Emerson de Souza Santos

**ANÁLISE POR *MICROARRAY* DE GENES
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM LINHAGEM
CELULAR DE CÂNCER DE MAMA (MDA-MB-231) TRATADA
COM O PEPTÍDEO BIOATIVO DA LAMININA C16**

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

São Paulo
2011

Emerson de Souza Santos

**ANÁLISE POR *MICROARRAY* DE GENES
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM LINHAGEM
CELULAR DE CÂNCER DE MAMA (MDA-MB-231) TRATADA
COM O PEPTÍDEO BIOATIVO DA LAMININA C16**

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

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. Ruy Gastaldoni Jaeger

Versão original

São Paulo
2011

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

© reprodução total

Santos, Emerson de Souza.

Análise por *microarray* de genes diferencialmente expressos em linhagem celular de câncer de mama (MDA-MB-231) tratada com o peptídeo bioativo da laminina C16 / Emerson de Souza Santos. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Ruy Gastaldoni Jaeger.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Influência da laminina e peptídeos bioativos no câncer.

Versão do título para o inglês: Microarray analysis of differentially expressed genes in MDA-MB-231 breast cancer cells treated with laminin-derived peptide C16.

Descritores: 1. Câncer 2. Matrix extracelular 3. Expressão gênica 4. Laminina 5. C16 I. Jaeger, Ruy Gastaldoni II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0135/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Emerson de Souza Santos.

Título da Dissertação: Análise por *microarray* de genes diferencialmente expressos em linhagem celular de câncer de mama (MDA-MB-231) tratada com o peptídeo bioativo da laminina C16.

Orientador(a): Ruy Gastaldoni Jaeger.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(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 N° 431/10 referente ao projeto intitulado: *“Análise por microarray de genes diferencialmente expressos em linhagens de mama tratadas e não tratadas com o peptídeo bioativo da laminina C16”* sob a responsabilidade de **Emerson de Souza Santos**, 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 envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 23 de novembro de 2010.

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

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

*Dedico este estudo aos meus pais, José e Marlene,
por terem sempre estimulado em mim o desejo de aprender...*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Ruy Gastaldoni Jaeger, pela oportunidade de desenvolver este trabalho em seu laboratório. Agradeço por todo o apoio e orientação. Obrigado pela confiança depositada em mim e por sempre ter proporcionado todas as condições para o desenvolvimento deste estudo, incluindo a aquisição de equipamentos e reagentes, muitas das vezes de custo elevado, mas indispensáveis para a realização deste trabalho. Aprendi muito durante a minha estadia em seu laboratório e levarei os seus ensinamentos sempre comigo.

À Profa. Vanessa Moraes Freitas, pela co-orientação, ainda que não oficializada. Agradeço pela colaboração neste estudo, por todas as sugestões e pelo treinamento inicial. Agradeço também pela permissão de uso de equipamentos em seu laboratório e pela amizade.

A todo o pessoal do Laboratório de Biologia Tumoral: Adriane, Camila, Edilberto, Elaine, João, Karen, Letícia, Luciana, Micael, Milza, Monique, Natália, Raphael e Renato. Trabalhar com vocês foi uma ótima experiência. Graças a vocês, nosso ambiente de trabalho sempre foi estimulante e alegre. Vocês, muito prestativos, sempre se mostraram prontos a ajudar. Adriane e Camila, obrigado pela amizade e pela ajuda nos experimentos! Admiro muito vocês e espero que nossa amizade se estenda por muitos anos. Prof. João, obrigado pela amizade, você é um grande exemplo de pessoa para mim. Agradeço também à Profa. Letícia, pelo treinamento inicial. Admiro muito sua determinação.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro concedido através do projeto de Auxílio Pesquisa 2009/04114-5, os quais foram essenciais para o desenvolvimento deste estudo.

Aos Professores Anselmo Sigari Moriscot, Chao Yun Irene Yan e Fabio Daumas Nunes, pelas sugestões feitas durante o meu exame de qualificação e ao assessor da FAPESP pelas críticas e sugestões.

Este trabalho foi realizado graças à colaboração com muitos pesquisadores do ICB. Em especial, agradeço a Profa. Dra. Gláucia Maria Machado-Santelli e a todos os componentes do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, pela utilização de diversos equipamentos e pela amizade e carinho com que sempre me receberam. Agradeço à Dra. Paula Rezende, por todas as dicas e auxílio nos experimentos de biologia molecular, à Michelle e ao Evandro pela ajuda nos experimentos de citometria de fluxo e à Marina pela amizade.

Ao Prof. Dr. Henrique Krieger, do Laboratório de Epidemiologia Genética do Departamento de Parasitologia do ICB-USP, por me permitir utilizar o equipamento *Affymetrix GeneChip System*, sem ônus financeiro. A utilização deste equipamento foi imprescindível para o desenvolvimento deste projeto. Agradeço também ao apoio técnico do Dr. Leandro Garrido.

À Profa. Telma Zorn, por ceder espaço do seu laboratório para a realização de experimentos de cultura celular e às Profas. Estela Bevilacqua e Maria Tereza Nunes, que gentilmente me permitiram a utilização de equipamentos de seus laboratórios durante a elaboração deste estudo.

Agradeço também aos meus ex-orientadores de iniciação científica, Profa. Dra. Marilis do Valle Marque, Prof. Dr. André Luiz Vettore de Oliveira e Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai, responsáveis pelos meus primeiros passos científicos.

A todos os membros da Comissão de Pós-Graduação, em especial à atual coordenadora, Profa. Marilce Fagundes dos Santos, e à coordenadora anterior, Profa. Dânia Emi Hamassaki. Agradeço também aos nossos representantes discentes. Obrigado pela busca por melhorias em nosso departamento.

Agradeço a todos os colegas de Pós-Graduação e funcionários do Departamento de Biologia Celular e Tecidual pela colaboração e amizade.

“Eles estão em ti e em mim; eles nos criaram, corpo e mente; e sua preservação é a razão final de nossa existência. Eles percorreram um longo caminho, esses replicadores. Agora eles dão pelo nome de genes, e nós somos suas máquinas de sobrevivência...”

Richard Dawkins

RESUMO

DE SOUZA SANTOS, E. **Análise por *microarray* de genes diferencialmente expressos em linhagem celular de câncer de mama (MDA-MB-231) tratada com o peptídeo bioativo da laminina C16.** 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O câncer de mama representa importante problema de saúde pública. O microambiente onde as células neoplásicas se encontram desempenha importante papel no processo de tumorigênese e progressão tumoral. Estudos têm mostrado que peptídeos derivados da clivagem da laminina estão envolvidos com progressão tumoral. Dentre eles, o peptídeo C16 (KAFDITYVRLKF), derivado da cadeia gama-1 da laminina-111, possui atividade de adesão celular, estimula migração celular, invasão, metástase e angiogênese. Isto nos motivou a analisar o efeito de C16 na expressão gênica de células derivadas de câncer de mama (linhagem MDA-MB-231). Para tanto, células foram tratadas com peptídeo C16 ou peptídeo controle (FKLRVYTIDFAK) por 24 horas. Após o tratamento, a expressão gênica foi avaliada através da técnica de *microarray*. Nossos resultados indicam que C16 regula a expressão de 80 genes em células MDA-MB-231, incluindo genes associados a processos biológicos ligados ao câncer. Dentre eles, os genes *FGFR3*, *GPNUMB* e *SPOCK1* tiveram suas expressões aumentadas após tratamento com C16, como confirmado por PCR quantitativo. *FGFR3* codifica um receptor tirosina quinase associado, entre outros, à migração celular e angiogênese. *GPNUMB* codifica uma glicoproteína que estimula angiogênese, migração, invasão e metástase de câncer de mama para tecido ósseo. *SPOCK1* codifica um proteoglicano associado à adesão celular e estímulo de migração celular. Neste estudo, ensaios de invasão em câmaras de Boyden recobertas com Matrigel também indicam que C16 estimula a invasão de células MDA-MB-231. Entretanto, C16 não mostrou possuir efeito sobre a proliferação celular e apoptose. Concluindo, nossos dados sugerem que o peptídeo C16 regula expressão gênica e estimula invasão de células de câncer de mama MDA-MB-231.

