumoral (84 poços) e genes de controle endógeno (5 poços); controle de contaminação com gDNA (1 poço); controles de transcrição reversa (3 poços) e reação de PCR positiva (3 poços). A reação foi lida em sistema de PCR em tempo real (qPCR) StepOnePlus[™] (ThermoFisher®, EUA) de acordo com recomendações do fabricante do PCR *array* para este equipamento. Os dados obtidos foram carregados em site de análise (PCR Array Data Analysis Web Portal, Qiagen), sendo a expressão gênica dos 84 genes de interesse normalizada em relação à média aritimética da expressão dos genes de controle endógeno (*ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1, RPLP0*). O *heatmap* da expressão gênica e agrupamento dos genes baseados em semelhança da modulação de expressão também foram gerados por meio da plataforma online de análise.

3.5.2 Validação por RT-qPCR

Cultivo celular, extração e análise do RNA total foram realizados conforme descrito na seção anterior. Em seguida, o cDNA foi sintetizado a partir de 0,5µg de RNA total com o kit QuantiNova[™] Reverse Transcription (Qiagen, EUA), de acordo com instruções do fabricante, e então amplificado com o kit Power SYBR Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, EUA) e *primers* específicos (Quadro 2) em sistema de qPCR StepOnePlus.

Gene alvo	Sequência Forward (5'-3')	Sequência Reverse (5'-3')	
			(bp)
NANOG	TTTGTGGGCCTGAAGAAAACT	AGGGCTGTCCTGAATAAGCAG	116
POU5F1/OCT4	GTGTTCAGCCAAAAGACCATCT	GGCCTGCATGAGGGTTTCT	156
SNAI1	TAGCGAGTGGTTCTTCTGCG	TTAGGCTTCCGATTGGGGTC	114
GAPDH	ACCCACTCCTCCACCTTTGA	CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT	101

Quadro 2 – Lista de *primers* utilizados para RT-qPCR

Inicialmente, a concentração ideal dos pares de *primers* e sua eficiência foi determinada. Foi escolhida a menor concentração de *primers* que não resultou em formação de dímeros e não diferiu significativamente da amplificação nas demais concentrações. Posteriormente, a concentração ideal de primers foi testada com diluições seriadas de cDNA, gerando curva-padrão cujo coeficiente angular da reta (**a**)

foi utilizado na determinação da eficiência de amplificação (**e**) seguindo-se a fórmula **e**=10^{-1/a}. A expressão gênica relativa foi calculada de acordo com o método de Pfaffl (PFAFFL, 2001) (Figura 6) utilizando *GAPDH* como controle endógeno para a normalização dos níveis de RNA mensageiro (mRNA).

$$E_{r} = \frac{(E_{alvo})^{ACt(2D-Col I)}}{(E_{endo})^{ACt(2D-Col I)}}$$

Figura 6 - Fórmula para cálculo da expressão gênica relativa. E_r = expressão relativa (2D/Col I); E_{alvo} = Eficiência do gene alvo; E_{endo} = Eficiência do gene endógeno; ▲ Ct = Variação de *Cycle threshold*¹ entre amostras de 2D e Col I, referente ao gene alvo (numerador) e endógeno (denominador).

3.6 Análise da expressão proteica de marcadores associados ao fenótipo tronco tumoral

3.6.1	Lista	de	anticor	pos	utilizados	(ordem	alfabética)
-------	-------	----	---------	-----	------------	--------	------------	---

				•	Diluicão	<u>9</u> (. .)
Anticorpos (Anti-)	Espécie	Fonte	Nº de catálogo	IB	IF	
R Actino	Comundonao	Santa Cruz	00 47779	1.2000		0011
p-Actina	Camundongo		SC-47770	1.2000	1.000	4 4 9 9
CD44	Camundongo	Cell Signaling	#3570	1:1000	1:200	1:100
E-caderina	Camundongo	Cell Signalling	#14472	1:1000	1:200	1:100
		Santa Cruz	sc-8426	1:500	1:100	1:50
Integrina-α6	Coelho	Cell Signaling	#3750	1:1000		
Ki-67	Coelho	Cell Signaling	#12202			1:200
Mouse IgG (H+L),	Cabra	ThermoFischer	A-11004		1.200	1.250
Alexa Fluor 568	Cabra	Scientific	A-11004		1.000	1.200
Mouse IgG (HL)-HRP	Cabra	Bio-Rad	#172-1011	1:3000		
NANOG	Coelho	Cell Signaling	#3580	1:1000	1:100	1:50
PCNA	Camundongo	Santa Cruz	sc-56			1:200
PP2A	Camundongo	Santa Cruz	sc-374380	1:500		
Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 568	Cabra	ThermoFischer Scientific	A-11011		1:500	1:250
Rabbit IgG (HL)-HRP	Cabra	Bio-Rad	#172-1019	1:3000		
REα	Camundongo	Santa Cruz	sc-8002	1:1000	1:100	1:50
SAV1	Camundongo	Santa Cruz	sc-374366	1:500		
Sox2	Coelho	Cell Signalling	#3579	1:500	1:100	1:50
WBP2	Camundongo	Santa Cruz	sc-514247	1:500		
		Santa Cruz	sc-271134	1:500	1:100	1:50
YAP	Camundongo	Santa Cruz	sc-376830	1:500	1:100	1:50
		Cell Signaling	#12395	1:1000	1:100	1:50

Quadro 3 - Lista de anticorpos utilizados em Imunofluorescência (IF) e Immunoblotting

3.6.2 Immunoblotting

Células foram cultivadas por 7 dias em superfície 2D (5x10³ céls/placa) e géis de Col I (25x10³ céls/gel), ou 10 dias em suspensão (5x10³ céls/poço). Todo o

¹Número do ciclo no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação ultrapassa o limiar (*threshold*) de fluorescência, que é significativamente superior ao ruído (*background*). É inversamente proporcional ao nível de expressão relativa do gene de interesse.

processo de extração e coleta de proteínas foi realizado a 4°C e com reagentes refrigerados. Células em superfície 2D foram lavadas três vezes com PBS 1X e em seguida lisadas com tampão de lise RIPA (Cloreto de Sódio 150mM, NP-40 1,0% v/v, Deoxicolato de Sódio 0,5% m/v, Dodecil sulfato de sódio 0,1% m/v em Tris 50 mM pH 8,0). O fundo das placas foi raspado com auxílio de Cell Scraper (Greiner Bio-One, Áustria) e o lisado foi transferido para microtubo. No caso de géis de Col I, os mesmos foram coletados, pressionados levemente contra parede dos poços para remoção de excesso de meio de cultura, e lavados três vezes com PBS 1X. Em seguida os géis foram brevemente centrifugados (11000rpm, 10 segundos, 4°C) para remoção de lise, triturados com auxílio de ponteira com ponta afiada e mantidos em gelo. Mamoesferas (ME) foram coletadas e centrifugadas (1000rpm, 3 minutos, 4°C). O *pellet* foi ressuspendido em PBS 1X gelado, homogeneizado e centrifugado (11000rpm, 10 segundos, 4°C). Após duas repetições da última etapa, o *pellet* de ME fol ressuspendido em tampão de lise e transferido para microtubo.

Todos os microtubos foram mantidos sob agitação por 20 minutos, sendo vortexados a cada 5 minutos para facilitar a lise celular. Por fim, os lisados foram centrifugados (11000rpm, 20 minutos) e o sobrenadante (extrato proteico) foi coletado. A concentração proteica dos lisados de células em 2D e ME foi determinada com kit Pierce™ BCA Protein Assay (ThermoFisher, EUA), conforme protocolo do fabricante. Esta etapa foi omitida para lisados de Col I, pela interferência deste no ensaio.

Inicialmente, 15µg-30µg (2D, ME) ou 20%-40% do volume de lisado (Col I) foram aliquotados em microtubos e misturados a tampão de corrida 10X (Tris-base 0,5M, Dodecil Sulfato de Sódio 0,87M e Azul de Bromofenol 0,3mM em solução 70% glicerol/30% água, pH 6,8) e β-mercaptoetanol (5% do volume final). As amostras foram aquecidas por 10 minutos a 95°C e suas proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE 10%). Depois, as proteínas do gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose de 0,45µm (Bio-Rad, EUA) em aparelho Trans-Blot® SD Semi-Dry (Bio-Rad, EUA). As membranas foram marcadas com Ponceau 1% (m/v), fotografadas, lavadas por 10 minutos com tampão tris salino TBS-T (tampão TBS com Tween® 20 0,1% v/v) e incubadas por 1 hora em tampão de bloqueio (Leite em pó desnatado 5% m/v em TBS-T). As membranas foram incubadas (*overnight*, 4°C, sob agitação) com anticorpo primário de interesse diluído

em tampão de bloqueio. Após 4 lavagens em TBS-T (5 minutos/cada), as membranas foram incubadas (1 hora, 23°C, sob agitação) com anticorpo secundário adequado diluído em tampão de bloqueio. Após lavagens com TBS-T, as membranas foram incubadas por 5 minutos com substrato Clarity[™] Western ECL (Bio-Rad, EUA) e as bandas foram detectadas em fotodocumentador MF-ChemiBIS 3.2 (DNR Bio-Imaging, EUA). As membranas foram lavadas e armazenadas ou, para remarcações, inicialmente agitadas por 20 minutos a 37°C em solução de *stripping* Restore[™] (ThermoFischer, EUA), lavadas com TBS-T e submetidas ao bloqueio. A análise densitométrica das bandas de interesse foi realizada em software Fiji (SCHINDELIN et al., 2012).

3.6.3 Imunofluorescência

Células foram cultivadas por 7 dias em lamínulas de vidro de diâmetro 13mm (100 céls/lamínula) e géis de Col I (1x10³ céls/gel), ou 10 dias em suspensão (5x10³ céls/poço). O processo de imunomarcação das células nos três modelos de cultura foi feito de forma distinta, considerando aspectos como densidade celular (ME>2D, Col I) e acesso dos componentes dos reagentes às células (2D, ME>Col I). Em comum, todos as etapas foram realizadas à temperatura ambiente, exceto durante incubação com anticorpo primário e bloqueio de géis de Col I (4°C, *overnight*). Para géis de Col I, todas as etapas foram realizadas sob agitação. Cada lavagem dos géis também foi prolongada (10 minutos) em relação à de lamínulas e ME (5 minutos). Etapas a partir da adição de anticorpo secundário foram realizadas ao abrigo da luz. Controle negativo consistiu na omissão do anticorpo primário durante a marcação e foi utilizado em todos os modelos. Eventualmente, a marcação nuclear por DAPI foi substituída pela de Hoechst 33342 (ThermoFisher, EUA) ou Sytox® Green (Molecular Probes, EUA).

Lamínulas de vidro (superfície 2D) foram lavadas com PBS 1X, fixadas (Paraformaldeído 4% m/v) por 10 minutos, lavadas e permeabilizadas com solução de Triton X-100 (Sigma, EUA) 0,2% (v/v) em PBS 1X. Depois, foram incubadas por 1 hora sob agitação em tampão de bloqueio, contendo BSA 1% (m/v), Triton X-100 0,2% (v/v), azida de sódio 0,05% (m/v) e Soro de cabra (KPL, EUA) 10% (v/v) em PBS 1X. Em seguida, as lamínulas foram incubadas com anticorpo primário em tampão de bloqueio, lavadas (3x) com PBS-T e incubadas com anticorpo secundário em tampão de bloqueio por 1 hora, sob agitação. Após lavagens com PBS-T (3x) e água destilada

(1x), as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro com meio de montagem SlowFade® Gold ou ProLong® Gold com ou sem DAPI (ThermoFisher, EUA) e seladas com esmalte.

