MARIANA TAMAZATO LONGHI

**Mecanismos de regulação da localização
subcelular de maspina em linhagem de células
epiteliais 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

2018

MARIANA TAMAZATO LONGHI

**Mecanismos de regulação da localização
subcelular de maspina em linhagem de células
epiteliais 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: Profa. Dra. Nathalie Cella

Versão original

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Tamazato Longhi, Mariana
Mecanismos de regulação da localização subcelular
de maspina em linhagem de células epiteliais de
mama / Mariana Tamazato Longhi; orientador Nathalie
Cella. -- São Paulo, 2018.
117 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Maspina. 2. EGFR. 3. Fosforilação. 4.
Sinalização. 5. Localização subcelular. I. Cella,
Nathalie, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mariana Tamazato Longhi

Título da tese: Mecanismos de regulação da localização subcelular de mapina em
linhagem de células epiteliai de mama

Orientador(a): Profa. Dra. Nathalie Cella

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação, em sessão pública realiza
da a dia / mês / ano, considerou

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinado(a):Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinado(a):Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinado(a):Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinado(a):Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 577/13 referente ao projeto intitulado: "*O papel de maspina na migração e proliferação celular*" sob a responsabilidade de **Mariana Tamazato Longhi**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 19 de fevereiro de 2013.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais pelo apoio incondicional, pelo amor, carinho e compreensão. Por serem modelos de pessoas honestas e batalhadoras, que eu tanto admiro.

À minha querida irmã, Érica, por estar sempre ao meu lado e me proporcionar uma das maiores alegrias da minha vida que é ser tia da Isadora.

Ao Marcelo, meu melhor amigo, companheiro da vida, fonte de muita alegria, apoio, compreensão, incentivo e muito amor.

À minha orientadora Profa. Dra. Nathalie Cella, mãe científica, por me aceitar como aluna, confiar e acreditar no meu potencial, por ter me ensinado tanto e ser um exemplo de profissional apaixonado e dedicado ao seu trabalho.

À Magna, Jeffrey, Heydi e Pri, muito mais que colegas, amigos pra vida toda onde quer que vocês estejam.

À todos os amigos e colegas do laboratório 428, Pereirinha, Sú, Maíra, Lú, Ana, Iuri, Thaimara, Andréa, Lilian por todas as conversas, risadas e desabafos.

Às Profa. Dra. Vanessa Moraes e Profa. Dra. Marilene Lopes por todo o auxílio nesse período.

Ao Prof. Dr. Barry Gumbiner pelo período tão enriquecedor do BEPE.

Aos colegas do SCRI, Alisha, Nam, Richard, Leslayann, Matthew e Allison por me recepcionarem tão bem em Seattle, e pelo auxílio em todos os momentos.

À todos os amigos que fiz no ICB nesse período.

À minhas amigas de infância, Angel, Dani, Lary, Lulu, Patry, Pri e Fê, pelo apoio, diversão, conselhos e broncas.

À minha família maravilhosa, avôs, tios, primos e agregados que fazem da minha vida mais feliz.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro. A concessão da bolsa de doutorado (2013/00815-4) e da bolsa BEPE (2015/16384-8) que foram essenciais para a realização desse trabalho.

RESUMO

LONGHI, M. T. **Mecanismos de regulação da localização subcelular de maspina em linhagem de células epiteliais de mama.** 2018. 117 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Maspina, uma proteína supressora de tumor de 42 kDa, pertence à superfamília das serpinas (inibidores de serina protease), no entanto, seu mecanismo de ação independe da inibição de proteases. Maspina é expressa por epitélio de diferentes órgãos e apresenta regulação diferencial durante a progressão tumoral. Entre suas atividades biológicas, foram descritas a regulação da adesão celular, migração, morte, expressão gênica e resposta ao estresse oxidativo. A localização subcelular de maspina está relacionada a regulação de suas funções biológicas. Estudos clínicos recentes indicam que é a localização nuclear de maspina, ao invés de seus níveis de expressão, correlaciona-se com bons fatores prognósticos e sobrevida global em alguns tipos de câncer, incluindo câncer de mama. No entanto, pouco se sabe sobre como a localização subcelular de maspina é regulada. A maioria dos estudos sobre maspina é conduzido em linhagens de células tumorais, que apresentam uma grande variabilidade no contexto celular. Portanto, é importante usar uma linhagem celular não transformada para esta abordagem. Nesse trabalho investigamos fatores solúveis, interação célula-célula e interação célula-substrato como possíveis reguladores da localização de maspina na célula e as vias de sinalização envolvidas nesta regulação. Usando a linhagem celular epitelial mamária não transformada MCF10A como modelo, observamos por experimentos de imunofluorescência que o Fator de Crescimento Epidermal (EGF) promove a localização nuclear de maspina. EGF também altera a fosforilação da proteína conforme mostram nossos experimentos de 2D-SDS-PAGE e gel contendo Phos-tag. A fosforilação ocorre em resíduos de serina e a desfosforilação em resíduos de tirosina. À procura por vias de sinalização a jusante de do receptor de EGF envolvidas na regulação da localização subcelular de maspina, identificamos as vias de PI3K e Stat3. Além disso, a adesão célula-célula parece bloquear a localização nuclear de maspina. Na tentativa de investigar funções celulares relacionadas à regulação de maspina por EGFR, identificamos proteínas que co-imunoprecipitam com maspina após o tratamento com EGF. O agrupamento funcional dessas proteínas sugere que a maspina pode estar envolvida em metabolismo de RNA, adesão celular e citoesqueleto. Desta forma, este trabalho identificou diferentes mecanismos que regulam a localização subcelular de maspina, que dependem da ativação das vias de PI3K e AKT pela via de EGFR.

Palavras-chave: Maspina. EGFR. Fosforilação. Sinalização. Localização subcelular.

ABSTRACT

LONGHI, M. T. **Mechanisms of subcellular localization of maspin in breast epithelial cell line.** 2018. 117 p. PhD Thesis (Cell and Tissue Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Maspin, a 42 kDa tumor suppressor protein, belongs to the serpin (serine protease inhibitors) superfamily, however, its mechanism of action does not depend on protease inhibition. Maspin is expressed by epithelium of different organs and presents differential regulation during tumor progression. Among its biological activities, regulation of cell adhesion, migration, death, gene expression and oxidative stress response were described. Subcellular localization of maspin is related to the regulation of its biological functions. Recent clinical studies indicate that nuclear localization of maspin, not its expression levels, correlates with good prognostic factors and overall survival in some types of cancer, including breast cancer. However, little is known about how maspin subcellular localization is regulated. Most studies on maspin are conducted in tumor cell lines, which show great variability in cell context. Therefore, it is important to use a nontransformed cell line for this approach. Here we investigated soluble factors, cell-cell interaction and cell-substrate interaction as possible regulators of maspin subcellular localization and the signaling pathways involved. Using the MCF10A untransformed mammary epithelial cell line as a model system, we observed by immunofluorescence experiments that the Epidermal Growth Factor (EGF) promotes nuclear localization of maspin. EGF also alters the phosphorylation of the protein as observed by 2D-SDS-PAGE and gel containing Phos-tag. Phosphorylation occurs on serine residues and dephosphorylation, on tyrosine residues. Looking for signaling pathways downstream of EGF receptor involved in regulation of maspin subcellular localization, we identified the PI3K and STAT3 pathways. On the other hand, cell-cell adhesion seems to block nuclear localization of maspin. In an attempt to investigate cellular functions related to regulation of maspin by EGFR, we identified proteins that co-immunoprecipitate with maspin in EGF-treated cells. The functional grouping of these proteins suggests that maspin may be involved with RNA metabolism, cell adhesion and cytoskeleton. Thus, this study identified different mechanisms that regulate subcellular localization of maspin, which depends on PI3K and STAT3 activation downstream of EGFR pathway.

Keywords: Maspin. EGFR. Phosphorylation. Signaling. Subcellular Localization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação da estrutura de maspina humana e alinhamento da sequência da região do RSL das serpinas do clado B..	22
Figura 2. Esquema ilustrativo dos efeitos de maspina observados nas células tumorais.	24
Figura 3. A família de receptores ErbB e seus ligantes.	37
Figura 4. Principais vias de sinalização ativadas por EGFR.	39
Figura 5. Exemplo de classificação das células de acordo com os níveis de maspina dos compartimentos.	48
Figura 6. Localização subcelular de maspina nas células MCF10A em meio completo e carenciado.	55
Figura 7. Localização subcelular de maspina após remoção dos fatores solúveis do meio de cultivo das células MCF10A.	57
Figura 8. Localização subcelular de maspina após tratamento das células MCF10A por diferentes períodos com EGF.	59
Figura 9. Variação da formas fosforiladas de maspina reguladas por EGFR.	61
Figura 10. Variação da fosforilação de maspina em resíduos de serina e tirosina após tratamento das células com EGF por imunoprecipitação.	64
Figura 11. Variação da localização subcellular de maspina após tratamento das células com inibidores farmacológicos de vias a jusante de EGFR.	67
Figura 12. Regulação da localização subcelular de maspina pela via de PI3K.	70
Figura 13. Análise das proteínas que co-imunoprecipitam com maspina após estímulo de EGF.	71
Figura 14. Interação de maspina com EGFR mediante estímulo das células com EGF.	72
Figura 15. Variação da localização subcelular de maspina em função da densidade de células MCF10A.	75
Figura 16. Variação da localização de maspina em células MCF10A tratadas com EGTA.	77
Figura 17. Variação da formas fosforiladas de maspina de células aderidas ou em suspensão.	79
Figura 18. Identificação de resíduos fosforilados de maspina segundo a literatura.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAM: uma Desintegrina e metaloproteinase (A disintegrin and metaloproteinase)

AP-1: *Proteína ativadora-1 (Activator protein 1)*

ATF-2: *Fator de transcrição 2 (Activating Transcription Factor 2)*

bFGF: *Fator de crescimento fibroblástico básico (Basic fibroblast growth factor)*

BSA: *Albumina de Soro Bovino (Bovine Serum Albumin)*

CAP2: *Antiproteinase citoplasmática 2 (Cytoplasmic antiproteinase 2)*

Chip: *Imunoprecipitação de cromatina (Chromatin Immunoprecipitation)*

CID: *Dissociação induzida por colisão (Collision-induced dissociation)*

CK18: *Citoqueratina 18 (Cytokeratin 18)*

CK2: *Caseína quinase 2 (Casein kinase 2)*

CRE: *Elemento de resposta ao AMP cíclico (cAMP response element)*

CSF1: *Fator Estimulante de Colônia 1 (Colony stimulating factor 1)*

DAG: *Diacilglicerol*

DMSO: *di-metilsulfóxido*

DNA: *Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)*

DTT: *Ditiotreitol (Dithiothreitol)*

EDTA: *Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (Ethylenediamine Tetraacetic Acid)*

EGF: *Fator de Crescimento Epidermal (Epidermal Growth Factor)*

EGFR: *Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (Epidermal Growth Factor Receptor)*

EGTA: *Ácido Etileno Glicol Tetracético (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid)*

ERK: *Proteínas Quinases Reguladas por Estímulos Extracelulares (Extracellular Signal Regulated Kinases 1/2)*

ESRRA: *receptor alfa relacionado a estrogênio (Estrogen-related receptor alpha)*

FAK: *Quinase de Adesão Focal (Focal Adhesion Kinase)*

GFP: *Proteína Verde Fluorescente (Green Fluorescent Protein)*

GST: *Glutathione S-Transferase (Glutathione S-Transferase)*

HDAC1: Histona Deacetilase 1 (*Histone Deacetylase 1*)

HPLC: Cromatografia líquida de alto desempenho (*High performance liquid chromatography*)

HRE: Elemento Responsivo a Hormônios (*Hormone response element*)

HSP70: Proteína de choque térmico de 70kDa (*Heat Shock Protein 70*)

HSP90: Proteína de choque térmico de 90kDa (*Heat Shock Protein 90*)

ILK: Quinase acoplada a Integrina (*Integrin-linked kinase*)

IPG: Gradiente de pH Imobilizado (*Immobilized pH Gradient*)

IRF6: Fator Regulador de Interferon 6 (*Interferon regulatory factor 6*)

JAK: Quinase janus (*Janus kinase*)

LFQ: Quantificação livre de marcação (*label free quantification*)

MAPK: Proteína–quinase ativada por mitógeno (*Mitogen activated protein kinases*)

MEC: Matriz extracelular

MMP: Metaloproteinases de matriz (*Matrix metalloproteinases*)

MS: Espectrometria de massa (*Mass spectrometry*)

NES: Sinal de exportação nuclear (*Nuclear Export Signal*)

NLS: Sinal de Localização Nuclear (*Nuclear Localization Signal*)

PAI-2: Inibidor do ativador de plasminogênio 2 (*Plasminogen activator inhibitor-2*)

PBS: Tampão de fosfato salina (*Phosphate buffered saline*)

PDCD4: Proteína de morte celular programada 4 (*Programmed Cell Death 4*)

PDK1: Quinase dependente de fosfoinosítídeos-1 (*Phosphoinositide-dependent kinase 1*)

pI: ponto isoelétrico

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase (*Phosphatidylinositol 3-kinase*)

PKC: Proteína quinase C (*Protein kinase C*)

PKM2: Quinase M2 do piruvato (*Pyruvate kinase isozymes M2*)

PLC: Fosfolipase C (*Phospholipase C*)

PTB: Domínio de interação com tirosina (*Phosphotyrosine-binding*)

RCL: Loop do sitio reativo (*Reactive Site Loop*)

RE: Retículo Endoplasmático

RIPA: Ensaio de Radioimunoprecipitação (*Radioimmunoprecipitation Assay*)

RNA: Ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*)

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)

RSL: Domínio reativo de Serpinas (*Reactive Site Loop*)

RTK: Receptor tirosina quinase (*Receptor tyrosine kinase*)

SCCA-1: Antígeno celular de carcinoma escamoso 1 (*Squamous cell carcinoma antigen 1*)

SCCA-2: Antígeno celular de carcinoma escamoso 2 (*Squamous cell carcinoma antigen 2*)

SDS: Dodecil sulfato de sódio (*Sodium dodecyl sulfate*)

SH2: Src homólogo 2 (*Src Homology 2*)

SRPK: Quinase de proteína SR (*SR protein kinase*)

STAT: Transdutor de sinal e ativador da transcrição (*Signal transducer and activator of transcription*)

TBS: Tampão Tris-HCl salino (*Tris Buffered Saline*)

TCA: Ácido tricloroacético (*Trichloroacetic acid*)

TGF: Fator de transformação do crescimento (*Transforming growth factor*)

TNBC: Cancer de mama triplo-negativo (*Triple negative breast cancer*)

TPM1: Tropomiosina 1

uPA: Ativador de Plasminogênio do tipo uroquinase (*Urokinase-type Plasminogen Activator*)

uPAR: Receptor do Ativador de Plasminogênio do tipo uroquinase (*Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor*)

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor*)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
µg	micrograma
µl	microlitro
µm	micrômetro
µM	micromolar
Ca ²⁺	íon cálcio
CO ₂	gás carbônico
HCl	ácido clorídrico
KCl	cloreto de potássio
kDa	kilodalton
M	molar
mg	miligramas
Mg ²⁺	íon magnésio
mM	milimolar
NaCl	cloreto de sódio
nm	nanômetro
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
α	alfa
β	beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Maspina	19
2.1.1	<i>Gene, proteína e expressão</i>	20
2.1.2	<i>Estrutura</i>	21
2.1.3	<i>Atividades biológicas e localização subcelular</i>	23
2.1.3.1	Maspina extracelular	25
2.1.3.2	Maspina citoplasmática	27
2.1.3.3	Maspina nuclear	29
2.1.4	<i>Estudos clínicos sobre maspina</i>	31
2.1.5	<i>Regulação da expressão de maspina (gene e proteína)</i>	32
2.1.5.1	Regulações epigenéticas	33
2.1.5.2	Alterações pós-traducionais de maspina	34
2.2	EGFR	35
2.2.1	<i>Estrutura</i>	36
2.2.2	<i>Ligantes da família EGFR</i>	36
2.2.3	<i>Mecanismo de transdução de sinal</i>	37
2.2.4	EGFR e o câncer	41
3	OBJETIVOS	43
3.1	Objetivo Geral	43
3.2	Objetivos específicos	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1	Cultura de células	44
4.2	Extração de proteína total das culturas celulares	44
4.1.1	<i>Extrato para SDS-PAGE ou imunoprecipitação de proteínas</i>	44
4.1.2	<i>Extrato para 2D-SDS-PAGE</i>	45
4.1.3	<i>Fracionamento de núcleo e citoplasma</i>	45
4.1.4	<i>Extrato para ensaio de co-imunoprecipitação</i>	45
4.2	Dosagem de proteínas	46
4.3	Imunoprecipitação	46

4.4	<i>Western blot</i>	46
4.5	Imunofluorescência indireta	47
4.6	Análise do papel da adesão na fosforilação de maspina	49
4.7	Separação das isoformas por 2D-SDS-PAGE	49
4.8	Análise dos resultados	51
4.9	Tratamento das células com inibidores farmacológicos	51
4.10	Sequenciamento por Espectrometria de Massas (MS)	51
5	RESULTADOS	53
5.1	Regulação de modificações pós-traducionais e alterações na localização subcelular de maspina.	54
5.2	Regulação de modificações pós-traducionais de maspina por EGF	60
5.3	Resíduos de maspina fosforilados após estímulo das células com EGF	63
5.4	Análise do papel de vias a jusante de EGFR na regulação da localização subcelular de maspina.	65
5.5	Proteínas que interagem com maspina após estímulo com EGF	70
5.7	Papel da interação célula-substrato na regulação da localização subcelular de maspina.....	77
6	DISCUSSÃO	81
7	CONCLUSÃO	91
	REFERÊNCIAS *	92

1 INTRODUÇÃO

Células sentem sinais provenientes do ambiente mediante três formas: (i) receptores presentes na superfície celular que são ativados por ligantes específicos, (ii) receptores que atuam como mediadores de interações com proteínas da matriz extracelular e (iii) interações entre proteínas da superfície que atuam na adesão entre células adjacentes. Os sinais detectados por esses sensores desencadeiam a ativação de determinadas vias de sinalização que por fim comunicam as condições do microambiente às células, e assim promovem respostas celulares adequadas. Deste modo, os estímulos ambientes modificam o contexto celular através da regulação dos níveis e atividades de determinadas proteína.

A proteína maspina foi identificada durante a busca de proteínas que apresentavam redução de seus níveis em tumores comparando-se com tecidos normais (ZOU et al., 1994a). Mais tarde outros trabalhos verificaram que em tumores com expressão de maspina prevalente, a localização subcelular da proteína era um importante indicador de prognóstico (GOULET et al., 2011). Além disso, a atividade de supressão tumoral atribuída a maspina foi relacionada a sua localização nuclear (GOULET et al., 2011; GOULET et al., 2012; MACHOWSKA et al., 2014).

A localização de maspina em diferentes compartimentos celulares está intrinsecamente relacionada as suas funções biológicas. O efeito de supressão tumoral de maspina é resultado de um conjunto de atividades biológicas que a proteína apresenta, tais como a modulação da adesão (QIN; ZHANG, 2010), a inibição do crescimento e a invasão tumoral (ZOU et al., 1994a; SHENG et al., 1996; SHI et al., 2001a), a inibição da angiogênese (ZHANG, M.; VOLPERT, O.; et al., 2000; CHER et al., 2003b), o efeito pró-apoptótico (ZHANG et al., 1999) e o controle da resposta ao stress oxidativo (YIN et al., 2005b).

Os mecanismo que regulam a translocação de maspina nos diferentes compartimentos celulares não estão esclarecidos na literatura. Nenhuma sequência de direcionamento para compartimentos celulares específicos foi identificada. No entanto, em trabalho anterior verificamos que a utilização de inibidores de tirosina

fosfatase levaram a um aumento nos níveis proteicos de maspina assim como seu acúmulo no citoplasma das células (LONGHI; CELLA, 2012).

Muitas alterações no meio a que as células são submetidas necessitam de uma resposta rápida para evitar danos. Uma das formas de obter uma resposta rápida é através de modificações pós-traducionais das proteínas, que são alterações químicas que uma proteína sofre após sua tradução, e têm variados efeitos na funcionalidade da mesma. Essas modificações influenciam propriedades como interações com outras proteínas, atividades enzimáticas, e localização subcelular.

Assim, o presente trabalho procurou investigar fatores responsáveis por determinar o contexto celular que estariam envolvidos na regulação da localização subcelular e modificações pós-traducionais de maspina.

Para tanto, alteramos fatores envolvidos na interação célula-célula, interação célula-matriz extracelular e fatores solúveis. A localização subcelular de maspina foi analisada por imunofluorescência e as modificações pós-traducionais, por 2D-SDS-PAGE seguido de *westernblot* com anticorpo anti-maspina. Em seguida buscamos vias de sinalizações relacionada a esses fatores que estariam envolvidas na regulação de maspina. Essa análise foi realizada utilizando-se inibidores farmacológicos específicos.

Deste modo, nossos dados poderiam contribuir com o conhecimento acerca dessa proteína multifacetada, que apresenta grande potencial terapêutico e diagnóstico para o câncer.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Abordaremos a seguir dois pontos importantes para a compreensão do trabalho: a proteína maspina e o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR). Ambas as proteínas foram muito estudadas quanto a suas atividades biológicas tanto na célula normal quanto na célula tumoral.

Os dados de incidência e mortalidade relacionados ao câncer mostram a relevância dessa doença em termos de saúde pública. Segundo o *World Cancer Report* publicado em 2014 pela *World Health Organization's International Agency for Research on Cancer*, em 2012 a incidência global de câncer teve aumento estimado em 14 milhões de novos casos, um número que deverá aumentar para 19,3 milhões de casos anuais até 2025. A progressão tumoral, em todos os tipos de neoplasia envolve a transformação de células normais para um estado tumoral à medida que essas adquirem certas capacidades biológicas. Segundo o trabalho de Hanahan e Weinberg, essas características envolvem: resistência à morte celular, indução de angiogênese, manutenção da proliferação, sustentação da capacidade de replicação, evasão de supressores de crescimento, ativação da invasão e metástase, desregulação energética, mutação e instabilidade genética, indução de inflamação pelo tumor e evasão do sistema imune (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Além disso, a progressão tumoral depende também da interação das células com o seu microambiente, como por exemplo a matriz extracelular (MEC) que é formada por moléculas como colágeno, glicoproteínas, integrinas e laminina. Deste modo, é fundamental a compreensão dos processos que mantêm a homeostase dos tecidos e os desvios que levam a esse estado patológico. Nesse sentido, muitos estudos concentram-se em detectar diferenças entre células normais e células tumorais. Em uma dessas abordagens, a proteína maspina (*mammary serpin*) foi identificada e seus efeitos biológicos a classificaram como um supressor tumoral.

2.1 Maspina

2.1.1 Gene, proteína e expressão

A proteína maspina foi identificada num estudo que buscava por genes expressos em células epiteliais mamárias normais, porém ausentes em tumores de mama, a fim de identificar possíveis genes supressores de tumor (ZOU et al., 1994a). Neste estudo, diversas linhagens de carcinoma (tumor de origem epitelial) de mama analisadas apresentaram redução drástica nos níveis de maspina em comparação com linhagens normais do mesmo tecido. O mesmo estudo verificou ainda que a transfecção do gene de maspina em células tumorais diminuiu tanto a capacidade de invasão *in vitro* quanto a habilidade de induzir tumores e metástase em camundongos (ZOU et al., 1994b; a).

Devido à homologia na sequência de aminoácidos, maspina foi classificada como uma serpina (derivado do inglês, *serine protease inhibitor*), por isso também é conhecida como serpina B5. A superfamília das serpinas inclui proteínas com uma estrutura conservada, entretanto, seus diversos membros estão envolvidos em uma grande diversidade de processos biológicos normais e patológicos tais como coagulação, fibrinólise, apoptose, inflamação e tumorigênese (LAW et al., 2006). O nome da família é derivado da atividade que grande parte dos membros desse grupo apresenta, a inibição de serina proteases, porém, serpinas que inibem cisteína proteases como caspase (RAY et al., 1992) e papaína (SCHICK et al., 1998; IRVING et al., 2002) também foram identificadas. Contudo, alguns membros dessa família não realizam atividade relacionada à inibição de proteases, e desenvolveram papéis distintos durante a evolução, como é o caso da maspina.

O gene de maspina presente em humanos está localizado num *cluster* de serpinas no cromossomo 18q21.3 que contém ainda os genes para antígeno 1 e 2 de carcinoma de células escamosas (SCCA-1 e 2), inibidor de ativador do plasminogênio tipo 1 (*PAI-2*) (SAGER et al., 1994), antiproteínase citoplasmática 2 (*CAP2*), bomapina (BARTUSKI et al., 1997), headpina (NAKASHIMA et al., 2000) e megasina (INAGI; MIYATA; IMASAWA; et al., 2002; INAGI; MIYATA; NANGAKU; et al., 2002). O gene de maspina é composto por 6 íntrons e 7 éxons, os quais codificam para uma proteína de 42kDa (376 aminoácidos). Dois produtos de *splicing* alternativo de maspina foram identificados (STRAUSBERG et al., 2002), e observados experimentalmente (DUAN et al., 2003), além de uma

proteína de menor massa molecular (36kDa) observada somente por *western blot*, utilizando 0,1% SDS no tampão de transferência (SMITH et al., 2003). Contudo, apenas maspina de maior massa molecular, 42kDa, foi caracterizada e os efeitos descritos na literatura são atribuídos à mesma.

Inicialmente identificada em tecidos de mama, sabe-se hoje que maspina está presente em inúmeros outros tecidos como útero, testículo, placenta, estômago, intestino, pâncreas, pele, rim e amígdala, porém quase que exclusivamente em epitélios (PEMBERTON et al., 1997). Apenas um estudo envolvendo células de córnea humana revelou que além de células epiteliais, maspina está presente em células endoteliais, assim como em queratinócitos nesse tecido (NGAMKITIDECHAKUL et al., 2001). Maspina também é essencial na fase inicial da embriogênese, uma vez que camundongos *knockout* para maspina são inviáveis (GAO et al., 2004; DZINIC et al., 2017).

Além de humanos, a sequência de maspina pode ser encontrada em camundongos, ratos, galinha, sapo e chimpanzé. Dessas, as sequências presentes em ratos e camundongos apresentam 88 e 89% de homologia com a sequência humana, respectivamente, e compartilha ainda os mesmos efeitos biológicos como a perda de expressão em células tumorais, e a diminuição da tumorigenicidade após re-expressão nas mesmas (UMEKITA; HIIPAKKA; LIAO, 1997; ZHANG; SHENG; et al., 1997; ZHANG, M.; SHI, Y.; et al., 2000; SHI et al., 2001b), o que mostra a conservação dessas funções entre essas espécies.

2.1.2 Estrutura

Maspina apresenta conformação típica das serpinas, e esta foi resolvida em 2004/2005 (AL-AYYOUBI; GETTINS; VOLZ, 2004; LAW et al., 2005). A estrutura terciária de maspina consiste em nove α -hélices (hA-hI), três folhas β antiparalelas (sA, sB e sC) e um domínio característico de serpinas, o *loop* do sítio reativo (RSL), também chamado de *loop* do centro reativo (RCL). Localizado entre as folhas β sA e sC, o RSL corresponde a uma sequência de 17 aminoácidos expostos na estrutura da proteína (Figura 1A). Em serpinas

inibitórias, o RSL é responsável por reconhecer especificamente o alvo da protease.

Figura 1. Representação da estrutura de maspina humana e alinhamento da sequência da região do RSL das serpinas do clado B. A. Modelo da estrutura terciária de maspina. Adaptado de (NARAYAN; TWINING, 2010). B. Alinhamento da sequência de aminoácidos da região do RSL (aminoácidos 330-345) entre as serpinas do clado B obtido pelo programa Clustal Omega (MCWILLIAM et al., 2013).