Palavras-chave: Câncer de mama. Laminina. C16.

ABSTRACT

DE SOUZA SANTOS, E. **Microarray analysis of differentially expressed genes in MDA-MB-231 breast cancer cells treated with laminin-derived peptide C16.** 2011. 103 p. Masters Thesis (Cell and Tissue Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Human breast cancer constitutes a worldwide health care problem. During breast cancer development and progression, tumor cells are engaged in a complex interplay with the surrounding microenvironment. In this scenario, extracellular matrix molecules play important roles influencing malignant behavior. An increasing number of evidences have shown that peptides derived from laminin cleavage are involved in tumor progression. Among them, C16 (KAFDITYVRLKF), derived from laminin-111 gamma-1 chain, is a cell-adhesive peptide that increases cell migration and invasion, enhances metastasis, and promotes angiogenesis. This prompted us to analyze whether C16 would regulate gene expression in cells derived from human breast cancer (MDA-MB-231). Cells were treated with C16 or scrambled peptide control (FKLRVYTIDFAK) for 24 hours. After treatment, gene expression was analyzed by microarray. We found that C16 regulates expression of 80 genes in MDA-MB-231, including genes directly involved in processes associated with cancer. Among those genes, *FGFR3*, *GPNMB* and *SPOCK1* expression was increased by C16 treatment, as confirmed by quantitative Real-Time PCR. *FGFR3* encodes a tyrosine kinase receptor which regulates various biological processes, including cell migration and angiogenesis. *GPNMB* encodes a transmembrane glycoprotein involved in angiogenesis and promotion of migration, invasion and bone metastasis of breast cancer cells. *SPOCK1*, on the other hand, encodes a proteoglycan associated with cell adhesion and increased migration. Functional results also indicate that C16 significantly increases MDA-MB-231 cell invasion, as shown by assays in Boyden chambers coated with Matrigel. However, no effect on cell proliferation and apoptosis was observed. We concluded that laminin-derived peptide C16 regulates gene expression and enhances invasion of metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells.

Key-words: Breast cancer. Laminin. C16.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A230	absorbância no comprimento de onda de 230 nanômetros
A260	absorbância no comprimento de onda de 260 nanômetros
A280	absorbância no comprimento de onda de 280 nanômetros
A550	absorbância no comprimento de onda de 550 nanômetros
A655	absorbância no comprimento de onda de 655 nanômetros
AG73	sequência dos aminoácidos RKRLQVQLSIRT (arginina - lisina - arginina - leucina - glicina - valina - glicina - leucina - serina - isoleucina - arginina - treonina)
AMPC	adenosina monofosfato cíclico
APE1	do inglês “apurinic endonuclease 1”, traduzido como endonuclease apurínica 1
Bcl-2	do inglês “B-cell lymphoma 2”, traduzido como linfoma de células B 2.
BLAST	do inglês, “Basic Local Alignment Search Tool”, traduzido como Ferramenta Básica para Busca de Alinhamentos Locais
BRCA1	do inglês, “breast cancer 1, early onset”, traduzido como câncer de mama 1, início precoce
BRCA2	do inglês, “breast cancer 2, early onset”, traduzido como câncer de mama 2, início precoce
BSA	do inglês “Bovine Serum Albumine”, traduzido como Albumina Sérica Bovina
C16	sequência dos aminoácidos KAFDITYVRLKF (lisina - asparagina - fenilalanina - ácido aspártico - isoleucina - treonina - tirosina - valina - arginina - leucina - lisina - fenilalanina)
C16-SX	sequência dos aminoácidos FKLRVYTIDFAK (fenilalanina - lisina - leucina - arginina - valina - tirosina - treonina - isoleucina - ácido aspártico - fenilalanina - asparagina - lisina)
cDNA	do inglês “complementary deoxyribonucleic acid”, traduzido como ácido desoxirribonucleico complementar
cRNA	do inglês “complementary ribonucleic acid”, traduzido como ácido ribonucleico complementar
Ct	do inglês “cycle threshold”, ciclo na qual a fluorescência atinge o limiar de detecção
dATP	do inglês “deoxyadenosine triphosphate”, traduzido como desoxiadenosina trifosfato
dCTP	do inglês “deoxycytidine triphosphate”, traduzido como desoxicitidina trifosfato
dGTP	do inglês “deoxyguanosine triphosphate”, traduzido como desoxiguanosina trifosfato
DMEM	do inglês “Dulbecco’s Modified Eagles’ Medium”, traduzido como meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	do inglês “deoxyribonucleic acid”, traduzido como ácido desoxirribonucleico

dNTP	do inglês “deoxynucleotide triphosphate”, traduzido como desoxirribonucleotídeo trifosfato
dTTP	do inglês “deoxythymidine triphosphate”, traduzido como desoxitimidina trifosfato
dUTP	do inglês “deoxyuridine triphosphate”, traduzido como desoxiuridina trifosfato
EDTA	do inglês “ethylenediamine-tetra acetic acid”, traduzido como ácido etilenodiamino tetra acético
ERK	do inglês “extracellular signal-regulated Kinases”, traduzido como quinases reguladas por sinais extracelulares
EUA	Estados Unidos da América
FC	do inglês “fold change”, número de vezes de diferença de expressão
FGF	do inglês “fibroblast growth factor”, traduzido como fator de crescimento de fibroblasto
FGF2	do inglês “fibroblast growth factor 2”, traduzido como fator de crescimento de fibroblasto 2
FGFR	do inglês “fibroblast growth factor receptor”, traduzido como receptor de fator de crescimento de fibroblasto
FGFR3	do inglês “fibroblast growth factor receptor 3”, traduzido como receptor 3 do fator de crescimento de fibroblasto
FITC	do inglês “fluorescein isothiocyanate”, traduzido como isotiocianato de fluoresceína
GAG	glicosaminoglicano
GAPDH	do inglês “glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase”, traduzido como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GCBG	do inglês “guanine-cytosine composition-based background”, traduzido como fundo baseado na composição de guanina-citosina
GPNMB	do inglês “glycoprotein nonmetastatic B”, traduzido como glicoproteína não metastática B
HEPES	do inglês “4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid”, traduzido como ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfônico
IGF-1	do inglês “insulin-like growth factor 1”, traduzido como fator de crescimento semelhante à insulina 1
IGFR	do inglês “insulin-like growth factor receptor”, traduzido como receptor de fator de crescimento semelhante à insulina
IgG	imunoglobulina G
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JNK	do inglês “c-Jun N-terminal kinases”, traduzido como quinases c-Jun N-terminal
LB	lâmina basal
MAPK	do inglês “Mitogen-Activated Protein Kinase”, traduzido como proteína quinase ativada por mitógeno
MEC	matriz extracelular