Géis de Col I foram lavados, fixados (15 minutos), incubados com Glicina 0,15M (10 minutos), lavados, permeabilizados com Triton X-100 0,5% (15 minutos) e incubados em solução de bloqueio. Depois, os géis foram divididos em 4 ou 6 partes iguais e cada fragmento foi incubado com um anticorpo primário. Após lavagens (6x) com PBS-T, fragmentos foram incubados com anticorpo secundário, lavados com PBS-T (6x) e água destilada (1x), montados sobre lâmina com meio de montagem e cobertos com lamínula de vidro, que foram posteriormente seladas.

Mamoesferas (ME) foram coletadas com ponteira com ponta cortada e adicionadas em microtubo, ambos previamente lavados com PBS-BSA 0,5%. Após centrifugação (500rpm, 5 minutos), o *pellet* foi ressuspendido em PBS 1X e alíquotas (~25µL) foram pipetadas em áreas sobre lâmina de vidro demarcadas com caneta hidrofóbica (Super PAP Pen). As lâminas foram secadas em estufa (37°C, 5 minutos), fixadas (10 minutos), incubadas com Glicina 0,15M (10 minutos), permeabilizadas com Triton X-100 0,5% (15 minutos), lavadas (2x) e incubadas em tampão de bloqueio. Depois, essas lâminas foram incubadas com anticorpos primários, lavadas com PBS-T (3x), incubadas com anticorpo secundário, lavadas com PBS-T (3x), montadas com meio de montagem e lamínula de vidro e posteriormente seladas.

Imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência Axio Vert A.1 e microscópio Axio Observer Z.1 com sistema de fluorescência de reflexão interna total (TIRF; Carl Zeiss, Alemanha), ambos operados pelo software Zen Blue 2.0 e localizados no CEFAP-USP. Imagens foram adquiridas e posteriormente processadas para análise quantitativa da positividade de marcação ou intensidade média de fluorescência (IMF) de alguns marcadores. As imagens sequenciais (*z-stacks*) obtidas pelo TIRF foram processadas para reduzir distorções, por meio do Fiji (SCHINDELIN et al., 2012). Inicialmente, o *plugin* PSF *generator* (École polytechnique fédérale de Lausanne, EPFL, Suiça), gerou uma função de propagação de ponto (PSF), que consiste basicamente em representação 3D de um objeto ao microscópio. Este PSF teórico foi utilizado para deconvolução das imagens por meio do plugin DeconvolutionLab2 (EPFL, Suiça), utilizando-se o algoritmo *Richardson-Lucy Total Variation*.

Para análise de marcação positiva para Ki-67 e PCNA, o filtro gaussian blur foi utilizado para melhor determinação da área ocupada por núcleos positivos, seguido da aplicação de autothreshold para identificação destes. Em seguida, para otimizar a segmentação nuclear, a função watershed foi aplicada. Por fim, a função analyze particles foi acionada para geração de lista contendo número total de núcleos positivos identificados. Este valor foi dividido pelo número total de núcleos identificados no canal referente à marcação nuclear (DAPI/Hoechst 33342). Para o caso de marcadores nucleares associados a CTT (Nanog, Sox2, YAP, REα), os núcleos foram delineados manualmente e a intensidade média de fluorescência (IMF) dos marcadores nestas áreas foi derterminado. Para marcadores de junções celulares (CD44 e E-caderina), o background foi reduzido de forma a destacar estas, com exclusão da marcação superficial difusa e de baixa intensidade. Em seguida, a função autothreshold foi utilizada e as regiões de interesse identificadas (ROIs) pela função analyze particles foram combinadas para geração da área total ocupada por junções. A IMF desta área, referente a um esferóide celular, foi determinada para cada uma das imagens analisadas.

3.7 Análise do potencial clonogênico de células cultivadas previamente em superfície2D e géis de Col I

Células MDA-MB-231 previamente cultivadas em superfície 2D (5x10³ céls/placa) ou géis de Col I (25x10³ céls/gel) foram coletadas, dissociadas e as suspensões de células individuais foram plaqueadas em baixa densidade (250 células) em placas de cultura 60 mm e cultivadas durante 21 dias, com reposição do meio de cultura completo a cada 3 dias. Após descarte do meio, as células foram lavadas com PBS 1X, fixadas com Paraformaldeído 10% (m/v) por 10 minutos e coradas com solução de cristal violeta 0,1% (m/v) em metanol 20% (v/v) durante 2 minutos. Depois, foram lavadas cuidadosamente com água destilada e secadas *overnight* à temperatura ambiente. As imagens digitais das colônias foram adquiridas utilizando o sistema de imagem BioDoc-It (UVP, EUA) e em seguida contabilizadas no software Fiji (SCHINDELIN et al., 2012) após subtração de *background*, seleção de área da placa e aplicação de *threshold* adequado para segmentação das colônias (CAI et al., 2011).

3.8 Análise do potencial de autorrenovação de células cultivadas previamente em superfície 2D e géis de Col I

Células MDA-MB-231 previamente cultivadas em superfície 2D (5x10³ céls/placa) ou géis de Col I (25x10³ céls/gel) foram coletadas, dissociadas e as suspensões de células individuais foram cultivadas em suspensão para geração de mamoesferas (ME), conforme descrito anteriormente (seção 3.3.6). Fotomicrografias de pelo menos 25 campos utilizando lente objetiva de menor aumento (4X) por poço foram feitas. A quantificação e análise dos parâmetros de área e diâmetro das ME foram feitas no software Fiji (SCHINDELIN et al., 2012). Para tanto, o *background* das imagens foi reduzido e o filtro *gaussian blur* foi utilizado para auxiliar na segmentação das ME. Em seguida, o *autothreshold* foi selecionado e a função *analyze particles* foi acionada para contagem e determinação da área e diâmetro das ME. Foram consideradas apenas partículas (ME) com mais de 50µm de diâmetro e circularidade maior do que 0,5 (faixa: 0-1), com o objetivo de excluir agregados celulares.

3.9 Análise da morfologia celular e arquitetura fibrilar de Col I por imageamento de células vivas e reflectância confocal

3.9.1 Imageamento

Células MDA-MB-231 foram incorporadas em géis de Col I (250 céls/gel) e plaqueadas em poços de placas de 24 poços com fundo de vidro (Glass Bottom Culture Plates, MatTek, USA). Após cultivo por 7 dias, as células foram coradas com o corante CellTracker[™] Green (ThermoFisher, USA) de acordo com protocolo previamente publicado (UEDA et al., 2004). Em resumo, após descarte do meio de cultura e lavagens (2x) em meio DMEM/F-12, os géis foram corados com solução do corante diluída (25µM) em DMEM/F-12. Após incubação por 45 minutos em estufa de CO₂ a 37°C, o corante foi descartado e os géis foram lavados (2x) em meio DMEM/F-12 e retornados à estufa de CO₂ após adição de meio de cultura completo. Para imageamento, parte do meio de cultura dos géis foi retirado com o intuito de permitir a deposição dos géis no fundo do poço, dotada de lamínula de vidro ideal para o imageamento.

As imagens foram feitas em microscópio confocal de varredura a laser Zeiss 700 em Axio Observer.Z1 invertido (Carl Zeiss, Alemanha) e equipado de incubadora com regulação de temperatura (37°C), teor de CO₂ (5%) e umidade, para manutenção do ambiente adequado ao imageamento de células vivas. O microscópio possui *beam splitter* principal intercambiável, que possibilita o imageamento sequencial por fluorescência (células) e reflectância (Col I). Para aquisição da reflectância confocal, as amostras foram iluminadas através de espelho dicroico 80/20 com *laser* de baixa potência, que foi refletido de fibras colágenas e detectado por tubo fotomultiplicador (PMT) (KRANING-RUSH et al., 2012). Foi utilizada lente 40X de imersão em água (C-Apochromat 40/1.2 W Corr, Zeiss) para aquisição de *z-stack* (0.31µm x 0.31µm x 0.95µm; x y z), especificamente da região central dos géis, com baixa densidade celular e distanciada da extremidade inferior.

3.9.2 Análise da morfologia celular e microarquitetura fibrilar de Col I

Para análise de parâmetros descritivos da morfologia celular, as imagens foram abertas em software Fiji (SCHINDELIN et al., 2012), *background* foi reduzido e a superfície de cada célula foi delimitada manualmente por meio da ferramenta *wand* (*tracing*) *tool* após conversão do *z-stack* em projeção máxima (*Max Intensity ZProjection*). Depois, cada célula foi identificada como uma região de interesse (ROI) e diversos parâmetros morfológicos foram obtidos após ativação da função *measure*. Parâmetros descritivos fibrilares de Col I foram obtidos por meio do software CT-FIRE, conforme instruções encontradas em seu manual. CT-FIRE é uma ferramenta direcionada à extração automática de fibras de Col individuais de imagens, para avaliação quantitativa de diversos parâmetros como comprimento, espessura e linearidade (BREDFELDT et al., 2014). Alternativamente, a área porosa dos géis foi determinada a partir de análise no Fiji (SCHINDELIN et al., 2012). Após conversão do *z-stack* em projeção máxima, a função *autothreshold* foi utilizada para segmentar a área fibrilar da imagem. A área ocupada pelo restante da imagem (*background*) foi designada como área porosa (Área porosa = Área total – Área fibrilar).

3.9.3 Identificação da distribuição angular das fibras de Col I

O método descrito por Franco-Barraza e colaboradores foi utilizado para análise da orientação angular das fibras de Col I (FRANCO-BARRAZA et al., 2016). As imagens foram abertas no software Fiji (SCHINDELIN et al., 2012) e processadas em seu *plugin* OrientationJ (REZAKHANIHA et al., 2012). A função *Dominant Direction* do *plugin* foi utilizada para determinar o ângulo fibrilar mais observado na imagem (moda). Depois, a função *Distribution* do *plugin* foi empregada para gerar gráfico **xy** do número de objetos (fibras) encontradas (**y**) para cada orientação/ângulo entre -90° e +90° (**x**). A função *Analysis* foi utilizada em seguida para atribuir tonalidades (*hue*) aos

ângulos das fibras identificadas, com o ângulo 0° representado pela cor ciano. Em seguida, os resultados foram exportados para o Microsoft Excel e os ângulos foram corrigidos pela subtração do ângulo encontrado em *Dominant Direction* (moda) e posteriormente para retornarem à faixa de -90° a +90°. Após essa normalização, as orientações angulares de todas as imagens passaram a apresentar o ângulo de 0° como o mais frequente (moda). Em seguida, as imagens de tonalidade (*hue*) foram normalizadas no software Photoshop CC (Adobe Systems, EUA) para que apresentassem a faixa angular normalizada (i.e. 0° = ciano).

3.9.4 Grau de alinhamento das fibras de Col I

A anisotropia (dependência direcional) das fibras de Col I foi avaliada conforme descrito anteriormente (WANG et al., 2018). Basicamente, a distribuição de orientação angular das fibras foi aproximada à uma distribuição normal (Gaussiana), por meio do software GraphPad Prism v.7 (GraphPad, EUA). A razão entre a altura máxima (Alt. Máx.) e largura total à média altura (LTMA≈2.355x σ ; σ = desvio padrão) da Gaussiana foi utilizada como razão anisotrópica. A proporção de fibras com ângulos próximos a 0° (moda) foi determinada dividindo-se a quantidade total de fibras em intervalos de 10° (-5° a +5°), 20° (-10° a +10°) e 30° (-15° a +15°) pela quantidade total de fibras em cada imagem (FRANCO-BARRAZA et al., 2016).