A inibição de proteases por serpinas ocorre por um mecanismo irreversível e suicida, que envolve uma grande mudança conformacional de transição entre os estados *stressed* (S) para o estado *relaxed* (R) da molécula. Após interação com o substrato, o RSL da serpina é clivado e insere-se no interior da enzima, formando uma nova folha β e promovendo o deslocamento da protease ligada covalentemente a enzima. Deste modo, a serpina adota uma configuração mais estável enquanto a protease, que está covalentemente ligada, tem seu sítio ativo distorcido, resultando em sua inativação (HUNTINGTON; READ; CARRELL, 2000).

O sítio RSL de maspina no entanto é distinto de outras serpinas por ser mais curto (Figura 1B), mais hidrofóbico e rígido (AL-AYYOUBI; GETTINS; VOLZ, 2004). Deste modo, estudos bioquímicos indicam que maspina é incapaz

de passar pela transição S para R necessária para promover a inibição de proteases (PEMBERTON et al., 1995; BASS; FERNANDEZ; ELLIS, 2002). De fato, até o momento, nenhuma protease foi descrita como alvo de inibição por maspina através do mecanismo clássico das serpinas.

Apesar de não ter função de inibição de proteases, o RSL de maspina é essencial para alguns efeitos biológicos da proteína. Entre esses efeitos estão: inibição da invasão (SHENG; PEMBERTON; SAGER, 1994; ZOU et al., 1994a; SHENG et al., 1996; ZHANG; SHENG; et al., 1997), aumento da apoptose (JIANG et al., 2002; LATHA et al., 2005b) e inibição do ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA) e do ativador de plasminogênio de tecidos (SHENG et al., 1998; MCGOWEN et al., 2000; BILIRAN; SHENG, 2001).

Uma importante modificação estrutural foi identificada em maspina e não é compartilhada por outras serpinas. A α -hélice hG é capaz de variar entre as conformações aberta e fechada. Essa modificação é responsável pela redistribuição de cargas na superfície da molécula e expõe uma região de carga negativa que pode afetar a dinâmica na interação com outras proteínas (LAW et al., 2005). Além disso, a atividade de inibição da migração celular por maspina foi reproduzida por um peptídeo contendo somente a sequência da hélice G, que indica que essa porção da molécula é essencial e suficiente para este efeito (RAVENHILL et al., 2010). Os eventos que regulam essa mudança na conformação ainda não foram esclarecidos.

A sequência de maspina contém oito resíduos de cisteína, e a formação de pontes dissulfeto ocorre somente em situações específicas que serão mencionadas posteriormente.

2.1.3 Atividades biológicas e localização subcelular

O efeito de supressão tumoral de maspina é resultado de um conjunto de atividades biológicas desempenhado pela proteína, tais como a modulação da adesão, a inibição do crescimento e a invasão tumoral, a inibição da angiogênese, o efeito pró-apoptótico e o controle da resposta ao *stress* oxidativo, que serão detalhados a seguir. A diversidade de funções de maspina se reflete

nos seus inúmeros ligantes, e está intrinsecamente relacionada a sua localização subcelular (Figura 2) como mostraremos a seguir.

Figura 2. Esquema ilustrativo dos efeitos de maspina observados nas células tumorais. Efeito do tratamento de células tumorais com rMaspina ou re-expressão de maspina observado em modelos *in vitro* e *in cellula*. Adaptado de (BODENSTINE et al., 2012).

Muitos estudos indicam que maspina é uma serpina predominantemente intracelular, presente tanto no núcleo quanto no citoplasma, mas também está associada a superfície celular e é secretada. Entretanto, nenhuma sequência de localização foi relacionada ao direcionamento do seu tráfego para compartimentos subcelulares específicos.

2.1.3.1 Maspina extracelular

Estudos iniciais com maspina mostraram que a proteína está presente nos ductos luminiais de tecidos de mama, sugerindo que a proteína é secretada (ZOU et al., 1994a). Um único estudo mostrou evidências de que maspina é localizada exclusivamente no compartimento intracelular (TEOH; WHISSTOCK; BIRD, 2010). Contudo, maspina foi detectada no meio condicionado de diversas linhagens celulares (ZHANG, M.; VOLPERT, O.; et al., 2000; NICKOLOFF et al., 2004; KHALKHALI-ELLIS; HENDRIX, 2007; TOILLON et al., 2007; DEAN et al., 2017) e sua secreção foi descrita por diversos autores (PEMBERTON et al., 1997; STERNLICHT et al., 1997; YU; HARRIS; LEVINE, 2006; BODENSTINE et al., 2014; DEAN et al., 2017).

Em sua sequência de aminoácidos, maspina não contém um peptídeo sinal da via clássica de secreção pelo retículo endoplasmático (RE) - Golgi, no entanto, nem todas as proteínas secretadas contêm esse peptídeo sinal e dependem da via de RE-Golgi para sua secreção. Vias não clássicas de secreção já foram descritas, é o caso das microvesículas geradas por *shedding* da membrana, secreção de exossomos ou por translocação direta através da membrana plasmática (ZHANG, N. N. et al., 2009). Segundo predição pelo programa SecretomeP (BENDTSEN et al., 2004), maspina pode ser secretada por vias não clássicas (BENDTSEN et al., 2004; DEAN et al., 2017). Efetivamente, dados recentes mostram que maspina é secretada na forma solúvel assim como por meio de exossomos (DEAN et al., 2017).

Os mecanismos que envolvem a secreção de maspina são de grande relevância a medida que muitos dos efeitos biológicos de maspina foram observados a partir do tratamento de células tumorais com a proteína recombinante purificada, as quais passaram a apresentar um fenótipo menos agressivo e invasivo (SHENG; PEMBERTON; SAGER, 1994; SHENG et al., 1996; PEMBERTON et al., 1997; SEFTOR et al., 1998; ODERO-MARAH et al., 2003).

Os efeitos de inibição de invasão e aumento da adesão celular por maspina estão relacionados a atividade de integrinas. As integrinas são proteínas responsáveis pela conexão entre a matriz extracelular, o citoesqueleto de actina e moléculas sinalizadoras da porção intracelular (DELON; BROWN, 2007). Maspina está associada ao citoesqueleto cortical e interage fisicamente com $\beta 1$ integrina (CELLA et al., 2006). Essas interações são responsáveis pelo aumento da atividade da quinase acoplada à integrina (ILK) e aumento nos níveis da

quinase de adesão focal (FAK), resultando na reorganização do citoesqueleto de actina que é necessário nos processos de adesão e migração celular (QIN; ZHANG, 2010). Além disso, maspina também modula o perfil de integrinas nas células tumorais tratadas com a proteína recombinante, aumentando os níveis de integrinas do tipo $\alpha 5$ e $\alpha 3$. Consequentemente, observou-se aumento da adesão à fibronectina, modificando o fenótipo celular de morfologia fusiforme para epitelial (SEFTOR et al., 1998).

Outro ligante de maspina na superfície celular é o complexo do ativador de plasminogênio do tipo uroquinase e seu receptor (uPA/uPAR). Esse complexo é responsável por promover a conversão de plasminogênio para plasmina, uma protease capaz de clivar uma série de proteínas da matriz extracelular. A expressão estável de maspina em tumores de próstata reduziu a atividade do complexo PA/uPAR, resultando no bloqueio da atividade proteolítica pericelular (BILIRAN; SHENG, 2001). Maspina inibe o complexo de duas maneiras: mediante sua internalização e inibindo a ativação do zimógeno pro-uPA (BILIRAN; SHENG, 2001; YIN, S. et al., 2006; ENDSLEY et al., 2011). Experimentos de co-imunoprecipitação demonstraram que maspina da superfície celular faz parte de um complexo proteico que inclui $\beta 1$ -integrina e ao sistema uPA/uPAR. Este modelo propôs que esse complexo está relacionado a regulação da adesão e migração celular (ENDSLEY et al., 2011).

O tratamento de células tumorais com maspina resulta ainda no aumento da adesão dessas células à colágeno I, IV, fibronectina e laminina (NGAMKITIDECHAKUL et al., 2001). Efetivamente, ensaios de duplo-híbrido em leveduras identificaram que maspina interage com moléculas da matriz extracelular, colágeno I e III (NGAMKITIDECHAKUL et al., 2001; BLACQUE; WORRALL, 2002). No entanto, não foi demonstrado que essa interação é essencial para o efeito de maspina na adesão.

A adição de maspina recombinante em linhagem de carcinoma de mama em cultura resulta ainda na inibição de Rac 1 e Cdc42, proteínas intracelulares que são membros da família das Rho GTPases e que regulam o citoesqueleto de actina. (ODERO-MARAH et al., 2003; SHI et al., 2007). Contudo, os mecanismos envolvidos na regulação dessa inibição por maspina não foram explorados.

Outros estudos clínicos relacionaram a expressão de maspina em tumores à inibição da angiogênese (SOPEL; KASPRZYK; BERDOWSKA, 2005; MARIONI et al., 2006; SOLOMON et al., 2006; CHUA et al., 2009; MACHOWSKA et al., 2014). A angiogênese é a formação de novos vasos a partir de vasos pré-existent, um processo fundamental na tumorigênese já que células tumorais têm alta taxa de proliferação e, portanto maior demanda por suprimentos. Evidências de inibição da angiogênese por maspina recombinante *in vivo* e *in vitro* foram demonstradas por Zhang e colaboradores. *In vitro*, maspina inibiu a migração de células endoteliais induzidas pelo fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF). De forma semelhante, experimentos *in vivo* utilizando córnea de rato foram implantadas com *pellet* contendo maspina e bFGF, que produziram efeito de inibição do processo de neovascularização. Além disso, a administração de maspina local em células tumorais de próstata em modelo de camundongos xenotransplantados resultou na dramática redução da densidade de microvasos associados ao tumor (ZHANG, M.; VOLPERT, O.; et al., 2000). Portanto, maspina atua diretamente em células endoteliais, porém a expressão de maspina em célula tumorais também resulta em inibição de angiogênese *in vivo*, sugerindo um mecanismo indireto de regulação desse processo (CHER et al., 2003a). A inibição da angiogênese por maspina mostrou estar relacionada ao seu efeito pró-apoptótico em células endoteliais (LI; SHI; ZHANG, 2005).

2.1.3.2 Maspina citoplasmática

Atribui-se à maspina localizada no citoplasma das células os efeitos de indução da apoptose e resposta ao *stress*. Esses efeitos não foram observados para o tratamento das células com maspina recombinante, o que significa que a expressão endógena de maspina e talvez algum processamento da proteína são necessários.

A primeira observação do efeito pró-apoptótico de maspina ocorreu durante a superexpressão da proteína em glândulas mamárias de camundongos. Tal abordagem resultou na inibição do desenvolvimento alveolar durante a gravidez de camundongos devido à maior taxa de apoptose das células (ZHANG et al., 1999). *In vitro*, a transfecção de maspina em linhagem de células tumorais

levou ao aumento da sensibilidade dessas células à apoptose quando tratadas com estaurosporina, doxazosina e inibidores de proteasoma, conhecidos indutores de apoptose (JIANG et al., 2002; TAHMATZOPOULOS; SHENG; KYPRIANOU, 2005; LI et al., 2007). É importante ressaltar que a presença de maspina em células normais não é suficiente para promover sua apoptose. Por outro lado, quando sua expressão é induzida em células tumorais, essas provavelmente restauram suas vias de sensibilidade à apoptose, as quais foram alteradas durante a progressão tumoral. Da mesma forma, o papel de maspina deve estar relacionado à sensibilidade das células ante aos estímulos do contexto celular durante o desenvolvimento e morfogênese da glândula mamária (BODENSTINE et al., 2012).

Dois mecanismos foram descritos para o papel pró-apoptótico de maspina. As células tumorais transfectadas com maspina apresentam um aumento da expressão da proteína Bax, que transloca para a mitocôndria e é diretamente responsável pelo aumento da sua permeabilidade mitocondrial e consequente liberação de citocromo c e Smac/DIABLE no citoplasma (LIU et al., 2004). O efluxo dessas proteínas contribui para a ativação de caspases, proteínas fundamentais no processo de apoptose. Outro estudo indica que a própria maspina transloca para a mitocôndria durante transição na permeabilidade da organela, provocando a dissipação do potencial de membrana, liberação de citocromo c e consequente morte celular. O RSL tem papel essencial nessa atividade, visto que sua ausência na estrutura de maspina impede a translocação da molécula para a mitocôndria (LATHA et al., 2005b). Deste modo, o efeito de supressão tumoral de maspina também parece estar associado à via mitocondrial da apoptose.

Evidências sugerem ainda que maspina citoplasmática está envolvida na resposta ao *stress*. Entre os ligantes de maspina identificados, alguns são relacionados a esse evento como a transferase S de glutationa (GST), proteína de choque térmico de 90kDa (HSP90) e proteína de choque térmico de 70kDa [HSP70 (YIN et al., 2005a)]. A interação de maspina com GST é diretamente proporcional à concentração de peróxido de hidrogênio em células normais e tumorais. Tal interação leva à diminuição de espécies reativas de oxigênio (ROS), ao contrário do que ocorre quando a expressão de maspina é inibida por siRNA, que resulta no aumento dos níveis de ROS na célula (YIN et al., 2005b).

A presença de ROS nas células está relacionada, entre outros efeitos, a danos no DNA, proteínas, lipídeos e promoção da angiogênese (DACHS; TOZER, 2000). Por outro lado, baixas concentrações de oxigênio levam ao aumento da expressão do gene de maspina (EITEL et al., 2009) assim como a formação de pontes dissulfeto intramolecular na proteína (NAWATA et al., 2011). Esta forma que apresenta menor massa molecular (36kDa), tem também menor afinidade por GST, e deve ter propriedades distintas da maspina não modificada durante situações de *stress* oxidativo, porém pouco se sabe sobre as funções biológicas dessa nova forma.

A interação de maspina com as proteínas HSP90 e HSP70 não têm seus efeitos ou mecanismos esclarecidos na literatura. Porém, essas proteínas são chaperonas muito estudadas e têm papel importante na resposta celular ao *stress*.

2.1.3.3 Maspina nuclear

A detecção de maspina nuclear já foi considerada um artefato de técnica em estudo anterior (KIM et al., 2004). Posteriormente, diversos outros estudos reportaram a presença de maspina nesse compartimento celular e destacaram sua importância.

Apesar de estar presente no núcleo das células, a sequência de aminoácidos de maspina não apresenta um sinal de localização nuclear (NLS) clássico. Isso significa que sua translocação para o núcleo pode ocorrer por meio de um NLS atípico, a partir da interação com outra proteína nuclear seguida de translocação conjunta ou por difusão. De qualquer forma, a presença de maspina nuclear têm sido relacionada à inibição da proliferação e metástase de tumores.

A localização de maspina nuclear mostrou correlação inversa com a proliferação celular, demonstrada pela marcação da proteína Ki67, tanto em tecidos tumorais quanto em linhagens de células tumorais transfectadas com a proteína (MACHOWSKA et al., 2014). Além disso, a exclusão de maspina do compartimento nuclear de linhagem de células tumorais, mostrou que estas perderam seu potencial de inibir a metástase em comparação com células que não tiveram a proteína excluída do núcleo (GOULET et al., 2011). A utilização da técnica de

imunoprecipitação de cromatina (ChIP) utilizando anticorpo contra maspina mostrou que a proteína de fato interage com porções específicas da sequência de DNA. Verificou-se interação de maspina com a sequência do promotor dos genes do fator estimulador de colônia 1 (CSF1) assim como do receptor alfa relacionado ao estrogênio (ESRRA). A expressão dessas proteínas são tidas como evidência de progressão tumoral e ambas foram reguladas de forma negativa por maspina nuclear.

Outra forma de maspina atuar na expressão gênica de proteínas é mediada por sua interação com a deacetilase de histona H1 (HDAC1) e fator regulador de interferon 6 (IRF6). A deacetilação de histonas por HDAC1 promove condensação da cromatina, que conseqüentemente impede o acesso de fatores de transcrição ao DNA. Portanto, ao inibir a atividade de HDAC1, maspina interfere na expressão gênica. Os genes de Bax, P21^{WAF1/CIP1}, e citoqueratina 18 (CK18) são alvos de HDAC1, e têm sua expressão inibida pela deacetilase. Esses genes tiveram aumento em sua expressão após re-expressão de maspina nas células tumorais (LI et al., 2006a). A proteína CK18 é um marcador de diferenciação epitelial (CORSON; PINKUS, 1982), enquanto Bax e P21^{WAF1/CIP1} têm papel essencial no comprometimento celular com o processo de apoptose (KYPRIANOU et al., 1991; OLTVAI; MILLIMAN; KORSMEYER, 1993). O complexo maspina-HDAC1 parece contar também com a proteína GST, fundamental para a inibição da atividade de HDAC1 (LI et al., 2006a).

Uma mutação pontual em maspina que resulta em sua localização predominantemente nuclear promoveu uma inibição maior de HDAC1 em comparação com maspina selvagem (DZINIC et al., 2013), que sugere que a localização nuclear de maspina é de grande importância para esse efeito.

O outro ligante de maspina no núcleo, IRF6 parece estar envolvido na regulação da expressão de genes que codificam N-caderina e vimentina, marcadores da transição epitélio-mesenquimal. O mecanismo envolvido no processo de inibição de IRF6 ainda não está claro, mas ocorre mediante a interação com maspina, que pode impedir sua translocação para o núcleo ou já no núcleo impedir sua interação com o DNA (BAILEY et al., 2005a).

Deste modo, maspina nuclear parece também estar comprometida com a diferenciação epitelial além da sensibilidade à apoptose já evidenciada anteriormente.

2.1.4 Estudos clínicos sobre maspina

Muitos estudos relatam a existência de uma correlação entre a perda da expressão de maspina e a progressão tumoral em diferentes tecidos, incluindo a glândula mamária (ZOU et al., 1994a; MAASS; HOJO; RÖSEL; et al., 2001; MAASS; TEFFNER; et al., 2001), próstata (ZOU et al., 2002), pulmão (NAKASHIMA et al., 2004; TAKANAMI; ABIKO; KOIZUMI, 2008) e pele (CHUA et al., 2009). Enquanto isso, outros observaram uma correlação inversa de maspina na progressão tumoral nos tecidos citados (UMEKITA et al., 2002; SMITH et al., 2003; UMEKITA; YOSHIDA, 2003), assim como em tumores de ovário (SOOD et al., 2002) e pâncreas (MAASS; HOJO; UEDING; et al., 2001). Interessantemente, alguns estudos observaram que maspina tem níveis de expressão muito baixos em tecidos normais de ovário, pâncreas e tireóide, enquanto que os tumores desses tecidos apresentam altos níveis de maspina, que é predominantemente citoplasmática (PEMBERTON et al., 1997; MAASS; HOJO; UEDING; et al., 2001; SOOD et al., 2002; BAL et al., 2008; HONG et al., 2009).

Apesar das atividades biológicas de maspina nos dois compartimentos celulares, núcleo e citoplasma, serem relacionadas a inibição do processo de tumorigênese, alguns autores indicam que em tumores, a localização subcelular de maspina é um melhor indicativo do prognóstico tumoral que os seus níveis de expressão (GOULET et al., 2011).

Maspina nuclear foi associada a um bom prognóstico na maioria dos casos reportados (MOHSIN et al., 2003; LONARDO et al., 2006; SOLOMON et al., 2006; MARIONI et al., 2008), mas não em outros (WOENCKHAUS et al., 2007; MARTINOLI et al., 2014). Em suma, a falta de padronização das análises dos níveis subcelulares de maspina assim como a necessidade de mais estudos com a mesma abordagem dificulta a interpretação conclusiva dos dados.

Muitos autores apontam para o potencial terapêutico e diagnóstico de maspina, contudo, as divergências na literatura sugerem que os efeitos de maspina são dependentes da regulação de suas atividades de acordo com o contexto celular.

2.1.5 Regulação da expressão de maspina (gene e proteína)

A perda ou redução da expressão de maspina em tumores não envolve perda ou rearranjo do seu gene (ZOU et al., 1994a). Logo, novos estudos concentraram-se em identificar fatores responsáveis pela regulação da expressão de maspina alterados durante a progressão tumoral.

Uma região de 1kb localizada a montante do sítio de início de transcrição do gene de maspina mostrou-se suficiente para induzir sua expressão (ZHANG; MAASS; et al., 1997). Essa região promotora revelou conter sequências múltiplas de regulação de transcrição nas quais foram identificados os sítios de interação de Ets, proteína ativadora 1 (AP-1), receptores andrógenos e p53 (ZHANG; MAGIT; SAGER, 1997).

O elemento Ets também é responsável por regular a expressão de proteínas do leite como as proteínas ácidas do soro, lactalbumina e lactoglobulina na glândula mamária (MINK et al., 1992). Ets é um indutor primário da expressão de maspina mas está frequentemente associado a outros fatores de transcrição. A proteína AP-1 atua de forma cooperativa com Ets aumentando ainda mais os níveis de expressão de maspina. Foi observada a diminuição desses dois fatores em células de tumores primários de mama enquanto os mesmos estavam ausentes em uma linhagem de tumor invasivo (ZHANG; MAASS; et al., 1997). Em células de próstata, além de Ets, a expressão de maspina é negativamente regulada por elementos responsivos a hormônio (HRE), os quais são sítios de interação para receptores andrógenos tanto em células normais quanto em células tumorais (ZHANG; MAGIT; SAGER, 1997).

No promotor de maspina também foram identificados sítio de ligação à p53, que ativa sua expressão gênica a partir de sua interação (MACHTENS et al., 2000). A proteína p53 é um supressor de tumor extensamente estudado e tem papel fundamental na regulação do ciclo celular e nos processos de angiogênese e apoptose. Foi então sugerido que maspina atua como um efector de p53.

O ativador de fator de transcrição 2 (ATF-2) também regula a expressão de maspina interagindo com uma sequência de elemento de resposta a AMP cíclico (CRE) a jusante do sítio de início de transcrição (MAEKAWA et al., 2008). ATF-2 é

alvo de p38 e JNK, proteínas envolvidas no processo de indução de apoptose por *stress*.

Em conjunto, esses dados mostram que a expressão de maspina pode ser regulada por fatores que variam no contexto celular.

2.1.5.1 Regulações epigenéticas

A observação de alterações epigenéticas de genes são frequentes na tumorigênese (LAIRD; JAENISCH, 1994). A expressão de maspina também está submetida ao controle epigenético tanto em células tumorais quanto em células normais, de modo tecido-específica.

A metilação do DNA é um dos mecanismos epigenéticos de controle de expressão de um gene. A ocorrência de metilação no promotor de um gene em geral correlaciona-se a uma atividade de transcrição baixa ou ausente (SUZUKI; BIRD, 2008). A acetilação das lisinas das histonas por outro lado, neutraliza a cauda positiva desses resíduos (HONG et al., 1993; STEGER; WORKMAN, 1996), enfraquecendo a interação entre DNA-histona e promovendo maior acesso ao *locus* gênico.

Um trabalho de Domann e colaboradores indicou que a metilação do promotor de maspina é muito comum em linhagens de célula tumorais de mama enquanto está ausente em células normais (DOMANN et al., 2000). Em geral, células normais e tumorais que expressam maspina apresentam as citosinas do promotor do gene não metiladas e as histonas dessa região acetiladas, ou seja, com a cromatina acessível (AKIYAMA et al., 2003; FITZGERALD et al., 2003; YATABE; MITSUDOMI; TAKAHASHI, 2004). Situação inversa ocorre em células normais e tumorais que não expressam a proteína (DOMANN et al., 2000; FUTSCHER et al., 2002; REIS-FILHO et al., 2002; BOLTZE et al., 2003; BETTSTETTER et al., 2005). Esses dados foram corroborados a partir do tratamento de células de mama e bexiga deficientes em maspina com 5-aza-2'deoxicitidina (inibidor de metiltransferase de DNA) e tricostatina A (um inibidor de histona deacetilase) que reestabeleceram a expressão de maspina dessas células (MAASS et al., 2002; SUGIMOTO et al., 2004).

Zhu e colaboradores sugerem ainda que o completo silenciamento de maspina requer a atividade de miRNAs (ZHU et al., 2008). Os miRNAs são uma classe de RNA não codificante que ocorre naturalmente nas células e geralmente atuam na inibição da tradução por levar à degradação de RNAm. Ao contrário dos siRNAs, os alvos dos miRNAs são *cluster* de genes, e não um gene específico. Diversos processos celulares como a proliferação, apoptose e diferenciação são afetados por miRNAs (CHEN et al., 2004; CROCE; CALIN, 2005) e consequentemente sua desregulação está envolvida em diversas patologias, como o câncer (IORIO et al., 2005). A partir da utilização de oligonucleotídeos *antisense*, que inibem os miRNAs, um estudo demonstrou que maspina é alvo do miRNA-21 (ZHU et al., 2008), assim como a tropomiosina 1 (TPM1) e a proteína de morte celular programada 4 (PDCD4), outras proteínas envolvidas na invasão e metástase (ZHU et al., 2008).

2.1.5.2 Alterações pós-traducionais de maspina

Todos os efeitos biológicos, ligantes e localizações subcelulares de maspina são atribuídos à proteína de 42kDa, no entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos que envolvem sua regulação nas células. Algumas modificações pós-traducionais foram descritas, mas de forma geral pouco se sabe sobre como regulam suas atividades.

Entre as modificações pós-traducionais conhecidas de maspina está a formação de pontes dissulfeto intramoleculares que até o momento só foram observadas durante *stress* oxidativo (NAWATA et al., 2011). Esta forma que apresenta menor massa molecular (36kDa), tem também menor afinidade por GST, e deve ter propriedades distintas da maspina não modificada mas pouco se sabe sobre as funções biológicas dessa modificação.

Em células epiteliais de próstata foi identificada a nitrosilação de maspina (LAM et al., 2010). Nesses tumores, ocorre superexpressão de sintase de óxido nítrico, por isso o estudo identificou proteínas que são potenciais alvos de modificação por nitrosilação. Apesar de maspina ser identificada entre as proteínas nitrosiladas, o efeito biológico dessa modificação não foi esclarecido.

A fosforilação de maspina foi observada em alguns estudos que utilizaram abordagem proteômica de alto rendimento (OLSEN et al., 2010; MERTINS et al., 2014; TSAI et al., 2015; HUANG et al., 2016). Ao mesmo tempo, a fosforilação de maspina também foi reportada por outros estudos de forma mais individual. Em linhagens de células de epitélio mamário normal, HMEC1331 e 1436N1 foi observada a fosforilação de maspina, assim como ocorre após a transfecção de maspina em linhagens de células tumorais de glândula mamária (ODERO-MARAH et al., 2002). Além disso, em células epiteliais de córnea, a fosforilação de maspina foi identificada em resíduos de tirosina, serina e treonina. Interessantemente, maspina fosforilada em tirosina ocorre apenas no lisado total dessas células, ao contrário de maspina secretada, que aparentemente é fosforilada somente em serina e treonina (NARAYAN; MIRZA; TWINING, 2011). Um trabalho do nosso grupo verificou ainda que a inibição de tirosinas fosfatases levou a um aumento dos níveis de maspina, assim como acúmulo da proteína no citoplasma das células (LONGHI; CELLA, 2012). De qualquer forma, não há maiores informações sobre o papel dessas formas fosforiladas e nem de vias de sinalização relacionadas. Um desses estudos mostrou no entanto que a fosforilação de maspina pode ocorrer *in vitro* pelo domínio quinase de EGFR.

2.2 EGFR

Em um organismo multicelular, as células estão constantemente expostas a uma grande variedade de sinais extracelulares, tais sinais devem ser devidamente interpretados e uma resposta apropriada deve ser originada. Os diversos receptores presentes na superfície da membrana das células são responsáveis por responder a estímulos específicos. Esses receptores foram agrupados em famílias de acordo com o mecanismo de transdução de sinal envolvido.

Fatores de crescimento são estímulos fundamentais para as células e regulam muitos processos celulares como a proliferação, migração, cicatrização e diferenciação celular. O fator de crescimento epidermal (EGF) foi identificado inicialmente como uma proteína extraída da glândula submaxilar de camundongos capaz de acelerar a abertura de pálpebras em animais recém-nascidos (COHEN, 1962). Em seguida, devido a observação de que este fator estimulava a proliferação

de células epiteliais, seu nome foi atribuído. O mesmo grupo de pesquisa identificou EGFR como uma proteína de 170kDa componente da membrana plasmática, que mostrou aumento da incorporação de P^{32} em resposta ao tratamento das células A-432 com EGF (CARPENTER; KING; COHEN, 1978). Hoje, a família dos receptores de EGF (ErbBs) dentro da superfamília dos receptores do tipo tirosina quinase (RTK) inclui quatro membros: ErbB-1 (EGFR), ErbB-2, ErbB-3 e ErbB-4.