MES	do inglês “2-(<i>N</i> -morpholino) ethanesulfonic acid”, traduzido como ácido 2-(<i>N</i> -morfolino) etanosulfônico
MMP	do inglês “matrix metalloproteinases”, traduzido como metaloproteases da matriz
MOPS	do inglês “3-(<i>N</i> -morpholino) propanesulfonic acid”, traduzido como ácido 3-(<i>N</i> -morfolino) propanosulfônico
MTT	do inglês “3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide”, traduzido como brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NCBI	do inglês, “National Center for Biotechnology Information”, traduzido como Centro Nacional de Informação Biotecnológica
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	do inglês “phosphate-buffered saline”, traduzido como tampão fosfato salina
PCR	do inglês “Polymerase Chain Reaction”, traduzido como Reação em Cadeia da Polimerase
PI3K	do inglês “phosphoinositide 3-kinase”, traduzido como quinase fosfatidilinositol-3
PKC	do inglês “protein kinase C”, traduzido como proteína quinase C
PKD	do inglês “Polycystic Kidney Disease”, traduzido como doença renal policística
PM	do inglês “Perfect Match”, traduzido como complementaridade perfeita
qPCR	do inglês “quantitative Polymerase Chain Reaction”, traduzido como reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA	do inglês “ribonucleic acid”, traduzido como ácido ribonucleico
RP-HPLC	do inglês “Reverse-Phase, High Performance Liquid Chromatography”, traduzido como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa
SFB	soro fetal bovino
SIKVAV	sequência dos aminoácidos serina - isoleucina - lisina - valina - alanina - valina
SNORD116	do inglês “small nucleolar RNA, 116 cluster”, traduzido como pequeno RNA nucleolar, agrupamento 116
snoRNA	do inglês “small nucleolar RNA”, traduzido como pequeno RNA nucleolar
SPOCK1	do inglês “SPARC/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan”, traduzido como proteoglicano com domínios SPARC/osteonectina, cwcv e domínio semelhante a kazal
TdT	do inglês “Terminal deoxynucleotidyl Transferase”, traduzido como deoxinucleotidil Transferase Terminal
TIMP	do inglês, “tissue inhibitors of metalloproteinases”, traduzido como inibidor tecidual de metaloproteases
TNFR	do inglês “tumor necrosis factor receptor”, traduzido como receptor de fator de necrose tumoral
VEGF	do inglês “vascular endothelial growth factor”, traduzido como fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
%	porcentagem
α	alfa
β	beta
γ	gama
μg	microgramas
$\mu\text{g/ml}$	microgramas por mililitro
μl	microlitro
μM	micromolar
CaCl_2	cloreto de cálcio
cm	centímetros
CO_2	gás carbônico
g	força centrífuga relativa
HCl	ácido clorídrico
kDa	kilodalton
M	molar, medida de concentração de soluções
mg	miligramas
mg/ml	miligramas por mililitro
MgCl_2	cloreto de magnésio
ml	mililitro
mM	milimolar
N	normal, medida de concentração de soluções
Na^+	íon sódio
NaCl	cloreto de sódio
NaH_2PO_4	fosfato de sódio monobásico
NaOH	hidróxido de sódio
ng	nanogramas
nm	nanômetros
nM	nonomolar
pH	potencial hidrogeniônico
Zn^{2+}	íon zinco

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Células MDA-MB-231 expressam a cadeia $\gamma 1$ da laminina e as subunidades de integrinas αv , $\beta 3$, $\alpha 5$ e $\beta 1$	66
Figura 2 – <i>Heatmap</i> de genes diferencialmente expressos em células MDA-MB-231 tratadas com C16, em comparação ao tratamento com peptídeo controle (C16-SX)	72
Figura 3 – O peptídeo C16 regula a expressão de genes associados ao câncer na linhagem MDA-MB-231	74
Figura 4 – Validação de resultados de <i>microarray</i> : PCR quantitativa em tempo real para os genes <i>SPOCK1</i> , <i>GPNMB</i> , <i>FGFR3</i> e <i>SNORD116</i>	75
Figura 5 – C16 estimula invasão de células MDA-MB-231.....	77
Figura 6 – C16 não influencia na proliferação de células MDA-MB-231	78
Figura 7 – C16 não tem efeito sobre a apoptose de células MDA-MB-231	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Cadeias da laminina e localização nos tecidos	37
Tabela 2.2 – Isoformas da laminina, suas respectivas cadeias e integrinas ligantes.....	39
Tabela 4.1 – Anticorpos primários utilizados para detecção por imunofluorescência da cadeia $\gamma 1$ da laminina e das integrinas αv , $\beta 3$, $\alpha 5$ e $\beta 1$ em células MDA-MB-231	51
Tabela 4.2 – Iniciadores utilizados nas reações de PCR quantitativa em tempo real e tamanho do produto amplificado (<i>amplicon</i>) em pares de bases (pb).....	62
Tabela 5.1 – Lista de genes diferencialmente expressos encontrados em células de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231) tratadas com peptídeo C16 em comparação ao tratamento com peptídeo controle (C16-SX). Valores de diferença de expressão (FC) positivos indicam aumento de expressão, enquanto valores negativos indicam diminuição da expressão gênica.....	68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 O câncer de mama	24
2.1.1 <i>Epidemiologia e fatores de risco associados ao câncer de mama</i>	<i>24</i>
2.1.2 <i>Glândula mamária normal, origem e progressão do câncer de mama</i>	<i>26</i>
2.2 Matriz extracelular e evolução tumoral	29
2.3 Lâmina basal, laminina e seus peptídeos bioativos.....	34
2.3.1 <i>A lâmina basal.....</i>	<i>34</i>
2.3.2 <i>Laminina.....</i>	<i>35</i>
2.3.3 <i>Peptídeos bioativos da laminina.....</i>	<i>41</i>
2.4 Peptídeo C16.....	44
2.5 Moléculas da matriz extracelular e regulação da expressão gênica	46
3 PROPOSIÇÃO	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 Cultura celular	50
4.2 Imunofluorescência.....	50
4.3 Tratamento das células com o peptídeo C16.....	52
4.4 Extração de RNA total.....	53
4.5 Análise de expressão gênica por <i>microarray</i>	54
4.5.1 <i>Síntese de cDNA.....</i>	<i>54</i>
4.5.2 <i>Síntese de cRNA (transcrição in vitro).....</i>	<i>55</i>
4.5.3 <i>Segundo ciclo de síntese de cDNA</i>	<i>55</i>
4.5.4 <i>Fragmentação do cDNA fita simples</i>	<i>56</i>
4.5.5 <i>Marcação do cDNA</i>	<i>57</i>
4.5.6 <i>Hibridização.....</i>	<i>57</i>
4.5.7 <i>Lavagem, marcação e escaneamento.....</i>	<i>57</i>
4.5.8 <i>Normalização, correção de fundo e sumarização</i>	<i>58</i>
4.5.9 <i>Análise estatística</i>	<i>59</i>
4.5.10 <i>Heatmap.....</i>	<i>59</i>
4.6 Confirmação dos resultados de expressão gênica diferencial pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real.....	60
4.6.1 <i>Desenho de oligonucleotídeos iniciadores</i>	<i>60</i>
4.6.2 <i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real</i>	<i>60</i>

4.7 Ensaio de invasão	62
4.8 Ensaio de proliferação celular	63
4.9 Ensaio de apoptose.....	64
5 RESULTADOS.....	65
5.1 A linhagem de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 expressa a cadeia γ 1 da laminina	65
5.2 A linhagem de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 expressa as subunidades de integrinas α v, β 3, α 5 e β 1	65
5.3 O peptídeo C16 regula expressão gênica em células MDA-MB-231	67
5.4 O peptídeo C16 estimula a invasão de células MDA-MB-231	76
5.5 C16 não tem efeito sobre a proliferação de células MDA-MB-231	76
5.6 C16 não tem efeito sobre a apoptose de células MDA-MB-231	76
6 DISCUSSÃO	80
7 CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS.....	90

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama perfaz cerca de 10% de todos os tumores malignos (BOYLE, 2005) e representa a segunda causa de morte por câncer entre as mulheres nos EUA (NELSON et al., 2009). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou que no ano de 2010, 49.240 casos novos seriam diagnosticados, representando o tipo de câncer não cutâneo mais frequentemente diagnosticado (INCA, 2010).

Um conjunto complexo de alterações moleculares está envolvido no processo de tumorigênese e evolução tumoral. Tais alterações podem conferir às células tumorais maior potencial proliferativo, evasão à apoptose, angiogênese sustentada e capacidade de invadir e formar metástases (HANAHA e WEINBERG, 2000).

O microambiente onde as células neoplásicas se encontram desempenha um importante papel no processo de tumorigênese e progressão tumoral. Estudos já demonstraram que o potencial maligno não é dependente apenas de características inerentes das células tumorais, mas pode ser substancialmente modificado pelo microambiente (ECCLES e WELCH, 2007). Neste cenário, a matriz extracelular tem grande importância. Ela é uma rede complexa de moléculas que preenchem os espaços extracelulares, sendo composta por colágenos, glicoproteínas e proteoglicanos (LIU e XU, 1996). Na interface entre o epitélio e o tecido conjuntivo, a matriz forma a lâmina basal, constituída predominantemente por laminina, colágeno tipo IV, perlecan e nidogênio (AUMAILLEY, 1995; COLOGNATO e YURCHENCO, 2000; SASAKI et al., 2004; MAO e SCHWARZBAUER, 2005). A importância da matriz na tumorigênese e progressão tumoral reside no fato de ela conter enzimas proteolíticas, citocinas e moléculas regulatórias que, ao serem ativadas fora de um contexto normal, podem estimular a progressão tumoral (LUKASHEV e WERB, 1998). A matriz extracelular pode influenciar na proliferação celular, apoptose, diferenciação, (DALEY et al., 2008), angiogênese (STUPACK e CHERESH, 2002), migração celular, invasão e metástase (ECCLES e WELCH, 2007).