3.10 Análise estatística

O software GraphPad Prism v.7 foi utilizado para análise estatística. Teste ANOVA de uma via foi utilizado na comparação entre três ou mais grupos, com uma variável sob consideração, seguido de teste de comparações múltiplas de Bon Ferroni. Teste ANOVA de duas vias foi utilizado na comparação de três ou mais grupos, com duas variáveis sob consideração, seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey. Para ambos, um valor de p<0,05 foi considerado como estatisticamente significativo. Nos resultados apresentados abaixo, a ausência de indicação gráfica (*) indica ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

4 RESULTADOS

4.1 Análise dos níveis da subpopulação de fenótipo tronco CD44⁺CD24⁻ em linhagens células mamárias cultivadas em matrizes tridimensionais e superfície 2D

Inicialmente, avaliamos os níveis da subpopulação de fenótipo tronco CD44⁺CD24⁻ por citometria de fluxo, após cultivo das linhagens celulares MCF-10A, MDA-MB-231 e MCF-7 em superfície 2D, Matrigel e Col I.

Observamos que as linhagens apresentaram níveis variáveis da subpopulação de interesse (Figura 7). A análise quantitativa indicou níveis semelhantes dessa subpopulação entre os grupos avaliados, tanto para a linhagem MCF-10A quanto para a MCF-7 (Figura 8). Em contrapartida, a linhagem MDA-MB-231 apresentou maior proporção de células CD44⁺CD24⁻ em géis de alta e média densidades de Col I, em comparação à baixa (Figura 8). Devido a essas observações, optamos por prosseguir os ensaios apenas com as linhagens tumorais MDA-MB-231 e MCF-7, sem o modelo de cultura em Matrigel.



Figura 7 - Análise por citometria de fluxo dos níveis da subpopulação CD44⁺CD24⁻ em linhagens celulares mamárias cultivadas em ambiente bidimensional (2D) de placa de cultura, géis de baixa (BD), média (MD) e alta (AD) densidade de Col I, além de Matrigel. Linhagens celulares (MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231) foram cultivadas durante 7 dias em superfície 2D ou matrizes 3D, coletadas, fixadas e imunomarcadas com CD44-FITC e CD24-PE. Quadrantes dos gráficos *dot-plot* demarcam subpopulações com marcação negativa e positiva para uma ou ambas as moléculas analisadas. Destaque para o quadrante inferior direito (Q3), contendo a subpopulação de interesse (CD44⁺CD24⁻). Cada linhagem celular apresenta uma intensidade específica de autofluorescência, resultando em divisão igualmente específica dos quadrantes.



Figura 8 - Análise quantitativa dos níveis da subpopulação CD44⁺CD24⁻. Análise referente ao ensaio de citometria de fluxo, cujo resultado representativo encontra-se na Figura 7. Gráficos de barras apresentam a média ± erro da média de pelo menos três experimentos independentes. (Teste ANOVA de uma via seguido de pós teste de Bonferroni, * p <0,05).

4.2 Avaliação da expressão de genes relacionados ao fenótipo tronco tumoral em células MDA-MB-231

Técnicas de alto rendimento são ideais para avaliar os diversos componentes moleculares que regulam as propriedades funcionais das CTT. Com base nisso, avaliamos a expressão gênica de dezenas de genes relacionados ao fenótipo tronco tumoral na linhagem MDA-MB-231, por meio de kit de PCR *array* (RT² Profiler, Qiagen).

Dos 84 genes analisados pelo *array*, 29 apresentaram expressão modulada pelo cultivo em Col I. Desses 29 genes, 13 apresentaram expressão reduzida e 16 apresentaram expressão aumentada, em relação ao cultivo em superfície 2D (Figura 9A). Dentre os genes regulados positivamente estão os marcadores clássicos de pluripotência (*NANOG, LIN28A, POU5F1/OCT4*). Entretanto, os géis de diferentes densidades de Col I modularam a expressão gênica de forma semelhante, indicando que tal modulação independe da densidade de Col I. Posteriormente, selecionamos para validação por RT-qPCR genes com altos índices de variação de expressão, menores valores de Ct e relevância para o campo de estudo.

Células MDA-MB-231 cultivadas em géis de Col I apresentaram níveis maiores de *NANOG* em comparação às cultivadas em superfície 2D. Os níveis de *POU5F1/OCT4* não foram modulados pelo cultivo em Col I e menor expressão de *SNAI1* foi observada em baixa densidade de Col I (Figura 9B). Células em diferentes densidades de Col I apresentaram níveis semelhantes dos genes avaliados.



Figura 9 - Análise da expressão gênica de marcadores associados ao fenótipo tronco tumoral em linhagem MDA-MB-231. A) Agrupamento hierárquico de 29 genes diferencialmente expressos em células MDA-MB-231 cultivadas em géis de Col I. A crescente subdivisão do ramo inicial (da esquerda para a direita) aproxima genes com similaridade crescente da modulação da expressão gênica. O *heatmap* representa uma única replicata experimental. A magnitude a expressão gênica é representada em escala de cor, do verde (menor magnitude) ao vermelho (maior magnitude). B) Análise por transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR) da expressão de mRNA de *NANOG*, *POU5F1/OCT4* e *SNAI1* em células MDA-MB-231 cultivadas em superfície 2D e géis de Col I. Os resultados são apresentados em termos da variação da expressão em relação ao cultivo em superfície 2D (linha tracejada), após normalização com RNAm de GAPDH. Os gráficos de barras representam a média ± erro da média de três replicatas biológicas. (Teste ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni (*p≤0,05, **p≤0,01).

4.3 Análise da expressão proteica de marcadores de CTT e proliferação em linhagemMDA-MB-231

Além da validação dos resultados obtidos no PCR *array* através de RT-qPCR, avaliamos alguns dos marcadores de CTT por meio das técnicas de *immunoblotting* e imunofluorescência.

4.3.1 Immunoblotting

Em relação a NANOG, não foi possível detectar expressão significativa em nenhum dos grupos avaliados, mesmo extendendo-se consideravelmente o tempo de exposição das membranas à luz (Figura 10A). Os níveis de CD44 e Integrina-α6 não foram modulados por Col I (Figura 10A, B). Em contrapartida, células cultivadas em superfície 2D apresentaram altos níveis de YAP e seu regulador positivo (PP2A) em comparação às cultivadas em Col I (Figura 10A, B). SAV1 e WBP2, respectivamente inibidor e indutor da ativdade de YAP, não apresentaram níveis alterados (Figura 10A, B).

4.3.2 Imunofluorescência

Nanog e YAP apresentaram marcação predominantemente citoplasmática nos grupos avaliados (Figura 11a,b), e a densidade de Col I não modulou os níveis nucleares de YAP (Figura 11B). Células cultivadas em superfície 2D e Col I apresentaram CD44 marcadamente na periferia celular e juncões célula-célula (Figura 11c), como esperado. Os níveis de CD44 também não foram modulados pela densidade de Col I (Figura 11B). Similarmente, a densidade de Col I não alterou a porcentagem de células MDA-MB-231 positivas para PCNA (Figura 11d, B).



Figura 10 - Análise por *immunoblotting* da expressão de marcadores de CTT e mecanotransdução celular em linhagem MDA-MB-231. A) *Immunoblotting* representativo dos marcadores de CTT mamárias e mecanotransdução celular. A linhagem de carcinoma embrionário humano NTERA-2 foi utilizada como controle positivo para a expressão da Nanog. β -actina foi utilizada como controle endógeno de carregamento de proteína no gel. B) Gráficos representam média ± erro da média de ao menos dois experimentos independentes. (Teste ANOVA de uma via seguido de pós teste de Bon-Ferroni; **p <0,01, relativo ao grupo 2D da respectiva proteína de interesse).



Figura 11 - Análise por imunofluorescência da expressão de marcadores de CTT, mecanotransdução e proliferação em linhagem MDA-MB-231. A) Imagens representativas da expressão de marcadores de CTT (Nanog e CD44), mecanotransdução (YAP) e proliferação (PCNA) em escala de cinza, com evidenciação de núcleo celular, em azul. Em "a" e "b", núcleos celulares foram substituídos por seus contornos (branco tracejado) para melhor visualização dos pixels nucleares em escala de cinza. Barra de escala: 20µm. B) Gráficos de quantificação da intensidade média de fluorescência (IMF) dos marcadores avaliados e de porcentagem de células que expressam o marcador de proliferação PCNA (PCNA+). À exceção do gráfico de PCNA, que apresenta valores de média ± desvio padrão, os demais gráficos apresentam quartis, mediana e valores mínimo e máximo. Dados são referentes a pelo menos dois experimentos independentes, com número de células (n) avaliado variando de 50 a 800. Objetivas utilizadas: "a" e "b", 63x (2D) e 40x (Col I); "c", 63x; "d", 10x.

4.4 Análise de parâmetros funcionais das células MDA-MB-231

Em sequência à análise de marcadores característicos de CTT, iniciamos a caracterização funcional das células cultivadas em superfície 2D e géis de Col I. Escolhemos avaliar a capacidade de formação de colônias de células MDA-MB-231 em placas de poliestireno (ensaio clonogênico) e em suspensão com meio enriquecido para manutenção de CTT (ME).

4.4.1 Clonogenicidade de células cultivadas em superfície 2D e géis de Col I

A capacidade de formação de colônias foi semelhante entre células previamente cultivadas em superfície 2D e géis de Col I. Além disso, a densidade de Col I não alterou o potencial de formação de colônias (Figura 12A, B).

4.4.2 Formação de mamoesferas de células cultivadas em superfície 2D e géis de Col I

O potencial de formação de mamoesferas de células previamente cultivadas em superfície 2D e géis de Col I foi semelhante. A densidade de Col I não alterou o potencial em questão (Figura 13A, B). A área e o diâmetro das mamoesferas também foram semelhantes entre os grupos avaliados (Figura 13A,B).



Figura 12 - Avaliação da capacidade clonogênica da linhagem MDA-MB-231 previamente cultivada em superfície 2D ou géis de Col I. Após cultivo, células foram coletadas e processadas para obtenção de suspensão de células individualizadas. Após plaqueamento (500 células/placa de 35mm), procedeu-se com cultivo por 21 dias e posterior lavagem, fixação e coloração com cristal violeta. As imagens foram adquiridas com transluminador. A) Replicatas técnicas representativas de uma replicata experimental. B) Gráficos representam média ± erro da média de cinco experimentos independentes, realizados em quadruplicata técnica.











Figura 13 - Avaliação da formação de mamoesferas (ME) pela linhagem MDA-MB-231 previamente cultivada em superfície 2D ou géis de Col I. Após cultivo, células foram coletadas e processadas para obtenção de suspensão de células individualizadas. As células foram cultivadas em placa de 6 poços de baixa adesão celular (5000 células/poço) com meio de cultura enriquecido para formação de ME. Após cultivo por 10 dias, imagens (A) de ao menos 25 campos por poço foram obtidas. A) Setas destacam ME, que apresentam diâmetro mínimo de 50µm (escala), compactação e bordas irregulares características. B) Gráfico em barras apresentam média ± erro da média de cinco experimentos independentes, realizados em triplicata técnica. Gráficos de coluna em dispersão apresentam valores individuais das ME analisadas e média dos grupos.

4.5 Avaliação de parâmetros morfológicos de géis de Col I e células MDA-MB-231

Após a caracterização molecular e funcional das células MDA-MB-231 cultivadas em superfície 2D e géis de Col I, prosseguimos com a caracterização de diversos parâmetros morfológicos das células e fibras de Col I. Para este fim, células vivas e a estrutura fibrilar de Col I foram imageadas com microscópio confocal por coloração com corante Cell Tracker Green® e reflectância confocal, respectivamente.

Observamos que a espessura (Figura 14a), comprimento (Figura 14b) e linearidade (Figura 14c) das fibras de Col I foram semelhantes em todos os géis avaliados, celularizados ou não. Como esperado, entretanto, géis acelulares com alta densidade de Col I apresentaram maior área porosa quando em comparação a géis de baixa densidade (Figura 14d).