2.2.1 Estrutura

Esses receptores são composto por: uma região extracelular de interação com ligantes (subdomínios I, II, III e IV), uma hélice transmembrana, um domínio citoplasmático com atividade tirosina quinase e uma cauda C-terminal que contém diversos sítios de autofosforilação em tirosina (OLAYIOYE et al., 2000). Acreditava-se que ErbB-3 não apresentava atividade de tirosina quinase intrínseca, no entanto, foi reportado que ErbB-3 é capaz de trans-autofosforilar sua porção intracelular embora de forma menos robusta que EGFR (SHI et al., 2010). De qualquer modo, a transdução de sinais é observada a partir de sua dimerização com outros membros de ErbB (CITRI; SKARIA; YARDEN, 2003). É interessante notar que é observada 59-81% de homologia entre os domínios quinase dos receptores mas apenas 11-25% no domínio C-terminal dos mesmos (ECCLES, 2011).

2.2.2 Ligantes da família EGFR

Cada membro dessa família de receptores têm seus ligantes específicos, exceto por ErbB2, que não tem nenhum ligante conhecido (Figura 3).

Figura 3. A família de receptores ErbB e seus ligantes. Os quatro receptores da família ErbB (ErbB1, ErbB2, ErbB3 e ErbB4) são compostos por uma região extracelular (subdomínios I, II, III e IV), domínio transmembrana e domínio citoplasmático (composto de lobos N e C-terminal com domínio tirosina quinase entre eles). Os ligantes específicos estão listados acima de cada receptor. Adaptado de (ZAHNOW, 2006).

Os ligantes de EGFR são produzidos como precursores transmembrana, e submetidos a clivagem do domínio extracelular para a liberação de um ligante solúvel, que poderá então se ligar e ativar o receptor. Em geral esta clivagem é mediada por metaloproteinases de matriz (MMP), especialmente da família ADAM (SUZUKI et al., 1997; PESCHON et al., 1998; YU et al., 2002; HINKLE et al., 2003). Os ligantes solúveis podem atuar de forma endócrina, parácrina ou autócrina.

2.2.3 Mecanismo de transdução de sinal

A arquitetura, mecanismo de ativação, e componentes essenciais das vias de sinalização dos RTK são altamente conservados durante a evolução. Muitos casos em que esses receptores têm sua atividade, abundância ou localização alterada

resultam em doenças como câncer, diabetes, arterosclerose, osteopatias entre outras. De fato, grande parte dos tumores conhecidos apresentam alterações nas vias de EGFR, que podem ser resultado de amplificação do gene, mutação (pontual, inserção, ou deleção), ou ainda produção anormal de ligante. A alteração de EGFR leva consequentemente a uma desregulação da sinalização da cascata.

Os RTK são ativados por seus ligantes extracelulares, que induzem a formação de homo ou heterodímeros dos receptores, dependendo da natureza do ligante e da disponibilidade de receptores expressos pela célula (TZAHAR et al., 1996; OLAYIOYE et al., 2000). A formação de dímeros induz mudanças conformacionais que liberam a autoinibição dos domínios tirosina quinase. Ocorre então a autofosforilação da porção citoplasmática do receptor, que promove o recrutamento e a ativação de moléculas sinalizadoras. Essas moléculas possuem domínios que reconhecem e se ligam de forma específica aos resíduos de tirosina fosforilados, como os domínios homólogo de Src 2 (SH2) e o domínio de ligação a fosfotirosina [PTB (SCHLESSINGER; LEMMON, 2003; PAWSON, 2004)]. Proteínas que contêm esses domínios podem ser recrutadas diretamente pelas fosfotirosinas do receptor ou por fosfotirosinas de proteínas adaptadoras (SCHLESSINGER, 2000). Evidências apontam para a existência de complexas redes de sinalização conectadas e não uma via linear, visto que existem múltiplos sítios de fosforilação no receptor capazes de interagir com diferentes domínios PTB ou SH2, além da grande quantidade de moléculas com as quais as proteínas adaptadoras são capazes de se ligar (LEMMON; SCHLESSINGER).

As principais vias ativadas pelo estímulo de EGF são: via da MAPK/ERK, via de PI3K, via de STAT e via de PKC que serão detalhadas a seguir. O papel dessas vias em diferentes processos celulares é fundamental e a ativação anormal das mesmas é frequentemente relacionada a processos de tumorigênese (Figura 4).

Figura 4. Principais vias de sinalização ativadas por EGFR. Importantes vias de sinalização são reguladas por EGFR (MAPK/ERK, via da PI3K, via de STAT e via da PKC) e as funções biológicas atribuídas a estas vias estão representadas nas caixas azuis. Adaptado de (NYATI et al., 2006).

A via de MAPK inicia a partir da fosforilação do receptor de EGF que recruta um complexo formado pelas proteínas adaptadoras Grb2 e Sos, e pode envolver ainda a proteína Shc (LOWENSTEIN et al., 1992; BATZER et al., 1994). A interação desse complexo com o receptor leva a uma mudança conformacional em Sos, que passa a recrutar Ras-GDP, resultando em sua ativação para Ras-GTP. A forma ativa de Ras, Ras-GTP, ativa então Raf-1 (AVRUCH et al., 2001), que por meio de intermediários leva a fosforilação de MAPK1/2, também chamados de Erk1/2 (HALLBERG; RAYTER; DOWNWARD, 1994; LIEBMANN, 2001). As MAPKs translocam para o núcleo onde são responsáveis por fosforilar fatores de transcrição envolvidos na proliferação celular (HILL; TREISMAN, 1995; GAESTEL, 2006).

Outra via a jusante de EGFR é a via de PI3K. Após ativação de EGFR, PI3K é recrutado para a membrana através da interação da sua unidade p85 com ou por meio de proteínas adaptadoras. A subunidade catalítica de PI3K catalisa então a reação de fosforilação de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato ($\text{PtdIns}4,5\text{P}_2$) para fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato ($\text{PtdIns}3,4,5\text{P}_3$), resultando no recrutamento de

PDK1 e Akt para a membrana assim como a ativação dos mesmos. Em seguida, Akt atua inibindo ou ativando diversos alvos que levam à proliferação, crescimento e sobrevivência da célula (VIVANCO; SAWYERS, 2002).

A via de sinalização de JAK/STAT é simples e direta. A ligação de EGF ao EGFR leva à dimerização do receptor, que fosforila e ativa JAK, uma tirosina quinase localizada no citoplasma, próximo à membrana. Subsequentemente, JAK fosforila o receptor e outros alvos como STAT. A fosforilação de STAT leva a formação de homo ou heterodímeros da família STAT que translocam para o núcleo e atuam na ativação de genes relacionados a proliferação, diferenciação e sobrevivência da célula (O'SHEA; GADINA; SCHREIBER, 2002; HAURA; TURKSON; JOVE, 2005). STAT pode ainda ser fosforilado diretamente por EGFR (DAVID et al., 1996) assim como por proteínas da família Src (CAO et al., 1996; ZHANG, Y. et al., 2000).

Ainda, dentre as vias abaixo de EGFR, PLC γ liga-se ao receptor fosforilado por meio do seu domínio SH2 e torna-se ativo. Em seguida, PLC γ hidrolisa fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato a diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). IP3 promove a liberação de Ca²⁺ afetando enzimas dependentes de Ca²⁺, enquanto que DAG ativa a quinase PKC (CHATTOPADHYAY et al., 1999; PATTERSON et al., 2005), que resulta em progressão do ciclo celular, diferenciação e apoptose.

A ativação de EGFR leva ainda a internalização do receptor e tráfico para a via endocítica. Em seguida, o receptor pode ser degradado pela via de lisossomos ou reciclado para a superfície celular. A endocitose do receptor é um importante mecanismo de atenuação do sinal. No entanto, a sinalização de EGFR não ocorre apenas no nível da superfície celular após interação com o ligante, pois muitos estudos indicam que a sinalização prevalece em endossomos e é necessária para ativação ótima de sinais (Haugh et al., 1999; Leonard et al., 2008; Foley et al., 2012; Francavilla et al., 2016). Além disso, o receptor de EGF também transloca para o núcleo das células e desempenha três funções nesse compartimento: regulação gênica (LIN et al., 2001; LO et al., 2005; HANADA et al., 2006; HUNG et al., 2008; LO, 2010), tirosina quinase (WANG et al., 2006), e interação entre proteínas que levam ao reparo de DNA (DITTMANN et al., 2005; DITTMANN; MAYER; RODEMANN, 2005; CHOU et al., 2014).

Diversos estudos apontam que a ativação de EGFR por diferentes ligantes leva a respostas seletivas, isto é, que variam tanto de modo quantitativo quanto qualitativo. Diferenças foram observadas em relação a proporção de receptor reciclado/degradado (ROEPSTORFF et al., 2009); proteínas recrutadas (RONAN et al., 2016), e vias de sinalização ativadas (KNUDSEN et al., 2014). Alguns estudos hipotetizam que os diferentes ligantes estabilizam a região extracelular do receptor em conformações sutilmente distintas, que levariam a essa variação nas resposta (DAWSON et al., 2005) como foi observado para EGF-EGFR e TGF α -EGFR (HARTE; GENTRY, 1995; GARRETT et al., 2002; OGISO et al., 2002). Além disso, a concentração de ligantes também afeta a resposta celular.

Além da variação da resposta celular desencadeada por diversos ligantes de EGFR, é importante ressaltar que as vias de sinalização de EGFR não são lineares como muitas vezes representadas graficamente para melhor compreensão. As células possuem diversos outros receptores em sua superfície e estão constantemente recebendo diversos sinais de forma simultânea. A via de EGFR é componente de uma complexa rede de sinalizações que interagem e expandem a diversidade de respostas celulares. Ainda, outros fatores como interações célula-célula e célula-matriz também são determinantes para a biologia das células e atuam de forma conjunta para determinar o destino das mesmas. O estado da célula pode ser alterado por condições fisiológicas ou patológicas, a partir de um desequilíbrio entre os fatores solúveis e insolúveis, que podem levar a uma mudança no comportamento da célula (DE DONATIS; RANALDI; CIRRI, 2010).

2.2.4 EGFR e o câncer

Alterações na sinalização de EGFR são relacionadas a diversas patologias, das quais o cancer é o mais estudado. A superexpressão e mutações nos membros da família dos receptores de EGF, assim como de seus ligantes foram identificadas em tumores de diversos tecidos como mama, pulmão, estômago, ovário, rim, próstata, pâncreas e cérebro (NORMANNO et al., 2006). Tais alterações são estratégias comuns para ativar as vias a jusante dos receptores que conferem aumento da proliferação celular, sobrevivência, invasão e metástase.

Em geral, duas abordagens terapêuticas são mais adotadas tendo EGFR como alvo em tumores humanos: o uso de anticorpos monoclonais e pequenas moléculas que inibem tirosina quinase (SESHACHARYULU et al., 2012). Enquanto os anticorpos ligam-se a porção extracelular do receptor, os inibidores visam o domínio quinase intracelular. Diversos tratamentos que têm como alvo EGFR têm sido testados, mas os resultados muitas vezes não são tão robustos quanto previstos em estudos pré-clínicos, provavelmente devido à outras alterações que influenciam a resposta aos inibidores de EGFR, ressaltando a complexidade da biologia tumoral (HYNES; LANE, 2005).

Especificamente em tumores de mama, a superexpressão de EGFR está associada a um aumento no tamanho do tumor, menor diferenciação celular e piores prognósticos clínicos (SAINSBURY et al., 1987; SALOMON et al., 1995). A amplificação de EGFR ocorre para grande parte dos subtipos de tumores de mama, entretanto, é mais frequentemente observada (ao menos 50% dos casos) em tumores triplo-negativos de mama (TNBC), os quais são um subtipo muito agressivo (GUÉRIN et al., 1989; RAKHA et al., 2007; BURNES; GRUSHKO; OLOPADE, 2010). O tratamento desse subtipo de tumor têm sido um grande desafio devido a ausência de uma terapia eficaz.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar o papel de fatores solúveis, interação célula-célula e interação célula-matriz extracelular na regulação de modificações pós-traducionais e localização subcelular da proteína maspina.

3.2 Objetivos específicos

- I) Analisar entre os fatores solúveis, interações célula-célula e célula-matriz quais tem papel na regulação de modificações pós-traducionais e alterações na localização subcelular de maspina;
- II) Determinar resíduos alvos de modificações pós-traducionais de maspina;
- III) Analisar vias a jusante dos fatores envolvidos na regulação da localização subcelular de maspina;
- IV) Analisar proteínas que interagem com maspina após regulação da proteína pelos fatores identificados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse trabalho não envolveu manipulação direta de seres humanos ou animais, e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do ICB, parecer nº577/13.

4.1 Cultura de células

Células MCF10A (epitélio mamário humano adquirido no banco de células do Rio de Janeiro) foram cultivadas em meio DMEM/F12 (Thermo Fischer, Waltham, MA, EUA) suplementado com 5% de soro de cavalo (Gibco-Thermo Fisher), 20 ng/ml de EGF (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 100 ng/ml de toxina colérica (Sigma, St. Louis, MO, USA), 10 ug/ml de insulina (Invitrogen) 500 ng/ml de hidrocortisona (Sigma) e antibióticos penicilina/estreptamicina (Sigma).

A linhagem foi mantida em estufa a 37 °C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. O repique foi feito a cada 2 ou 3 dias a partir do tratamento das células com 0,05% tripsina-EDTA (Thermo Fischer). Para manutenção da linhagem, amostras da cultura foram congeladas e mantidas em nitrogênio líquido, crio-protegidas com 5% de DMSO (Sigma).

4.2 Extração de proteína total das culturas celulares

As células mantidas em placas de 10 cm de diâmetro foram lavadas duas vezes com tampão PBS e as proteínas foram extraídas diretamente na placa com o auxílio de um *cell scraper*, utilizando-se tampão de extração adequado ao ensaio subsequente, descritos a seguir. Todos os tampões utilizados continham inibidores de protease (2mM Na₃VO₄, 5mM NaF, 50μM β-glicerofosfato) e de fosfatase (1μg/ml leupeptina, 1μg/ml aprotinina, 1mM PMSF).

4.1.1 Extrato para SDS-PAGE ou imunoprecipitação de proteínas

O lisado foi obtido com tampão RIPA: 50 mM Tris pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% deoxicolato de sódio, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0 e 1mM EGTA.

4.1.2 Extrato para 2D-SDS-PAGE

O lisado foi obtido com tampão contendo 8M uréia e 2% CHAPS, 50mM DTT (Mercke, Darmstadt, HE, Alemanha), o mesmo tampão utilizado para hidratação das fitas de gradiente de pH imobilizado (IPG).

Após lise das células com a utilização de um *cell scrapper*, os materiais obtidos nos itens 4.2.1 e 4.2.2 foram incubados por 20 minutos a 4°C sob agitação para completar a lise, e foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C (MIKRO 200R, Hettich). O sobrenadante da centrifugação continha o extrato total de proteínas solubilizadas.

4.1.3 Fracionamento de núcleo e citoplasma

Para obtenção dos extratos, acrescentou-se 5mM de EDTA ao PBS utilizado nas lavagens. Em seguida, o lisado foi obtido com tampão contendo 500 mM Hepes pH 7.9, 1M KCl, 500 mM EDTA, 200 mM EGTA por 30 minutos. Passada essa incubação, 3% de NP-40 foi adicionado, e a solução foi vortexada por 10 segundos e centrifugada a 14.000 rpm durante 30 segundos. O sobrenadante recolhido correspondeu à fração citossólica. Para obtenção da fração nuclear, o *pellet* foi ressuspenso em tampão contendo 500 mM Hepes pH 7.9, 3 M NaCl, 500 mM EDTA, 200 mM EGTA, inibidores e incubado em gelo por 30 minutos. Foi realizada nova centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante obtido corresponde à fração nuclear.

4.1.4 Extrato para ensaio de co-imunoprecipitação

A fim de preservar as interações entre proteínas, o extrato foi obtido a partir de tampão contendo 1,5mM EGTA, 1mM EDTA, 1mM DTT, conforme descrito por

Plotnikov e colaboradores (PLOTNIKOV et al., 2011). A seguir, os extratos foram sonicados 2 vezes de 7 segundos, centrifugados por 15 minutos, 14000 rpm à 4°C e o sobrenadante foi utilizado para ensaios de imunoprecipitação.

4.2 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi determinada pelo método colorimétrico Bradford (Bradford, 1976) utilizando uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) [Cell Signalling, Danvers, MA, EUA], em leitor de Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) [Epoch, BioTek, Winooski, VT, EUA] com valores de absorbância obtidos em 595 nm.

4.3 Imunoprecipitação

O extrato total (500µg) foi incubado com 2 µg de anticorpo *overnight* a 4°C. Foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-maspina (MABC603, Millipore, Billerica, MA, EUA), anti-EGFR (sc-03, Santa Cruz, Dallas, TX, EUA), anti-fosfo-tirosina (05-321, Millipore) e anti-fosfo-serina (05-1000X, Millipore). O material foi então imunoprecipitado com a proteína G-sepharose (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) e os *beads* de *sepharose*, lavados 3 vezes com a mesma solução utilizada na extração proteica. O material imunoprecipitado foi fervido em tampão de amostra redutor (2% SDS, 10% glicerol, 5% 2-mercaptoetanol, azul de bromofenol, 62,5 mM Tris HCl pH6,8) e separado em gel SDS-PAGE a 12%.

4.4 Western blot

Os extratos proteicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, contendo SDS como descrito (LAEMMLI, 1970).

As proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (Millipore), usando tampão de transferência (25mM Tris, 150mM glicina e 20% metanol) em sistema de transferência Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Biorad, Berkeley, CA, EUA). A seguir, a membrana foi bloqueada por 30 minutos em PBS-Molico 5% ou TBS-BSA

5% para anticorpos que reconhecem proteínas fosforiladas. Anticorpos primários foram incubados no mesmo tampão de bloqueio *overnight* à 4°C. A seguir a membrana foi lavada 3 vezes por 10 minutos com PBS-Tween (TBS-Tween para anticorpos que reconhecem proteínas fosforiladas) 0,1% e o anticorpo secundário conjugado à peroxidase (Sigma) foi incubado por 1 hora à temperatura ambiente em tampão de bloqueio. A membrana foi lavada novamente conforme descrito acima, e incubada com *Clarity Western ECL Blotting Substrate* (BioRad) e exposta a filme de raios-X (Ortho CP-G Plus – AGFA, Mortsel, Bélgica). As auto-radiografias foram digitalizadas e quantificadas através do software Fiji/ImageJ (SCHINDELIN et al., 2012). Para tanto, a primeira banda da imagem foi demarcada, em seguida foi selecionado *Analyze>Gels>Select First Lane*. A próxima banda foi selecionada arrastando a demarcação da primeira e selecionando *Analyze>Gels>Select Next Lane*, esse passo foi repetido para as bandas subseqüentes. A seguir utilizamos a ferramenta *Analyze>Gels>Plot Lanes*, que gerou vários gráficos referentes às bandas. A área dos gráficos foi quantificada a partir de *Analyze>Measure*.

4.5 Imunofluorescência indireta

As células MCF10A cultivadas em lamínulas foram lavadas e fixadas em solução de 2% paraformaldeído em PBS por 20 minutos a temperatura ambiente. Após nova lavagem, foi realizada a permeabilização incubando as células em solução de 0,5% Triton X-100 em PBS por 10 minutos em ambiente úmido. A seguir foi feito o bloqueio com 10% de soro de cabra em PBS por 1 hora. O anticorpo primário (anti-rabbit maspina HPA019132, Sigma e/ou anti-mouse E-caderina 14472, Cell Signaling) foi diluído 1:50 ou 1:100 na solução de bloqueio e incubado *overnight* a 4°C. As lamínulas foram então lavadas 3 vezes com PBS/0,1%Tween20. O anticorpo secundário (anti-mouse Alexa-fluor 594 e/ou anti-rabbit Alexa-fluor 488, Invitrogen) foi diluído também na solução de bloqueio (1:5000) e incubado por 1 hora a temperatura ambiente. Três lavagens foram feitas e em seguida incubamos Hoechst (1:5000 em PBS) por 5 minutos a temperatura ambiente. Uma última lavagem foi realizada e a lâmina foi montada utilizando-se meio de montagem (Prolong Gold, ThermoFisher) e obtidas em microscópio de fluorescência convencional DMI8 operado pelo software LAS X (Leica, Wetzlar, Alemanha). As

imagens de microscopia confocal foram obtidas no microscópio de fluorescência Axiophot widefield fluorescence microscope utilizando objetiva PlanApo 1.4 NA, aumento de 63 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As imagens foram adquiridas utilizando câmera monocromática CCD (CoolSnap HQ2, 137 Photometrics Inc., Tucson, AZ, USA). O microscópio e dispositivos foram manipulados pelo software Metamorph Premier 7.6 (Molecular 138 Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Foi utilizado o puglin *HeatMap* do software Fiji/ImageJ para verificar variações nas intensidades de fluorescência obtidas nas imagens. A Figura 5 mostra um exemplo de imagem processada pelo *plugin*.

Figura 5. Exemplo de classificação das células de acordo com os níveis de maspina dos compartimentos. A imagem de imunofluorescência de maspina (quadro superior a esquerda) foi processada pelo plugin HeatMap do ImageJ (quadro inferior) e as setas indicam como as células foram classificadas. No canto superior direito do quadro inferior é exibida uma barra de escalas.

As células foram divididas entre marcação nuclear predominantemente ($N > C$) ou marcação nuclear menor ou igual a citoplasmática ($N \leq C$).

4.6 Análise do papel da adesão na fosforilação de maspina

Este método tem sido muito usado para análise de vias de sinalização reguladas pela adesão ao substrato (MIRANTI, 2002). Células MCF10A foram cultivadas em duas placas de 10 cm em meio completo. Quando atingiram 70-80% o meio foi trocado por meio de carenciamento contendo 0,1% de soro e as células assim permaneceram por 16 a 18 horas. Passado esse intervalo, as células foram tripsinizadas, tratadas com inibidor de tripsina de soja (Invitrogen), lavadas com PBS sem Ca^{+2} e Mg^{+2} e incubadas em suspensão em meio com 0,1% de soro por 1 hora à 37°C. Neste intervalo foi preparada a placa contendo a matriz depositada pelas próprias células MCF10A (CELLA et al., 2006). Para isso duas placas de células MCF10A confluentes (uma para cada placa tripsinizada) foram lavadas com PBS e tratadas com 20 mM NH_4OH por 5 minutos, tratamento que lisa as células mas não retira a matriz depositada por essas (LANGHOFER; HOPKINSON; JONES, 1993). A matriz depositada foi lavada com água estéril e bloqueada com 10 mg/ml de BSA por 1 hora à temperatura ambiente. Passado o intervalo de 1h de incubação das células em suspensão metade das células foi plaqueada sobre a matriz depositada (e assim rapidamente induzida a aderir) e a outra metade foi plaqueada em uma placa recoberta com solução de BSA (a mesma utilizada no bloqueio), mantendo assim o estado em suspensão. As células foram incubadas nessas condições por 1h à 37 °C e posteriormente lisadas para análise por 2D-SDS-PAGE seguida de *westernblot* com anti-maspina.

4.7 Separação das isoformas por 2D-SDS-PAGE

Os extratos obtidos como descrito no item 4.2.2 foram previamente precipitados com acetona a fim de eliminar grande parte dos sais que interferem na eficiência da focalização isoeletrica. Para isso, três volumes de acetona gelada

foram adicionados à amostra e incubados a -20°C por no máximo 4 horas, seguida de centrifugação a 15000 rpm por 15 minutos a 4°C. A acetona residual foi removida deixando o *pellet* secar, e o mesmo foi ressuspensionado no mesmo tampão. A seguir foram realizadas as

A primeira dimensão consiste na separação das proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI). Utilizamos fitas de IPG (Bio-Rad) de 17 cm de pH em gradiente linear imobilizado de 4,7 a 5,9. As fitas foram reidratadas em 300µL de extrato proteico previamente precipitado por acetona e 1X ReadyStrip buffer pH 4,7-5,9 (BioRad), por no mínimo 16 horas a temperatura ambiente. As fitas foram cobertas com óleo mineral DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare) para evitar a desidratação das fitas. As focalizações isoelétricas foram conduzidas no sistema Ettan IPG phor3 (GE Healthcare), onde as fitas reidratadas foram acomodadas e cobertas novamente com óleo. A programação utilizada para focalização isoelétrica é apresentada a seguir na Tabela 1.

Tabela 1. Programa das condições de focalização utilizada para fita de IPG de 17 cm, pH 4,7 a 5,9.

<i>step</i>	voltagem	Volts/h
1	500V	500Vh
2	1000V	800Vh
3	10000V	16500Vh
4	10000V	39200Vh
5	500V	16h
6	10000V	1h

Após separação pela primeira dimensão, as fitas foram tratadas por 20 minutos em 2 soluções distintas. A primeira solução, redutora, consiste em solução de equilíbrio, contendo 50mM Tris-HCl pH 8,8, 6M uréia, 30% glicerol, 2% SDS e azul de bromofenol adicionada de 1% DTT (Merck); a segunda solução, necessária para alquilação das proteínas, consiste em solução de equilíbrio adicionada de 2,5% de iodoacetamida (Merck).

A segunda dimensão consiste na separação das proteínas por massa molecular. As fitas focalizadas, reduzidas e alquiladas foram submetidas à eletrofore em gel SDS-PAGE 12%, utilizando-se o sistema Ruby (GE Healthcare). Uma

pequena porção ácida da fita foi cortada (foi constatado previamente que não continha maspina) para adequar o tamanho da fita ao equipamento de eletroforese. As fitas foram colocadas na parte superior do gel de poliacrilamida e o padrão de massa molecular foi aplicado ao lado.

4.8 Análise dos resultados

Para analisar as imunofluorescências, as células foram contadas e agrupadas de acordo com a diferença entre a marcação de maspina nos compartimentos de núcleo e citoplasma. As células foram divididas entre marcação nuclear predominantemente ($N > C$) ou marcação nuclear menor ou igual a citoplasmática ($N \leq C$). Foi aplicado o teste qui-quadrado para verificar se existia associação entre as variáveis analisadas.

Para análise dos *westernblots*, as quantificações por densitometria óptica obtidas foram analisadas por ANOVA para verificar se existiam diferenças entre as médias das quantificações obtidas.

As análises foram realizadas utilizando-se o software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$.

4.9 Tratamento das células com inibidores farmacológicos

Após carenciamento de soro e fatores solúveis, as células MCF10A foram tratadas por 30 minutos com os inibidores Iressa, Wortmanina, PP2, WP1066, FTI-277-trifluoroacetato, Go6983, BX795, Triciribina, Rapamicina e Vo-Ohpic (Sigma). A concentração utilizada foi de 10 μ M exceto para BX795, que foi utilizado a 5 μ M.

4.10 Sequenciamento por Espectrometria de Massas (MS)

A análise por espectrometria de massas de proteínas que co-imunoprecipitam com maspina foram obtidas a partir de colaboração com a professora Júlia Pinheiro Chagas da Cunha do Laboratório Especial de Ciclo Celular-LECC/cetics do Instituto Butantan.

Os produtos de imunoprecipitação foram submetidos aos seguintes procedimentos:

I) Precipitação com TCA. Para isso, alíquotas de 60 a 100µg de proteínas foram completadas com 100mM de Tris-HCl pH8,5 gelado até o volume final de 400µl. Em seguida, 100µl de TCA 100% gelado foi adicionado e incubado overnight a 4°C. A solução foi então centrifugada a 14000rpm por 30 minutos a 4°C, e o *pellet* obtido foi lavado duas vezes com acetona gelada seguido de centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos. Após a última centrifugação, o pellet foi deixado para secar a temperatura ambiente.