A proliferação celular de um tecido normal é altamente regulada, tanto por sinais intrínsecos da célula, quanto por sinais provenientes de seu microambiente

(VAN DEN HEUVEL, 2005). Da mesma forma, as taxas de morte celular programada são também finamente reguladas em tecidos normais (RANGANATH e NAGASHREE, 2001). As células tumorais, por outro lado, apresentam ruptura destes mecanismos de controle. Resistência à apoptose é uma importante característica adquirida por células malignas, uma vez que permite a elas sobreviverem aos sinais ambientais de indução de morte e levar adiante suas alterações genéticas (AXELROD; AXELROD; PIENTA, 2006). Mesmo possuindo maior potencial proliferativo e evasão aos mecanismos pró-apoptóticos, as células tumorais não entram em fase de crescimento exponencial se não houver suplemento adequado de oxigênio e nutrientes a elas, demonstrando a importância do processo de angiogênese na evolução tumoral (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000).

Invasão e metástase são processos relacionados e estão associados a um pior prognóstico. Dois mecanismos estão envolvidos no processo de invasão tumoral: o remodelamento tecidual através de degradação proteolítica da matriz extracelular (JOHNSEN et al., 1998) e a migração celular (HEGERFELDT et al., 2002). A proteólise da matriz abre caminho para a invasão tumoral, ativa moléculas latentes e gera novas moléculas bioativas (SCHENK et al., 2003).

As moléculas de adesão celular também estão envolvidas no processo de progressão tumoral. Os receptores de adesão são glicoproteínas transmembrânicas que apresentam afinidade por receptores em outras células (adesão célula-célula) ou por moléculas da matriz (adesão célula-matriz extracelular) (APLIN et al., 1998). A perda de adesão celular é o primeiro evento do processo de invasão tecidual (JOHN e TUSZYNSKI, 2001). Além de atuarem na adesão, estes receptores são responsáveis por transmitir sinais regulatórios para as células (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000).

Dentre as moléculas de adesão célula-matriz extracelular, destacam-se as integrinas, as quais são receptores transmembrânicos compostos por duas subunidades, α e β (HYNES, 1987). Ao interagirem com ligantes presentes na matriz extracelular, estes receptores promovem adesão e geram sinalização celular de forma a integrar a célula a seu microambiente (VARNER e CHERESH, 1996; GIANCOTTI et al., 1999). Já foi demonstrado que as integrinas podem controlar migração celular, proliferação, angiogênese e morte celular (VARNER e CHERESH, 1996). Há uma grande variedade de subtipos de integrinas e as células de

carcinoma podem modificar a expressão destes subtipos de forma a favorecer aqueles que estimulam a progressão tumoral (HANAHAAN e WEINBERG, 2000). Dentre as moléculas que interagem com as integrinas, estão as lamininas (GIANCOTTI et al., 1999).

As moléculas de laminina são as principais componentes da lâmina basal. Elas são proteínas compostas por três cadeias polipeptídicas, denominadas cadeias α , β , e γ . As 16 isoformas da laminina identificadas até o momento são originadas da combinação de uma das 5 cadeias α , 3 cadeias β e 3 cadeias γ (AUMAILLEY et al., 2005). A laminina-111 (antiga laminina-1, conforme nova classificação proposta por Aumailley et al., 2005) é um heterotrímero formado pelas cadeias $\alpha 1$, $\beta 1$ e $\gamma 1$ e já foi associada com adesão celular, migração, secreção de proteases e metástases em células tumorais (KURATOMI et al., 2002; FREITAS et al., 2007; GAMA-DE-SOUZA et al., 2008).

Um evento chave que ocorre durante a evolução tumoral é a clivagem proteolítica de componentes da lâmina basal, incluindo as lamininas. A clivagem destas moléculas pode expor sítios crípticos bioativos (ARDINI et al., 2002). Muitos peptídeos derivados da clivagem da laminina já foram identificados e associados com progressão do câncer. Trabalhos realizados em nosso laboratório mostraram que diferentes peptídeos da laminina-111 têm capacidade de regular linhagens celulares derivadas de neoplasias benignas e malignas de glândula salivar (FREITAS e JAEGER, 2002; CAPUANO e JAEGER, 2004; FREITAS et al., 2004; MELO, 2004; OLIVEIRA, 2004; FREITAS et al., 2007; GAMA-DE-SOUZA et al., 2008). Dentre eles, o peptídeo C16 (KAFDITYVRLKF), derivado da cadeia $\gamma 1$ da laminina, possui atividade de adesão celular (NOMIZU et al., 1997), estimula migração de fibroblastos (MALINDA et al., 2008), estimula migração e metástase de células de melanoma (KURATOMI et al., 2002) e é capaz de promover angiogênese (PONCE et al., 1999; PONCE; NOMIZU; KLEINMAN, 2001). Dados não publicados de nosso Laboratório também mostraram que C16 estimula migração e invasão de células derivadas de carcinoma adenoide cístico. Diante destes resultados e do crescente interesse sobre a participação dos peptídeos bioativos da laminina no comportamento de células normais e tumorais, temos estendido nossas investigações também às neoplasias de mama.

Apesar da participação do peptídeo bioativo da laminina C16 na progressão tumoral já ter sido demonstrada, os genes que são regulados na presença deste peptídeo em células tumorais ainda não foram identificados. A tecnologia de *microarray* tem sido largamente utilizada na geração de dados referentes à expressão gênica, pois permite a análise simultânea de muitos genes, de forma qualitativa e quantitativa, possibilitando a comparação de padrões de expressão gênica em diferentes condições celulares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Na revisão de literatura, serão abordados os seguintes temas relacionados a esta dissertação: 1) O câncer de mama; 2) Matriz extracelular e evolução tumoral; 3) Lâmina basal, laminina e seus peptídeos bioativos; 4) Peptídeo C16; 5) Moléculas da matriz extracelular e regulação da expressão gênica.

2.1 O câncer de mama

2.1.1 *Epidemiologia e fatores de risco associados ao câncer de mama*

O câncer de mama perfaz cerca de 10% de todos os tumores malignos (BOYLE, 2005), representando a segunda causa de morte por câncer entre as mulheres nos EUA (NELSON et al., 2009). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa para o ano de 2010 no Brasil foi de 49.240 casos novos diagnosticados, com um risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres, representando o tipo de câncer não cutâneo mais frequentemente diagnosticado (INCA, 2010).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a frequência do câncer de mama vem aumentando mundialmente. Nas décadas de 1960 e 1970, registrou-se aumento de 10 vezes nas taxas de incidência ajustadas por idade em diversos continentes. Apesar do aumento constante da incidência do câncer de mama, nas últimas décadas, pela primeira vez, demonstrou-se queda na mortalidade. Isto se deve ao uso crescente de métodos de rastreamento, como a mamografia, ao aumento do conhecimento da biologia do tumor e à introdução de novas técnicas terapêuticas (SCHMITT e GOBBI, 2006).

As taxas de incidência de câncer de mama são influenciadas, dentre outros fatores, pelo gênero, idade, história reprodutiva da mulher (que inclui menarca precoce, menopausa tardia, idade avançada de primeira gestação e nuliparidade), predisposição genética, doença benigna prévia, estilo de vida e exposição da mama à radiação, sendo os quatro primeiros os mais fortes e consistentes fatores de risco (TRICHOPOULOS et al., 2008; MCPHERSON; STEEL; DIXON, 2000).

Dentre os fatores de risco para o câncer de mama, o gênero é o mais importante: câncer de mama em homens corresponde a menos de 1% do total de casos (ARNOULD et al., 2006).