Em relação às células MDA-MB-231, a alta densidade de Col I resultou em maior alongamento celular, mensurado pelo *aspect ratio*, quando em comparação à baixa densidade de Col I (Figure 14g). Em contrapartida, perímetro (Figura 14e), área (Figura 14f), solidez (Figura 14h) e circularidade (Figura 14i) celular não foram alterados pela densidade de Col I.



Figura 14 - Análise de parâmetros descritivos individuais das fibras de Col I e de células MDA-MB-231. Gráficos **a-d** apresentam média ± erro da média da espessura (**a**), comprimento (**b**), linearidade (**c**) de fibras de Col I e área porosa (não fibrilar) dos géis. Os sinais "-" e "+" identificam géis acelulares e celularizados, respectivamente. Gráficos da quantificação de perímetro (**e**), área (**f**), *aspect ratio* (**g**), solidez (**h**) e circularidade (**i**) das células avaliadas. À exceção dos descritores perímetro e área, os demais apresentam valores em unidades arbitrárias (u.a.). Os gráficos de coluna em dispersão apresentam valores individuais das células (n=24-29) bem como a média de cada grupo. A análise estatística foi realizada por meio de teste ANOVA uma via (**d**, **e-i**) ou duas vias (**a-c**) seguido de pós teste de Bon Ferroni (**d** e **g**; *p<0.05, relativo ao grupo BD).

4.6 Avaliação do remodelamento dos géis de Col I

Após a análise de parâmetros individuais fibrilares e celulares, prosseguimos com a análise do grau de remodelamento extracelular exercido pelas células em diferentes densidades de Col I. Para tanto, avaliamos de diferentes formas a orientação das fibras de Col I. Especificamente, tal análise teve como objetivo avaliar se células em alta densidade de Col I possuem maior capacidade de alinhar fibras de Col I umas às outras e, dessa forma, favorecer eventos como migração e invasão.

Identificamos células com aspecto mesenquimal em géis das variadas densidades de Col I e sua interação com fibras de Col I adjacentes. As células não apresentaram orientação preferencial (Figura 15a). Não identificamos orientação preferencial evidente das fibras de Col I, tanto em géis acelulares (Figura 15d,e,f) quanto celularizados (Figura 15,h,i). Após normalização angular e atribuição de cores aos ângulos, uma gama variada de cores foi observada em todos os géis avaliados (Figura 15j-o). A variedade de cores reflete variedade de orientações angulares e consequentemente, ausência de orientação preferencial evidente.

4.6.1 Distribuição angular das fibras de Col I

Após análise qualitativa da reorganização de fibras de Col I, analisamos quantitativamente a distribuição da orientação angular das fibras.

Observamos inicialmente que os géis de Col I apresentaram frequências de distribuição angular das fibras bastante semelhantes, independentemente da densidade de Col I avaliada e da presença ou não de células (Figura 16A). Para realizarmos uma análise comparativa e quantitativa dessa diferença entre os grupos, calculamos a razão anisotrópica dos mesmos (Figura 16B). Como esperado, os grupos avaliados apresentaram valores similares de razão anisotrópica, indicando alinhamento semelhante das fibrilas de Col I. Optamos também por quantificar a proporção de fibras com orientação angular próxima à mais frequentemente observada (moda). A densidade de Col I e a presença de células não afetou a proporção de fibras com orientação próxima à moda, quer seja considerando intervalo de 10º (Figura 17A), 20º (Figura 17B) ou 30º (Figura 17C) em relação a esta medida. Nossos resultados apontam que o alinhamento fibrilar global de géis de Col I por células MDA-MB-231 independe da densidade de Col I.



confocal. a-c) Interação de células (verde) com fibras de Col I (escala de cinza) nos géis de diferentes densidades de Col I. Imagens representam projeções de intensidade máxima dos z-stack obtidos. d-i) Projeções de intensidade máxima dos sinais advindos das fibras de Col I, por meio de técnica de Cell Tracker Green® e imageadas vivas com microscópio confocal. Simultaneamente, fibras de Col I foram imageadas por microscopia de reflectância reflectância confocal. j-o) Destaque dos ângulos das fibras detectadas, com o ângulo mais recorrente (*i.e.* moda) sendo normalizado para 0[°] e ajustado Figura 15 - Análise da microarquitetura fibrilar de Col I por reflectância confocal. Após cultivo por 7 dias, células MDA-MB-231 foram coradas com

para a cor ciano. A atribuição dos ângulos foi realizada por meio do plugin OrientationJ do software Fiji, enquanto a normalização da escala de cor (barra à esquerda de "j") foi realizada no software Adobe Photoshop CC. Barra de escala = 25µm.



Figura 16 - Análise da distribuição de fibras de Col I por orientação angular e razão anisotrópica dos géis. A) Gráficos apresentam dados de géis acelulares com densidade baixa (a), média (b) e alta (c) de Col I, além dos respectivos géis correspondentes celularizados (d, e, f). B) a. Evidenciação esquemática dos parâmetros de altura máxima e largura total à meia altura (LTMA). b. A razão Altura máxima/LTMA é denominada anisotrópica e seu aumento indica maior alinhamento de orientação angular das fibras. Os gráficos apresentam média ± erro da média de três experimentos independentes, com pelo menos 20 campos analisados por grupo.



Figura 17 - Análise da proporção de fibras de Col I com ângulos em intervalos próximos ao de 0º (moda). A-C) Gráficos à esquerda apresentam a distribuição normalizada da frequência de fibras de Col I pela orientação angular normalizada. Linhas tracejadas verticais apontam diferentes intervalos angulares em relação a 0º. As proporções de fibras de Col I contendo orientação angular dentro dos intervalos em questão estão apresentadas nos gráficos à direita. Gráficos de caixa apresentam quartis, intervalo entre mínimo e máximo, e mediana dos grupos. Valores são referentes a imagens (n=20-26) de três experimentos independentes.

4.7 Análise da expressão proteica de marcadores de CTT e proliferação em linhagem MCF-7

Prosseguimos nosso estudo com a análise molecular de células MCF-7 cultivadas em géis de Col I. No caso desta linhagem, optamos por inicialmente enriquecer a população de CTT por meio do cultivo de mamoesferas. Essas mamoesferas foram então dissociadas e a suspensão de células cultivada em géis de baixa, média ou alta densidade de Col I. Além disso, o cultivo em géis de Col I foi realizado com o mesmo tipo de meio de cultura utilizado no cultivo de mamoesferas. O objetivo dessa abordagem foi maximizar a manutenção dos marcadores de fenótipo tronco.

4.7.1 Immunoblotting

Avaliamos a expressão do marcador de pluripotência Sox2, além dos marcadores de CTT mamárias, como CD44, YAP e Integrina α 6, e proteínas expressas em abundância por MCF-7, como E-caderina e RE α . A densidade de Col I não modulou a expressão de Sox2 e Integrina- α 6 (Figura 18A,B). A expressão da isoforma padrão de CD44 (CD44s) não foi detectada em nenhum dos grupos avaliados (Figura 18A). A expressão das isoformas variantes (CD44v), entretanto, foi regulada negativamente pelo aumento da densidade de Col I (Figura 18A,B). De forma semelhante, a E-caderina também foi mais expressa por células cultivadas em baixa densidade de Col I (Figura 18A,B). Em contrapartida, o aumento da densidade de Col I regulou positivamente a expressão de RE α (Figura 18A,B). Por fim, à semelhança do observado em células MDA-MB-231, níveis totais de YAP não foram modulados pela densidade de Col I (Figura 18A,B).

4.7.2 Imunofluorescência

Não foi possível detectar expressão visível de Sox2 em nenhum dos géis de Col I avaliados. Ainda, a expressão de Sox2 em mamoesferas foi detectada predominantemente no citoplasma (Figura 19A). A expressão nuclear de YAP e REα também não foi modulada pela densidade de Col I (Figura 19A,B). CD44 e E-caderina foram detectadas em todos os grupos avaliados (Figura 19A) e com intensidade de fluorescência membranar semelhante (Figura 19B). Além disso, a densidade de Col I não influenciou significativamente a proliferação celular (Figura 19A,B).



Figura 18 - Análise por *immunoblotting* da expressão de marcadores de CTT mamárias em células MCF-7 derivadas de mamoesferas (ME). ME de MCF-7 foram coletadas após 7 dias de cultivo e lisadas para extração de proteínas. ME também foram dissociadas enzimática e mecanicamente, sendo a suspensão de células resultante embebida em géis de Col I. Após 7 dias de cultivo, os géis de Col I foram lisados para extração de proteínas. A linhagem de carcinoma embrionário humano NTERA2 foi utilizada como controle positivo da expressão do marcador de pluripotência Sox2. A) *Immunoblottings* representativos de três experimentos independentes. B) Análise densitómetrica dos *immunoblottings*. Gráficos de barra representam média ± erro da média de ao menos dois experimentos independentes.



Figura 19 - Análise por imunofluorescência da expressão de marcadores de CTT em linhagem MCF-7. A) Imagens representativas da expressão de marcadores moleculares, em **escala de cinza**, com evidenciação de núcleo celular, em **azul**. Em "b" e "c", núcleos foram substituídos por seus contornos para melhor evidenciação dos pixels intranucleares em escala de cinza. Barra de escala: 20μm. **B)** Gráficos de quantificação da intensidade média de fluorescência (IMF) dos marcadores avaliados e de porcentagem de células que expressam o marcador de proliferação Ki-67 (Ki-67+). À exceção do gráfico de Ki-67, que apresenta valores da média ± erro da média, os demais gráficos apresentam a mediana, quartis e intervalo entre valores mínimo e máximo. Dados são referentes a células (n=50-200) de ao menos dois experimentos independentes.

5 DISCUSSÃO

A MEC é importante moduladora de diversos processos fisiológicos e patológicos. Além disso, sua composição estrutural é extremamente variada e complexa (BONNANS; CHOU; WERB, 2014). Tendo isso em vista, faz-se necessário compreender a função de cada um de seus componentes em processos biológicos diversos, como por exemplo o câncer. Sob a ótica da doença, as CTT são também evidente foco de atenção, muito em função de sua alta resiliência e contribuição na gênese e manutenção tumoral (NASSAR; BLANPAIN, 2016). Dessa forma, o presente estudo avaliou a hipótese de a elevação de Col I induzir o fenótipo tronco tumoral em células de carcinoma mamário humano.

Identificamos inicialmente um aumento da subpopulação de CTT mamária CD44⁺CD24⁻ em células MDA-MB-231, decorrente do aumento na densidade de Col I. Em contrapartida, a densidade de Col I não teve efeito sobre a expressão dos mRNA de marcadores de CTT. Ainda assim, em comparação ao cultivo em superfície 2D, o cultivo em géis de Col I modulou positivamente a expressão gênica de diversos marcadores de CTT. Este efeito, entretanto, não foi observado a nível proteico. Em ambiente propício para potencialização do fenótipo tronco de células MCF-7, o aumento na densidade de Col I reduziu níveis totais de CD44v e E-caderina, mas não foi suficiente para induzir maior expressão nuclear de RE α e Sox2. Em comum aos dois tipos celulares, o aumento da densidade de Col I não provocou aumento de YAP nuclear. Funcionalmente, o aumento da densidade de Col I não modulou as capacidades clonogênica, de formação de mamoesferas e de alinhamento global de fibras colágenas.