II) Digestão com tripsina. As proteínas foram digeridas conforme protocolo modificado de (VILLÉN; GYGI, 2008). As amostras foram ressuspensas em 30 µl de tampão contendo 8 M ureia, 75 mM NaCl, 50 mM Tris pH8,2, reduzidas com DTT (concentração final de 5 mM) por 25 minutos, e alquiladas com iodoacetamida (concentração final 14 mM) por 30 minutos. A concentração de uréia em solução foi reduzida a 1,6 M e as amostras foram então digeridas com tripsina (Sigma) na proporção de 1:200 (enzima:substrato) por 16 horas a 37°C.

III) Espectrometria de massas. Os peptídeos produtos da digestão foram ressuspensos em ácido fórmico 0,1% e injetados em uma pré-coluna capilar de fase reversa C18 acoplada a nano HPLC (NanoLC-Proxeon) em gradiente 2-50% ACN em ácido fórmico 0.1%. Os peptídeos eluídos foram analisados online no espectrômetro de massas de alta resolução LTQ-Orbitrap Velos (ThermoFisher). Os 10 íons mais intensos foram selecionados para fragmentação por CID em *data dependent analysis*.

IV) Análise e integração dos dados proteômicos. Dados oriundos do LTQ Velos-Orbitrap foram analisados no programa Andromeda-MAXQUANT 1.5.3.12 (COX et al., 2011) usando banco de dados SwissProt (banco *Homo sapiens*), tolerância no MS de 6 ppm e no MS/MS de 0.5 Da, carbamidometilação na cisteína como modificação fixa, oxidação na metionina e acetilação nos N-terminais como modificações variáveis, lisina pesada com adição de 6 Da e taxa de 1% de FDR. Foram identificados e quantificados aqueles peptídeos que foram identificados por pelo menos um *razor + unique peptide match between runs* utilizada para aumentar o número de identificações confiáveis. Para a obtenção dos valores quantitativos, foram utilizados os valores de LFQ normalized do output proteingroups.txt.

5 RESULTADOS

As atividades biológicas e localização subcelular de maspina são tecido e contexto-dependente, ou seja, dependem do tipo celular, do seu microambiente e também de condições fisiológicas e patológicas. A variação na localização subcelular da proteína parece ter estreita relação com a regulação de suas atividades biológicas. Por exemplo, o efeito pró-apoptótico de maspina está relacionado a sua translocação para as mitocôndrias (LATHA et al., 2005b), o aumento da adesão depende de maspina extracelular e/ou associada à membrana plasmática (SEFTOR et al., 1998; QIN; ZHANG, 2010), a resposta ao *stress* está relacionada a maspina citoplasmática (YIN et al., 2005a) e o controle da expressão gênica ocorre a partir da translocação de maspina para o núcleo (LI et al., 2006a; GOULET et al., 2011). Ademais, a atividade de supressão tumoral de maspina está associada a sua localização nuclear (GOULET et al., 2012). Maspina nuclear foi associada a um bom prognóstico na maioria dos casos reportados (MOHSIN et al., 2003; LONARDO et al., 2006; SOLOMON et al., 2006; MARIONI et al., 2008), mas não em outros (WOENCKHAUS et al., 2007; MARTINOLI et al., 2014). Particularmente em tumores de mama, todos os casos reportados associam maspina nuclear a um bom prognóstico. Contudo, os mecanismos que regulam a translocação dessa proteína não estão esclarecidos.

Grande parte dos estudos sobre maspina é conduzida em tumores ou linhagem de células tumorais, que apresentam grande variabilidade em seu contexto celular, e adicionam um grau de dificuldade na tentativa de esclarecer como ocorre a regulação das funções da proteína. Logo, é importante investigar a regulação de maspina em modelos de célula e tecido não transformado. Desta forma, nosso trabalho foi desenvolvido utilizando-se a linhagem de células MCF10A, uma linhagem de epitélio mamário humano não transformado, diplóide e estável geneticamente mesmo em passagens mais altas na cultura (VITOLO et al., 2009). As células MCF10A expressam maspina endógena em altos níveis, tornando-a assim um bom modelo para investigar os mecanismos moleculares envolvidos na regulação dessa proteína. A ideia inicial do projeto foi investigar se há várias formas de maspina, já que parecia improvável que funções biológicas tão diversas fossem reguladas por uma proteína única. Verificamos então que em nosso modelo havia

diferentes fosfoformas de maspina, e que a fosforilação estava correlacionada com a sua localização citoplasmática (Longhi & Cella 2012). Como maspina é encontrada em vários subcompartimentos celulares, é possível que a regulação de suas funções seja determinada primariamente pela sua interação com diferentes ligantes restritos aos diferentes microambientes intracelulares. Assim, o passo seguinte foi investigar quais fatores extracelulares regulam a localização subcelular de maspina e que vias de sinalização estão envolvidas nesse processo.

5.1 Regulação de modificações pós-traducionais e alterações na localização subcelular de maspina.

Como uma linhagem não transformada, as células MCF10A precisam ser cultivadas na presença de vários outros fatores solúveis, além do soro de cavalo. Esses são a insulina, o EGF, a hidro cortisona e a toxina colérica. A partir de imunofluorescência com o anticorpo anti-maspina, verificamos que o padrão de marcação de maspina em células MCF10A cultivadas em meio completo (ou seja, contendo todos os fatores acima mencionados concentra-se no núcleo das células em cerca de 40% das células (Figura 6A, painel superior). Verificamos que as células carenciadas apresentaram um padrão de marcação de maspina diferente das células cultivadas em meio completo. Grande parte das células cultivadas em meio carenciado apresentou marcação similar entre os compartimentos do núcleo e citoplasma (Figura 6A, painel inferior). A quantificação dos níveis de maspina nuclear e citoplasmático mostraram uma diferença significativa entre as duas condições (Figura 6B).

Figura 6. Localização subcelular de maspina nas células MCF10A em meio completo e carenciado. A. Células cultivadas em meio completo ou carenciado de soro e fatores solúveis por 24 horas foram fixadas e processadas para imunofluorescência com anticorpo anti-maspina. O núcleo das células foi corado com Hoechst. Barra de escala – 20 μ m. B. Quantificação do número de células com maspina predominantemente nuclear (N>C) ou sem predominância nuclear (N≤C) referente a três ensaios independentes. Asterisco indica dado estatisticamente significativo em comparação com o respectivo controle ($p < 0,05$ teste qui quadrado).

A fim de determinar quais dos fatores adicionados ao meio de cultura são responsáveis por modificar o padrão de localização de maspina nessas células, realizamos ensaio semelhante ao anterior mas dessa vez cada fator do meio completo foi excluído do meio de cultura de forma isolada (Figura 7).

Figura 7. Localização subcelular de maspina após remoção dos fatores solúveis do meio de cultivo das células MCF10A. A. Foram retirados de forma independente os fatores solúveis: insulina, hidro cortisona, toxina colérica e EGF do meio de cultivo por 24 horas, assim como o soro de cavalo, como indicado na figura. As células foram então fixadas e processadas para imunofluorescência com anticorpo anti-maspina. O núcleo das células foi corado com Hoechst. Barra de escala – 50 μ m. B. Quantificação do número de células com maspina predominantemente nuclear (N>C) ou sem predominância nuclear (N≤C) referente a três ensaios independentes. Asteriscos indicam dados estatisticamente significantes em comparação com os respectivos controles ($p < 0,05$ teste qui quadrado).

Dentre os fatores que foram suprimidos de forma independente, é possível verificar que a marcação de maspina em células em que houve a retirada de toxina colérica, insulina e hidro cortisona assemelham-se ao padrão apresentado em células cultivadas em meio completo, ou seja, predomínio de marcação nuclear (Figura 7A, painéis 3, 4 e 5 de cima para baixo, à esquerda, respectivamente). Por outro lado, a supressão de soro de cavalo e EGF do meio de cultivo resultou em um padrão de marcação um pouco mais semelhante ao que encontramos para a condição de carenciamento total, onde observa-se também marcação citoplasmática, além de nuclear (Figura 7A, painéis 6 e 7 de cima para baixo, à esquerda). A quantificação dos níveis de maspina nuclear e citoplasmático mostraram uma diferença significativa na ausência de EGF e soro de cavalo em relação ao meio completo (Figura 7B). Este dado sugere que soro de cavalo e EGF regulam a localização subcelular de maspina.

O soro de cavalo é constituído por uma grande diversidade de proteínas (LEPCZYŃSKI et al., 2018), e tem composição variável de acordo com o lote

utilizado. Como nosso objetivo é identificar fatores específicos envolvidos na regulação de maspina, prosseguimos nosso estudo focando no fator de crescimento EGF. Para tanto, células MCF10A foram carenciadas de soro de cavalo e todos os outros fatores de crescimento por 24 horas, de modo que apenas o metabolismo basal das células fosse mantido. Em seguida as células foram tratadas com 20 ng/ul de EGF, mesma concentração utilizada no meio de cultura, por 15, 30 e 60 minutos. As células foram então fixadas e analisadas por imunofluorescência com anti-maspina quanto a localização subcelular da proteína (Figura 8).

Figura 8. Localização subcelular de maspina após tratamento das células MCF10A por diferentes períodos com EGF. A. Células foram carenciadas por 24 horas e tratadas com 20 ng/ml de EGF por 15, 30 e 60 minutos. A seguir, as células foram fixadas e processadas para imunofluorescência com anticorpo anti-maspina. O núcleo das células foi corado com Hoechst. Barra de escala – 20 μ m. B. Quantificação do número de células com maspina predominantemente nuclear (N>C) ou sem predominância nuclear (N≤C). Asteriscos indicam dados estatisticamente significantes em comparação com os respectivos controles ($p < 0,05$ teste qui quadrado). C. O extrato das frações nuclear e citoplasmática de células tratadas com EGF (20ng/ml) pelos tempos indicados foram separados em SDS-PAGE a 12% e analisados por *westernblot* com anti-maspina. Para confirmar a eficiência do fracionamento,

a membrana foi também incubada com anti- α -tubulina e anti-lamina A/C, marcadores de citoplasma e de núcleo, respectivamente. A figura é representativa de 3 experimentos independentes que tiveram resultados similares.

Observamos que em células carenciadas não há predominância de marcação nuclear de maspina, entretanto, o tratamento das células com EGF resulta no aumento significativo dos níveis de maspina no núcleo das células de forma tempo-dependente (Figura 8B). Mais da metade das células (58%) apresentaram marcação predominantemente nuclear com 60 minutos de tratamento com EGF.

O acúmulo de maspina no núcleo das células tratadas com EGF também pode ser observado pelo *westernblot* do fracionamento do extrato proteico submetido ao mesmo tratamento (Figura 8C).

5.2 Regulação de modificações pós-traducionais de maspina por EGF

A seguir, buscamos avaliar a relação entre a localização subcelular de maspina e modificações pós-traducionais na proteína já que em trabalho anterior verificamos uma correlação entre esses dois eventos, mais especificamente a fosforilação (LONGHI; CELLA, 2012). A técnica de 2D-SDS-PAGE é um método ideal para verificar alterações na carga ou massa molecular de proteínas, e devido ao nosso interesse específico em uma proteína, essa abordagem foi seguida de *westernblot* com anticorpo anti-maspina. As condições para esse experimento já tinham sido otimizadas, foram utilizados 3mg de extrato proteico que foram submetidos à focalização isoeletrica em fita de 17cm com gradiente de pH de 4,9 - 5,6, e gel de SDS-PAGE a 12% seguido de *westernblot* com anti-maspina. A proteína β -actina (42kDa) foi utilizada como controle para comparação da quantidade de extrato submetido ao 2D-SDS-PAGE das duas condições (Figura 9A).

Figura 9. Variação da formas fosforiladas de maspina reguladas por EGFR. A. Células MCF10A foram submetidas a 24 horas de carenciamento e tratadas com 20ng/ μ l de EGF por 15 minutos. O extrato total das células foi focalizado em fita de IPG de 17 cm, pH 4,7 a 5,9. O material foi submetido à eletroforese em gel SDS-PAGE 12 %, transferido para membrana PVDF e analisado por *immunoblot* com anti-maspina. Como controle de *loading* foi utilizada a marcação com anti- β -actina. B. Os *spots* foram quantificados por densitometria ótica (D.O.) e representados graficamente. Asterisco indicam dado estatisticamente significativo ($p < 0,05$ teste ANOVA). C e D. Células MCF10A foram carenciadas e tratadas com 20ng/ml de EGF pelo período indicado. 50 μ g do extrato total foi submetido à eletroforese em gel 8% Phos-tag SDS-PAGE (C) ou 12% SDS-PAGE (D). As proteínas foram transferidas para membrana de PVDF e incubadas com anti-maspina. E. Células foram submetidas a 24 horas de carenciamento total acompanhado de tratamento com anti-anfiregulina (hAR) ou IgG de cabra (1 μ g/ml). Os extratos totais de células (50 μ g)

foram submetidos à eletroforese em gel SDS-PAGE 8% contendo 50 μ M de Phos-tag, transferido para membrana PVDF e analisado por *western blot* com anti-maspina.

Em células carenciadas observamos três *spots* de maspina, os quais apresentaram variações no pI das formas identificadas e aparentemente pouca alteração em sua massa molecular. O tratamento com EGF resultou na presença de um quarto *spot* na parte mais ácida da fita. Os *spots* foram quantificados por densitometria óptica e representados graficamente para avaliarmos os níveis de cada forma de maspina. Obtivemos diferença estatisticamente significativa dos *spots* 4 entre as condições meio carenciado e EGF (Figura 9B).

O padrão dos *spots* de maspina observado é bem semelhante ao que obtivemos em trabalho anterior (LONGHI; CELLA, 2012), onde *spots* localizados na parte ácida da fita eram formas fosforiladas de maspina. A fosforilação adiciona carga negativa à proteína alvo, e dessa forma os *spots* passam a apresentar uma variação na distribuição horizontal, que corresponde à variação no pI das proteínas, mas pouca variação vertical, devido à pequena adição na massa molecular, cerca de 80Da por grupo fosfato (SEO; LEE, 2004). A fim de determinar se esses *spots* eram resultado de fosforilação de maspina, utilizamos o reagente Phos-tag (KINOSHITA et al., 2006). Ao ser adicionado ao gel de SDS-PAGE comum, a molécula de Phos-tag interage com íons fosforilados formando um complexo com a proteína fosforilada, provocando o retardo da sua migração eletroforética. Portanto, a partir desta abordagem é possível diferenciar a porção fosforilada de uma proteína após *western blot* com o anticorpo específico.

Células carenciadas apresentaram algumas formas de maspina fosforilada, as quais a medida que o tratamento de EGF aumentava, também aumentaram os níveis de maspina fosforilada (Figura 9C, painel superior). De maneira coerente, os níveis de maspina desfosforilada diminuíram (Figura 9C, seta). A membrana foi re-incubada com anti-HSP90 como controle de *loading* (Figura 9C, painel inferior). Esse dado está de acordo com a quantificação dos dados obtidos no 2D-SDS-PAGE que sugerem um aumento de *spots* localizados na parte ácida da fita (*spots* 3 e 4 da Figura 9B). Ao mesmo tempo, não observamos uma diferença significativa nos níveis totais de maspina ao realizar a mesma cinética de tratamento com EGF

(Figura 9D) utilizando a proteína α -tubulina (50kDa) como controle de *loading*. Concluímos que o aumento da fosforilação de maspina é regulado por EGF e varia em função do tempo do tratamento. Além disso, os dados indicam que maspina apresenta mais de uma forma fosforilada.

Ficou evidente que mesmo células cultivadas em meio DMEM/F12 puro (carenciamento total) continuam apresentando formas fosforiladas de maspina (Figura 9C, tempo 0). Células MCF10A secretam o fator anfiregulina, um ligante de EGFR (ZHANG, J. et al., 2009) mesmo após carenciamento das células (FAN; KIM; GUMBINER, 2013). Assim, anfiregulina poderia ser responsável por ativar o receptor de EGF, que desencadeia as modificações em maspina. Para testar essa hipótese, anticorpo contra anfiregulina foi adicionado ao meio de carenciamento das células a fim de neutralizar a proteína secretada e verificar se a fosforilação de maspina é alterada (Figura 9E). Como controle, foi utilizada a mesma concentração de IgG de cabra (animal em que é produzido o anticorpo anti-anfiregulina).

Após neutralização de anfiregulina do meio de cultura das células, a banda de maspina fosforilada sofre grande redução em relação ao controle tratado com IgG de cabra (Figura 9E, seta superior). Portanto, a sinalização por anfiregulina parece ser a responsável pela fosforilação de maspina mesmo após carenciamento de soro e fatores solúveis do meio de cultura. No entanto, a adição de anfiregulina ao meio de cultura das células MCF10A não resultou em modificação do padrão de localização subcelular de maspina (dados não mostrados).

5.3 Resíduos de maspina fosforilados após estímulo das células com EGF

Em lisado total de células epiteliais de córnea a fosforilação de maspina foi detectada em resíduos de tirosina, serina e treonina (NARAYAN; MIRZA; TWINING, 2011). Para investigar qual desses resíduos está relacionado à regulação da localização subcelular de maspina em nosso modelo, extrato de células MCF10A carenciadas e tratadas por diferentes períodos (5, 15, 30 e 60 minutos) com EGF foram imunoprecipitados com anticorpos anti-fosfo-tirosina e anti-fosfo-serina seguido de *western blot* com anti-maspina (Figura 10A). Adicionamos o período de 5 minutos de tratamento com EGF para verificar se eventos precoces na cascata de

sinalização poderiam atuar nesse mecanismo. Apesar de ser uma forma indireta de determinar a fosforilação de maspina, esta abordagem complementa nossos dados de 2D-SDS-PAGE e gel contendo Phos-tag que indicam que a proteína é mesmo fosforilada na presença de EGF.

Figura 10. Variação da fosforilação de maspina em resíduos de serina e tirosina após tratamento das células com EGF por imunoprecipitação. 500µg de extrato proteico de células MCF10A carenciadas e tratadas com EGF por 5, 15, 30 e 60 minutos foram utilizados para imunoprecipitação com 2 µg de anticorpo anti-fosfo-serina e anti-fosfo-tirosina. O produto das IPs foi submetido a gel de SDS-PAGE a 12%, transferido para membrana de PVDF e analisado por imunoblot com anti-maspina. Imunoprecipitação com IgG irrelevante foi utilizada como controle e extrato total indica o padrão de migração de maspina. B. Extratos totais foram analisados por *immunoblot* com anti-fosfo-tirosina e anti-fosfo-serina.

Interessantemente, verificamos que maspina está presente entre as proteínas imunoprecipitadas com anti-fosfo-tirosina na condição de carenciamento das células MCF10A, no entanto, é possível notar que a quantidade de maspina imunoprecipitada diminui com o aumento do tempo de tratamento das células com EGF. Por outro lado, verificamos o efeito oposto na imunoprecipitação com anti-fosfo-serina, a quantidade de maspina co-imunoprecipitada aumentou com o tratamento de EGF. Deste modo, o dado indica que EGF regula a fosforilação e

desfosforilação de maspina em resíduos de serina e tirosina, respectivamente. Como esperado, o total de proteínas fosforiladas em tirosina e serina também aumenta com tratamento com EGF (Figura 10B).

5.4 Análise do papel de vias a jusante de EGFR na regulação da localização subcelular de maspina.

O fator de crescimento EGF atua especificamente em EGFR (ErbB1), e a partir dessa ligação, EGFR forma homodímeros ou heterodímeros com ErbB2. A sinalização a jusante de EGFR inclui cascatas de sinalização distintas (Figura 4). Para determinar se e qual/quais dessas vias atuam na regulação de maspina, utilizamos um painel de inibidores farmacológicos específicos para moléculas a montante das diferentes vias de sinalização ativadas por EGFR (Tabela 2).

Tabela 2. Inibidores específicos, seus respectivos alvos e concentração utilizada.

INIBIDOR	ALVO	[]
Iressa	EGFR	10 μ M
Wortmanina	PI3K	10 μ M
PP2	Src	10 μ M
WP1066	STAT3	10 μ M
FTI-277- trifluoroacetato	H/K Ras	10 μ M
Go6983	PKC	10 μ M

Os inibidores foram incubado 30 minutos antes do tratamento das células carenciadas com EGF (20ng/ml) por 1 hora. Como controle, utilizamos o veículo DMSO. Após esse período, as células foram fixadas e analisadas quanto a localização subcelular de maspina a partir de imunofluorescência (Figura 11).

A

Figura 11. Variação da localização subcelular de maspina após tratamento das células com inibidores farmacológicos de vias a jusante de EGFR. A. Células carenciadas foram tratadas com 10 μ M de Iressa (inibidor de EGFR), Wortmanina (inibidor de PI3K), FTI (inibidor de H/K-Ras), PP2 (inibidor de Src), Go6983 (inibidor de PKC) e WP1066 (inibidor de STAT3), seguido de tratamento com EGF (20ng/ml) por 1 hora. A seguir, as células foram fixadas e processadas para imunofluorescência com anticorpo anti-maspina. O núcleo das células foi corado com Hoechst. Barra de escala – 20 μ m. B. Quantificação do número de células com maspina predominantemente nuclear (N>C) ou sem predominância nuclear (N≤C). Asteriscos indicam dados estatisticamente significantes em comparação com os respectivos controles ($p<0,05$ teste qui quadrado).

Como esperado, o tratamento das células com inibidor de EGFR bloqueou o acúmulo nuclear de maspina em comparação com as células tratadas com DMSO. Alguns dos inibidores de alvos a jusante de EGFR não bloquearam o efeito de EGF na localização de maspina, tais como FTI (inibidor de H/K-Ras), PP2 (inibidor de Src) e Go6983 (inibidor de PKC). Por outro lado, observamos que os inibidores wortmanina (inibidor de PI3K) e WP1066 (inibidor de STAT3) foram capazes de suprimir o efeito de EGF, sugerindo portanto que essas vias estão relacionadas a regulação da localização nuclear de maspina.

A via de PI3K inclui diversas proteínas até alcançar o seu alvo(s) final no núcleo da célula (Figura 12A), por isso utilizamos também alguns inibidores específicos dessa via para tentar identificar quais moléculas estão envolvidas na regulação da localização subcelular de maspina a jusante de PI3K (Tabela 3).

Tabela 3. Inibidores específicos da via de PI3K, seus respectivos alvos e concentração utilizada.

INIBIDOR	ALVO	[]
Wortmanina	PI3K	10 μ M
BX795	PDK1	5 μ M
Triciribina	Akt	10 μ M
Rapamicina	mTORC1	10 μ M
Vo-Ohpic	PTEN	10 μ M

Os inibidores foram utilizados da mesma forma que o experimento anterior. Inicialmente verificamos também o status da fosforilação de Akt ao utilizar esses inibidores para confirmar a eficácia dos mesmos (Figura 12B). É possível verificar que os inibidores cujos alvos são proteínas acima de Akt na cascata de fosforilação como Wortmanina e BX795, que inibem PI3K e PDK1 respectivamente, impediram a fosforilação de Akt, como esperado. O inibidor de Akt, Triciribina, também bloqueou a fosforilação da proteína. Rapamicina não inibiu a fosforilação de Akt, entretanto, visto que essa droga tem como alvo um complexo de proteínas abaixo de Akt na via, o mTORC1, este dado também é esperado. Por outro lado, VO-Ohpic atua sobre PTEN, uma fosfatase que desfosforila fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP₃), gerando -fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP₂). Deste modo, a inibição de PTEN promove o aumento da disponibilidade de PIP₃ na membrana e possibilita o ancoramento de Akt para que em seguida este seja fosforilado por PDK1 e mTORC2. É, portanto coerente que o uso desse inibidor tenha promovido o aumento da fosforilação de Akt.

Comparando a marcação de maspina nas células MCF10A tratadas com EGF e as condições em que os inibidores Wortmanina (inibidor de PI3K), BX795 (inibidor de PDK1) e Triciribina (inibidor de Akt) foram utilizados, observamos que estes inibem o acúmulo de maspina no núcleo das células. Por outro lado, Rapamicina e Vo-Ohpic não foram capazes de bloquear o acúmulo de maspina nuclear. Esses dados confirmam que a via de PI3K tem papel na localização subcelular de maspina até o nível de Akt. A sinalização abaixo de Akt referente ao complexo mTORC1 parece não atuar sob a localização de maspina.

Concluimos então que tanto a via de STAT3 quanto a via de PI3K estão envolvidas na regulação da localização subcelular de maspina.

A **B** **C**

Figura 12. Regulação da localização subcelular de maspina pela via de PI3K. A. Esquema ilustrativo da cascata de sinalização da via de PI3K. Adaptado de (FAES; DORMOND, 2015). Extratos protéicos de células carenciadas, tratadas com EGF (20ng/ml por 1h) ou pré-tratadas com 10 μ M dos inibidores Wortmanina, BX795, Triciribina, Rapamicina e Vo-Ohpic por 30 minutos. B. Os extratos proteicos foram submetidos a gel de SDS-PAGE a 4-15% e analisados por *immunoblot* utilizando os anticorpos indicados. Os números à esquerda indicam o padrão molecular em kDa. C. As células foram então fixadas e realizou-se imunofluorescência com anti-maspina. O núcleo das células foi corado com Hoechst. Barra de escala – 20 μ m. D. Quantificação do número de células com maspina predominantemente nuclear (N>C) ou sem predominância nuclear (N≤C). Asteriscos indicam dados estatisticamente significantes em comparação com os respectivos controles ($p < 0,05$ teste qui quadrado).

5.5 Proteínas que interagem com maspina após estímulo com EGF

A fim de esclarecer um pouco mais do significado biológico da regulação de maspina pela via de EGFR, utilizamos espectrometria de massas para identificação de proteínas que co-imunoprecipitam com maspina após tratamento das células com EGF. Para esta análise, imunoprecipitamos maspina a partir de extratos preparados com tampão descrito em (PLOTNIKOV et al., 2011), a fim de preservar as interações entre proteínas. Células carenciadas e tratadas com EGF por 5, 15 e 60 minutos foram utilizadas para obtenção dos extratos e imunoprecipitação. Além disso, utilizamos o extrato de células carenciadas para realizar uma imunoprecipitação com IgG_{2b} de camundongo, mesmo isotipo do anticorpo contra maspina e que funcionou como controle.

A seguir na Figura 13A apresentamos um diagrama de Venn com o número de proteínas identificadas em cada condição dos extratos imunoprecipitados:

carenciado, estimulados (EGF) e controle (IgG). As 100 proteínas que foram identificadas exclusivamente nas células estimuladas com EGF foram analisadas quanto à variação de sua intensidade relativa de Quantificação livre de Marcação (LFQ) em relação ao aumento do tempo de tratamento com EGF (Figura 13B).

Figura 13. Análise das proteínas que co-imunoprecipitam com maspina após estímulo de EGF. Após imunoprecipitação de extrato total de células MCF10A carenciadas e tratadas com EGF utilizando 2µg de anticorpo monoclonal de maspina (Millipore) ou 2µg de IgG de camundongo, as proteínas que co-imunoprecipitam foram identificadas por espectrometria de massa. A. O diagrama de Venn indica o número de proteínas específicas e comuns para cada condição. B. O gráfico indica a variação de LFQ que ocorreu com os tempos de tratamento com EGF (5, 15 e 60 minutos). C. Análise de *cluster* de anotação funcional de genes.

É possível verificar que cerca de metade das proteínas identificadas nessas condições passaram a interagir mais com maspina à medida que o tempo de tratamento com EGF aumentou (Figura 13B). Essas 100 proteínas também foram agrupadas de acordo com sua anotação funcional utilizando-se o programa DAVID (HUANG et al., 2007). As anotações com maior p-value estão representadas na Figura 13C. Dentre os grupamentos de anotações funcionais com maior *score*, encontramos proteínas ribossomais, proteínas envolvidas na adesão célula-célula, proteínas que se ligam a RNA, proteínas envolvidas em *splicing*, proteínas de citoesqueleto e proteínas com domínio SAP, um motivo encontrado em proteínas nucleares envolvidas na transcrição.

Interessantemente, nos experimentos de imunoprecipitação de maspina também detectamos o receptor de EGF entre as proteínas que co-imunoprecipitam com a mesma (Figura 14A).