A idade tem nítida influência na incidência dos carcinomas de mama. O tumor é muito raro antes dos 25 anos. Sua incidência aumenta a partir do 30 anos, sendo que a cada década de vida o risco aumenta consideravelmente (SCHMITT e GOBBI, 2006). A partir da menopausa, a incidência do câncer de mama apresenta uma redução, o que não é evidente em outros tipos de câncer (TRICHOPOULOS et al., 2008). Isto decorre do fato de grande parte dos carcinomas de mama ter como denominador comum uma estimulação estrogênica prolongada atuando em um tecido geneticamente susceptível. Os estrógenos são importantes na indução e progressão do câncer de mama porque apresentam efeito mitogênico em células de mama (ALTUCCI et al., 1996; FOSTER e WIMALASENA, 1996). Nestas células, ao interagir com seu receptor, o estrógeno induz, dentre outros, a expressão de genes envolvidos com o ciclo celular (FOSTER et al., 2001).

De fato, estímulo estrogênico por longo tempo (menarca precoce e menopausa tardia) aumenta consideravelmente o risco para o desenvolvimento de carcinoma mamário (SCHMITT e GOBBI, 2006; MEDINA, 2005). Por outro lado, idade precoce de gravidez e número total de partos são fortes fatores de proteção (TRICHOPOULOS et al., 2008). O efeito protetor da gravidez é devido à indução de um grau maior de diferenciação das células da glândula mamária, que ocorre em resposta ao hormônio progesterona (PECK et al., 2002).

Aproximadamente 10% de todos os cânceres de mama ocorrem devido à predisposição genética. O padrão de herança envolvido é o autossômico dominante, com penetrância limitada. Os genes *BRCA1* e *BRCA2* são responsáveis por uma proporção substancial dos tumores malignos de mama de caráter familiar (MCPHERSON; STEEL; DIXON, 2000).

Diagnóstico prévio de hiperplasia epitelial atípica, um tipo de tumor benigno de mama, também está associado a um risco relativo maior de desenvolvimento de câncer de mama, uma vez que tal condição pode ser a precursora do carcinoma *in situ* (MCPHERSON; STEEL; DIXON, 2000; GREENE et al., 2006).

A incidência e mortalidade por câncer de mama apresentam variação em relação à distribuição geográfica e ao *status* socioeconômico, sendo maiores em populações de maior *status* socioeconômico, nos países do ocidente e em mulheres residentes em áreas urbanas, indicando que fatores ambientais e estilo de vida têm importância no desenvolvimento desta neoplasia. Fatores como ingestão de bebida alcoólica, alimentação e obesidade conferem maior risco de desenvolvimento do câncer de mama (TRICHOPOULOS et al., 2008).

Em mulheres expostas à radiação observou-se um risco relativo aumentado de desenvolvimento de câncer de mama, dependendo da dose de radiação e da idade em que ocorreu a exposição (CARMICHAEL; SAMI; DIXON, 2003).

Estudos mostram, ainda, que o uso de contraceptivo oral e terapia de reposição hormonal contínua (por mais de 5 anos) aumentam discretamente o risco para o câncer mamário (CERNE; FRKOVIC-GRAZIO; GERSAK, 2011 - In press).

2.1.2 Glândula mamária normal, origem e progressão do câncer de mama

Para compreendermos a origem e progressão do câncer de mama, é preciso, primeiramente, entender como está organizado o tecido glandular mamário normal.

A mama humana normal é formada por um complexo sistema de ductos ramificados a partir do mamilo, os quais se estendem por um estroma formado por tecido adiposo e tecido conjuntivo fibroso. Ao contrário de outros órgãos, a glândula mamária não está completamente desenvolvida ao nascimento e é durante a puberdade feminina que ocorre a ramificação do sistema ductal (SCHMITT e GOBBI, 2006).

O complexo sistema de ductos ramificados da mama é dividido em dois grupos: a unidade terminal ducto-lobular (UTDL) e os grandes ductos. A UTDL, também conhecida como lóbulo mamário, representa a porção secretória da glândula e, por isto, é considerada a unidade anátomo-funcional da mama. Quando em intensa atividade secretora, como na gravidez ou na lactação, os pequenos ductulos do lóbulo formam estruturas glandulares esféricas com uma cavidade interna, os ácinos. A secreção mamária é conduzida desde os ácinos até os mamilos por meio dos ductos mamários (SCHMITT e GOBBI, 2006; RAMSAY et al., 2005).

Os ductos e lóbulos que formam a glândula mamária são revestidos internamente por dois tipos de células epiteliais, as células luminais e as mioepiteliais, sendo que ambas estão apoiadas em uma lâmina basal. A camada mais interna é composta por células luminais, que são células colunares com capacidade de secreção e absorção de fluidos. Estas células expressam, dentre outros, citoqueratinas, proteínas relacionadas ao leite e receptores para o estrógeno. A camada mais externa da glândula mamária é formada por células mioepiteliais. Estas células mostram diferenciação miofibrilar (SCHMITT e GOBBI, 2006) e estão envolvidas na regulação da polaridade das células luminais, na morfogênese do ducto mamário, na produção de componentes da lâmina basal e na ejeção do leite durante a lactação (CICHON et al., 2010). Entre o mioepitélio e a camada luminal estão presentes também células multipotentes e células progenitoras envolvidas na regeneração da glândula mamária (SCHMITT e GOBBI, 2006).

As células da glândula mamária, como de outros epitélios glandulares, apresentam muitas características histológicas próprias, incluindo polarização celular e contatos célula-célula especializados. O desenvolvimento e manutenção desta estrutura polarizada são críticos para a funcionalidade normal da glândula mamária, sendo que os carcinomas de mama apresentam ruptura desta arquitetura tecidual (DEBNATH; MUTHUSWAMY; BRUGGE, 2003).

Os carcinomas de mama têm sua origem em uma célula do epitélio glandular mamário que adquire uma ou mais mutações em genes que controlam programas essenciais, como proliferação, morte e diferenciação celular. Por apresentar vantagem seletiva, a célula transformada é selecionada e passa por uma expansão clonal, sendo que cada uma de suas células-filha tem o potencial de adquirir novas alterações moleculares. Os sucessivos eventos de alteração molecular, seleção e expansão clonal levam a um acúmulo de modificações genéticas e epigenéticas, induzindo a progressão tumoral (AXELROD et al., 2006). Ao final do processo de evolução tumoral, as células tumorais podem apresentar as seguintes características: 1) potencial replicativo ilimitado; 2) autossuficiência em fatores de crescimento; 3) insensibilidade a fatores antiproliferativos; 4) evasão à apoptose; 5) angiogênese sustentada; 6) invasão tecidual e metástase (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000).

A progressão do câncer de mama pode se dar através de estágios clínico-patológicos definidos, começando com hiperplasia epitelial atípica, progredindo para carcinoma *in situ*, daí para carcinoma invasivo e culminando com doença metastática (BECKMANN et al., 1997).

As hiperplasias epiteliais de mama são caracterizadas pela proliferação de células epiteliais para o interior de ductos ou lóbulos mamários. Com base no padrão citológico e de crescimento arquitetural das células, são divididos em ductais ou lobulares. Em geral, as hiperplasias epiteliais mamárias não determinam massa palpável ou lesão macroscópica, sendo diagnosticadas incidentalmente em biópsias por outras lesões detectadas à mamografia. Acredita-se que as hiperplasias evoluam como um espectro de lesões que vão desde um padrão proliferativo mais simples até lesões mais complexas com atipias, podendo, não obrigatoriamente, evoluir para carcinoma *in situ* (SCHMITT e GOBBI, 2006).

O carcinoma de mama *in situ* constitui um conjunto de lesões da mama caracterizado pela proliferação epitelial maligna restrita aos ductos ou lóbulos mamários e, portanto, totalmente limitadas pela lâmina basal. Os carcinomas *in situ* da mama não representam uma entidade única: além da existência de dois tipos distintos, lobular e ductal, diferenças histológicas e de comportamento clínico reforçam a ideia de que o carcinoma *in situ* represente um grupo heterogêneo de lesões (SCHMITT e GOBBI, 2006).