A subpopulação CD44⁺CD24⁻ foi a primeira identificada como CTT em câncer de mama (AL-HAJJ et al., 2003). Nossos resultados não apontam diferença nos níveis da subpopulação CD44⁺CD24⁻ entre células cultivadas em superfície 2D e géis de Col I. É sabido que Col I induz o aumento de diversas subpopulações com fenótipo tronco tumoral, quando em comparação ao cultivo em superfície 2D. Mais especificamente, o Col I induz subpopulações ALDH⁺, em células de adenocarcinoma pancreático ductal (BEGUM et al., 2017), e CD133⁺, em células de glioblastoma (MOTEGI et al., 2014) e carcinoma colorretal (KIRKLAND, 2009). É importante salientar que nesses estudos as células foram cultivadas em placas de cultura cobertas com fina camada de Col I. Sabe-se que a resposta celular ao cultivo em superfície coberta com Col I (2D) e géis de Col I (3D) pode ser distinta. Comparado ao cultivo bidimensional com Col I, o cultivo em géis de Col I reduz níveis de proteínas do complexo de adesão focal (WANG et al., 2003). Também modula diferentemente a diferenciação de células tronco mesenquimais (PARK et al., 2011) e potencializa ativação da via de Wnt em células de carcinoma ovariano (BARBOLINA et al., 2013). Dessa forma, é possível que fatores associados à dimensionalidade e rigidez do ambiente de cultivo celular estejam associados à indução do fenótipo tronco tumoral.

Identificamos que o aumento na densidade de Col I eleva os níveis do imunofenótipo CD44⁺CD24⁻, em células MDA-MB-231. O mesmo efeito, entretanto, não foi observado em células MCF-7 e MCF-10A. Um estudo recente já havia demonstrado que células MCF-7 cultivadas em matriz esponjosa de Col I apresentam níveis elevados da subpopulação CD44⁺CD24⁻, em comparação ao cultivo em superfície 2D (CHEN et al., 2012). O estudo em questão difere do nosso por não fazer referência à densidade de Col I da matriz utilizada. Além disso, sua estrutura se aproxima à de um arcabouço, com topografia distinta da do gel de Col I. Em resumo, entendemos que nosso estudo faz uso de um ambiente tridimensional estruturalmente mais fiel à glândula mamária. Mais importante, aponta que o efeito indutor de Col I sobre o imunofenótipo CD44⁺CD24⁻ é dependente da densidade e específico para cada tipo celular.

Nosso estudo também indica que o Matrigel não modula a subpopulação CD44⁺CD24⁻, em comparação ao cultivo em superfície 2D. Esse achado está alinhado ao de James e colaboradores, que demonstrou que a incorporação de Matrigel com CTT de carcinoma colorretal metastático não potencializa a formação de tumor-esferas (JAMES et al., 2015). Além disso, o cultivo em Matrigel não eleva a expressão de marcadores de CTT em tumor-esferas prostáticas, em comparação ao cultivo em superfície 2D (HÄRMÄ et al., 2010). Por fim, apesar de o Matrigel elevar os níveis do marcador CD271 em células de melanoma (VALYI-NAGY et al., 2012), a validade deste como marcador clínico foi recentemente descartada (BOYLE et al., 2016).

Em seguida à análise da subpopulação CD44⁺CD24⁻, avaliamos se o aumento na densidade de Col I regula positivamente a expressão de marcadores moleculares associados ao fenótipo tronco tumoral. Em relação ao cultivo em superfície 2D, o cultivo em géis de Col I regulou positivamente a expressão de 17 marcadores de CTT. Por RT-qPCR, validamos a superexpressão de *NANOG*, mas não de *OCT4* e *SNAI1*.
Esses dados encontram-se alinhados aos da literatura. Recentemente foi demonstrado que células MDA-MB-231 cultivadas em géis de alta densidade de Col I (4,0mg/ml) apresentam expressão semelhante de *OCT4* e elevada de *NANOG*, em comparação ao cultivo em superfície 2D (REYNOLDS et al., 2017). Um manuscrito em formato *preprint*, recentemente depositado, apontou que o aumento na densidade de Col I não impacta os níveis nucleares de Nanog em células de carcinoma colorretal (PANKOVA et al., 2018). Em relação a Snai1, é sabido que densidades elevadas de Col I elevam seus níveis em células MDA-MB-231 (ZHANG et al., 2013) e tumor mamário murino (ZHANG et al., 2016), sem consequente aumento da expressão de *SNAI1*. Em resumo, nossos resultados corroboram os da literatura e acrescentam que a densidade Col I não modula a expressão de *OCT4* e *NANOG*, bem como os níveis de Nanog, em células MDA-MB-231.

Além de marcadores de pluripotência, avaliamos os níveis de marcadores de superfície celular associados ao fenótipo tronco tumoral. Nas células MDA-MB-231, não observamos diferença nos níveis totais de CD44. A distribuição celular de CD44 também foi semelhante entre os grupos avaliados. Pang e colaboradores (PANG et al., 2016) demonstraram recentemente que regiões de tumor mamário humano com altos níveis de Col I apresentam maiores níveis de CD44. Ainda assim é possível que o aumento de CD44 seja provocado por outros fatores. A deposição elevada de Col I no estroma do tumor mamário humano está associada a quantidades elevadas do macrófago associado ao tumor (MAT) (ESBONA et al., 2018). Além disso, céluas tumorais mamárias são capazes de reprogramar fibroblastos normais em FAC, associados à maior deposição de Col I (SHARON et al., 2015). Em comum, ambos MAT e FAC secretam grandes quantidades de osteopontina, uma glicoproteína que interage com CD44 e eleva seus níveis celulares (RAO et al., 2013; SHARON et al., 2015). É possível, portanto, que os altos níveis de CD44 tumoral em regiões de alta densidade de Col I (PANG et al., 2016) sejam induzidos por células do estroma, ausentes em nosso modelo de estudo.

Diferentemente das células MDA-MB-231, que apresentam altos níveis da isoforma padrão CD44s, as células MCF-7 apresentam isoformas variantes CD44v (ZHAO et al., 2016). Dados da literatura divergem quanto ao papel de CD44s e CD44v na tumorigênese e metástase. Alguns estudos indicam que células tumorais CD44v⁺ são altamente metastáticas, porém sem fenótipo tronco tumoral evidente (YAE et al.,

2012; HU et al., 2017). Em contrapartida, a expressão de CD44s é associada à formação de invadopódios, relacionados à invasividade celular, bem como maior potencial metastático e associação a recorrência (BROWN et al., 2011; ZHAO et al., 2016). Observamos por *immunoblotting* que o aumento da densidade de Col I reduz os níveis celulares de CD44v em células MCF-7 derivadas de ME. Ainda assim, essa redução em CD44v não foi acompanhada por aumento de CD44s. Ensaios funcionais futuros nos auxiliarão a determinar se a redução de CD44v tem impacto no fenótipo tronco tumoral dessas células. Além disso, é necessário avaliar se fatores relacionados ao *splicing* de CD44, como ESPR1 (WARZECHA et al., 2009), também são modulados pela densidade de Col I.

Integrina- α 6 é um receptor transmembrana que se associa às subunidades β 1 e β4 e se liga preferencialmente a laminina. É também um importante marcador de diversos tipos de células tronco (KREBSBACH; VILLA-DIAZ, 2017). Um estudo recente avaliou os níveis de mRNA de Integrina α6 em células MDA-MB-231 cultivadas em placas cobertas com Col I e dotadas de baixa (100Pa) e elevada (4000Pa) rigidez. Células cultivadas em alta rigidez apresentaram níveis maiores do transcrito de Integrina-α6 (PANG et al., 2016). Em nosso estudo, observamos que a densidade de Col I não modula significativamente a expressão de Integrina-α6 (Anexo 1) em células MDA-MB-231. É possível que essa diferença se dê pela forma de cultivo, que em nosso estudo é realizada em géis de Col I, bem como pelos valores de rigidez, que provavelmente estão aquém e além aos dos nossos géis. Em um trabalho clássico, Paszek e colaboradores (PASZEK et al., 2005) demonstraram que aumento na densidade de Col I em géis de Col I/Matrigel eleva os níveis de Integrina α 6. É razoável supor que este aumento se deve à presença de Matrigel, que é rico em laminina, principal ligante de Integrina- α 6 e ausente em nosso modelo. Cumpre salientar que não avaliamos especificamente os níveis das principais isoformas de Integrina-α6 (α6A e α6B). No câncer de mama, a subpopulação de CTT CD44⁺CD24⁻ apresenta células com fenótipo epitelial e mesequimal, que expressam altos níveis de $\alpha 6A \in \alpha 6B$, respectivamente. A elevada expressão de $\alpha 6B$ está associada ao fenótipo tronco (GOEL et al., 2014). Uma vez que a glândula mamária normal expressa majoritariamente a isoforma α 6A (HOGERVORST et al., 1993), a isoforma α 6B pode ser importante alvo terapêutico no câncer de mama. Portanto, demonstramos que a densidade de Col I não modula a expressão e níveis de Integrina- α 6 total, e entendemos ser fundamental avaliar futuramente se a densidade de Col I modula os níveis das variantes de *splicing* desta integrina.

As CTT frequentemente apresentam fenótipo mesenquimal (MANI et al., 2008). A expressão de E-caderina, característica de células epiteliais, é reduzida no cultivo celular em géis de Col I (CHENG; LEUNG, 2011). Nossos resultados estão de acordo, além de indicarem que tal redução é dependente da densidade de Col I. Ainda que não tenhamos observado redução dos níveis de E-caderina nas junções célula-célula, é possível que outros parâmetros, como descontinuidade das junções célula-célula e expressão de E-caderina citoplasmática difusa, também sejam modulados pelo aumento na densidade de Col I e reforcem sua função com indutor da TEM. Nesse caso, uma nova análise quantitativa das imagens deverá ser realizada para avaliar essas hipóteses.

O componente hormonal é de fundamental importância no desenvolvimento da glândula mamária, mas também estimula a progressão do câncer de mama. Tal influência ocorre por sinalização direta e também de forma parácrina, portanto influenciando tumores $RE\alpha^+$ e $RE\alpha^-$ (ALFEREZ et al., 2018). Em relação ao efeito da densidade de Col I sobre a expressão de RE α , Barcus e colaboradores (BARCUS et al., 2015) demonstraram que o aumento da densidade de Col I (1.2mg/ml vs 2.8mg/ml) não modula os níveis de RE α em células MCF-7, porém altera a resposta transcricional ao estrógeno. Estudos recentes demonstraram que o aumento da deposição de Col I *in vivo*, especificamente na glândula mamária, não altera a expressão nuclear de RE α em tumores mamários RE α^+ (BARCUS et al., 2017; SHEA et al., 2018). Ao encontro desses resultados, observamos aumento nos níveis totais de RE α acompanhando o aumento na densidade de Col I, porém sem alteração nos níveis nucleares de RE α . Por este motivo, é necessário avaliarmos futuramente a atividade transcricional de RE α em nosso modelo de estudo.

A expressão de REα também vem sendo associada à de Sox2 no câncer de mama. Clinicamente, a expressão de Sox2 é mais frequentemente associada a tumores mamários RE⁻ (RODRIGUEZ-PINILLA et al., 2007). Em contrapartida, estudos *in vitro* demonstraram que células MCF-7 com Sox2 ativo apresentam maior capacidade de formação de colônias e mamoesferas, sendo estas características dependentes de Sox2 (WU et al., 2012). O'Shea e colaboradores avaliaram o fenótipo de tumores gerados a partir da inoculação de células RE⁺ em camundongos normais

ou com deposição elevada de Col I na glândula mamária. Células do tumor com estroma enriquecido em Col I apresentaram maior expressão de *Sox2* e *Bmi1*, outro fator de pluripotência característico de CTT, bem como maior capacidade de formação de mamoesferas (SHEA et al., 2018). Nossos ensaios apontaram níveis de Sox2 ligeiramente maiores em géis de alta densidade de Col I, porém com níveis nucleares não detectáveis por imunofluorescência convencional. Para otimizarmos esse ensaio, planejamos testar outros anticorpos anti-Sox2 e utilizar sistemas de detecção mais sensíveis, como os que envolvem polímeros de HRP do amplificador tiramida (SMITH et al., 2017). Em resumo, entendemos que ainda é preciso ter cautela sobre a função de Sox2 no aumento do fenótipo tronco mediado por alta densidade de Col I. Mais ainda, é necessário esclarecer se o aumento de Sox2 tem influência também de outros componentes do estroma, celulares ou não.