Figura 14. Interação de maspina com EGFR mediante estímulo das células com EGF. 500µg de extrato de células carenciadas e tratadas com EGF pelos tempos indicados, foram utilizados para imunoprecipitar A. maspina ou B. EGFR com o 2µg de anticorpo. O produto da imunoprecipitação assim como 10 µg do extrato total (carenciado) foram submetidos à eletroforese em gel SDS-PAGE à 10%, transferido para membrana PVDF e analisado por

westernblot com anti-maspina e anti-EGFR para confirmar a imunoprecipitação. A IP controle foi realizada com anticorpo IgG irrelevante.

É possível observar que com o aumento do tempo de tratamento das células com EGF, observamos também um aumento nos níveis do receptor de EGF co-imunoprecipitado com maspina. De forma complementar, realizamos o experimento mencionado anteriormente de forma inversa, imunoprecipitando o receptor de EGF para verificar se maspina co-imunoprecipita após o tratamento das células carenciadas com EGF (Figura 14B). Não foi observada banda de maspina entre as proteínas imunoprecipitadas com por anticorpo anti-EGFR na condição de carenciamento das células. No entanto, após 30 minutos de tratamento com EGF, uma banda referente a maspina foi detectada. Deste modo, verificamos que paralelamente ao aumento dos níveis de fosforilação de maspina e do seu predomínio nuclear, o tratamento das células com EGF também promove o aumento da interação da proteína diretamente com EGFR ou na composição de um complexo proteico contendo as duas proteínas.

O fato de não identificarmos EGFR entre as proteínas que co-imunoprecipitam com maspina por espectrometria de massa pode ser explicado pelo tampão de extração utilizado em cada experimento. Para a identificação de maspina entre as proteínas que co-imunoprecipitam com EGFR foi utilizado tampão RIPA. O tampão RIPA contém detergentes e sais que são capazes de solubilizar proteínas de citoplasma, núcleo e membrana. Por outro lado, para identificação de proteínas que co-imunoprecipitam com maspina por espectrometria de massa, utilizamos o tampão descrito em (PLOTNIKOV et al., 2011), que não contém qualquer tipo de detergente ou sais a fim de preservar interações proteicas, e deste modo talvez seja incapaz de solubilizar EGFR que frequentemente encontra-se associado à membrana plasmática.

5.6 Análise do papel da interação célula-célula na regulação da localização subcelular de maspina.

Um ponto interessante das anotações funcionais de proteínas que interagem com maspina após estimulação com EGF são as proteínas envolvidas na adesão

célula-célula. Esse dado é coerente com observações anteriores, onde vimos variação da localização subcelular de maspina em experimentos em que a densidade de células foi variada. Diferente número de células (2×10^4 , 9×10^4 e 2×10^5) foram plaqueadas em uma mesma área e no mesmo intervalo de tempo, fixadas e analisadas por imunofluorescência com anti-maspina (Figura 15).

A

B

Figura 15. Variação da localização subcelular de maspina em função da densidade de células MCF10A. Diferente número de células MCF10A foram plaqueadas (2×10^4 , 9×10^4 e 20×10^4) e cultivadas em meio completo. A. As células foram fixadas e processadas para imunofluorescência com anticorpo anti-maspina. O núcleo das células foi corado com Hoechst. Barra de escala – 20 μm . B. Quantificação do número de células com maspina predominantemente nuclear ($N > C$) ou sem predominância nuclear ($N \leq C$). Asteriscos indicam dados estatisticamente significantes em comparação com os respectivos controles ($p < 0,05$ teste qui quadrado).

A medida que aumentamos o número de células plaqueadas, verificamos que o padrão de maspina muda. Em células pouco confluentes (2×10^4 células) cerca de metade das células apresentam maspina predominantemente nuclear, enquanto que em células super confluentes (20×10^4 células), a distribuição de maspina no núcleo e citoplasma tem níveis similares. A diminuição do número de células que apresentam maspina predominantemente nuclear diminui de forma estatisticamente significativa a medida que aumenta a densidade de células.

Tratando-se de adesão entre as células, as E-caderinas são moléculas de superfície celular essenciais nesse processo. São proteínas com domínio transmembrana em que a porção N-terminal é extracelular enquanto a porção C-terminal é intracelular (HAJRA; FEARON, 2002; WHEELLOCK; JOHNSON, 2003). A adesão célula-célula é mediada por interações homofílicas dependente de cálcio entre E-caderinas de células adjacentes, pois a porção extracelular dessa proteína contém diversos sítios de ligação ao cálcio (BOGGON et al., 2002). Uma abordagem experimental muito utilizada para interferir na adesão célula-célula consiste em desfazer as interações homofílicas utilizando agentes quelantes como EGTA. Visto que a localização subcelular de maspina parece ser regulada pela adesão entre as células (quanto mais células, mais contato célula-célula), decidimos investigar essa hipótese através da perturbação da interação entre as caderinas. Para isso, realizamos tratamento das células MCF10A com 4mM de EGTA por 30 minutos (Figura 16).

Na Figura 16A superior, em vermelho observamos a marcação de E-caderina sobretudo nas junções entre as células, que foram cultivadas em meio completo. A marcação de maspina, em verde, dessas células apresenta níveis similares no núcleo e no citoplasma. Na parte inferior da Figura 16A, as células foram tratadas com EGTA por 30 minutos, e por isso a marcação de E-caderina apresenta-se mais

difusa e menos concentrada nos limites entre as células. Nessa condição, a marcação de maspina também está alterada em relação à Figura 16A superior, pois existe acúmulo de maspina no núcleo das células (Figura 16A, ponta de setas). De fato o número de células que acumulam maspina nuclear após o tratamento com EGF aumenta de forma significativa (Figura 16B).

Figura 16. Variação da localização de maspina em células MCF10A tratadas com EGTA. A. Células foram cultivadas em meio completo (porção superior) e tratadas com 4mM de EGTA por 30 minutos (porção inferior). As células foram fixadas e processadas para imunofluorescência com anticorpo anti-maspina (verde) e anti-E-caderina (vermelho). O núcleo das células foi corado por Hoechst. Barra de escala – 20 μ m. B. Quantificação do número de células com maspina predominantemente nuclear ($N>C$) ou sem predominância nuclear ($N\leq C$). Asteriscos indicam dados estatisticamente significantes em comparação com os respectivos controles ($p<0,05$ teste qui quadrado).

Os dados referentes as Figuras 15 e 16 sugerem portanto que a adesão entre as células também regula a localização subcelular de maspina

5.7 Papel da interação célula-substrato na regulação da localização subcelular de maspina.

Como evidenciado na Figura 17, o extrato de células cultivadas em meio DMEM/F12 puro (carenciamento total) apresenta *spots* de maspina fosforilada. Uma vez que todos os fatores solúveis foram suprimidos do meio de cultura, o estímulo da fosforilação poderia ser oriundo da interação entre célula e substrato, já que maspina também interage com $\beta 1$ -integrina (CELLA et al., 2006; ENDSLEY et al., 2011). Para investigar essa hipótese, realizamos gel de 2D-SDS-PAGE seguida de *western blot* com anti-maspina para comparar o padrão de *spots* de extrato de células submetidas a duas condições: (i) aderidas à placa de cultura contendo matriz extracelular de MCF10A (Figura 10A, painel a direita); e (ii) plaqueadas em placa

coberta por BSA para proporcionar um substrato não aderente (Figura 17A, painel a esquerda) portanto as células permaneceram em suspensão (Figura 17B).

Não foi observada diferença significativa entre os *spots* nas duas condições (Figura 17C), enquanto a marcação para β -actina revela que existem níveis comparáveis de proteína no ensaio. Portanto esse dado sugere que estímulo provenientes da adesão da célula ao substrato não influencia a fosforilação de maspina nas condições testadas.

A **B** **C**

Figura 17. Variação da formas fosforiladas de maspina de células aderidas ou em suspensão. A. Células MCF10A foram plaqueada em matriz depositada por MCF-10A (painel a direita) e placa coberta por BSA (painel a esquerda). B. Os extratos proteicos

foram focalizados em fita de IPG de 17 cm contendo gradiente linear de pH 4,7 a 5,9 e em seguida separado em SDS-PAGE 12%. As proteínas foram transferidas para membrana de PVDF e maspina foi detectada. Como controle de *loading* foi utilizada a marcação com anti- β -actina. C. Após quantificação dos spots por densitometria óptica (D.O.), seus valores foram representados graficamente.

6 DISCUSSÃO

Maspina, uma proteína classificada como um supressor de tumor tem diversas atividades biológicas descritas que justificam tal classificação, entre elas estão o aumento da adesão, inibição da migração, controle da expressão gênica, modulação da apoptose e resposta celular ao *stress* oxidativo. Apesar da localização subcelular de maspina ter sido apontada como um dos fatores que regulam as diversas funções biológicas da proteína, inclusive tendo sido relacionada a um indicativo de prognóstico tumoral, pouco se sabe sobre os mecanismos que regulam a localização de maspina nas células. Fato é que o transporte entre esses dois compartimentos é essencial na regulação de diversos processos como a transcrição, transdução de sinais, proliferação e ciclo celular (STRAMBIO-DE-CASTILLIA; NIEPEL; ROUT, 2010; SCHELLHAUS; DE MAGISTRIS; ANTONIN, 2016; TIMNEY et al., 2016). Dessa forma, essa tese teve como objetivos identificar mecanismos envolvidos nessa regulação. Assim, identificamos estímulos externos, como EGF e a interação entre as células, que regulam a localização subcelular de maspina nas células MCF10A. Enquanto EGF atua de forma positiva na translocação nuclear de maspina, a interação entre as células parece ter papel oposto.

Em termos de translocação de proteínas entre o núcleo e o citoplasma, esta pode ocorrer de duas formas, por difusão passiva ou processo ativo, que envolve o gasto de energia. Inicialmente, acreditava-se que o limite de difusão de proteínas pelo complexo de poro nuclear compreendia um diâmetro de cerca de 9 nm, permitindo proteínas de 40 a 60kDa de difundir pelo mesmo (MATTAJ; ENGLMEIER, 1998; GÖRLICH; KUTAY, 1999). Mais tarde, outros trabalhos mostraram que o limite de difusão do poro nuclear é muito maior que 60kDa pois proteínas com mais de 100kDa são capazes de entrar no núcleo das células passivamente. Além disso, a permeabilidade do complexo de poro nuclear envolve mais variáveis que tamanho e massa molecular (WANG; BRATTAIN, 2007; POPKEN et al., 2015). Por outro lado, o processo ativo de translocação de proteínas entre compartimentos é mediado por sequências chamadas de sinal de localização nuclear (NLS) e sinal de exportação nuclear (NES), que são reconhecidas por proteínas adaptadoras responsáveis por facilitar o transporte entre esses compartimentos.

Maspina é uma proteína de 42kDa e por isso deve ser capaz de translocar para o núcleo de forma passiva. No entanto, a transfecção de maspina acoplada a proteína verde fluorescente (GFP) mostrou que a localização da proteína varia de acordo com o tipo celular transfectado, sendo restrita ao citoplasma em células MCF7, MDA-MB-231 e SKBR-3 (BODENSTINE et al., 2014; MACHOWSKA et al., 2014), ou estar presente nos dois compartimentos, núcleo e citoplasma, em células PC3 e H1299 (DZINIC et al., 2013), por exemplo. Esses dados sugerem que a localização de maspina depende do contexto celular. No presente trabalho mostramos alguns fatores que regulam a localização subcelular da proteína maspina.

Estudos abordando maspina são conduzidos em grande parte utilizando-se tecidos ou células tumorais, os quais apresentam muita variação no contexto celular. A fim de compreender os mecanismos que atuam sobre a regulação de maspina em condições não patológicas, e portanto com menor variabilidade, as células MCF10A foram utilizadas. Dentre os fatores solúveis adicionados ao meio de cultivo das células MCF10A, identificamos especificamente EGF como responsável pela localização nuclear de maspina. Esse processo envolve ainda a fosforilação de maspina em resíduos de serina, concomitante com sua desfosforilação em resíduo de tirosina.

Até o momento não foi identificado um NLS clássico de maspina, contudo, dados não publicados do nosso grupo de pesquisa indicam que maspina possui uma sequência de NLS que direciona parte da proteína para o núcleo. Esse dado sugere que maspina pode translocar tanto de forma passiva como ativa para o núcleo. Ademais, o NLS identificado medeia a translocação nuclear de uma construção contendo 5GFPs em células HeLa, porém, a molécula inteira de maspina não é capaz de se translocar da mesma forma, sugerindo portanto que esse NLS está críptico e/ou pode depender de modificações na proteína para possibilitar sua interação com proteínas adaptadoras. Como e se esse NLS é regulado por EGF ainda deve ser esclarecido.

Um dos mecanismos envolvidos na regulação da importação de proteínas pro núcleo inclui a retenção citoplasmática. Um exemplo dessa regulação ocorre com a proteína p53, que semelhante a maspina, sua localização nuclear é fundamental

para garantir sua função de supressor de tumor. Evidências indicam que a proteína Parc atua como uma âncora citoplasmática de p53 já que o *knockdown* de Parc induz a localização nuclear de p53. Aparentemente, Parc indisponibiliza os NLSs de p53 já que interage com a proteína justamente na região C-terminal onde estão localizados os NLS. Em situação de dano ao DNA, a interação de Parc com p53 é perdida e a proteína transloca para o núcleo, e esse processo pode envolver a modificação pós-traducional de p53 (NIKOLAEV et al., 2003).

Segundo dados da literatura, EGF regula a translocação de diversas proteínas para o núcleo, tais como ERK2, PKM2 e STAT5, e esses processos ocorrem mediante modificações pós-traducionais. PKM2 por exemplo, é alvo de fosforilação e acetilação mediante o estímulo de EGF, e essas duas modificações parecem ser essenciais para a translocação dessa proteína (LV et al., 2013; YANG; LU, 2013). No caso de ERK2, a translocação para o núcleo depende da fosforilação de serina em uma sequência de serina-prolina-serina (SPS) que também regula a translocação nuclear em sequências similares em SMAD3 e MEK1 (CHUDERLAND; KONSON; SEGER, 2008). Por outro lado, Stat5 é fosforilado em resíduos de tirosina e transloca para o núcleo em resposta a EGF no fígado de camundongo (RUFF-JAMISON; CHEN; COHEN, 1995).

Similarmente ao que ocorre para outras proteínas que tem sua localização regulada por EGF, nossos dados apontam para uma relação entre os eventos de fosforilação e translocação de maspina. A utilização de inibidores de tirosina fosfatases por exemplo, leva ao acúmulo de maspina no compartimento do citoplasma das células MCF10A (LONGHI; CELLA, 2012). De forma oposta, observamos que o tratamento das mesmas células com EGF parece diminuir os níveis de fosforilação da proteína em resíduos de tirosina e diminuir seus níveis citoplasmáticos. De forma concomitante, ocorre o aumento dos níveis de maspina fosforilada em resíduos de serina e aumento dos níveis nucleares de maspina. Em trabalho recente de Roth e colaboradores foi demonstrado por análises proteômicas que cerca de 93% dos sítios fosforilados após estimulação das células MCF10A com EGF representavam resíduos de serina (ROTH et al., 2018).

Apesar de algumas tentativas de identificação dos resíduos fosforilados de maspina das células MCF10A por espectrometria de massas, esse objetivo não foi

atingido. Como alternativa, maspina foi identificada entre proteínas imunoprecipitadas por anticorpos contra tirosina e serina fosforilados. A fosforilação de maspina em tirosina, serina e treonina foi descrita em alguns trabalhos com mostra a Figura 18.

Figura 18. Identificação de resíduos fosforilados de maspina segundo a literatura. A. Representação gráfica contendo a indicação dos resíduos fosforilados descritos ao longo da sequência de maspina. B. Discriminação dos resíduos fosforilados identificados segundo citações. Caixas vermelhas representam resíduos identificados somente por *highthroughput* MS e azul, identificação por mais de uma técnica.

Narayan e colaboradores verificaram por co-imunoprecipitações de proteínas fosforiladas que tanto maspina do lisado de células epiteliais de córnea quanto de seu meio condicionado apresentaram maspina fosforilada em serina e treonina. Fosforilação em resíduos de tirosina só foram detecadas no lisado total. As

fosforilações de maspina extracelular foram confirmadas por espectrometria de massas (NARAYAN; MIRZA; TWINING, 2011). O significado biológico da fosforilação nessas células também não é conhecido.

Outros trabalhos que identificaram os resíduos de maspina fosforilados utilizaram abordagem de alto rendimento de espectrometria de massa. Entre esses, Tsai e colaboradores identificaram maspina fosforilada após reações de fosforilação *in vitro* utilizando as quinases: caseína quinase 2 (CK2), e EGFR a partir de extrato de células PC9 (linhagem de adenocarcinoma de pulmão humano). O resíduo de maspina fosforilada após reação enzimática com EGFR foi tirosina 356 (TSAI et al., 2015). A fosforilação de maspina em resíduo de tirosina em reação *in vitro* com a quinase de EGFR já tinha sido demonstrada por meio de co-imunoprecipitação (ODERO-MARAH et al., 2002).

A fosforilação de maspina por espectrometria de massa também foi observada em tumores de mama humano por Mertins e colaboradores, sobretudo em resíduos de serina. O que indica que a fosforilação de maspina tem paralelo *in vivo* (MERTINS et al., 2014).

Olsen e colaboradores detectaram maspina fosforilada durante a mitose de células HeLa [linhagem de tumor cervical humano (OLSEN et al., 2010)]. Também em células HeLa a fosforilação de maspina foi identificada nos resíduos de serina 31 e 316 após tratamento das células com EGF por 5 minutos (HUANG et al., 2016). Esse dado está de acordo com nosso ensaio de imunoprecipitação de proteínas fosforiladas usando extrato proteico de células estimuladas com EGF. Interessantemente, segundo predição do programa NetPhos 3.1 (BLOM et al., 2004), os resíduos S31 e S316 poderiam ser fosforilados pela quinase GSK3, um dos alvos de Akt na via de PI3K (score de 0,492 e 0,442, respectivamente). Essa hipótese é coerente com os dados que indicam que a inibição da atividade de Akt promove o bloqueio da translocação de maspina para o núcleo das células já que a fosforilação e a localização subcelular de maspina são eventos relacionados.

Ainda que um NLS não esteja regulando a translocação de maspina para o núcleo, alguns modelos que explicam a localização nuclear de proteínas sugerem que após entrar no núcleo por difusão, a proteína poderia ser retida devido a

interações com outros componentes nucleares como outras proteínas, DNA ou mesmo a lamina nuclear.

De acordo com a literatura, maspina nuclear tem a função de regulação de expressão gênica, interagindo, por exemplo, com HDAC1 (LI et al., 2006b). A regulação da atividade de deacetilases de histona é fundamental para modular a expressão gênica que ocorre durante os processos de desenvolvimento embrionário (BRUNMEIR; LAGGER; SEISER, 2009) e progressão tumoral (KELLY; MARKS, 2005). Em tumores de próstata, a superexpressão de maspina levou ao aumento da expressão de genes alvos de HDAC1 como BAX1, CK8, CK18 e p21 (LI et al., 2006a).

Outro ligante de maspina nuclear é IRF6 (BAILEY et al., 2005b), um fator de transcrição que regula o ciclo celular e quiescência durante a diferenciação celular (BAILEY et al., 2005b). Hipoteticamente, maspina e IRF6 atuam de forma cooperativa para estabelecer a pausa no ciclo celular e diferenciação terminal em células de epitélio mamário durante a lactação (BAILEY et al., 2009). Ainda que os mecanismos envolvidos não estejam claros, foi observado que a fosforilação de IRF6 leva a sua ubiquitinação e degradação pelo proteasoma. Maspina interage preferencialmente com a forma fosforilada de IRF6. Deste modo, foi hipotetizado que maspina atua como uma ancora de IRF6 prevenindo sua degradação e talvez sua translocação nuclear (BAILEY et al., 2008). Em células MCF10A, EGF não é capaz de promover a fosforilação de IRF6 e não induz a entrada no ciclo celular. Portanto, é possível que a translocação de maspina induzida por EGF, pode levar à liberação de IRF6 que poderia promover a parada no ciclo celular para a diferenciação do epitélio mamário. Em concordância com essa hipótese, maspina nuclear correlaciona negativamente com Ki67, um marcador de proliferação. E ainda, camundongos heterozigotos para maspina expressam menores níveis de p21 e p27, inibidores de ciclo celular (SHAO et al., 2008; MACHOWSKA et al., 2014).

A regulação de maspina por EGF em células epiteliais de mama pode ter um paralelo *in vivo*, atuando no desenvolvimento da glândula mamária. Tanto EGF quanto anfiregulina atuam na regulação de maspina nas células MCF10A. Os dois ligantes de EGFR apresentam também papel fundamental na glândula mamária, porém em momentos distintos de seu desenvolvimento. EGF e anfiregulina

compartilham o mesmo domínio de interação com o receptor (SHOYAB et al., 1989; JOHNSON et al., 1993), entretanto, anfiregulina apresenta menor afinidade pelo receptor (JONES; AKITA; SLIWKOWSKI, 1999) e ativa diferentes vias de sinalização, promovendo assim, respostas celulares distintas na glândula mamária (LUETTEKE et al., 1999; MUKHOPADHYAY et al., 2013). Anfiregulina atua de forma parácrina na proliferação do epitélio mediada por estrógeno durante a puberdade, que promove o preenchimento do *fat pad* da glândula mamária (CIARLONI; MALLEPELL; BRISKEN, 2007). Por outro lado, os níveis de EGF aumentam durante a lactação na glândula mamária murina e atua na sobrevivência de células alveolares durante esse estágio (FU et al., 2015). Desta forma, possivelmente a fosforilação de maspina regulada por AREG tem papel distinto de EGF nas células epiteliais já que diferente de EGF, a fosforilação de maspina por AREG não leva à localização nuclear de maspina em células MCF10A (dado não mostrado).

Dentre os processos celulares regulados pela via de PI3K, a proliferação é um evento extensamente estudado. Entretanto, a via de PI3K também é fundamental na regulação do metabolismo, inflamação, sobrevivência, mobilidade e progressão tumoral (VANHAESEBROECK et al., 2010). Akt tem papel central nessa via e a alteração de seus níveis ou sua atividade é um importante fator relacionado a progressão de diversos tumores (SAMUELS et al., 2004; CULLY et al., 2006; FRUMAN; ROMMEL, 2014). Mostramos que a via de PI3K atua na regulação da localização subcelular de maspina até o nível de Akt. Existem dois resíduos fosforilados em Akt mais conhecidos, treonina 308 e serina 473, fosforilados por PDK1 e mTORC2. A fosforilação de Akt em treonina 308 é capaz de promover grande parte da sinalização abaixo de Akt mas para sua ativação completa, é necessário que serina 473 esteja fosforilada (SARBASSOV et al., 2005). A inibição de PDK1 não foi capaz de bloquear a translocação nuclear de maspina. Ao mesmo tempo, verificou-se que a inibição de Akt bloqueou a localização de maspina nuclear, reforçando o papel da via de PI3K na regulação de maspina.

Ainda que PDK1 não seja capaz de inibir a translocação nuclear de maspina, esse dado sugere que a fosforilação de Akt por mTORC2 esteja envolvida na regulação de maspina. Embora rapamicina iniba o complexo mTORC1, dados da literatura indicam que o mesmo não ocorre para mTORC2 (JACINTO et al., 2004; SARBASSOV et al., 2004), e portanto, o tratamento com esse inibidor não indica

regulação de mTORC2 em maspina. Além disso, Akt pode ser modificado em outros resíduos menos estudados mas que também controlam sua atividade nas células. Entre as modificações estão outros resíduos fosforilados (ALESSI et al., 1996; CHEN et al., 2001; CONUS et al., 2002; DI MAIRA et al., 2005; LIAO et al., 2009; GULEN et al., 2012; LIU et al., 2014; LIU; WANG; WEI, 2014), acetilados (SUNDARESAN et al., 2011), oxidados (WANI et al., 2011), glicosilados (PARK; RYU; LEE, 2005; GANDY; ROUNTREE; BIJUR, 2006), ubiquitinados (YANG et al., 2009; BAE et al., 2012; CHAN et al., 2012) e sumoilados (LI et al., 2013; RISSO et al., 2013; HENDRIKS et al., 2014)]. Essas modificações parecem estar relacionadas a estabilidade, conformação, ativação e interações de Akt com outras proteínas.

Além da via de PI3K, a localização de maspina também é regulada por STAT3. Na família das proteínas STAT, STAT3 é amplamente estudado devido ao seu envolvimento com a transdução de sinais estimuladas por fatores de crescimento, que envolvem também a sinalização alterada em tumores. O potencial oncogênico de Stat3 foi observado a partir de sua ativação constitutiva em diversas linhagens de tumors como de mama, gástrico, pulmão, cabeça, pele, prostate e pescoço (LEVY; LEE, 2002; YIN, W. et al., 2006; SANSONE et al., 2007; YOSHIMURA; NAKA; KUBO, 2007). De fato, estudos reportaram o papel de Stat3 na proliferação, angiogênese, resposta imune e metástase (YUE; TURKSON, 2009). Principalmente no contexto tumoral, muitos trabalhos têm indicado que as vias de PI3K e STAT3 estão relacionadas. Células C3H 10T1/2 transfectadas com mutante de PI3K constitutivamente ativo apresentou aumento tanto na fosforilação de STAT3 quanto de seus alvos. O efeito de PI3k na via de STAT3 parece ser mediado pela quinase Tec (HART et al., 2011). O mesmo efeito também foi observado em duas linhagens humanas de tumor, SK-BR-3 e MCF-7 (HART et al., 2011). Apesar desse *crosstalk* ser observado em linhagens tumorais, este pode ter um paralelo em outros modelos não transformados e poderia explicar a regulação de maspina pelas duas vias. Ainda, autores sugerem que a sinalização por Stat3 deve ser analisada levando-se em conta não só os fatores que induzem sua ativação, mas também a confluência das células. Portanto, a variação na localização subcelular de maspina associada a densidade de células plaqueadas pode envolver a proteína STAT3.

Após identificação das vias a jusante de EGFR que regulam maspina, buscamos identificar processos celulares que podem ser afetados por essa

sinalização envolvendo maspina. Dentro das 100 proteínas que co-imunoprecipitam com maspina após a estimulação das células com EGF, os agrupamentos de anotações funcionais com maior *score* analisado pelo software DAVID, encontramos proteínas ribossomais, proteínas envolvidas na adesão célula-célula, proteínas que se ligam a RNA, proteínas envolvidas em *splicing* e proteínas de citoesqueleto. Grande parte das anotações funcionais apontam para proteínas relacionadas com o processamento de RNA. Interessantemente, dados da literatura mostram que a ativação da via de Akt após estímulo das células com EGF, resulta na regulação da maquinaria de *splicing* alternativo. Esse processo envolve a ativação de Akt que atua na regulação da atividade da quinase SRPK. SRPK deixa então de interagir com HSP70, sua âncora citoplasmática, e passa a interagir com HSP90. A troca de chaperonas promove a translocação de SRPK para o núcleo onde a quinase atua em proteínas da família SR envolvidas na regulação do maquinaria de *splicing* (ZHOU et al., 2012). Similarmente, maspina é regulada por Akt após estímulo com EGF, e apresenta também interação com HSP90 após o mesmo estímulo, assim como outras proteínas envolvidas em *splicing*. A interação de maspina com HSP90 já foi reportada anteriormente (YIN et al., 2005a). Deste modo, é possível que maspina atue na regulação do processo de *splicing*. Isso poderia explicar como maspina regula uma gama tão grande de efeitos biológicos como modulação da adesão (CELLA et al., 2006), a inibição do crescimento e a invasão tumoral (ZOU et al., 1994a; SHENG et al., 1996; SHI et al., 2001a), a inibição da angiogênese (ZHANG, M.; VOLPERT, O.; et al., 2000; CHER et al., 2003b), o efeito pró-apoptótico (LATHA et al., 2005a) e o controle da resposta ao stress oxidativo (YIN et al., 2005a).