Semelhantemente, o grupo dos carcinomas invasivos de mama é caracterizado por uma profunda heterogeneidade histomorfológica e clínica (BOMBONATI e SGROI, 2010) e inclui todos os carcinomas mamários que infiltram o estroma, independentemente da coexistência de componente *in situ*. Tal como os carcinomas *in situ*, também os invasores são divididos em dois grandes grupos: ductais e lobulares. O carcinoma ductal invasivo é o tipo mais frequente de câncer de mama e tem comportamento agressivo, com sobrevida de cinco anos em 60% das pacientes. Ele se apresenta como massa palpável, endurecida, em média com 2 a 3 cm de diâmetro. A lesão é bem visualizada à mamografia e manifesta-se por densidade irregular e microcalcificações frequentes (SCHMITT e GOBBI, 2006).

Os carcinomas de mama disseminam-se por invasão local, linfática ou hematogênica. Invasão local ocorre no próprio parênquima, pele, mamilo, músculo

ou parede torácica. Em 30-50% dos casos de câncer mamário, existem metástases nos linfonodos axilares no momento do diagnóstico. Em geral, metástases regionais indicam o potencial metastático à distância, sendo que quanto maior o número de linfonodos envolvidos, maior a probabilidade de metástases sistêmicas. Metástases sistêmicas ocorrem mais frequentemente nos pulmões, ossos, fígado, suprarrenais, ovários e sistema nervoso central (SCHMITT e GOBBI, 2006).

2.2 Matriz extracelular e evolução tumoral

O microambiente onde as células neoplásicas se encontram desempenha um importante papel na progressão tumoral, incluindo o câncer de mama. Muitos estudos já demonstraram que o potencial maligno não é dependente apenas de características inerentes das células tumorais, mas pode ser substancialmente modificado pelo microambiente (ECCLES e WELCH, 2007). Neste cenário, a matriz extracelular (MEC) tem grande importância, como será discutido a seguir.

A matriz extracelular é uma rede tridimensional complexa e organizada de macromoléculas que dão suporte estrutural para os elementos celulares do estroma. A matriz extracelular pode ser dividida em matriz intersticial e lâmina basal. Neste tópico, abordaremos aspectos gerais da matriz extracelular, enquanto que a lâmina basal, uma especialização da MEC, será discutida no tópico a seguir.

Estruturalmente, a matriz extracelular é composta por proteínas fibrosas, glicoproteínas adesivas, glicosaminoglicanos (GAGs), proteoglicanos e proteínas especializadas, incluindo fatores de crescimento (DALEY; PETERS; LARSEN, 2008), enzimas proteolíticas, citocinas e outras moléculas regulatórias (LUKASHEV e WERB, 1998). A composição precisa da MEC varia de tecido para tecido, sendo que a proporção entre os componentes da MEC e a forma como estão organizados ditam as propriedades físicas da matriz de um tecido específico (HOHENESTER e ENGEL, 2002). As macromoléculas da matriz extracelular são sintetizadas localmente pelas células do parênquima ou do estroma e estão em íntima associação com a superfície celular (TANZER, 2006; ZIOBER et al., 2006; ALBERTS et al., 2002).

As proteínas da MEC incluem as várias isoformas de colágeno, elastina, fibronectina, vitronectina, lamininas, dentre outros (DALEY; PETERS; LARSEN, 2008). As proteínas da MEC são grandes e multifuncionais e contêm diferentes domínios que podem conferir várias funções a uma mesma macromolécula (HOHENESTER e ENGEL, 2002).

As cadeias de glicosaminoglicanos da matriz são usualmente encontradas ligadas covalentemente a proteínas, na forma de proteoglicanos. Por serem carregados negativamente, os glicosaminoglicanos atraem cátions, principalmente Na^+ . Estes, por serem osmoticamente ativos, tornam a MEC altamente hidratada, formando um gel viscoso chamado de substância fundamental amorfa, onde estão embebidas as proteínas da matriz. Os GAGs resistem a forças de compressão na matriz e permitem rápida difusão de nutrientes, metabólitos, hormônios e outras moléculas regulatórias (TITZE et al., 2004; ALBERTS et al., 2002).

A matriz extracelular não é meramente um suporte estrutural para os elementos celulares do estroma. A MEC regula vários aspectos do comportamento celular, incluindo proliferação e crescimento celular, sobrevivência, morfologia, migração e diferenciação (DALEY; PETERS; LARSEN, 2008). Justamente por regular tais processos biológicos é que a MEC tem importância na progressão tumoral, como citado anteriormente. Esta importância reside no fato de ela conter enzimas proteolíticas, citocinas e moléculas regulatórias que, ao serem ativadas fora de um contexto normal, podem estimular a evolução do tumor. Mutações em genes que codificam proteínas de matriz ou seus receptores celulares já foram associadas ao câncer e outras doenças, demonstrando que a organização adequada da matriz extracelular é importante para as suas funções regulatórias (LUKASHEV e WERB, 1998; HYNES, 1996).

As moléculas da matriz extracelular exercem suas funções regulatórias nas células através da interação com receptores celulares, principalmente as integrinas. As integrinas são receptores transmembrânicos compostos por duas subunidades, α e β (HYNES, 1987). Ao interagirem com ligantes presentes na matriz extracelular, as integrinas medeiam adesão e geram sinalização celular de forma a integrar a célula a seu microambiente (VARNER e CHERESH, 1996; GIANCOTTI et al., 1999). Há uma grande variedade de subtipos de integrinas, os quais apresentam preferências por ligantes distintos. As células de carcinoma podem modificar a expressão destes

subtipos, favorecendo a expressão daqueles que estimulam a evolução tumoral (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000).

Como citado anteriormente, as moléculas da MEC desempenham papel importante na regulação de proliferação celular. O processo de proliferação celular de um tecido normal é altamente regulado, tanto por sinais intrínsecos da célula, quanto por sinais provenientes de seu microambiente (VAN DEN HEUVEL, 2005). Para entrar em divisão celular, uma célula normal necessita receber estímulos mitogênicos de seu meio externo, os quais são transmitidos para o interior da célula por meio de receptores celulares, que incluem as integrinas e os receptores de fatores de crescimento (STREULI, 2009). A importância da MEC se dá principalmente devido ao fato de ela ser um reservatório de fatores de crescimento e outras moléculas mitogênicas. Estes fatores, ao serem liberados, podem interagir com seus receptores celulares (KIM; TURNBULL; GUIMOND, 2011). A partir da interação com o receptor celular, vias de sinalização intracelular induzem a ativação de moléculas efetoras, como ERK, JNK e Rho GTPases, que levam à divisão celular (STREULI, 2009). A divisão celular é também regulada por estímulos antiproliferativos exercidos por inibidores de crescimento, os quais operam de modo a manter a célula em estado quiescente. Da mesma forma que os sinais mitogênicos, os sinais antiproliferativos são transmitidos para a célula por meio de receptores presentes na membrana celular ligados a circuitos de sinalização intracelular. Os inibidores de crescimento incluem moléculas solúveis presentes na matriz extracelular (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000).

A taxa de crescimento de um tecido é determinada não apenas por sua taxa de proliferação celular, mas também por sua taxa de morte celular. Apoptose é um processo altamente regulado de morte celular e possui um papel fundamental na organogênese, na hematopoiese, na reposição fisiológica de certos tecidos, na resposta inflamatória (RANGANATH e NAGASHREE, 2001) e na eliminação de células após dano celular (HENGARTNER, 2000).

Sobrevivência ou apoptose são processos regulados tanto por sinais intracelulares, quanto por sinais provenientes do microambiente celular. O meio extracelular é monitorado por receptores de superfície celular, incluindo receptores de sobrevivência (ex. IGFR e IL-3R) e de morte celular (ex. FASR e TNFR). Ao interagir com ligantes presentes no meio extracelular, estes receptores induzem vias

de sinalização associadas à sobrevivência ou morte celular (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000). Além dos receptores citados, as integrinas têm papel chave na regulação de apoptose. As integrinas funcionam como biossensores que respondem a moléculas específicas da MEC e geram sinais de morte ou sobrevivência. Algumas integrinas, ao interagir com seus ligantes, podem, por exemplo, elevar a expressão de Bcl2 e, assim, inibir apoptose (ZIOBER; LIN; KRAMER, 1996). A adesão de integrinas a moléculas da MEC é essencial para a sobrevivência celular e, no caso de células dependentes de ancoragem, a perda de adesão induz um tipo especial de apoptose denominado anoikis (HSIEH e NGUYEN, 2005).

