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

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

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

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.

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