Entre as proteínas que co-imunoprecipitam com maspina também estão muitas proteínas envolvidas nos eventos de adesão célula-célula. Neste sentido, é interessante notar que nossos dados sugerem que a adesão entre as células também regula a localização subcelular de maspina. O bloqueio da localização nuclear de maspina por sinais oriundos da adesão entre as células pode ser relacionado à inibição do receptor de EGF pela densidade celular saturada (TAKAHASHI; SUZUKI, 1996). Dados da literatura indicam que essa inibição é coordenada pela proteína merlina, responsável pelo bloqueio da proliferação pelo contato celular. Merlina interage indiretamente com EGFR e regula de forma

negativa a sinalização pelo receptor de EGFR a partir do seu confinamento em compartimentos da membrana, que impede tanto sua sinalização quanto sua internalização (CURTO et al., 2007). Também em células confluentes, a proteína p38 α , membro das MAPKs regula de forma negativa os níveis da proteína Sprouty2, um inibidor de cCbl. Deste modo, a atividade de cCbl aumenta e resulta na ubiquitinação e degradação do receptor de EGF (SWAT et al., 2009). Portanto, a atividade de EGFR é negativamente regulada pelo contato celular por ao menos dois mecanismos e possivelmente este é o motivo do padrão de marcação de maspina em células super confluentes diferir do padrão observado para células pouco confluentes. A perturbação do contato entre as células superconfluentes causado pelo tratamento com EGTA, restaura o padrão de marcação de maspina nuclear, mais um indicativo do papel da adesão entre as células sob maspina.

Apesar de não ter sido identificado entre as proteínas que co-imunoprecipitam com maspina por espectrometria de massas, o receptor de EGF foi identificado em experimento de co-imunoprecipitação seguida de *westernblot* como mais uma proteína que interage com maspina. A interação parece aumentar a medida que o tratamento das células com EGF também aumenta.

Os resultados apresentados demonstram como atividades de maspina podem ser reguladas por diferentes fatores a que uma célula é exposta, o que ressalta mais uma vez que o contexto celular é determinante para o estudo dessa proteína. Nossos dados trazem portanto informações relevantes para o desenvolvimento de alvos terapêuticos no tratamento de câncer. Tumores de mama do tipo triplo-negativo (TNBC) por exemplo, são um subtipo muito agressivo que carece de uma terapia efetiva. Esses tumores não apresentam receptores de estrogênio, progesterona e ErbB2 (RAKHA et al., 2009). A expressão de maspina tem correlação com marcadores de TNBC, e está superexpressa em 4 de 7 subtipos dos mesmos (LEHMANN et al., 2011; LAWRENCE et al., 2015). De fato, maspina pode ser utilizada como um marcador do subtipo *basal-like* de TNBC (UMEKITA et al., 2011). Assim como maspina, EGFR também é um marcador molecular de TNBC (REIS-FILHO et al., 2006; KLEIN; LEVITZKI, 2009; LEHMANN et al., 2011; FERRARO et al., 2013). Desta forma, a modulação da atividade de maspina pela via de EGFR nesses tumores poderia representar um importante alvo terapêutico.

7 CONCLUSÃO

Os dados apresentados permitem concluirmos que em células MCF10A:

1. EGFR regula fosforilação de maspina, promovendo a fosforilação da proteína em resíduos de serina e desfosforilação em resíduos de tirosina;
2. EGFR regula também a localização subcelular de maspina, especificamente através das vias de Stat3 e PI3K, levando a sua translocação para o núcleo;
3. Após estímulo das células com EGF, maspina passa a interagir com proteínas envolvidas nos processos de splicing, adesão entre células, além de proteínas ribossomais e de citoesqueleto;
4. Nas condições analisadas, a adesão entre células e substrato não regulam a fosforilação de maspina;
5. A adesão entre células dependente de íons cálcio inibe a localização nuclear de maspina;

REFERÊNCIAS *

AKIYAMA, Y.; MAESAWA, C.; OGASAWARA, S.; TERASHIMA, M.; MASUDA, T. Cell-type-specific repression of the maspin gene is disrupted frequently by demethylation at the promoter region in gastric intestinal metaplasia and cancer cells. **Am J Pathol**, v. 163, n. 5, p. 1911-9, Nov 2003.

AL-AYYOUBI, M.; GETTINS, P. G.; VOLZ, K. Crystal structure of human maspin, a serpin with antitumor properties: reactive center loop of maspin is exposed but constrained. **J Biol Chem**, v. 279, n. 53, p. 55540-4, Dec 2004.

ALESSI, D. R.; ANDJELKOVIC, M.; CAUDWELL, B.; CRON, P.; MORRICE, N.; COHEN, P.; HEMMINGS, B. A. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. **EMBO J**, v. 15, n. 23, p. 6541-51, Dec 1996.

AVRUCH, J.; KHOKHLATCHEV, A.; KYRIAKIS, J. M.; LUO, Z.; TZIVION, G.; VAVVAS, D.; ZHANG, X. F. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. **Recent Prog Horm Res**, v. 56, p. 127-55, 2001.

BAE, S.; KIM, S. Y.; JUNG, J. H.; YOON, Y.; CHA, H. J.; LEE, H.; KIM, K.; KIM, J.; AN, I. S.; UM, H. D.; PARK, I. C.; LEE, S. J.; NAM, S. Y.; JIN, Y. W.; LEE, J. H.; AN, S. Akt is negatively regulated by the MULAN E3 ligase. **Cell Res**, v. 22, n. 5, p. 873-85, May 2012.

BAILEY, C. M.; ABBOTT, D. E.; MARGARYAN, N. V.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; HENDRIX, M. J. Interferon regulatory factor 6 promotes cell cycle arrest and is regulated by the proteasome in a cell cycle-dependent manner. **Mol Cell Biol**, v. 28, n. 7, p. 2235-43, Apr 2008.

BAILEY, C. M.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; KONDO, S.; MARGARYAN, N. V.; SEFTOR, R. E.; WHEATON, W. W.; AMIR, S.; PINS, M. R.; SCHUTTE, B. C.; HENDRIX, M. J. Mammary serine protease inhibitor (Maspin) binds directly to interferon regulatory factor 6: identification of a novel serpin partnership. **J Biol Chem**, v. 280, n. 40, p. 34210-7, Oct 7 2005a.

_____. Mammary serine protease inhibitor (Maspin) binds directly to interferon regulatory factor 6: identification of a novel serpin partnership. **J Biol Chem**, v. 280, n. 40, p. 34210-7, Oct 2005b.

BAILEY, C. M.; MARGARYAN, N. V.; ABBOTT, D. E.; SCHUTTE, B. C.; YANG, B.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; HENDRIX, M. J. Temporal and spatial expression patterns for the tumor suppressor Maspin and its binding partner interferon regulatory factor 6 during breast development. **Dev Growth Differ**, v. 51, n. 5, p. 473-81, Jun 2009.

BAL, N.; KOCER, N. E.; ERTORER, M. E.; CANPOLAT, E. T.; KAYASELCUK, F. Maspin, E-selectin, and P-selectin expressions in papillary thyroid carcinomas and their correlation with prognostic parameters. **Pathol Res Pract**, v. 204, n. 10, p. 743-50, 2008.

BARTUSKI, A. J.; KAMACHI, Y.; SCHICK, C.; OVERHAUSER, J.; SILVERMAN, G. A. Cytoplasmic antiproteinase 2 (PI8) and bomapin (PI10) map to the serpin cluster at 18q21.3. **Genomics**, v. 43, n. 3, p. 321-8, Aug 1997.

BASS, R.; FERNANDEZ, A. M.; ELLIS, V. Maspin inhibits cell migration in the absence of protease inhibitory activity. **J Biol Chem**, v. 277, n. 49, p. 46845-8, Dec 6 2002.

BATZER, A. G.; ROTIN, D.; UREÑA, J. M.; SKOLNIK, E. Y.; SCHLESSINGER, J. Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. **Mol Cell Biol**, v. 14, n. 8, p. 5192-201, Aug 1994.

BENDTSEN, J. D.; JENSEN, L. J.; BLOM, N.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. **Protein Eng Des Sel**, v. 17, n. 4, p. 349-56, Apr 2004.

BETTSTETTER, M.; WOENCKHAUS, M.; WILD, P. J.; RÜMMELE, P.; BLASZYK, H.; HARTMANN, A.; HOFSTÄDTER, F.; DIETMAIER, W. Elevated nuclear maspin expression is associated with microsatellite instability and high tumour grade in colorectal cancer. **J Pathol**, v. 205, n. 5, p. 606-14, Apr 2005.

BILIRAN, H.; SHENG, S. Pleiotrophic inhibition of pericellular urokinase-type plasminogen activator system by endogenous tumor suppressive maspin. **Cancer Res**, v. 61, n. 24, p. 8676-82, Dec 2001.

BLACQUE, O. E.; WORRALL, D. M. Evidence for a direct interaction between the tumor suppressor serpin, maspin, and types I and III collagen. **J Biol Chem**, v. 277, n. 13, p. 10783-8, Mar 29 2002.

BLOM, N.; SICHERITZ-PONTÉN, T.; GUPTA, R.; GAMMELTOFT, S.; BRUNAK, S. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. **Proteomics**, v. 4, n. 6, p. 1633-49, Jun 2004.

BODENSTINE, T. M.; SEFTOR, R. E.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; SEFTOR, E. A.; PEMBERTON, P. A.; HENDRIX, M. J. Maspin: molecular mechanisms and therapeutic implications. **Cancer Metastasis Rev**, Jul 2012.

BODENSTINE, T. M.; SEFTOR, R. E.; SEFTOR, E. A.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; SAMII, N. A.; MONARREZ, J. C.; CHANDLER, G. S.; PEMBERTON, P. A.; HENDRIX, M. J. Internalization by multiple endocytic pathways and lysosomal processing impact maspin-based therapeutics. **Mol Cancer Res**, v. 12, n. 10, p. 1480-91, Oct 2014.

BOGGON, T. J.; MURRAY, J.; CHAPPUIS-FLAMENT, S.; WONG, E.; GUMBINER, B. M.; SHAPIRO, L. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. **Science**, v. 296, n. 5571, p. 1308-13, May 2002.

BOLTZE, C.; SCHNEIDER-STOCK, R.; QUEDNOW, C.; HINZE, R.; MAWRIN, C.; HRIBASCHEK, A.; ROESSNER, A.; HOANG-VU, C. Silencing of the maspin gene by promoter hypermethylation in thyroid cancer. **Int J Mol Med**, v. 12, n. 4, p. 479-84, Oct 2003.

BRUNMEIR, R.; LAGGER, S.; SEISER, C. Histone deacetylase HDAC1/HDAC2-controlled embryonic development and cell differentiation. **Int J Dev Biol**, v. 53, n. 2-3, p. 275-89, 2009.

BURNESS, M. L.; GRUSHKO, T. A.; OLOPADE, O. I. Epidermal growth factor receptor in triple-negative and basal-like breast cancer: promising clinical target or only a marker? **Cancer J**, v. 16, n. 1, p. 23-32, 2010 Jan-Feb 2010.

CAO, X.; TAY, A.; GUY, G. R.; TAN, Y. H. Activation and association of Stat3 with Src in v-Src-transformed cell lines. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 4, p. 1595-603, Apr 1996.

CARPENTER, G.; KING, L.; COHEN, S. Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. **Nature**, v. 276, n. 5686, p. 409-10, Nov 1978.

CELLA, N.; CONTRERAS, A.; LATHA, K.; ROSEN, J. M.; ZHANG, M. Maspin is physically associated with [beta]1 integrin regulating cell adhesion in mammary epithelial cells. **Faseb J**, v. 20, n. 9, p. 1510-2, Jul 2006.

CHAN, C. H.; LI, C. F.; YANG, W. L.; GAO, Y.; LEE, S. W.; FENG, Z.; HUANG, H. Y.; TSAI, K. K.; FLORES, L. G.; SHAO, Y.; HAZLE, J. D.; YU, D.; WEI, W.; SARBASSOV, D.; HUNG, M. C.; NAKAYAMA, K. I.; LIN, H. K. The Skp2-SCF E3 ligase regulates Akt ubiquitination, glycolysis, herceptin sensitivity, and tumorigenesis. **Cell**, v. 149, n. 5, p. 1098-111, May 2012.

CHATTOPADHYAY, A.; VECCHI, M.; JI, Q.; MERNAUGH, R.; CARPENTER, G. The role of individual SH2 domains in mediating association of phospholipase C-gamma1 with the activated EGF receptor. **J Biol Chem**, v. 274, n. 37, p. 26091-7, Sep 1999.

CHEN, C. Z.; LI, L.; LODISH, H. F.; BARTEL, D. P. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. **Science**, v. 303, n. 5654, p. 83-6, Jan 2004.

CHEN, R.; KIM, O.; YANG, J.; SATO, K.; EISENMANN, K. M.; MCCARTHY, J.; CHEN, H.; QIU, Y. Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. **J Biol Chem**, v. 276, n. 34, p. 31858-62, Aug 2001.

CHER, M. L.; BILIRAN, H. R.; BHAGAT, S.; MENG, Y.; CHE, M.; LOCKETT, J.; ABRAMS, J.; FRIDMAN, R.; ZACHAREAS, M.; SHENG, S. Maspin expression inhibits osteolysis, tumor growth, and angiogenesis in a model of prostate cancer bone metastasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 13, p. 7847-52, Jun 2003a.

CHER, M. L.; BILIRAN, H. R., JR.; BHAGAT, S.; MENG, Y.; CHE, M.; LOCKETT, J.; ABRAMS, J.; FRIDMAN, R.; ZACHAREAS, M.; SHENG, S. Maspin expression inhibits osteolysis, tumor growth, and angiogenesis

in a model of prostate cancer bone metastasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 13, p. 7847-52, Jun 24 2003b.

CHOU, R. H.; WANG, Y. N.; HSIEH, Y. H.; LI, L. Y.; XIA, W.; CHANG, W. C.; CHANG, L. C.; CHENG, C. C.; LAI, C. C.; HSU, J. L.; CHANG, W. J.; CHIANG, S. Y.; LEE, H. J.; LIAO, H. W.; CHUANG, P. H.; CHEN, H. Y.; WANG, H. L.; KUO, S. C.; CHEN, C. H.; YU, Y. L.; HUNG, M. C. EGFR modulates DNA synthesis and repair through Tyr phosphorylation of histone H4. **Dev Cell**, v. 30, n. 2, p. 224-37, Jul 2014.

CHUA, R.; SETZER, S.; GOVINDARAJAN, B.; SEXTON, D.; COHEN, C.; ARBISER, J. L. Maspin expression, angiogenesis, prognostic parameters, and outcome in malignant melanoma. **J Am Acad Dermatol**, v. 60, n. 5, p. 758-66, May 2009.

CHUDERLAND, D.; KONSON, A.; SEGER, R. Identification and characterization of a general nuclear translocation signal in signaling proteins. **Mol Cell**, v. 31, n. 6, p. 850-61, Sep 2008.

CIARLONI, L.; MALLEPELL, S.; BRISKEN, C. Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor alpha function in mammary gland development. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 13, p. 5455-60, Mar 2007.

CITRI, A.; SKARIA, K. B.; YARDEN, Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. **Exp Cell Res**, v. 284, n. 1, p. 54-65, Mar 2003.

COHEN, S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. **J Biol Chem**, v. 237, p. 1555-62, May 1962.

CONUS, N. M.; HANNAN, K. M.; CRISTIANO, B. E.; HEMMINGS, B. A.; PEARSON, R. B. Direct identification of tyrosine 474 as a regulatory phosphorylation site for the Akt protein kinase. **J Biol Chem**, v. 277, n. 41, p. 38021-8, Oct 2002.

CORSON, J. M.; PINKUS, G. S. Mesothelioma: profile of keratin proteins and carcinoembryonic antigen: an immunoperoxidase study of 20 cases and comparison with pulmonary adenocarcinomas. **Am J Pathol**, v. 108, n. 1, p. 80-8, Jul 1982.

COX, J.; NEUHAUSER, N.; MICHALSKI, A.; SCHELTEMA, R. A.; OLSEN, J. V.; MANN, M. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. **J Proteome Res**, v. 10, n. 4, p. 1794-805, Apr 2011.

CROCE, C. M.; CALIN, G. A. miRNAs, cancer, and stem cell division. **Cell**, v. 122, n. 1, p. 6-7, Jul 2005.

CULLY, M.; YOU, H.; LEVINE, A. J.; MAK, T. W. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 3, p. 184-92, Mar 2006.

CURTO, M.; COLE, B. K.; LALLEMAND, D.; LIU, C. H.; MCCLATCHEY, A. I. Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. **J Cell Biol**, v. 177, n. 5, p. 893-903, Jun 2007.

DACHS, G. U.; TOZER, G. M. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. **Eur J Cancer**, v. 36, n. 13 Spec No, p. 1649-60, Aug 2000.

DAVID, M.; WONG, L.; FLAVELL, R.; THOMPSON, S. A.; WELLS, A.; LARNER, A. C.; JOHNSON, G. R. STAT activation by epidermal growth factor (EGF) and amphiregulin. Requirement for the EGF receptor kinase but not for tyrosine phosphorylation sites or JAK1. **J Biol Chem**, v. 271, n. 16, p. 9185-8, Apr 1996.

DAWSON, J. P.; BERGER, M. B.; LIN, C. C.; SCHLESSINGER, J.; LEMMON, M. A.; FERGUSON, K. M. Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-induced conformational changes in the dimer interface. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 17, p. 7734-42, Sep 2005.

DE DONATIS, A.; RANALDI, F.; CIRRI, P. Reciprocal control of cell proliferation and migration. **Cell Commun Signal**, v. 8, p. 20, 2010.

DEAN, I.; DZINIC, S. H.; BERNARDO, M. M.; ZOU, Y.; KIMLER, V.; LI, X.; KAPLUN, A.; GRANNEMAN, J.; MAO, G.; SHENG, S. The secretion and biological function of tumor suppressor maspin as an exosome cargo protein. **Oncotarget**, v. 8, n. 5, p. 8043-8056, Jan 2017.

DELON, I.; BROWN, N. H. Integrins and the actin cytoskeleton. **Curr Opin Cell Biol**, v. 19, n. 1, p. 43-50, Feb 2007.

DI MAIRA, G.; SALVI, M.; ARRIGONI, G.; MARIN, O.; SARNO, S.; BRUSTOLON, F.; PINNA, L. A.; RUZZENE, M. Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. **Cell Death Differ**, v. 12, n. 6, p. 668-77, Jun 2005.

DITTMANN, K.; MAYER, C.; FEHRENBACHER, B.; SCHALLER, M.; RAJU, U.; MILAS, L.; CHEN, D. J.; KEHLBACH, R.; RODEMANN, H. P. Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. **J Biol Chem**, v. 280, n. 35, p. 31182-9, Sep 2005.

DITTMANN, K.; MAYER, C.; RODEMANN, H. P. Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity. **Radiother Oncol**, v. 76, n. 2, p. 157-61, Aug 2005.

DOMANN, F. E.; RICE, J. C.; HENDRIX, M. J.; FUTSCHER, B. W. Epigenetic silencing of maspin gene expression in human breast cancers. **Int J Cancer**, v. 85, n. 6, p. 805-10, Mar 2000.

DUAN, H.; ZHANG, H. J.; YANG, J. Q.; OBERLEY, L. W.; FUTSCHER, B. W.; DOMANN, F. E. MnSOD up-regulates maspin tumor suppressor gene expression in human breast and prostate cancer cells. **Antioxid Redox Signal**, v. 5, n. 5, p. 677-88, Oct 2003.

DZINIC, S. H.; BERNARDO, M. M.; LI, X.; FERNANDEZ-VALDIVIA, R.; HO, Y. S.; MI, Q. S.; BANDYOPADHYAY, S.; LONARDO, F.; VRANIC, S.; OLIVEIRA, D. S.; BONFIL, R. D.; DYSON, G.; CHEN, K.; OMEROVIC, A.; SHENG, X.; HAN, X.; WU, D.; BI, X.; CABARAVDIC, D.; JAKUPOVIC, U.; WAHBA, M.; PANG, A.; HARAJLI, D.; SAKR, W. A.; SHENG, S. An Essential Role of Maspin in Embryogenesis and Tumor Suppression. **Cancer Res**, v. 77, n. 4, p. 886-896, Feb 2017.

DZINIC, S. H.; KAPLUN, A.; LI, X.; BERNARDO, M.; MENG, Y.; DEAN, I.; KRASS, D.; STEMMER, P.; SHIN, N.; LONARDO, F.; SHENG, S. Identification of an intrinsic determinant critical for maspin subcellular localization and function. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e74502, 2013.

ECCLES, S. A. The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. **Int J Dev Biol**, v. 55, n. 7-9, p. 685-96, 2011.

EITEL, J. A.; BIJANGI-VISHEHSARAEI, K.; SAADATZADEH, M. R.; BHAVSAR, J. R.; MURPHY, M. P.; POLLOK, K. E.; MAYO, L. D. PTEN and p53 are required for hypoxia induced expression of maspin in glioblastoma cells. **Cell Cycle**, v. 8, n. 6, p. 896-901, Mar 2009.

ENDSLEY, M. P.; HU, Y.; DENG, Y.; HE, X.; WAREJCKA, D. J.; TWINING, S. S.; GONIAS, S. L.; ZHANG, M. Maspin, the molecular bridge between the plasminogen activator system and beta1 integrin that facilitates cell adhesion. **J Biol Chem**, v. 286, n. 28, p. 24599-607, Jul 2011.

FAES, S.; DORMOND, O. PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 9, p. 21138-52, 2015.

FAN, R.; KIM, N. G.; GUMBINER, B. M. Regulation of Hippo pathway by mitogenic growth factors via phosphoinositide 3-kinase and phosphoinositide-dependent kinase-1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 7, p. 2569-74, Feb 2013.

FERRARO, D. A.; GABORIT, N.; MARON, R.; COHEN-DVASHI, H.; PORAT, Z.; PAREJA, F.; LAVI, S.; LINDZEN, M.; BEN-CHETRIT, N.; SELA, M.; YARDEN, Y. Inhibition of triple-negative breast cancer models by combinations of antibodies to EGFR. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 5, p. 1815-20, Jan 2013.

FITZGERALD, M.; OSHIRO, M.; HOLTAN, N.; KRAGER, K.; CULLEN, J. J.; FUTSCHER, B. W.; DOMANN, F. E. Human pancreatic carcinoma cells activate maspin expression through loss of epigenetic control. **Neoplasia**, v. 5, n. 5, p. 427-36, 2003 Sep-Oct 2003.

FRUMAN, D. A.; ROMMEL, C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. **Nat Rev Drug Discov**, v. 13, n. 2, p. 140-56, Feb 2014.

FU, N. Y.; RIOS, A. C.; PAL, B.; SOETANTO, R.; LUN, A. T.; LIU, K.; BECK, T.; BEST, S. A.; VAILLANT, F.; BOUILLET, P.; STRASSER, A.; PREISS, T.; SMYTH, G. K.; LINDEMAN, G. J.; VISVADER, J. E. EGF-mediated

induction of Mcl-1 at the switch to lactation is essential for alveolar cell survival. **Nat Cell Biol**, v. 17, n. 4, p. 365-75, Apr 2015.

FUTSCHER, B. W.; OSHIRO, M. M.; WOZNIAK, R. J.; HOLTAN, N.; HANIGAN, C. L.; DUAN, H.; DOMANN, F. E. Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. **Nat Genet**, v. 31, n. 2, p. 175-9, Jun 2002.

GAESTEL, M. MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, n. 2, p. 120-30, Feb 2006.

GANDY, J. C.; ROUNTREE, A. E.; BIJUR, G. N. Akt1 is dynamically modified with O-GlcNAc following treatments with PUGNAc and insulin-like growth factor-1. **FEBS Lett**, v. 580, n. 13, p. 3051-8, May 2006.

GAO, F.; SHI, H. Y.; DAUGHTY, C.; CELLA, N.; ZHANG, M. Maspin plays an essential role in early embryonic development. **Development**, v. 131, n. 7, p. 1479-89, Apr 2004.

GARRETT, T. P.; MCKERN, N. M.; LOU, M.; ELLEMAN, T. C.; ADAMS, T. E.; LOVRECZ, G. O.; ZHU, H. J.; WALKER, F.; FRENKEL, M. J.; HOYNE, P. A.; JORISSEN, R. N.; NICE, E. C.; BURGESS, A. W.; WARD, C. W. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. **Cell**, v. 110, n. 6, p. 763-73, Sep 2002.

GÖRLICH, D.; KUTAY, U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 15, p. 607-60, 1999.

GOULET, B.; CHAN, G.; CHAMBERS, A. F.; LEWIS, J. D. An emerging role for the nuclear localization of maspin in the suppression of tumor progression and metastasis. **Biochem Cell Biol**, v. 90, n. 1, p. 22-38, Feb 2012.

GOULET, B.; KENNETTE, W.; ABLACK, A.; POSTENKA, C. O.; HAGUE, M. N.; MYMRYK, J. S.; TUCK, A. B.; GIGUÈRE, V.; CHAMBERS, A. F.; LEWIS, J. D. Nuclear localization of maspin is essential for its inhibition of tumor growth and metastasis. **Lab Invest**, v. 91, n. 8, p. 1181-7, Aug 2011.

GUÉRIN, M.; GABILLOT, M.; MATHIEU, M. C.; TRAVAGLI, J. P.; SPIELMANN, M.; ANDRIEU, N.; RIOU, G. Structure and expression of c-erbB-2 and EGF receptor genes in inflammatory and non-inflammatory breast cancer: prognostic significance. **Int J Cancer**, v. 43, n. 2, p. 201-8, Feb 1989.

GULEN, M. F.; BULEK, K.; XIAO, H.; YU, M.; GAO, J.; SUN, L.; BEUREL, E.; KAIDANOVICH-BEILIN, O.; FOX, P. L.; DICORLETO, P. E.; WANG, J. A.; QIN, J.; WALD, D. N.; WOODGETT, J. R.; JOPE, R. S.; CARMAN, J.; DONGRE, A.; LI, X. Inactivation of the enzyme GSK3 α by the kinase IKKi promotes AKT-mTOR signaling pathway that mediates interleukin-1-induced Th17 cell maintenance. **Immunity**, v. 37, n. 5, p. 800-12, Nov 2012.

HAJRA, K. M.; FEARON, E. R. Cadherin and catenin alterations in human cancer. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 34, n. 3, p. 255-68, Jul 2002.

HALLBERG, B.; RAYTER, S. I.; DOWNWARD, J. Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. **J Biol Chem**, v. 269, n. 6, p. 3913-6, Feb 1994.

HANADA, N.; LO, H. W.; DAY, C. P.; PAN, Y.; NAKAJIMA, Y.; HUNG, M. C. Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor. **Mol Carcinog**, v. 45, n. 1, p. 10-7, Jan 2006.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011.

HART, J. R.; LIAO, L.; YATES, J. R.; VOGT, P. K. Essential role of Stat3 in PI3K-induced oncogenic transformation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 32, p. 13247-52, Aug 2011.

HARTE, M. T.; GENTRY, L. E. Mutations within subdomain II of the extracellular region of epidermal growth factor receptor selectively alter TGF alpha binding. **Arch Biochem Biophys**, v. 322, n. 2, p. 378-89, Oct 1995.

HAURA, E. B.; TURKSON, J.; JOVE, R. Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 2, n. 6, p. 315-24, Jun 2005.

HENDRIKS, I. A.; D'SOUZA, R. C.; YANG, B.; VERLAAN-DE VRIES, M.; MANN, M.; VERTEGAAL, A. C. Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner. **Nat Struct Mol Biol**, v. 21, n. 10, p. 927-36, Oct 2014.

HILL, C. S.; TREISMAN, R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 199-211, Jan 1995.

HINKLE, C. L.; MOHAN, M. J.; LIN, P.; YEUNG, N.; RASMUSSEN, F.; MILLA, M. E.; MOSS, M. L. Multiple metalloproteinases process protransforming growth factor-alpha (proTGF-alpha). **Biochemistry**, v. 42, n. 7, p. 2127-36, Feb 2003.

HONG, L.; SCHROTH, G. P.; MATTHEWS, H. R.; YAU, P.; BRADBURY, E. M. Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. **J Biol Chem**, v. 268, n. 1, p. 305-14, Jan 1993.