Resistência à apoptose é uma importante característica adquirida por células malignas durante a progressão tumoral, uma vez que permite a ela sobreviver aos sinais ambientais de indução de morte celular e levar adiante alterações genéticas e epigenéticas (AXELROD et al., 2006). Muitos tipos de tumores mamários, como o carcinoma ductal, são caracterizados pela perda da organização do ácino e preenchimento do lúmen, decorrente de uma maior taxa proliferativa aliada à inibição da apoptose nestes tumores (REGINATO et al., 2005).

A matriz extracelular tem papel importante também no processo de invasão tumoral. Dois mecanismos estão envolvidos no processo de invasão: a migração celular (HEGERFELDT et al., 2002) e o remodelamento tecidual através de degradação proteolítica da matriz extracelular (JOHNSEN et al., 1998).

A migração celular é um mecanismo complexo que depende, além de outros fatores, da habilidade da célula em formar interações transientes com componentes da matriz extracelular. As glicoproteínas presentes na MEC (ex. fibronectina e laminina) guiam as células durante o processo de migração celular (ALBERTS et al., 2002). Moléculas de adesão célula-matriz têm importância no processo de migração celular, com destaque para as integrinas, que podem controlar migração celular ao interagir com as glicoproteínas da matriz extracelular (VARNER e CHERESH, 1996).

Para as células tumorais invadirem tecidos circunjacentes e formarem metástases é necessária uma extensiva degradação de componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno, fibronectina, laminina e proteoglicanas (MOSCATELLI et al., 1988; WOESSNER JR, 1991). As enzimas responsáveis pela degradação dos componentes da MEC são as proteinases da matriz extracelular,

que podem ser produzidas tanto pelas células tumorais, quanto por células estromais (JOHNSEN et al., 1998). A proteólise da matriz abre caminho para a migração celular, ativa moléculas latentes e ainda gera novas moléculas bioativas (SCHENK et al., 2003).

Entre as proteinases da matriz extracelular, destacam-se as metaloproteinases da matriz (MMP). O grupo das MMPs contém mais de 20 endopeptidases dependentes de Zn^{2+} , capazes de degradar diversos componentes da MEC (STAMENKOVIC, 2003; RUNDHAUG, 2005; PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007). As MMPs são altamente reguladas por processos que envolvem regulação da transcrição, ativação e inibição da atividade enzimática. Os maiores inibidores naturais da atividade das MMPs são os inibidores teciduais de metaloproteinases, conhecidos como TIMPs (WOESSNER JR, 2001). Em tecidos normais, a maioria das MMPs é expressa em níveis baixos ou não é expressa. No entanto, várias citocinas e fatores de crescimento presentes na MEC, além de interações celulares, podem induzir rápida expressão de MMPs (OVERALL e LOPEZ-OTIN, 2002; STAMENKOVIC, 2003; BJÖRKLUND e KOIVUNEN, 2005).

O processo de invasão tecidual, além de ocorrer durante a evolução tumoral, ocorre também em processos fisiológicos normais, como angiogênese, embriogênese, cicatrização e defesa imunológica (DIETERICH et al., 2008; LAMALICE; LE BOEUF; HUOT, 2007). O mecanismo de invasão utilizado pelas células tumorais é o mesmo utilizado por células não malignas em condições normais. Porém, diferentemente do que ocorre com as células tumorais, a invasão de células normais é finamente regulada e cessa quando o estímulo é retirado (WOODHOUSE; CHUAQUI; LIOTTA, 1997).

Durante o processo de invasão tumoral, as células neoplásicas podem alcançar a corrente sanguínea, extravasar e proliferar em outro órgão-alvo. Neste percurso, a maioria das células que escapam do tumor primário não sobrevive (JOHN e TUSZYNSKI, 2001), mas aquelas que apresentam características moleculares favoráveis são selecionadas e dão origem a um tumor metastático (BIDARD et al., 2008). A capacidade que a célula tumoral tem de sobreviver e proliferar depende de sua habilidade em responder aos fatores de crescimento e, ao mesmo tempo, resistir aos inibidores de crescimento e indutores de morte presentes em seu novo microambiente. Dependendo da forma como responderem, as células

tumorais irão entrar em apoptose, manter-se quiescentes ou proliferar no novo órgão-alvo (COOK; HURST; WELCH, 2011).

2.3 Lâmina basal, laminina e seus peptídeos bioativos

2.3.1 A lâmina basal

Como discutido no tópico anterior, a matriz extracelular exerce influência no comportamento tumoral. Na interface entre o epitélio e o tecido conjuntivo, a matriz forma a lâmina basal (LB), uma camada fina (40-120 nm de espessura), flexível e altamente especializada de matriz extracelular (ALBERTS et al., 2002; COLOGNATO e YURCHENCO, 2000; MINER e YURCHENCO, 2004; YURCHENCO et al., 2004; YURCHENCO e WADSWORTH, 2004; TANZER, 2006). A lâmina basal também pode ser observada recobrindo células do mesotélio, células musculares, células de Schwann e adipócitos (BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003).

A lâmina basal é constituída predominantemente por: 1) colágeno tipo IV, um polímero não fibroso; 2) laminina, uma glicoproteína adesiva; 3) fibronectina; 4) nidogênio (entactina) e 5) perlecan, um proteoglicano. Pequenas quantidades de outros proteoglicanos e glicoproteínas também podem ser encontradas (AUMAILLEY, 1995; COLOGNATO e YURCHENCO, 2000; SASAKI et al., 2004; MAO e SCHWARZBAUER, 2005). Em alguns epitélios estratificados, a lâmina basal é ligada ao tecido conjuntivo por fibrilas de ancoragem especializadas contendo colágeno tipo VII. O termo membrana basal é utilizado para descrever esta estrutura composta pela lâmina basal e fibrilas de ancoragem (MCMILLAN; AKIYAMA; SHIMIZU, 2003; ALBERTS et al., 2002).

A lâmina basal é sintetizada principalmente pelas células que repousam sobre ela. Durante o processo de organização da lâmina basal, as moléculas de colágeno tipo IV se polimerizam e dão origem a uma rede de colágeno. Da mesma forma, moléculas de laminina se associam entre si, formando uma rede. A importância da laminina é ainda reforçada pelo fato de sua ausência impedir a formação da lâmina basal (YURCHENCO et al., 2004; YURCHENCO e WADSWORTH, 2004). O nidogênio e o perlecan fazem a conexão entre as redes de colágeno e laminina por se associarem com ambas as moléculas. Posteriormente, outras moléculas se

conectam a esta estrutura, criando uma rede interligada que se torna resistente e insolúvel. Receptores celulares, principalmente integrinas e distroglicanos, auxiliam na organização da lâmina basal (ALBERTS et al., 2002; TANZER, 2006).

Funcionalmente, a LB apresenta funções mecânicas de suporte; atua na compartimentalização de tecidos, formando uma barreira de permeabilidade seletiva entre tecidos diferentes; auxilia na organização e manutenção de tecidos, tanto nos estágios iniciais do desenvolvimento, quanto na fase adulta; determina polaridade celular; e ainda regula diversos processos biológicos, influenciando, dentre outros, no metabolismo celular, proliferação, diferenciação e migração celular. Nos glomérulos renais e alvéolos pulmonares, a lâmina basal atua como um filtro altamente seletivo para sais e pequenas moléculas (ALBERTS et al., 2002; MASUNAGA, 2006; COLOGNATO e YURCHENCO, 2000; SUZUKI et al., 2005).