A avaliação de marcadores de proliferação também é frequentemente utilizada na identificação das CTT. Foi demonstrado que tumores de mama positivos para o marcador de fenótipo tronco ALDH apresentam maior proporção de células PCNA⁺ e pior quadro clínico (GONG et al., 2010). Ki-67⁺, outro marcador de proliferação, foi inclusive apontado como essencial para as características funcionais das CTT mamárias (CIDADO et al., 2016). Barcus e colaboradores demonstraram que o aumento na densidade de Col I (1.2mg/ml vs 2.8mg/ml) não altera os níveis de Ki-67 em células Ki-67 (BARCUS et al., 2015). Adicionalmente, a deposição exacerbada de Col I in vivo, especificamente na glândula mamária, também não altera a proporção de células Ki-67 em tumores mamários REα⁺ (BARCUS et al., 2017; SHEA et al., 2018). Em células MDA-MB-231, entretanto, o aumento na densidade de Col I parece ter efeito oposto. Kim e colaboradores (KIM et al., 2015a) demonstraram que células MDA-MB-231 apresentam proliferação reduzida quando cultivadas em géis de Col I com densidades de 2.5 e 3.5mg/ml, em comparação a 1.5mg/ml. Em nossos ensaios observamos, de fato, manutenção nos níveis de Ki-67 em células MCF-7 com o aumento da densidade de Col I. Para MDA-MB-231, em contrapartida, detectamos uma tendência na redução do marcador PCNA. Nossos resultados corroboram que a manutenção da proliferação pela densidade de Col I é específica para cada tipo celular, e permitem inferir que são independentes de alterações profundas no fenótipo tronco tumoral.

Assim como fatores químicos e biológicos, os fatores mecânicos são fundamentais na modulação do fenótipo molecular e funcional das células. A via de Hippo intermedeia a resposta celular a estes fatores mecânicos (DUPONT et al., 2011), além de estar associada ao fenótipo tronco tumoral (HAYASHI et al., 2015; SUN et al., 2016). Nukuda e colaboradores demonstraram que células de carcinoma colorretal cultivadas em géis de Col I apresentam expressão reduzida de YAP total e nuclear, em comparação a células cultivadas em superfície 2D (NUKUDA et al., 2015). Nossos ensaios também apontaram maior expressão gênica e proteica de YAP em células cultivadas em superfície 2D, porém com YAP nuclear semelhante ao cultivo em Col I. Quanto ao efeito da densidade de Col I, células tronco mesenguimais apresentam aumento de YAP nuclear guando em alta densidade de Col I (ISHIHARA et al., 2017), ao passo que fibroblastos não apresentam diferença nesse parâmetro (ALI; CHUANG; SAIF, 2014). No estudo de O'shea (SHEA et al., 2018), tumores mamários RE⁺ em ambiente com alta densidade de Col I demonstraram maior proporção de células com expressão nuclear de YAP. Em contrapartida, Lee e colaboradores demonstraram recentemente que a densidade de Col I e rigidez do ambiente não modulam a localização e atividade de YAP durante a progressão do câncer de mama (LEE et al., 2018). Apresentamos evidências de que a expressão nuclear de YAP em células tumorais mamárias não é modulada pela densidade de Col I. Além disso, a densidade de Col I também não modula a expressão de SAV1 e WBP2, respectivamente inibidor e indutor da atividade de YAP. Ainda, os níveis reduzidos de fosfatase PP2A sugerem que YAP fosforilado (pYAP) e inativo está potencialmente elevado nas células cultivadas em Col I. Esses resultados sugerem que ferramentas terapêuticas modernas voltadas à erradicação de tecido tumoral com YAP ativado (LIU et al., 2017) podem não ser efetivos no tratamento de tumores mamários.

É necessário fazer uma ressalva com relação aos dados obtidos por *immunoblotting*. Um estudo demonstrou que lisados de células em géis de Col I apresentam contaminação com proteína de peso de aproximadamente 66 kilodaltons (kDa), potencialmente albumina. A presença dessa proteína dificulta a detecção da proteína p65, que possui 65kDa. Albumina está presente em grande quantidade no soro fetal bovino no suplemento e ficaria retida nos géis de Col I (ISHIHARA et al., 2016). De fato, observamos uma banda intensa em altura aproximada de 66kDa, mediante coloração da membrana de nitrocelulose com *ponceau*. As bandas são mais fortes nos lisados de maiores densidades de Col I, provavelmente por maior retenção da albumina nesses géis. Em resumo, é provável que a fraca detecção de YAP nos lisados de células em Col I se deva, em parte, por interferência da proteína contaminante.

As CTT tem capacidade proliferativa diferenciada, além da capacidade exclusiva de formar colônias em suspensão (mamoesferas). Nós observamos que células MDA-MB-231 cultivadas em géis de Col I não apresentam maior capacidade clonogênica ou de formação de mamoesferas, em comparação às células cultivadas em superfície 2D. Nossos resultados corroboram parcialmente os de Reynolds e colaboradores (REYNOLDS et al., 2017), em que células MDA-MB-231 cultivadas em superfície 2D e géis de Col I (4.0mg/ml) apresentavam capacidade semelhante de formação de mamoesferas. Nosso estudo indica que a densidade de Col I também não modula esse parâmetro.

Avaliamos a arquitetura de géis de colágeno e parâmetros individuais das fibras e células que os compõem. Apesar de haver claramente uma maior concentração de fibras decorrente do aumento da densidade de Col I, seus parâmetros individuais (comprimento, espessura e linearidade) permaneceram constantes. Mais ainda, a presença de células também não alterou significativamente os parâmetros em questão. Em relação à morfologia celular, observamos que células cultivadas em alta densidade de Col I possuem menor *Aspect ratio* (grau de alongamento) do que células cultivadas em or espaçamento entre fibras colágenas dos géis mais densos, resultando em poros menores e que dificultam o alongamento celular. Esta característica pode ser responsável pela similaridade de geração e polarização de força contrátil celular em ambientes com densidades variadas de Col I (STEINWACHS et al., 2016)

Um fenótipo invasivo e pior prognóstico do câncer está associado ao maior grau de alinhamento entre fibras colágenas (PROVENZANO et al., 2006; CONKLIN et al., 2011). Nossos dados indicam que tal parâmetro não é modulado significativamente pela densidade de Col I ou mesmo pela presença de células MDA-MB-231. Esses dados corroboram parcialmente os de Sun e colaboradores. Neste estudo, géis acelulares de variadas densidades de Col I apresentaram graus semelhantes de

alinhamento entre fibras colágenas. Em contrapartida, a adição de células MDA-MB-231 aos géis elevou o grau de alinhamento, porém independentemente da densidade de Col I (SUN; BLOOM; ZAMAN, 2015). Convém destacar que no estudo em questão foram escolhidas para análise, e propositalmente, regiões com alto grau de alinhamento. Em nosso estudo, a análise foi realizada em toda a extensão da matriz ao redor da célula, e com imagens em menor aumento (40x vs 60x). Dessa forma, nossa análise considera um maior número de fibras mais distantes à célula e, portanto, sob menor efeito remodelador da mesma. Considerando a nossa análise limitada neste caso, é importante avaliarmos futuramente o alinhamento das fibras colágenas exclusivamente próximas às maiores projeções celulares. Alternativamente, géis com alta densidade celular, com remodelamento mais pronunciado, podem ser decelularizados e submetidos à análise do grau de alinhamento.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, concluímos que o aumento da densidade de Col I:

 Modula positivamente os níveis da subpopulação CD44⁺CD24⁻ em linhagem MDA-MB-231, mas não em MCF-7 e MCF-10A

 Não modula consideravelmente a expressão gênica de marcadores associados às CTT na linhagem MDA-MB-231;

 Não modula expressão proteica de marcadores associados às CTT em linhagem MDA-MB-231;

- Induz aumento dos níveis totais de CD44v, REα e Sox2 em MCF-7 derivada de ME;

- Não modula a sublocalização celular de YAP em linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 derivada de ME;

 Não modula a capacidade clonogênica e de autorrenovação em linhagem MDA-MB-231;

- Inibe o alongamento, porém não modula a área, perímetro, solidez e circularidade da linhagem MDA-MB-231;

- Não induz o alinhamento fibrilar global pela linhagem MDA-MB-231;

REFERÊNCIAS¹

ABRAHAM, B. K. et al. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 11, n. 3, p. 1154–9, 2005

ACERBI, I. et al. Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration. **Integrative Biology**, v. 7, n. 10, p. 1120–1134, 2015

AL-HAJJ, M. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 7, p. 3983–3988, 2003

ALFEREZ, D. G. et al. The Role of Steroid Hormones in Breast and Effects on Cancer Stem Cells. **Current stem cell reports**, v. 4, n. 1, p. 81–94, 2018

ALI, M. Y.; CHUANG, C.-Y.; SAIF, M. T. A. Reprogramming cellular phenotype by soft collagen gels. **Soft matter**, v. 10, n. 44, p. 8829–37, 2014

BANE, A. et al. Clinical–pathologic significance of cancer stem cell marker expression in familial breast cancers. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 140, n. 1, p. 195–205, 2013

BARBOLINA, M. V et al. Matrix rigidity activates Wnt signaling through down-regulation of Dickkopf-1 protein. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 1, p. 141–51, 2013

BARCUS, C. E. et al. Dense Collagen-I Matrices Enhance Pro-Tumorigenic Estrogen-Prolactin Crosstalk in MCF-7 and T47D Breast Cancer Cells. **PLOS ONE**, v. 10, n. 1, p. e0116891, 2015

BARCUS, C. E. et al. Elevated collagen-I augments tumor progressive signals, intravasation and metastasis of prolactin-induced estrogen receptor alpha positive mammary tumor cells. **Breast Cancer Research**, v. 19, n. 1, p. 9, 2017

BATLLE, E.; CLEVERS, H. Cancer stem cells revisited. **Nature Medicine**, v. 23, n. 10, p. 1124–1134, 2017

BEGUM, A. et al. The extracellular matrix and focal adhesion kinase signaling regulate cancer stem cell function in pancreatic ductal adenocarcinoma. **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0180181, 2017

BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 786–801, 2014

BORST, P. Cancer drug pan-resistance: pumps, cancer stem cells, quiescence, epithelial to mesenchymal transition, blocked cell death pathways, persisters or what? **Open biology**, v. 2, n. 5, p. 120066, 2012

BOYD, N. F. et al. Mammographic Density and the Risk and Detection of Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 3, p. 227–236, 2007

BOYLE, S. E. et al. CD271 Expression on Patient Melanoma Cells Is Unstable and Unlinked to Tumorigenicity. **Cancer Research**, v. 76, n. 13, p. 3965–3977, 2016

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018

BREDFELDT, J. S. et al. Computational segmentation of collagen fibers from secondharmonic generation images of breast cancer. **Journal of biomedical optics**, v. 19, n. 1, p. 16007, 2014

BROWN, R. L. et al. CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 3, p. 1064–74, 2011

CAILLEAU, R. et al. Breast tumor cell lines from pleural effusions. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 53, n. 3, p. 661–74, 1974

CHEN, L. et al. The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs. **Biomaterials**, v. 33, n. 5, p. 1437–44, 2012

CHENG, J.-C.; LEUNG, P. C. K. Type I collagen down-regulates E-cadherin expression by increasing PI3KCA in cancer cells. **Cancer Letters**, v. 304, n. 2, p. 107–116, 2011

CIDADO, J. et al. Ki-67 is required for maintenance of cancer stem cells but not cell proliferation. **Oncotarget**, v. 7, n. 5, p. 6281–93, 2016

CONKLIN, M. W. et al. Aligned Collagen Is a Prognostic Signature for Survival in Human Breast Carcinoma. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 3, p. 1221–1232, 2011

CORDENONSI, M. et al. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 759–72, 2011

DIMRI, G.; BAND, H.; BAND, V. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. **Breast Cancer Research**, v. 7, n. 4, p. 171, 2005

DONTU, G. et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. **Genes & Development**, v. 17, n. 10, p. 1253–1270, 2003

DRIESSENS, G. et al. Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. **Nature**, v. 488, n. 7412, p. 527–530, 2012

DUPONT, S. et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. **Nature**, v. 474, n. 7350, p. 179–183, 2011

ESBONA, K. et al. The Presence of Cyclooxygenase 2, Tumor-Associated

Macrophages, and Collagen Alignment as Prognostic Markers for Invasive Breast Carcinoma Patients. **The American journal of pathology**, v. 188, n. 3, p. 559–573, 2018

FRANCO-BARRAZA, J. et al. Preparation of Extracellular Matrices Produced by Cultured and Primary Fibroblasts. In: **Current Protocols in Cell Biology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 71p. 10.9.1-10.9.34.