HONG, S. N.; LEE, J. K.; CHOE, W. H.; HA, H. Y.; PARK, K.; SUNG, I. K.; LEE, K. T.; KIM, J. J.; RHEE, J. C. The effect of aberrant maspin expression on the invasive ability of pancreatic ductal adenocarcinoma cells. **Oncol Rep**, v. 21, n. 2, p. 425-30, Feb 2009.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; TAN, Q.; KIR, J.; LIU, D.; BRYANT, D.; GUO, Y.; STEPHENS, R.; BASELER, M. W.; LANE, H. C.; LEMPICKI, R. A. DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. **Nucleic Acids Res**, v. 35, n. Web Server issue, p. W169-75, Jul 2007.

HUANG, H.; HAAR PETERSEN, M.; IBAÑEZ-VEA, M.; LASSEN, P. S.; LARSEN, M. R.; PALMISANO, G. Simultaneous Enrichment of Cysteine-containing Peptides and Phosphopeptides Using a Cysteine-specific Phosphonate Adaptable Tag (CysPAT) in Combination with titanium dioxide (TiO₂) Chromatography. **Mol Cell Proteomics**, v. 15, n. 10, p. 3282-3296, Oct 2016.

HUNG, L. Y.; TSENG, J. T.; LEE, Y. C.; XIA, W.; WANG, Y. N.; WU, M. L.; CHUANG, Y. H.; LAI, C. H.; CHANG, W. C. Nuclear epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in activating Aurora-A gene expression. **Nucleic Acids Res**, v. 36, n. 13, p. 4337-51, Aug 2008.

HUNTINGTON, J. A.; READ, R. J.; CARRELL, R. W. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. **Nature**, v. 407, n. 6806, p. 923-6, Oct 2000.

HYNES, N. E.; LANE, H. A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 5, p. 341-54, May 2005.

INAGI, R.; MIYATA, T.; IMASAWA, T.; NANGAKU, M.; KUROKAWA, K. Mesangial cell-predominant gene, megsin. **Nephrol Dial Transplant**, v. 17 Suppl 9, p. 32-3, 2002.

INAGI, R.; MIYATA, T.; NANGAKU, M.; UEYAMA, H.; TAKEYAMA, K.; KATO, S.; KUROKAWA, K. Transcriptional regulation of a mesangium-predominant gene, megsin. **J Am Soc Nephrol**, v. 13, n. 11, p. 2715-22, Nov 2002.

IORIO, M. V.; FERRACIN, M.; LIU, C. G.; VERONESE, A.; SPIZZO, R.; SABBIONI, S.; MAGRI, E.; PEDRIALI, M.; FABBRI, M.; CAMPIGLIO, M.; MÉNARD, S.; PALAZZO, J. P.; ROSENBERG, A.; MUSIANI, P.; VOLINIA, S.; NENCI, I.; CALIN, G. A.; QUERZOLI, P.; NEGRINI, M.; CROCE, C. M. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. **Cancer Res**, v. 65, n. 16, p. 7065-70, Aug 2005.

IRVING, J. A.; PIKE, R. N.; DAI, W.; BRÖMME, D.; WORRALL, D. M.; SILVERMAN, G. A.; COETZER, T. H.; DENNISON, C.; BOTTOMLEY, S. P.; WHISSTOCK, J. C. Evidence that serpin architecture intrinsically supports papain-like cysteine protease inhibition: engineering alpha(1)-antitrypsin to inhibit cathepsin proteases. **Biochemistry**, v. 41, n. 15, p. 4998-5004, Apr 2002.

JACINTO, E.; LOEWITH, R.; SCHMIDT, A.; LIN, S.; RÜEGG, M. A.; HALL, A.; HALL, M. N. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. **Nat Cell Biol**, v. 6, n. 11, p. 1122-8, Nov 2004.

JIANG, N.; MENG, Y.; ZHANG, S.; MENSAH-OSMAN, E.; SHENG, S. Maspin sensitizes breast carcinoma cells to induced apoptosis. **Oncogene**, v. 21, n. 26, p. 4089-98, Jun 2002.

JOHNSON, G. R.; KANNAN, B.; SHOYAB, M.; STROMBERG, K. Amphiregulin induces tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor and p185erbB2. Evidence that amphiregulin acts exclusively through the epidermal growth factor receptor at the surface of human epithelial cells. **J Biol Chem**, v. 268, n. 4, p. 2924-31, Feb 1993.

JONES, J. T.; AKITA, R. W.; SLIWKOWSKI, M. X. Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. **FEBS Lett**, v. 447, n. 2-3, p. 227-31, Mar 1999.

KELLY, W. K.; MARKS, P. A. Drug insight: Histone deacetylase inhibitors--development of the new targeted anticancer agent suberoylanilide hydroxamic acid. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 2, n. 3, p. 150-7, Mar 2005.

KHALKHALI-ELLIS, Z.; HENDRIX, M. J. Elucidating the function of secreted maspin: inhibiting cathepsin D-mediated matrix degradation. **Cancer Res**, v. 67, n. 8, p. 3535-9, Apr 2007.

KIM, S.; HAN, J.; KIM, J.; PARK, C. Maspin expression is transactivated by p63 and is critical for the modulation of lung cancer progression. **Cancer Res**, v. 64, n. 19, p. 6900-5, Oct 2004.

KINOSHITA, E.; KINOSHITA-KIKUTA, E.; TAKIYAMA, K.; KOIKE, T. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. **Mol Cell Proteomics**, v. 5, n. 4, p. 749-57, Apr 2006.

KLEIN, S.; LEVITZKI, A. Targeting the EGFR and the PKB pathway in cancer. **Curr Opin Cell Biol**, v. 21, n. 2, p. 185-93, Apr 2009.

KNUDSEN, S. L.; MAC, A. S.; HENRIKSEN, L.; VAN DEURS, B.; GRØVDAL, L. M. EGFR signaling patterns are regulated by its different ligands. **Growth Factors**, v. 32, n. 5, p. 155-63, Oct 2014.

KYPRIANOU, N.; ENGLISH, H. F.; DAVIDSON, N. E.; ISAACS, J. T. Programmed cell death during regression of the MCF-7 human breast cancer following estrogen ablation. **Cancer Res**, v. 51, n. 1, p. 162-6, Jan 1991.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970.

LAIRD, P. W.; JAENISCH, R. DNA methylation and cancer. **Hum Mol Genet**, v. 3 Spec No, p. 1487-95, 1994.

LAM, Y. W.; YUAN, Y.; ISAAC, J.; BABU, C. V.; MELLER, J.; HO, S. M. Comprehensive identification and modified-site mapping of S-nitrosylated targets in prostate epithelial cells. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9075, 2010.

LANGHOFER, M.; HOPKINSON, S. B.; JONES, J. C. The matrix secreted by 804G cells contains laminin-related components that participate in hemidesmosome assembly in vitro. **J Cell Sci**, v. 105 (Pt 3), p. 753-64, Jul 1993.

LATHA, K.; ZHANG, W.; CELLA, N.; SHI, H. Y.; ZHANG, M. Maspin mediates increased tumor cell apoptosis upon induction of the mitochondrial permeability transition. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 5, p. 1737-48, Mar 2005a.

_____. Maspin mediates increased tumor cell apoptosis upon induction of the mitochondrial permeability transition. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 5, p. 1737-48, Mar 2005b.

LAW, R. H.; IRVING, J. A.; BUCKLE, A. M.; RUZYLA, K.; BUZZA, M.; BASHTANNYK-PUHALOVICH, T. A.; BEDDOE, T. C.; NGUYEN, K.; WORRALL, D. M.; BOTTOMLEY, S. P.; BIRD, P. I.; ROSSJOHN, J.; WHISSTOCK, J. C. The high resolution crystal structure of the human tumor suppressor maspin reveals a novel conformational switch in the G-helix. **J Biol Chem**, v. 280, n. 23, p. 22356-64, Jun 2005.

LAW, R. H.; ZHANG, Q.; MCGOWAN, S.; BUCKLE, A. M.; SILVERMAN, G. A.; WONG, W.; ROSADO, C. J.; LANGENDORF, C. G.; PIKE, R. N.; BIRD, P. I.; WHISSTOCK, J. C. An overview of the serpin superfamily. **Genome Biol**, v. 7, n. 5, p. 216, 2006.

LAWRENCE, R. T.; PEREZ, E. M.; HERNÁNDEZ, D.; MILLER, C. P.; HAAS, K. M.; IRIE, H. Y.; LEE, S. I.; BLAU, C. A.; VILLÉN, J. The proteomic landscape of triple-negative breast cancer. **Cell Rep**, v. 11, n. 4, p. 630-44, Apr 2015.

LEHMANN, B. D.; BAUER, J. A.; CHEN, X.; SANDERS, M. E.; CHAKRAVARTHY, A. B.; SHYR, Y.; PIETENPOL, J. A. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **J Clin Invest**, v. 121, n. 7, p. 2750-67, Jul 2011.

LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 141, n. 7, p. 1117-34, Jun 25

LEPCZYŃSKI, A.; OŹGO, M.; DRATWA-CHAŁUPNIK, A.; ROBAK, P.; PYĆ, A.; ZABORSKI, D.; HEROSIMCZYK, A. An update on medium- and low-abundant blood plasma proteome of horse. **Animal**, v. 12, n. 1, p. 76-87, Jan 2018.

LEVY, D. E.; LEE, C. K. What does Stat3 do? **J Clin Invest**, v. 109, n. 9, p. 1143-8, May 2002.

LI, R.; WEI, J.; JIANG, C.; LIU, D.; DENG, L.; ZHANG, K.; WANG, P. Akt SUMOylation regulates cell proliferation and tumorigenesis. **Cancer Res**, v. 73, n. 18, p. 5742-53, Sep 2013.

LI, X.; CHEN, D.; YIN, S.; MENG, Y.; YANG, H.; LANDIS-PIWOWAR, K. R.; LI, Y.; SARKAR, F. H.; REDDY, G. P.; DOU, Q. P.; SHENG, S. Maspin augments proteasome inhibitor-induced apoptosis in prostate cancer cells. **J Cell Physiol**, v. 212, n. 2, p. 298-306, Aug 2007.

LI, X.; YIN, S.; MENG, Y.; SAKR, W.; SHENG, S. Endogenous inhibition of histone deacetylase 1 by tumor-suppressive maspin. **Cancer Res**, v. 66, n. 18, p. 9323-9, Sep 15 2006a.

_____. Endogenous inhibition of histone deacetylase 1 by tumor-suppressive maspin. **Cancer Res**, v. 66, n. 18, p. 9323-9, Sep 2006b.

LI, Z.; SHI, H. Y.; ZHANG, M. Targeted expression of maspin in tumor vasculatures induces endothelial cell apoptosis. **Oncogene**, v. 24, n. 12, p. 2008-19, Mar 2005.

LIAO, Y.; WEI, Y.; ZHOU, X.; YANG, J. Y.; DAI, C.; CHEN, Y. J.; AGARWAL, N. K.; SARBASSOV, D.; SHI, D.; YU, D.; HUNG, M. C. Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase Pin1 is critical for the regulation of PKB/Akt stability and activation phosphorylation. **Oncogene**, v. 28, n. 26, p. 2436-45, Jul 2009.

LIEBMANN, C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. **Cell Signal**, v. 13, n. 11, p. 777-85, Nov 2001.

LIN, S. Y.; MAKINO, K.; XIA, W.; MATIN, A.; WEN, Y.; KWONG, K. Y.; BOURGUIGNON, L.; HUNG, M. C. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. **Nat Cell Biol**, v. 3, n. 9, p. 802-8, Sep 2001.

LIU, J.; YIN, S.; REDDY, N.; SPENCER, C.; SHENG, S. Bax mediates the apoptosis-sensitizing effect of maspin. **Cancer Res**, v. 64, n. 5, p. 1703-11, Mar 2004.

LIU, P.; BEGLEY, M.; MICHOWSKI, W.; INUZUKA, H.; GINZBERG, M.; GAO, D.; TSOU, P.; GAN, W.; PAPA, A.; KIM, B. M.; WAN, L.; SINGH, A.; ZHAI, B.; YUAN, M.; WANG, Z.; GYGI, S. P.; LEE, T. H.; LU, K. P.; TOKER, A.; PANDOLFI, P. P.; ASARA, J. M.; KIRSCHNER, M. W.; SICINSKI, P.; CANTLEY, L.; WEI, W. Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus. **Nature**, v. 508, n. 7497, p. 541-5, Apr 2014.

LIU, P.; WANG, Z.; WEI, W. Phosphorylation of Akt at the C-terminal tail triggers Akt activation. **Cell Cycle**, v. 13, n. 14, p. 2162-4, 2014.

LO, H. W. EGFR-targeted therapy in malignant glioma: novel aspects and mechanisms of drug resistance. **Curr Mol Pharmacol**, v. 3, n. 1, p. 37-52, Jan 2010.

LO, H. W.; XIA, W.; WEI, Y.; ALI-SEYED, M.; HUANG, S. F.; HUNG, M. C. Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. **Cancer Res**, v. 65, n. 1, p. 338-48, Jan 2005.

LONARDO, F.; LI, X.; SIDDIQ, F.; SINGH, R.; AL-ABBADI, M.; PASS, H. I.; SHENG, S. Maspin nuclear localization is linked to favorable morphological features in pulmonary adenocarcinoma. **Lung Cancer**, v. 51, n. 1, p. 31-9, Jan 2006.

LONGHI, M.; CELLA, N. Tyrosine phosphorylation plays a role in increasing maspin protein levels and its cytoplasmic accumulation. **FEBS Open Bio**, 2012.

LOWENSTEIN, E. J.; DALY, R. J.; BATZER, A. G.; LI, W.; MARGOLIS, B.; LAMMERS, R.; ULLRICH, A.; SKOLNIK, E. Y.; BAR-SAGI, D.; SCHLESSINGER, J. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. **Cell**, v. 70, n. 3, p. 431-42, Aug 1992.

LUETTEKE, N. C.; QIU, T. H.; FENTON, S. E.; TROYER, K. L.; RIEDEL, R. F.; CHANG, A.; LEE, D. C. Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development. **Development**, v. 126, n. 12, p. 2739-50, Jun 1999.

LV, L.; XU, Y. P.; ZHAO, D.; LI, F. L.; WANG, W.; SASAKI, N.; JIANG, Y.; ZHOU, X.; LI, T. T.; GUAN, K. L.; LEI, Q. Y.; XIONG, Y. Mitogenic and oncogenic stimulation of K433 acetylation promotes PKM2 protein kinase activity and nuclear localization. **Mol Cell**, v. 52, n. 3, p. 340-52, Nov 2013.

MAASS, N.; BIALLEK, M.; RÖSEL, F.; SCHEM, C.; OHIKE, N.; ZHANG, M.; JONAT, W.; NAGASAKI, K. Hypermethylation and histone deacetylation lead to silencing of the maspin gene in human breast cancer. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 297, n. 1, p. 125-8, Sep 2002.

MAASS, N.; HOJO, T.; RÖSEL, F.; IKEDA, T.; JONAT, W.; NAGASAKI, K. Down regulation of the tumor suppressor gene maspin in breast carcinoma is associated with a higher risk of distant metastasis. **Clin Biochem**, v. 34, n. 4, p. 303-7, Jun 2001.

MAASS, N.; HOJO, T.; UEDING, M.; LÜTTGES, J.; KLÖPPEL, G.; JONAT, W.; NAGASAKI, K. Expression of the tumor suppressor gene Maspin in human pancreatic cancers. **Clin Cancer Res**, v. 7, n. 4, p. 812-7, Apr 2001.

MAASS, N.; TEFFNER, M.; RÖSEL, F.; PAWARESCH, R.; JONAT, W.; NAGASAKI, K.; RUDOLPH, P. Decline in the expression of the serine proteinase inhibitor maspin is associated with tumour progression in ductal carcinomas of the breast. **J Pathol**, v. 195, n. 3, p. 321-6, Oct 2001.

MACHOWSKA, M.; WACHOWICZ, K.; SOPEL, M.; RZEPECKI, R. Nuclear location of tumor suppressor protein maspin inhibits proliferation of breast cancer cells without affecting proliferation of normal epithelial cells. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, p. 142, 2014.

MACHTENS, S.; KUCZYK, M.; SERTH, J.; JONAS, U. P53 regulated maspin protein expression determines recurrence-free survival of patients with localised prostate cancer. **Prostate Cancer Prostatic Dis**, v. 3, n. S1, p. S27, Dec 2000.

MAEKAWA, T.; SANO, Y.; SHINAGAWA, T.; RAHMAN, Z.; SAKUMA, T.; NOMURA, S.; LICHT, J. D.; ISHII, S. ATF-2 controls transcription of Maspin and GADD45 alpha genes independently from p53 to suppress mammary tumors. **Oncogene**, v. 27, n. 8, p. 1045-54, Feb 2008.

MARIONI, G.; D'ALESSANDRO, E.; GIACOMELLI, L.; DE FILIPPIS, C.; CALGARO, N.; SARI, M.; STAFFIERI, A.; BLANDAMURA, S. Maspin nuclear localization is related to reduced density of tumour-associated micro-vessels in laryngeal carcinoma. **Anticancer Res**, v. 26, n. 6C, p. 4927-32, 2006 Nov-Dec 2006.

MARIONI, G.; GIACOMELLI, L.; D'ALESSANDRO, E.; MARCHESE-RAGONA, R.; STAFFIERI, C.; FERRARO, S. M.; STAFFIERI, A.; BLANDAMURA, S. Nuclear localization of mammary serine protease inhibitor (MASPIN): is its impact on the prognosis in laryngeal carcinoma due to a proapoptotic effect? **Am J Otolaryngol**, v. 29, n. 3, p. 156-62, 2008 May-Jun 2008.

MARTINOLI, C.; GANDINI, S.; LUISE, C.; MAZZAROL, G.; CONFALONIERI, S.; GIUSEPPE PELICCI, P.; TESTORI, A.; FERRUCCI, P. F. Maspin expression and melanoma progression: a matter of sub-cellular localization. **Mod Pathol**, v. 27, n. 3, p. 412-9, Mar 2014.

MATTAJ, I. W.; ENGLMEIER, L. Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. **Annu Rev Biochem**, v. 67, p. 265-306, 1998.

MCGOWEN, R.; BILIRAN, H.; SAGER, R.; SHENG, S. The surface of prostate carcinoma DU145 cells mediates the inhibition of urokinase-type plasminogen activator by maspin. **Cancer Res**, v. 60, n. 17, p. 4771-8, Sep 2000.

MCWILLIAM, H.; LI, W.; ULUDAG, M.; SQUIZZATO, S.; PARK, Y. M.; BUSO, N.; COWLEY, A. P.; LOPEZ, R. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. **Nucleic Acids Res**, v. 41, n. Web Server issue, p. W597-600, Jul 2013.

MERTINS, P.; YANG, F.; LIU, T.; MANI, D. R.; PETYUK, V. A.; GILLETTE, M. A.; CLAUSER, K. R.; QIAO, J. W.; GRITSENKO, M. A.; MOORE, R. J.; LEVINE, D. A.; TOWNSEND, R.; ERDMANN-GILMORE, P.; SNIDER, J. E.; DAVIES, S. R.; RUGGLES, K. V.; FENYO, D.; KITCHENS, R. T.; LI, S.; OLVERA, N.; DAO, F.; RODRIGUEZ, H.; CHAN, D. W.; LIEBLER, D.; WHITE, F.; RODLAND, K. D.; MILLS, G. B.; SMITH, R. D.; PAULOVICH, A. G.; ELLIS, M.; CARR, S. A. Ischemia in tumors induces early and sustained phosphorylation changes in stress kinase pathways but does not affect global protein levels. **Mol Cell Proteomics**, v. 13, n. 7, p. 1690-704, Jul 2014.

MINK, S.; HÄRTIG, E.; JENNEWEIN, P.; DOPPLER, W.; CATO, A. C. A mammary cell-specific enhancer in mouse mammary tumor virus DNA is composed of multiple regulatory elements including binding sites for CTF/NFI and a novel transcription factor, mammary cell-activating factor. **Mol Cell Biol**, v. 12, n. 11, p. 4906-18, Nov 1992.

MIRANTI, C. K. Application of cell adhesion to study signaling networks. **Methods Cell Biol**, v. 69, p. 359-83, 2002.

MOHSIN, S. K.; ZHANG, M.; CLARK, G. M.; CRAIG ALLRED, D. Maspin expression in invasive breast cancer: association with other prognostic factors. **J Pathol**, v. 199, n. 4, p. 432-5, Apr 2003.

MUKHOPADHYAY, C.; ZHAO, X.; MARONI, D.; BAND, V.; NARAMURA, M. Distinct effects of EGFR ligands on human mammary epithelial cell differentiation. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e75907, 2013.

NAKASHIMA, M.; OHIKE, N.; NAGASAKI, K.; ADACHI, M.; MOROHOSHI, T. Prognostic significance of the maspin tumor suppressor gene in pulmonary adenocarcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 130, n. 8, p. 475-9, Aug 2004.

NAKASHIMA, T.; PAK, S. C.; SILVERMAN, G. A.; SPRING, P. M.; FREDERICK, M. J.; CLAYMAN, G. L. Genomic cloning, mapping, structure and promoter analysis of HEADPIN, a serpin which is down-regulated in head and neck cancer cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1492, n. 2-3, p. 441-6, Jul 2000.

NARAYAN, M.; MIRZA, S. P.; TWINING, S. S. Identification of phosphorylation sites on extracellular corneal epithelial cell maspin. **Proteomics**, v. 11, n. 8, p. 1382-90, Apr 2011.

NARAYAN, M.; TWINING, S. Focus on molecules: maspin. **Exp Eye Res**, v. 90, n. 1, p. 2-3, Jan 2010.

NAWATA, S.; SHI, H. Y.; SUGINO, N.; ZHANG, M. Evidence of post-translational modification of the tumor suppressor maspin under oxidative stress. **Int J Mol Med**, v. 27, n. 2, p. 249-54, Feb 2011.

NGAMKITIDECHAKUL, C.; BURKE, J. M.; O'BRIEN, W. J.; TWINING, S. S. Maspin: synthesis by human cornea and regulation of in vitro stromal cell adhesion to extracellular matrix. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 42, n. 13, p. 3135-41, Dec 2001.

NICKOLOFF, B. J.; LINGEN, M. W.; CHANG, B. D.; SHEN, M.; SWIFT, M.; CURRY, J.; BACON, P.; BODNER, B.; RONINSON, I. B. Tumor suppressor maspin is up-regulated during keratinocyte senescence, exerting a paracrine antiangiogenic activity. **Cancer Res**, v. 64, n. 9, p. 2956-61, May 2004.

NIKOLAEV, A. Y.; LI, M.; PUSKAS, N.; QIN, J.; GU, W. Parc: a cytoplasmic anchor for p53. **Cell**, v. 112, n. 1, p. 29-40, Jan 2003.

NORMANNO, N.; DE LUCA, A.; BIANCO, C.; STRIZZI, L.; MANCINO, M.; MAIELLO, M. R.; CAROTENUTO, A.; DE FEO, G.; CAPONIGRO, F.; SALOMON, D. S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. **Gene**, v. 366, n. 1, p. 2-16, Jan 2006.

NYATI, M. K.; MORGAN, M. A.; FENG, F. Y.; LAWRENCE, T. S. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 11, p. 876-85, 11 2006.

O'SHEA, J. J.; GADINA, M.; SCHREIBER, R. D. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. **Cell**, v. 109 Suppl, p. S121-31, Apr 2002.

ODERO-MARAH, V. A.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; CHUNTHAPONG, J.; AMIR, S.; SEFTOR, R. E.; SEFTOR, E. A.; HENDRIX, M. J. Maspin regulates different signaling pathways for motility and adhesion in aggressive breast cancer cells. **Cancer Biol Ther**, v. 2, n. 4, p. 398-403, 2003 Jul-Aug 2003.

ODERO-MARAH, V. A.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; SCHNEIDER, G. B.; SEFTOR, E. A.; SEFTOR, R. E.; KOLAND, J. G.; HENDRIX, M. J. Tyrosine phosphorylation of maspin in normal mammary epithelia and breast cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 295, n. 4, p. 800-5, Jul 2002.

OGISO, H.; ISHITANI, R.; NUREKI, O.; FUKAI, S.; YAMANAKA, M.; KIM, J. H.; SAITO, K.; SAKAMOTO, A.; INOUE, M.; SHIROUZU, M.; YOKOYAMA, S. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. **Cell**, v. 110, n. 6, p. 775-87, Sep 2002.

OLAYIOYE, M. A.; NEVE, R. M.; LANE, H. A.; HYNES, N. E. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. **EMBO J**, v. 19, n. 13, p. 3159-67, Jul 2000.

OLSEN, J. V.; VERMEULEN, M.; SANTAMARIA, A.; KUMAR, C.; MILLER, M. L.; JENSEN, L. J.; GNAD, F.; COX, J.; JENSEN, T. S.; NIGG, E. A.; BRUNAK, S.; MANN, M. Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. **Sci Signal**, v. 3, n. 104, p. ra3, Jan 2010.

OLTVAI, Z. N.; MILLIMAN, C. L.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell**, v. 74, n. 4, p. 609-19, Aug 1993.

PARK, S. Y.; RYU, J.; LEE, W. O-GlcNAc modification on IRS-1 and Akt2 by PUGNAc inhibits their phosphorylation and induces insulin resistance in rat primary adipocytes. **Exp Mol Med**, v. 37, n. 3, p. 220-9, Jun 2005.

PATTERSON, R. L.; VAN ROSSUM, D. B.; NIKOLAIDIS, N.; GILL, D. L.; SNYDER, S. H. Phospholipase C-gamma: diverse roles in receptor-mediated calcium signaling. **Trends Biochem Sci**, v. 30, n. 12, p. 688-97, Dec 2005.

PAWSON, T. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 191-203, Jan 2004.

PEMBERTON, P. A.; TIPTON, A. R.; PAVLOFF, N.; SMITH, J.; ERICKSON, J. R.; MOUCHABECK, Z. M.; KIEFER, M. C. Maspin is an intracellular serpin that partitions into secretory vesicles and is present at the cell surface. **J Histochem Cytochem**, v. 45, n. 12, p. 1697-706, Dec 1997.

PEMBERTON, P. A.; WONG, D. T.; GIBSON, H. L.; KIEFER, M. C.; FITZPATRICK, P. A.; SAGER, R.; BARR, P. J. The tumor suppressor maspin does not undergo the stressed to relaxed transition or inhibit trypsin-like serine proteases. Evidence that maspin is not a protease inhibitory serpin. **J Biol Chem**, v. 270, n. 26, p. 15832-7, Jun 30 1995.

PESCHON, J. J.; SLACK, J. L.; REDDY, P.; STOCKING, K. L.; SUNNARBORG, S. W.; LEE, D. C.; RUSSELL, W. E.; CASTNER, B. J.; JOHNSON, R. S.; FITZNER, J. N.; BOYCE, R. W.; NELSON, N.; KOZLOSKY, C. J.; WOLFSON, M. F.; RAUCH, C. T.; CERRETTI, D. P.; PAXTON, R. J.; MARCH, C. J.; BLACK, R. A. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. **Science**, v. 282, n. 5392, p. 1281-4, Nov 1998.

PLOTNIKOV, A.; CHUDERLAND, D.; KARAMANSHA, Y.; LIVNAH, O.; SEGER, R. Nuclear extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 translocation is mediated by casein kinase 2 and accelerated by autophosphorylation. **Mol Cell Biol**, v. 31, n. 17, p. 3515-30, Sep 2011.

POPKEN, P.; GHAVAMI, A.; ONCK, P. R.; POOLMAN, B.; VEENHOFF, L. M. Size-dependent leak of soluble and membrane proteins through the yeast nuclear pore complex. **Mol Biol Cell**, v. 26, n. 7, p. 1386-94, Apr 2015.

QIN, L.; ZHANG, M. Maspin regulates endothelial cell adhesion and migration through an integrin signaling pathway. **J Biol Chem**, v. 285, n. 42, p. 32360-9, Oct 2010.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. . Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing 2016.

RAKHA, E. A.; EL-SAYED, M. E.; GREEN, A. R.; LEE, A. H.; ROBERTSON, J. F.; ELLIS, I. O. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. **Cancer**, v. 109, n. 1, p. 25-32, Jan 2007.

RAKHA, E. A.; ELSHEIKH, S. E.; ALESKANDARANY, M. A.; HABASHI, H. O.; GREEN, A. R.; POWE, D. G.; EL-SAYED, M. E.; BENHASOUNA, A.; BRUNET, J. S.; AKSLEN, L. A.; EVANS, A. J.; BLAMEY, R.; REIS-FILHO, J. S.; FOULKES, W. D.; ELLIS, I. O. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 7, p. 2302-10, Apr 2009.

RAVENHILL, L.; WAGSTAFF, L.; EDWARDS, D. R.; ELLIS, V.; BASS, R. G-helix of maspin mediates effects on cell migration and adhesion. **J Biol Chem**, v. 285, n. 47, p. 36285-92, Nov 2010.

RAY, C. A.; BLACK, R. A.; KRONHEIM, S. R.; GREENSTREET, T. A.; SLEATH, P. R.; SALVESEN, G. S.; PICKUP, D. J. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. **Cell**, v. 69, n. 4, p. 597-604, May 1992.

REIS-FILHO, J. S.; PINHEIRO, C.; LAMBROS, M. B.; MILANEZI, F.; CARVALHO, S.; SAVAGE, K.; SIMPSON, P. T.; JONES, C.; SWIFT, S.; MACKAY, A.; REIS, R. M.; HORNICK, J. L.; PEREIRA, E. M.; BALTAZAR, F.; FLETCHER, C. D.; ASHWORTH, A.; LAKHANI, S. R.; SCHMITT, F. C. EGFR amplification and lack of activating mutations in metaplastic breast carcinomas. **J Pathol**, v. 209, n. 4, p. 445-53, Aug 2006.

REIS-FILHO, J. S.; TORIO, B.; ALBERGARIA, A.; SCHMITT, F. C. Maspin expression in normal skin and usual cutaneous carcinomas. **Virchows Arch**, v. 441, n. 6, p. 551-8, Dec 2002.

RISSO, G.; PELISCH, F.; POZZI, B.; MAMMI, P.; BLAUSTEIN, M.; COLMAN-LERNER, A.; SREBROW, A. Modification of Akt by SUMO conjugation regulates alternative splicing and cell cycle. **Cell Cycle**, v. 12, n. 19, p. 3165-74, Oct 2013.

ROEPSTORFF, K.; GRANDAL, M. V.; HENRIKSEN, L.; KNUDSEN, S. L.; LERDRUP, M.; GRØVDAL, L.; WILLUMSEN, B. M.; VAN DEURS, B. Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. **Traffic**, v. 10, n. 8, p. 1115-27, Aug 2009.

RONAN, T.; MACDONALD-OBERMANN, J. L.; HUELSMANN, L.; BESSMAN, N. J.; NAEGLE, K. M.; PIKE, L. J. Different Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Agonists Produce Unique Signatures for the Recruitment of Downstream Signaling Proteins. **J Biol Chem**, v. 291, n. 11, p. 5528-40, Mar 2016.

ROTH, L.; SRIVASTAVA, S.; LINDZEN, M.; SAS-CHEN, A.; SHEFFER, M.; LAURIOLA, M.; ENUKA, Y.; NORONHA, A.; MANCINI, M.; LAVI, S.; TARCIC, G.; PINES, G.; NEVO, N.; HEYMAN, O.; ZIV, T.; RUEDA, O. M.; GNOCCHI, D.; PIKARSKI, E.; ADMON, A.; CALDAS, C.; YARDEN, Y. SILAC identifies LAD1 as a filamin-binding regulator of actin dynamics in response to EGF and a marker of aggressive breast tumors. **Sci Signal**, v. 11, n. 515, Jan 2018.

RUFF-JAMISON, S.; CHEN, K.; COHEN, S. Epidermal growth factor induces the tyrosine phosphorylation and nuclear translocation of Stat 5 in mouse liver. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 10, p. 4215-8, May 1995.

SAGER, R.; SHENG, S.; ANISOWICZ, A.; SOTIROPOULOU, G.; ZOU, Z.; STENMAN, G.; SWISSHELM, K.; CHEN, Z.; HENDRIX, M. J.; PEMBERTON, P. RNA genetics of breast cancer: maspin as paradigm. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 59, p. 537-46, 1994.

SAINSBURY, J. R.; FARNDON, J. R.; NEEDHAM, G. K.; MALCOLM, A. J.; HARRIS, A. L. Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. **Lancet**, v. 1, n. 8547, p. 1398-402, Jun 1987.

SALOMON, D. S.; BRANDT, R.; CIARDIELLO, F.; NORMANNO, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 19, n. 3, p. 183-232, Jul 1995.

SAMUELS, Y.; WANG, Z.; BARDELLI, A.; SILLIMAN, N.; PTAK, J.; SZABO, S.; YAN, H.; GAZDAR, A.; POWELL, S. M.; RIGGINS, G. J.; WILLSON, J. K.; MARKOWITZ, S.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B.; VELCULESCU, V. E. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. **Science**, v. 304, n. 5670, p. 554, Apr 2004.

SANSONE, P.; STORCI, G.; TAVOLARI, S.; GUARNIERI, T.; GIOVANNINI, C.; TAFFURELLI, M.; CECCARELLI, C.; SANTINI, D.; PATERINI, P.; MARCU, K. B.; CHIECO, P.; BONAFÈ, M. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. **J Clin Invest**, v. 117, n. 12, p. 3988-4002, Dec 2007.

SARBASSOV, D. D.; ALI, S. M.; KIM, D. H.; GUERTIN, D. A.; LATEK, R. R.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; SABATINI, D. M. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. **Curr Biol**, v. 14, n. 14, p. 1296-302, Jul 2004.

SARBASSOV, D. D.; GUERTIN, D. A.; ALI, S. M.; SABATINI, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science**, v. 307, n. 5712, p. 1098-101, Feb 2005.

SCHELLHAUS, A. K.; DE MAGISTRIS, P.; ANTONIN, W. Nuclear Reformation at the End of Mitosis. **J Mol Biol**, v. 428, n. 10 Pt A, p. 1962-85, 05 2016.

SCHICK, C.; PEMBERTON, P. A.; SHI, G. P.; KAMACHI, Y.; CATALTEPE, S.; BARTUSKI, A. J.; GORNSTEIN, E. R.; BRÖMME, D.; CHAPMAN, H. A.; SILVERMAN, G. A. Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. **Biochemistry**, v. 37, n. 15, p. 5258-66, Apr 1998.

SCHINDELIN, J.; ARGANDA-CARRERAS, I.; FRISE, E.; KAYNIG, V.; LONGAIR, M.; PIETZSCH, T.; PREIBISCH, S.; RUEDEN, C.; SAALFELD, S.; SCHMID, B.; TINEVEZ, J. Y.; WHITE, D. J.; HARTENSTEIN, V.; ELICEIRI, K.; TOMANCAK, P.; CARDONA, A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nat Methods**, v. 9, n. 7, p. 676-82, Jun 2012.

SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 211-25, Oct 2000.

SCHLESSINGER, J.; LEMMON, M. A. SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. **Sci STKE**, v. 2003, n. 191, p. RE12, Jul 2003.

SEFTOR, R. E.; SEFTOR, E. A.; SHENG, S.; PEMBERTON, P. A.; SAGER, R.; HENDRIX, M. J. maspin suppresses the invasive phenotype of human breast carcinoma. **Cancer Res**, v. 58, n. 24, p. 5681-5, Dec 1998.

SEO, J.; LEE, K. J. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. **J Biochem Mol Biol**, v. 37, n. 1, p. 35-44, Jan 2004.

SESHACHARYULU, P.; PONNUSAMY, M. P.; HARIDAS, D.; JAIN, M.; GANTI, A. K.; BATRA, S. K. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. **Expert Opin Ther Targets**, v. 16, n. 1, p. 15-31, Jan 2012.

SHAO, L. J.; SHI, H. Y.; AYALA, G.; ROWLEY, D.; ZHANG, M. Haploinsufficiency of the maspin tumor suppressor gene leads to hyperplastic lesions in prostate. **Cancer Res**, v. 68, n. 13, p. 5143-51, Jul 2008.

SHENG, S.; CAREY, J.; SEFTOR, E. A.; DIAS, L.; HENDRIX, M. J.; SAGER, R. Maspin acts at the cell membrane to inhibit invasion and motility of mammary and prostatic cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 21, p. 11669-74, Oct 15 1996.

SHENG, S.; PEMBERTON, P. A.; SAGER, R. Production, purification, and characterization of recombinant maspin proteins. **J Biol Chem**, v. 269, n. 49, p. 30988-93, Dec 1994.

SHENG, S.; TRUONG, B.; FREDRICKSON, D.; WU, R.; PARDEE, A. B.; SAGER, R. Tissue-type plasminogen activator is a target of the tumor suppressor gene maspin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 2, p. 499-504, Jan 1998.

SHI, F.; TELESKO, S. E.; LIU, Y.; RADHAKRISHNAN, R.; LEMMON, M. A. ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 17, p. 7692-7, Apr 2010.

SHI, H. Y.; STAFFORD, L. J.; LIU, Z.; LIU, M.; ZHANG, M. Maspin controls mammary tumor cell migration through inhibiting Rac1 and Cdc42, but not the RhoA GTPase. **Cell Motil Cytoskeleton**, v. 64, n. 5, p. 338-46, May 2007.

SHI, H. Y.; ZHANG, W.; LIANG, R.; ABRAHAM, S.; KITTRELL, F. S.; MEDINA, D.; ZHANG, M. Blocking tumor growth, invasion, and metastasis by maspin in a syngeneic breast cancer model. **Cancer Res**, v. 61, n. 18, p. 6945-51, Sep 15 2001a.

_____. Blocking tumor growth, invasion, and metastasis by maspin in a syngeneic breast cancer model. **Cancer Res**, v. 61, n. 18, p. 6945-51, Sep 2001b.

SHOYAB, M.; PLOWMAN, G. D.; MCDONALD, V. L.; BRADLEY, J. G.; TODARO, G. J. Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. **Science**, v. 243, n. 4894 Pt 1, p. 1074-6, Feb 1989.

SMITH, S. L.; WATSON, S. G.; RATSCHILLER, D.; GUGGER, M.; BETTICHER, D. C.; HEIGHWAY, J. Maspin - the most commonly-expressed gene of the 18q21.3 serpin cluster in lung cancer - is strongly expressed in preneoplastic bronchial lesions. **Oncogene**, v. 22, n. 54, p. 8677-87, Nov 2003.

SOLOMON, L. A.; MUNKARAH, A. R.; SCHIMP, V. L.; ARABI, M. H.; MORRIS, R. T.; NASSAR, H.; ALI-FEHMI, R. Maspin expression and localization impact on angiogenesis and prognosis in ovarian cancer. **Gynecol Oncol**, v. 101, n. 3, p. 385-9, Jun 2006.

SOOD, A. K.; FLETCHER, M. S.; GRUMAN, L. M.; COFFIN, J. E.; JABBARI, S.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; ARBOUR, N.; SEFTOR, E. A.; HENDRIX, M. J. The paradoxical expression of maspin in ovarian carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 8, n. 9, p. 2924-32, Sep 2002.

SOPEL, M.; KASPRZYK, I.; BERDOWSKA, I. Maspin and c-erbB-2 expression in correlation with microvessel density in invasive ductal breast cancer. **Folia Histochem Cytobiol**, v. 43, n. 2, p. 109-16, 2005.

STEGER, D. J.; WORKMAN, J. L. Remodeling chromatin structures for transcription: what happens to the histones? **Bioessays**, v. 18, n. 11, p. 875-84, Nov 1996.

STERNLICHT, M. D.; KEDESHIAN, P.; SHAO, Z. M.; SAFARIANS, S.; BARSKY, S. H. The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor. **Clin Cancer Res**, v. 3, n. 11, p. 1949-58, Nov 1997.

STRAMBIO-DE-CASTILLIA, C.; NIEPEL, M.; ROUT, M. P. The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 7, p. 490-501, Jul 2010.

STRAUSBERG, R. L.; FEINGOLD, E. A.; GROUSE, L. H.; DERGE, J. G.; KLAUSNER, R. D.; COLLINS, F. S.; WAGNER, L.; SHENMEN, C. M.; SCHULER, G. D.; ALTSCHUL, S. F.; ZEEBERG, B.; BUETOW, K. H.; SCHAEFER, C. F.; BHAT, N. K.; HOPKINS, R. F.; JORDAN, H.; MOORE, T.; MAX, S. I.; WANG, J.; HSIEH, F.; DIATCHENKO, L.; MARUSINA, K.; FARMER, A. A.; RUBIN, G. M.; HONG, L.; STAPLETON, M.; SOARES, M. B.; BONALDO, M. F.; CASAVANT, T. L.; SCHEETZ, T. E.; BROWNSTEIN, M. J.; USDIN, T. B.; TOSHIYUKI, S.; CARNINCI, P.; PRANGE, C.; RAHA, S. S.; LOQUELLANO, N. A.; PETERS, G. J.; ABRAMSON, R. D.; MULLAHY, S. J.; BOSAK, S. A.; MCEWAN, P. J.; MCKERNAN, K. J.; MALEK, J. A.; GUNARATNE, P. H.; RICHARDS, S.; WORLEY, K. C.; HALE, S.; GARCIA, A. M.; GAY, L. J.; HULYK, S. W.; VILLALON, D. K.; MUZNY, D. M.; SODERGREN, E. J.; LU, X.; GIBBS, R. A.; FAHEY, J.; HELTON, E.; KETTEMAN, M.; MADAN, A.; RODRIGUES, S.; SANCHEZ, A.; WHITING, M.; YOUNG, A. C.; SHEVCHENKO, Y.; BOUFFARD, G. G.; BLAKESLEY, R. W.; TOUCHMAN, J. W.; GREEN, E. D.; DICKSON, M. C.; RODRIGUEZ, A. C.; GRIMWOOD, J.; SCHMUTZ, J.; MYERS, R. M.; BUTTERFIELD, Y. S.; KRZYWINSKI, M. I.; SKALSKA, U.; SMAILUS, D. E.; SCHNERCH, A.; SCHEIN, J. E.; JONES, S. J.; MARRA, M. A.; TEAM, M. G. C. P. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 26, p. 16899-903, Dec 2002.

SUGIMOTO, S.; MAASS, N.; TAKIMOTO, Y.; SATO, K.; MINEI, S.; ZHANG, M.; HOSHIKAWA, Y.; JÜNEMANN, K. P.; JONAT, W.; NAGASAKI, K. Expression and regulation of tumor suppressor gene maspin in human bladder cancer. **Cancer Lett**, v. 203, n. 2, p. 209-15, Jan 2004.

SUNDARESAN, N. R.; PILLAI, V. B.; WOLFGEHER, D.; SAMANT, S.; VASUDEVAN, P.; PAREKH, V.; RAGHURAMAN, H.; CUNNINGHAM, J. M.; GUPTA, M.; GUPTA, M. P. The deacetylase SIRT1 promotes membrane localization and activation of Akt and PDK1 during tumorigenesis and cardiac hypertrophy. **Sci Signal**, v. 4, n. 182, p. ra46, 2011.

SUZUKI, M.; RAAB, G.; MOSES, M. A.; FERNANDEZ, C. A.; KLAGSBRUN, M. Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site. **J Biol Chem**, v. 272, n. 50, p. 31730-7, Dec 1997.

SUZUKI, M. M.; BIRD, A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 6, p. 465-76, Jun 2008.

SWAT, A.; DOLADO, I.; ROJAS, J. M.; NEBREDA, A. R. Cell density-dependent inhibition of epidermal growth factor receptor signaling by p38alpha mitogen-activated protein kinase via Sprouty2 downregulation. **Mol Cell Biol**, v. 29, n. 12, p. 3332-43, Jun 2009.

TAHMATZOPOULOS, A.; SHENG, S.; KYPRIANOU, N. Maspin sensitizes prostate cancer cells to doxazosin-induced apoptosis. **Oncogene**, v. 24, n. 34, p. 5375-83, Aug 2005.

TAKAHASHI, K.; SUZUKI, K. Density-dependent inhibition of growth involves prevention of EGF receptor activation by E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. **Exp Cell Res**, v. 226, n. 1, p. 214-22, Jul 1996.

TAKANAMI, I.; ABIKO, T.; KOIZUMI, S. Expression of maspin in non-small-cell lung cancer: correlation with clinical features. **Clin Lung Cancer**, v. 9, n. 6, p. 361-6, Nov 2008.

TEOH, S. S.; WHISSTOCK, J. C.; BIRD, P. I. Maspin (SERPINB5) is an obligate intracellular serpin. **J Biol Chem**, v. 285, n. 14, p. 10862-9, Apr 2010.

TIMNEY, B. L.; RAVEH, B.; MIRONSKA, R.; TRIVEDI, J. M.; KIM, S. J.; RUSSEL, D.; WENTE, S. R.; SALI, A.; ROUT, M. P. Simple rules for passive diffusion through the nuclear pore complex. **J Cell Biol**, v. 215, n. 1, p. 57-76, Oct 2016.

TOILLON, R. A.; LAGADEC, C.; PAGE, A.; CHOPIN, V.; SAUTIÈRE, P. E.; RICORT, J. M.; LEMOINE, J.; ZHANG, M.; HONDERMARCK, H.; LE BOURHIS, X. Proteomics demonstration that normal breast epithelial cells can induce apoptosis of breast cancer cells through insulin-like growth factor-binding protein-3 and maspin. **Mol Cell Proteomics**, v. 6, n. 7, p. 1239-47, Jul 2007.

TSAI, C. F.; WANG, Y. T.; YEN, H. Y.; TSOU, C. C.; KU, W. C.; LIN, P. Y.; CHEN, H. Y.; NESVIZHSHKII, A. I.; ISHIHAMA, Y.; CHEN, Y. J. Large-scale determination of absolute phosphorylation stoichiometries in human cells by motif-targeting quantitative proteomics. **Nat Commun**, v. 6, p. 6622, Mar 2015.

TZAHAR, E.; WATERMAN, H.; CHEN, X.; LEVKOWITZ, G.; KARUNAGARAN, D.; LAVI, S.; RATZKIN, B. J.; YARDEN, Y. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 10, p. 5276-87, Oct 1996.

UMEKITA, Y.; HIIPAKKA, R. A.; LIAO, S. Rat and human maspins: structures, metastatic suppressor activity and mutation in prostate cancer cells. **Cancer Lett**, v. 113, n. 1-2, p. 87-93, Feb 1997.

UMEKITA, Y.; OHI, Y.; SAGARA, Y.; YOSHIDA, H. Expression of maspin predicts poor prognosis in breast-cancer patients. **Int J Cancer**, v. 100, n. 4, p. 452-5, Aug 2002.

UMEKITA, Y.; OHI, Y.; SOUDA, M.; RAI, Y.; SAGARA, Y.; TAMADA, S.; TANIMOTO, A. Maspin expression is frequent and correlates with basal markers in triple-negative breast cancer. **Diagn Pathol**, v. 6, p. 36, 2011.

UMEKITA, Y.; YOSHIDA, H. Expression of maspin is up-regulated during the progression of mammary ductal carcinoma. **Histopathology**, v. 42, n. 6, p. 541-5, Jun 2003.

VANHAESEBROECK, B.; GUILLERMET-GUIBERT, J.; GRAUPERA, M.; BILANGES, B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 5, p. 329-41, May 2010.

VILLÉN, J.; GYGI, S. P. The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. **Nat Protoc**, v. 3, n. 10, p. 1630-8, 2008.

VITOLO, M. I.; WEISS, M. B.; SZMACINSKI, M.; TAHIR, K.; WALDMAN, T.; PARK, B. H.; MARTIN, S. S.; WEBER, D. J.; BACHMAN, K. E. Deletion of PTEN promotes tumorigenic signaling, resistance to anoikis, and altered response to chemotherapeutic agents in human mammary epithelial cells. **Cancer Res**, v. 69, n. 21, p. 8275-83, Nov 2009.

VIVANCO, I.; SAWYERS, C. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 7, p. 489-501, Jul 2002.

WANG, R.; BRATTAIN, M. G. The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa. **FEBS Lett**, v. 581, n. 17, p. 3164-70, Jul 2007.

WANG, S. C.; NAKAJIMA, Y.; YU, Y. L.; XIA, W.; CHEN, C. T.; YANG, C. C.; MCINTUSH, E. W.; LI, L. Y.; HAWKE, D. H.; KOBAYASHI, R.; HUNG, M. C. Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. **Nat Cell Biol**, v. 8, n. 12, p. 1359-68, Dec 2006.

WANI, R.; QIAN, J.; YIN, L.; BECHTOLD, E.; KING, S. B.; POOLE, L. B.; PAEK, E.; TSANG, A. W.; FURDUI, C. M. Isoform-specific regulation of Akt by PDGF-induced reactive oxygen species. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 26, p. 10550-5, Jun 2011.

WHELOCK, M. J.; JOHNSON, K. R. Cadherins as modulators of cellular phenotype. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 19, p. 207-35, 2003.

WOENCKHAUS, M.; BUBENDORF, L.; DALQUEN, P.; FOERSTER, J.; BLASZYK, H.; MIRLACHER, M.; SOLER, M.; DIETMAIER, W.; SAUTER, G.; HARTMANN, A.; WILD, P. J. Nuclear and cytoplasmic Maspin expression in primary non-small cell lung cancer. **J Clin Pathol**, v. 60, n. 5, p. 483-6, May 2007.

YANG, W.; LU, Z. Nuclear PKM2 regulates the Warburg effect. **Cell Cycle**, v. 12, n. 19, p. 3154-8, Oct 2013.

YANG, W. L.; WANG, J.; CHAN, C. H.; LEE, S. W.; CAMPOS, A. D.; LAMOTHE, B.; HUR, L.; GRABINER, B. C.; LIN, X.; DARNAY, B. G.; LIN, H. K. The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation. **Science**, v. 325, n. 5944, p. 1134-8, Aug 2009.

YATABE, Y.; MITSUDOMI, T.; TAKAHASHI, T. Maspin expression in normal lung and non-small-cell lung cancers: cellular property-associated expression under the control of promoter DNA methylation. **Oncogene**, v. 23, n. 23, p. 4041-9, May 2004.

YIN, S.; LI, X.; MENG, Y.; FINLEY, R. L., JR.; SAKR, W.; YANG, H.; REDDY, N.; SHENG, S. Tumor-suppressive maspin regulates cell response to oxidative stress by direct interaction with glutathione S-transferase. **J Biol Chem**, v. 280, n. 41, p. 34985-96, Oct 14 2005a.

YIN, S.; LI, X.; MENG, Y.; FINLEY, R. L.; SAKR, W.; YANG, H.; REDDY, N.; SHENG, S. Tumor-suppressive maspin regulates cell response to oxidative stress by direct interaction with glutathione S-transferase. **J Biol Chem**, v. 280, n. 41, p. 34985-96, Oct 2005b.

YIN, S.; LOCKETT, J.; MENG, Y.; BILIRAN, H.; BLOUSE, G. E.; LI, X.; REDDY, N.; ZHAO, Z.; LIN, X.; ANAGLI, J.; CHER, M. L.; SHENG, S. Maspin retards cell detachment via a novel interaction with the urokinase-type plasminogen activator/urokinase-type plasminogen activator receptor system. **Cancer Res**, v. 66, n. 8, p. 4173-81, Apr 2006.

YIN, W.; CHEEPALA, S.; ROBERTS, J. N.; SYSON-CHAN, K.; DIGIOVANNI, J.; CLIFFORD, J. L. Active Stat3 is required for survival of human squamous cell carcinoma cells in serum-free conditions. **Mol Cancer**, v. 5, p. 15, Apr 2006.

YOSHIMURA, A.; NAKA, T.; KUBO, M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 6, p. 454-65, Jun 2007.

YU, W. H.; WOESSNER, J. F.; MCNEISH, J. D.; STAMENKOVIC, I. CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. **Genes Dev**, v. 16, n. 3, p. 307-23, Feb 2002.

YU, X.; HARRIS, S. L.; LEVINE, A. J. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. **Cancer Res**, v. 66, n. 9, p. 4795-801, May 2006.

YUE, P.; TURKSON, J. Targeting STAT3 in cancer: how successful are we? **Expert Opin Investig Drugs**, v. 18, n. 1, p. 45-56, Jan 2009.

ZAHNOW, C. A. ErbB receptors and their ligands in the breast. **Expert Rev Mol Med**, v. 8, n. 23, p. 1-21, 2006.

ZHANG, J.; JI, J. Y.; YU, M.; OVERHOLTZER, M.; SMOLEN, G. A.; WANG, R.; BRUGGE, J. S.; DYSON, N. J.; HABER, D. A. YAP-dependent induction of amphiregulin identifies a non-cell-autonomous component of the Hippo pathway. **Nat Cell Biol**, v. 11, n. 12, p. 1444-50, Dec 2009.

ZHANG, M.; MAASS, N.; MAGIT, D.; SAGER, R. Transactivation through Ets and Ap1 transcription sites determines the expression of the tumor-suppressing gene maspin. **Cell Growth Differ**, v. 8, n. 2, p. 179-86, Feb 1997.

ZHANG, M.; MAGIT, D.; BOTTERI, F.; SHI, H. Y.; HE, K.; LI, M.; FURTH, P.; SAGER, R. Maspin plays an important role in mammary gland development. **Dev Biol**, v. 215, n. 2, p. 278-87, Nov 1999.

ZHANG, M.; MAGIT, D.; SAGER, R. Expression of maspin in prostate cells is regulated by a positive ets element and a negative hormonal responsive element site recognized by androgen receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 11, p. 5673-8, May 1997.

ZHANG, M.; SHENG, S.; MAASS, N.; SAGER, R. mMaspin: the mouse homolog of a human tumor suppressor gene inhibits mammary tumor invasion and motility. **Mol Med**, v. 3, n. 1, p. 49-59, Jan 1997.

ZHANG, M.; SHI, Y.; MAGIT, D.; FURTH, P. A.; SAGER, R. Reduced mammary tumor progression in WAP-TAg/WAP-maspin bitransgenic mice. **Oncogene**, v. 19, n. 52, p. 6053-8, Dec 2000.

ZHANG, M.; VOLPERT, O.; SHI, Y. H.; BOUCK, N. Maspin is an angiogenesis inhibitor. **Nat Med**, v. 6, n. 2, p. 196-9, Feb 2000.

ZHANG, N. N.; LIU, X.; SUN, J.; WU, Y.; LI, Q. W. [Nonclassical mechanisms of secretory protein in eukaryotic cells]. **Yi Chuan**, v. 31, n. 1, p. 29-35, Jan 2009.

ZHANG, Y.; TURKSON, J.; CARTER-SU, C.; SMITHGALL, T.; LEVITZKI, A.; KRAKER, A.; KROLEWSKI, J. J.; MEDVECZKY, P.; JOVE, R. Activation of Stat3 in v-Src-transformed fibroblasts requires cooperation of Jak1 kinase activity. **J Biol Chem**, v. 275, n. 32, p. 24935-44, Aug 2000.

ZHOU, Z.; QIU, J.; LIU, W.; ZHOU, Y.; PLOCINIK, R. M.; LI, H.; HU, Q.; GHOSH, G.; ADAMS, J. A.; ROSENFELD, M. G.; FU, X. D. The Akt-SRPK-SR axis constitutes a major pathway in transducing EGF signaling to regulate alternative splicing in the nucleus. **Mol Cell**, v. 47, n. 3, p. 422-33, Aug 2012.

ZHU, S.; WU, H.; WU, F.; NIE, D.; SHENG, S.; MO, Y. Y. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. **Cell Res**, v. 18, n. 3, p. 350-9, Mar 2008.

ZOU, Z.; ANISOWICZ, A.; HENDRIX, M. J.; THOR, A.; NEVEU, M.; SHENG, S.; RAFIDI, K.; SEFTOR, E.; SAGER, R. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. **Science**, v. 263, n. 5146, p. 526-9, Jan 28 1994a.

_____. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. **Science**, v. 263, n. 5146, p. 526-9, Jan 1994b.

ZOU, Z.; ZHANG, W.; YOUNG, D.; GLEAVE, M. G.; RENNIE, P.; CONNELL, T.; CONNELLY, R.; MOUL, J.; SRIVASTAVA, S.; SESTERHENN, I. Maspin expression profile in human prostate cancer (CaP) and in vitro induction of Maspin expression by androgen ablation. **Clin Cancer Res**, v. 8, n. 5, p. 1172-7, May 2002.