GINESTIER, C. et al. ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 5, p. 555–567, 2007

GOEL, H. L. et al. Regulated Splicing of the α 6 Integrin Cytoplasmic Domain Determines the Fate of Breast Cancer Stem Cells. **Cell Reports**, v. 7, n. 3, p. 747–761, 2014

GONG, C. et al. Markers of Tumor-Initiating Cells Predict Chemoresistance in Breast Cancer. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. e15630, 2010

GUPTA, P. B. et al. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. **Cell**, v. 146, n. 4, p. 633–44, 2011

HÄRMÄ, V. et al. A comprehensive panel of three-dimensional models for studies of prostate cancer growth, invasion and drug responses. **PIoS one**, v. 5, n. 5, p. e10431, 2010

HASSIOTOU, F.; GEDDES, D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. **Clinical anatomy (New York, N.Y.)**, v. 26, n. 1, p. 29–48, 2013

HAYASHI, H. et al. An Imbalance in TAZ and YAP Expression in Hepatocellular Carcinoma Confers Cancer Stem Cell-like Behaviors Contributing to Disease Progression. **Cancer Research**, v. 75, n. 22, p. 4985–4997, 2015

HERSCHKOWITZ, J. I. et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biology**, v. 8, n. 5, p. R76, 2007

HOGERVORST, F. et al. Biochemical characterization and tissue distribution of the A and B variants of the integrin alpha 6 subunit. **The Journal of cell biology**, v. 121, n. 1, p. 179–91, 1993

HU, J. et al. A CD44v+ subpopulation of breast cancer stem-like cells with enhanced lung metastasis capacity. **Cell death & disease**, v. 8, n. 3, p. e2679, 2017

HUO, C. W. et al. High mammographic density is associated with an increase in stromal collagen and immune cells within the mammary epithelium. **Breast cancer research : BCR**, v. 17, n. 1, p. 79, 2015

INCA. Estimativa 2018. Incidencia de câncer no Brasil. [s.l: s.n.]

INSUA-RODRÍGUEZ, J.; OSKARSSON, T. The extracellular matrix in breast cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 41–55, 2016

ISHIHARA, S. et al. An improved method for western blotting when extracting proteins from mammalian cells cultured on a collagen gel under serum-free conditions. **Cytotechnology**, v. 68, n. 1, p. 25–32, 2016

ISHIHARA, S. et al. Mechano-Signal Transduction in Mesenchymal Stem Cells Induces Prosaposin Secretion to Drive the Proliferation of Breast Cancer Cells. **Cancer research**, v. 77, n. 22, p. 6179–6189, 2017

JAISWAL, R. et al. Breast Cancer-Derived Microparticles Display Tissue Selectivity in the Transfer of Resistance Proteins to Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61515, 2013

JAMES, M. I. et al. Characterization and propagation of tumor initiating cells derived from colorectal liver metastases: trials, tribulations and a cautionary note. **PIoS one**, v. 10, n. 2, p. e0117776, 2015

JETER, C. R. et al. Functional Evidence that the Self-Renewal Gene *NANOG* Regulates Human Tumor Development. **Stem Cells**, v. 27, n. 5, p. 993–1005, 2009

KAKKAD, S. M. et al. Collagen I fiber density increases in lymph node positive breast cancers: pilot study. **Journal of biomedical optics**, v. 17, n. 11, p. 116017, 2012

KIM, B. J. et al. A 3D in situ cell counter reveals that breast tumor cell (MDA-MB-231) proliferation rate is reduced by the collagen matrix density. **Biotechnology Progress**, v. 31, n. 4, p. 990–996, 2015 A

KIM, T. et al. A basal-like breast cancer-specific role for SRF–IL6 in YAP-induced cancer stemness. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 10186, 2015 B

KIRKLAND, S. C. Type I collagen inhibits differentiation and promotes a stem cell-like phenotype in human colorectal carcinoma cells. **British journal of cancer**, v. 101, n. 2, p. 320–6, 2009

KOBOLDT, D. C. et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 61–70, 2012

KRANING-RUSH, C. M. et al. Quantifying traction stresses in adherent cells. **Methods** in cell biology, v. 110, p. 139–78, 2012

KREBSBACH, P. H.; VILLA-DIAZ, L. G. The Role of Integrin α 6 (CD49f) in Stem Cells: More than a Conserved Biomarker. **Stem Cells and Development**, v. 26, n. 15, p. 1090–1099, 2017

LAKHANI, S. R. et al. **WHO Classification of Tumours of the Breast**. 4a. ed. [s.l.] International Agency for Research on Cancer (IARC),

LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelialmesenchymal transition. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 3, p. 178– 196, 2014

LAMPRECHT, S. et al. Multicolor lineage tracing reveals clonal architecture and dynamics in colon cancer. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1406, 2017

LAPIDOT, T. et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. **Nature**, v. 367, n. 6464, p. 645–8, 1994

LEE, J. Y. et al. YAP-independent mechanotransduction drives breast cancer progression. **bioRxiv**, p. 495499, 2018

LEIS, O. et al. Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. **Oncogene**, v. 31, n. 11, p. 1354–1365, 2012

LENOS, K. J. et al. Stem cell functionality is microenvironmentally defined during tumour expansion and therapy response in colon cancer. **Nature Cell Biology**, v. 20, n. 10, p. 1193–1202, 2018

LEVENTAL, K. R. et al. Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 891–906, 2009

LI, X. et al. Intrinsic Resistance of Tumorigenic Breast Cancer Cells to Chemotherapy. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 9, p. 672–679, 2008

LIEDTKE, C. et al. Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 8, p. 1275–1281, 2008

LIM, E. et al. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. **Nature medicine**, v. 15, n. 8, p. 907–13, 2009

LIU, L. et al. Mechanoresponsive stem cells to target cancer metastases through biophysical cues. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 400, p. eaan2966, 2017

LIU, S. et al. Breast Cancer Stem Cells Are Regulated by Mesenchymal Stem Cells through Cytokine Networks. **Cancer Research**, v. 71, n. 2, p. 614–624, 2011

LIU, S. et al. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. **Stem cell reports**, v. 2, n. 1, p. 78–91, 2014

MA, S. et al. The Hippo Pathway: Biology and Pathophysiology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 88, n. 1, p. annurev-biochem-013118-111829, 2019

MANI, S. A. et al. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. **Cell**, v. 133, n. 4, p. 704–715, 2008

MEDINA, D. The mammary gland: a unique organ for the study of development and tumorigenesis. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 1, n. 1, p. 5–19, 1996

MOTEGI, H. et al. Type 1 collagen as a potential niche component for CD133-positive glioblastoma cells. **Neuropathology: official journal of the Japanese Society of Neuropathology**, v. 34, n. 4, p. 378–85, 2014

NASSAR, D.; BLANPAIN, C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic

Implications. Annual review of pathology, v. 11, n. 1, p. 47–76, 2016

NOONE AM, HOWLADER N, KRAPCHO M, MILLER D, BREST A, YU M, RUHL J, TATALOVICH Z, MARIOTTO A, LEWIS DR, CHEN HS, FEUER EJ, C. K. (eds). Cancer Statistics Review, 1975-2015 - SEER Statistics.

NUKUDA, A. et al. Stiff substrates increase YAP-signaling-mediated matrix metalloproteinase-7 expression. **Oncogenesis**, v. 4, n. 9, p. e165, 2015

PANG, M.-F. et al. Tissue Stiffness and Hypoxia Modulate the Integrin-Linked Kinase ILK to Control Breast Cancer Stem-like Cells. **Cancer research**, v. 76, n. 18, p. 5277–87, 2016

PANKOVA, D. et al. Hippo Pathway Deregulation Drives Tissue Stiffness and Cancer Stem-like Cells in Lung Adenocarcinoma. **bioRxiv**, 2018

PARK, J. S. et al. The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF- β . **Biomaterials**, v. 32, n. 16, p. 3921–3930, 2011

PARK, S. Y. et al. Heterogeneity for Stem Cell-Related Markers According to Tumor Subtype and Histologic Stage in Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 3, p. 876–887, 2010

PASZEK, M. J. et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. **Cancer Cell**, v. 8, n. 3, p. 241–254, 2005

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001

PLAKS, V.; KONG, N.; WERB, Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? **Cell stem cell**, v. 16, n. 3, p. 225–38, 2015

PLEASURE, S. J.; LEE, V. M.-Y. NTera 2 Cells: A human cell line which displays characteristics expected of a human committed neuronal progenitor cell. **Journal of Neuroscience Research**, v. 35, n. 6, p. 585–602, 1993

PROVENZANO, P. P. et al. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. **BMC Medicine**, v. 4, n. 1, p. 38, 2006

PROVENZANO, P. P. et al. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. **BMC medicine**, v. 6, n. 1, p. 11, 2008

RAO, G. et al. Reciprocal Interactions between Tumor-Associated Macrophages and CD44-Positive Cancer Cells via Osteopontin/CD44 Promote Tumorigenicity in Colorectal Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 4, p. 785–797, 2013

REYNOLDS, D. S. et al. Breast Cancer Spheroids Reveal a Differential Cancer Stem Cell Response to Chemotherapeutic Treatment. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p.

10382, 2017

REZAKHANIHA, R. et al. Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy. **Biomechanics and modeling in mechanobiology**, v. 11, n. 3–4, p. 461–73, 2012

RODRIGUEZ-PINILLA, S. M. et al. Sox2: A possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer. **Modern Pathology**, v. 20, n. 4, p. 474–481, 2007

SAMANI, A.; ZUBOVITS, J.; PLEWES, D. Elastic moduli of normal and pathological human breast tissues: an inversion-technique-based investigation of 169 samples. **Physics in Medicine and Biology**, v. 52, n. 6, p. 1565–1576, 2007

SCHINDELIN, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 676–82, 2012

SCHWITALLA, S. et al. Intestinal Tumorigenesis Initiated by Dedifferentiation and Acquisition of Stem-Cell-like Properties. **Cell**, v. 152, n. 1–2, p. 25–38, 2013

SHARON, Y. et al. Tumor-Derived Osteopontin Reprograms Normal Mammary Fibroblasts to Promote Inflammation and Tumor Growth in Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 75, n. 6, p. 963–973, 2015

SHEA, M. P. et al. High collagen density augments mTOR-dependent cancer stem cells in ER α + mammary carcinomas, and increases mTOR-independent lung metastases. **Cancer Letters**, v. 433, p. 1–9, 2018

SHIOZAWA, Y. et al. Cancer stem cells and their role in metastasis. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 138, n. 2, p. 285–293, 2013

SMITH, E. R. et al. FGF23 is synthesised locally by renal tubules and activates injuryprimed fibroblasts. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 3345, 2017

SOULE, H. D. et al. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, n. 5, p. 1409–16, 1973

SOULE, H. D. et al. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. **Cancer research**, v. 50, n. 18, p. 6075–86, 1990

STEINWACHS, J. et al. Three-dimensional force microscopy of cells in biopolymer networks. **Nature Methods**, v. 13, n. 2, p. 171–176, 2016

STOLZENBURG, S. et al. Targeted silencing of the oncogenic transcription factor SOX2 in breast cancer. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 14, p. 6725–6740, 2012

SUN, J.-G. et al. Yap1 promotes the survival and self-renewal of breast tumor initiating cells via inhibiting Smad3 signaling. **Oncotarget**, v. 7, n. 9, p. 9692–706, 2016

SUN, M.; BLOOM, A. B.; ZAMAN, M. H. Rapid Quantification of 3D Collagen Fiber Alignment and Fiber Intersection Correlations with High Sensitivity. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0131814, 2015

TANG, B. et al. A flexible reporter system for direct observation and isolation of cancer stem cells. **Stem cell reports**, v. 4, n. 1, p. 155–69, 2015

THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 4–27, 2016

UEDA, A. et al. Effect of shear stress on microvessel network formation of endothelial cells with in vitro three-dimensional model. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 287, n. 3, p. H994-1002, 2004

VAILLANT, F. et al. The mammary progenitor marker CD61/beta3 integrin identifies cancer stem cells in mouse models of mammary tumorigenesis. **Cancer research**, v. 68, n. 19, p. 7711–7, 2008

VALYI-NAGY, K. et al. Stem cell marker CD271 is expressed by vasculogenic mimicryforming uveal melanoma cells in three-dimensional cultures. **Molecular vision**, v. 18, p. 588–92, 2012

WANG, H. et al. Age-related morphological changes of the dermal matrix in human skin documented in vivo by multiphoton microscopy. **Journal of biomedical optics**, v. 23, n. 3, p. 1–4, 2018

WANG, N. Review of Cellular Mechanotransduction. **Journal of physics D: Applied physics**, v. 50, n. 23, 2017

WANG, Y.-K. et al. Rigidity of collagen fibrils controls collagen gel-induced downregulation of focal adhesion complex proteins mediated by alpha2beta1 integrin. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 24, p. 21886–92, 2003

WARZECHA, C. C. et al. ESRP1 and ESRP2 are epithelial cell-type-specific regulators of FGFR2 splicing. **Molecular cell**, v. 33, n. 5, p. 591–601, 2009

WU, F. et al. Identification of two novel phenotypically distinct breast cancer cell subsets based on Sox2 transcription activity. **Cellular signalling**, v. 24, n. 11, p. 1989–98, 2012

YAE, T. et al. Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell. **Nature communications**, v. 3, n. 1, p. 883, 2012

YOUNG, R. A. Control of the Embryonic Stem Cell State. Cell, v. 144, n. 6, p. 940– 954, 2011

ZHANG, K. et al. The collagen receptor discoidin domain receptor 2 stabilizes SNAIL1 to facilitate breast cancer metastasis. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 677–687, 2013

ZHANG, K. et al. Mechanical signals regulate and activate SNAIL1 protein to control the fibrogenic response of cancer-associated fibroblasts. **Journal of cell science**, v. 129, n. 10, p. 1989–2002, 2016

ZHANG, M. et al. Identification of Tumor-Initiating Cells in a p53-Null Mouse Model of

Breast Cancer. Cancer Research, v. 68, n. 12, p. 4674–4682, 2008

ZHAO, P. et al. The CD44s splice isoform is a central mediator for invadopodia activity. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 7, p. 1355–1365, 2016

ZOMER, A. et al. Brief Report: Intravital Imaging of Cancer Stem Cell Plasticity in Mammary Tumors. **STEM CELLS**, v. 31, n. 3, p. 602–606, 2013

ANEXOS

(continua)

		Densidade de Col I							
Posição na	Refser	Gene	BD		ΔΠ	Comentários			
placa	Reiseq	(símbolo)	Variação do or	Comentarios					
A01									
A01 A02	NM 004827	ABCG2	0.5071	0 1235	0.4745	B			
A02 A03	NM 001627		0.3071	0.1200	0.4403				
A03 A04	NM_000689		5 0944	0.7330	2 3082	B			
A05	NM_000051	ATM	3 2318	2 6416	2 0199	OKAY			
A06	NM_000332	ATXN1	3.4481	3.9224	2.4147	OKAY			
A07	NM 001699	AXL	1.1149	1.4571	1.2845	OKAY			
A08	NM 005180	BMI1	1.0967	0.9989	0.9749	OKAY			
A09	NM_001719	BMP7	5.6834	5.5189	5.4745	С			
A10	NM_013230	CD24	49.3261	25.3935	29.7586	В			
A11	NM_001773	CD34	5.6834	5.5189	5.4745	С			
A12	NM_001775	CD38	2.8076	0.2616	0.2595	В			
B01	NM_000610	CD44	3.2322	3.7338	3.9291	OKAY			
B02	NM_001274	CHEK1	0.7498	1.1234	0.8167	OKAY			
B03	NM_004392	DACH1	0.0724	0.0577	0.0536	A			
B04	NM_001954	DDR1	0.5331	0.5873	0.2919	A			
B05	NM_012242	DKK1	0.1891	0.2432	0.2732	OKAY			
B06	NM_005618	DLL1	0.7802	0.5971	0.1379	В			
B07	NM_019074	DLL4	9.8022	9.7474	5.3783	В			
B08	NM_001379	DNMT1	0.2637	0.6191	0.3002	OKAY			
B09	NM_001963	EGF	0.5334	0.4784	1.0389	В			
B10	NM_000118	ENG	2.2413	6.0592	1.7641	В			
B11	NM_002354	EPCAM	0.8024	1.079	1.0096	OKAY			
	NIVI_004448		0.348	0.8473	0.3354	A			
C01	NIVI_000120	ELLER	0.9001	1.1010	1.2077	OKAT			
C02	NM 004475		0.5744	0 7381	0.5654				
C04	NM 021784	FOXA2	0.5179	0.7501	0.0004	OKAY			
C05	NM_032682	FOXP1	1 1316	0.6102	0.4555	OKAY			
C06	NM_003507	FZD7	0 7072	0.8116	0.3986	OKAY			
C07	NM_002051	GATA3	0 1261	0.2551	0.3223	B			
C08	NM_002093	GSK3B	1,1913	0.967	1.0171	OKAY			
C09	NM 004964	HDAC1	0.4373	0.4105	0.4379	OKAY			
C10	NM_002165	ID1	4.2998	3.0475	3.9642	OKAY			
C11	NM_001556	IKBKB	1.3511	1.3422	1.2539	OKAY			
C12	NM_000584	CXCL8	1.9588	2.012	1.962	OKAY			
D01	NM_002203	ITGA2	1.3403	1.9542	1.4105	OKAY			
D02	NM_000885	ITGA4	5.6834	5.5189	5.4745	С			
D03	NM_000210	ITGA6	1.8589	2.3049	2.3618	OKAY			
D04	NM_002211	ITGB1	0.653	0.8002	0.6863	OKAY			
D05	NM_000214	JAG1	1.6908	1.1482	1.3051	OKAY			
D06	NM_004972	JAK2	0.9955	0.5054	0.5731	A			
D07	NM_000222	KIT	5.6834	5.5189	5.4745	C			
D08	NM_003994	KITLG	0.021	0.1125	0.0202	A			
D09	NM_173484	KLF17	9.5777	1.3509	4.6123	В			
D10	NM_004235		1.1534	0.9604	0.9439	OKAY			
U11 012	NIVI_004690		1.2008	0.8959	0.9358				
	INIVI_UZ4074	LINZÖA	54.0045 56021	10.1090	22.4140 51715	в С			
E01 E02	NM_014757	MAML1	0.3962	0.3819	0.3235	A			

Anexo A - Lista de genes analisados por "PCR array"

			Densidade de Col I					
Posição na	Refsea	Gene	BD	MD	AD	Comentários		
placa	Reiseq	(símbolo)	Variação de e	Comontanoo				
F03	NM 006343	MERTK	0 1681 0 2282 0 1591 OKAY					
E00	NM_021950	MS4A1	5 6834	5 5189	5 4745	C		
E05	NM 00101801	MUC1	2 3148	1 841	1 1913	OKAY		
E06	NM 002467	MYC	0 4881	0 5097	0 5105	OKAY		
E07	NM_005378	MYCN	5 6834	5 5189	5 4745	C		
E08	NM_024865	NANOG	105 6878	24 0278	40 5926	B		
E09	NM 003998	NFKB1	0.3304	0.3171	0.2995	Ā		
E10	NM_000625	NOS2	2.8291	1.0932	2.6347	В		
E11	NM_017617	NOTCH1	1,7953	2.3226	1.4867	Ā		
E12	NM 024408	NOTCH2	2.2178	2.4478	1,5079	OKAY		
F01	NM 000442	PECAM1	1.7502	0.8969	1.3685	В		
F02	NM_000930	PLAT	3.3842	2.8615	3.2684	OKAY		
F03	NM 002659	PLAUR	9.4456	9.9732	9.7354	OKAY		
F04	NM 002701	POU5F1	23.3705	66.4514	19.8901	В		
F05	NM_006017	PROM1	1.2866	1.2494	1.2393	В		
F06	NM_000264	PTCH1	0.0645	0.0632	0.0967	В		
F07	NM_002838	PTPRC	5.6834	5.5189	5.4745	С		
F08	NM_021818	SAV1	0.8414	0.6336	0.6544	OKAY		
F09	NM_012238	SIRT1	0.6858	0.5566	0.6518	OKAY		
F10	NM_005631	SMO	5.6834	5.5189	5.4745	С		
F11	NM_005985	SNAI1	5.2018	6.112	4.7397	В		
F12	NM_003106	SOX2	0.22	0.8498	0.0529	В		
G01	NM_003150	STAT3	0.8223	0.768	0.6445	OKAY		
G02	NM_000116	TAZ	0.6157	0.6691	0.3664	OKAY		
G03	NM_004612	TGFBR1	0.6049	0.5007	0.5613	OKAY		
G04	NM_006288	THY1	5.6834	5.5189	5.4745	С		
G05	NM_000474	TWIST1	5.6834	5.5189	5.4745	С		
G06	NM_057179	TWIST2	24.0529	5.5189	5.4745	С		
G07	NM_003390	WEE1	0.6418	0.7584	0.5046	OKAY		
G08	NM_005430	WNT1	2.6525	2.5757	2.555	В		
G09	NM_015238	WWC1	0.186	0.3392	0.3503	Α		
G10	NM_006106	YAP1	0.458	0.5483	0.429	OKAY		
G11	NM_030751	ZEB1	0.8204	0.7788	0.6229	OKAY		
G12	NM_014795	ZEB2	3.7462	4.5587	3.6373	OKAY		
H01	NM_001101	ACTB	0.7402	0.6844	0.7424	OKAY		
H02	NM_004048	B2M	0.807	0.7678	0.7983	OKAY		
H03	NM_002046	GAPDH	1.608	2.0345	1.3893	OKAY		
H04	NM_000194	HPRT1	0.9596	1.0102	1.091	OKAY		
H05	NM_001002	RPLP0	1.0851	0.926	1.1132	OKAY		

(conclusão)

Tabela 1 - Lista de genes analisados por "PCR array"

"OKAY": indica valores de Ct inferiores a 30 nos grupos controle (2D) e teste (Col I);
"A": indica valores de Ct superiores a 30 no grupo controle ou teste;
"B": indica valores de Ct superiores a 30 nos grupos controle e teste;
"C": indica valores de Ct indeterminados ou superiores a 35 nos grupos controle e teste.