Além de funcionar como barreira para grandes solutos, a lâmina basal também atua como barreira seletiva para o movimento de células, permitindo apenas o trânsito de macrófagos e linfócitos (ALBERTS et al., 2002). Desta forma, durante o processo de invasão tumoral, a lâmina basal é o primeiro obstáculo que a célula neoplásica epitelial deve romper para atingir o tecido conjuntivo. Um evento chave que ocorre durante o processo de invasão tumoral é a clivagem proteolítica de componentes da lâmina basal. A ação das enzimas proteolíticas gera descontinuidades na lâmina basal, facilitando o processo de invasão (EPSTEIN, 2003; ZIOBER et al., 2006; ALEXANDROVA, 2008). Entre as moléculas da lâmina basal que sofrem clivagem proteolítica durante a invasão do tumor estão as lamininas, discutidas no tópico a seguir.

2.3.2 *Laminina*

As lamininas são as glicoproteínas mais abundantes da lâmina basal e exercem tanto funções estruturais quanto regulatórias (MARTIN e TIMPL, 1987; SASAKI et al. 2004). Esta molécula foi identificada por Timpl et al. em 1979, depois de ser isolada e purificada a partir de uma neoplasia de camundongo dotada de grande quantidade de lâmina basal, o tumor Engelbreth-Holm-Swarm (TIMPL et al., 1979).

As lamininas são proteínas grandes (400 a 900 kDa) e heterotriméricas, ou seja, compostas por três cadeias polipeptídicas diferentes, denominadas cadeias α , β e γ (AUMAILLEY et al., 2005). As 3 cadeias da laminina se organizam formando uma estrutura cruciforme, com 3 braços curtos e um braço longo formado a partir do entrelaçamento de parte de cada uma das cadeias (MARTIN e TIMPL, 1987; MINER e YURCHENCO, 2004; AUMAILLEY et al., 2005; HAMILL et al., 2009).

A laminina apresenta isoformas resultantes da combinação de diferentes cadeias α , β e γ . Até o momento, já foram identificados cinco genes distintos para a cadeia α , quatro para a cadeia β e três para a cadeia γ , sendo que as cadeias $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\gamma 3$ podem também apresentar variantes de *splicing* (COLOGNATO e YURCHENCO, 2000; BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003; MINER e YURCHENCO, 2004). A associação das diferentes cadeias α , β e γ resultaria em 45 possíveis combinações heterotriméricas, sem considerar variantes de *splicing*. Entretanto, o número real de combinações é bem inferior, devido a restrições de união entre algumas cadeias (COLOGNATO e YURCHENCO, 2000; HAMILL et al., 2009). Atualmente, a família das lamininas é constituída por 16 isoformas, mas provavelmente existem outras que ainda não foram isoladas (MALINDA e KLEINMAN, 1996; PONCE et al., 2001; MINER e YURCHENCO, 2004). As isoformas de laminina são sintetizadas por praticamente todas as células epiteliais, além de células musculares lisas, de tecido ósseo, de músculo cardíaco, células nervosas, endoteliais e de medula óssea (BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003). Entretanto, tais tecidos expressam isoformas específicas de laminina, decorrente do fato de que as cadeias individuais que constituem a laminina apresentam expressão temporal e tecido dependente (PATARROYO; TRYGGVASON; VIRTANEN, 2002). A tabela abaixo mostra os tecidos onde cada cadeia individual da laminina é normalmente expressa.

Tabela 2.1 – Cadeias da laminina e localização nos tecidos

Cadeias da laminina	Tecidos onde são expressas
$\alpha 1$	Embrião, neuroretina, rim, glândulas mamária e salivar
$\alpha 2$	Músculo esquelético e cardíaco, nervos periféricos, capilares, trofoblasto, cérebro e outros tecidos
$\alpha 3$	Pele e outros epitélios
$\alpha 4$	Músculos esquelético, cardíaco e liso fetal, nervos, vasos sanguíneos, endotélio, medula óssea e outros tecidos
$\alpha 5$	Diversos epitélios, rins, vasos sanguíneos, medula óssea, músculos e nervos em desenvolvimento e lâmina basal sináptica
$\beta 1$	Maioria dos tecidos
$\beta 2$	Junção neuromuscular, vasos sanguíneos e glomérulo renal
$\beta 3$	Pele e maioria dos outros epitélios
$\gamma 1$	Maioria dos tecidos
$\gamma 2$	Pele e maioria de outros epitélios
$\gamma 3$	Rim, pulmão, trato reprodutivo, nervo e cérebro

Fonte: (PATARROYO; TRYGGVASON; VIRTANEN, 2002)

Os trímeros de laminina são organizados intracelularmente. Inicialmente, são formados dímeros de subunidades β e γ , as quais são unidas por pontes dissulfeto. O dímero é retido no citoplasma até a incorporação da subunidade α . A secreção da laminina só ocorre após a trimerização (HAMILL et al., 2009). Após a síntese e secreção, a laminina se deposita principalmente, mas não exclusivamente, na lâmina basal (BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003).

Quanto à estrutura molecular das lamininas, análises com microscopia eletrônica mostraram que a laminina é uma glicoproteína com múltiplos domínios, possuindo diversos segmentos semelhantes a bastonetes e domínios globulares (MARTIN e TIMPL, 1987; MINER e YURCHENCO, 2004). Todas as subunidades contêm repetições seguidas de domínios semelhantes ao fator de crescimento epidermal (domínios LE). Na região N-terminal das subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3B$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$ e $\gamma 3$ existe um grande domínio globular, denominado LN, enquanto que este domínio está ausente da região N-terminal das subunidades

$\alpha 3A$, $\alpha 4$ e $\gamma 2$. Em cada subunidade, o último domínio LE é seguido por um domínio de α -hélice. Os domínios α -hélice das 3 subunidades da laminina se enrolam para formar a estrutura cruciforme da laminina. A região C-terminal das subunidades α possui ainda 5 domínios globulares denominados domínios LG1-LG5 (HAMILL et al., 2009). Nos domínios globulares estão presentes vários sítios para ligação a integrinas (BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003).

Recentemente, Aumailley et al. (2005) propuseram uma nova nomenclatura para as lamininas. Ao contrário do sistema antigo, em que as lamininas eram nomeadas de acordo com a ordem de descoberta, no novo sistema, mais intuitivo, as lamininas são nomeadas de acordo com as subunidades que apresentam. Assim, a laminina-1, por exemplo, passaria então a ser chamada de laminina-111, já que possui cadeias $\alpha 1$, $\beta 1$ e $\gamma 1$. Laminina-5, por sua vez, seria denominada laminina-332, por ser composta pelas cadeias $\alpha 3$, $\beta 3$ e $\gamma 2$ (AUMAILLEY et al., 2005).

A tabela a seguir mostra as isoformas da laminina, suas cadeias e as integrinas com as quais se ligam, assim como suas nomenclaturas atuais e antigas (AUMAILLEY et al., 2005).

Tabela 2.2 - Isoformas da laminina, suas respectivas cadeias e integrinas ligantes.

Antiga Nomenclatura	Nova nomenclatura	Cadeias	Receptores (integrinas)
Laminina-1	Laminina-111	$\alpha 1\beta 1\gamma 1$	$\alpha 1\beta 1, \alpha 2\beta 1, \alpha 6\beta 1, \alpha 6\beta 4, \alpha 7\beta 1$
Laminina-2	Laminina-211	$\alpha 2\beta 1\gamma 1$	$\alpha 1\beta 1, \alpha 2\beta 1, \alpha 3\beta 1, \alpha 6\beta 1, \alpha 6\beta 4, \alpha 7\beta 1$
Laminina-3	Laminina-121	$\alpha 1\beta 2\gamma 1$	ND
Laminina-4	Laminina-221	$\alpha 2\beta 2\gamma 1$	Similar à laminina-2
Laminina-5	Laminina-332	$\alpha 3\beta 3\gamma 2$	$\alpha 3\beta 1, \alpha 6\beta 4, \alpha 6\beta 1$
Laminina-6	Laminina-311	$\alpha 3\beta 1\gamma 1$	ND
Laminina-7	Laminina-321	$\alpha 3\beta 2\gamma 1$	ND
Laminina-8	Laminina-411	$\alpha 4\beta 1\gamma 1$	$\alpha 6\beta 1$
Laminina-9	Laminina-421	$\alpha 4\beta 2\gamma 1$	ND
Laminina-10	Laminina-511	$\alpha 5\beta 1\gamma 1$	$\alpha 3\beta 1, \alpha 6\beta 1$
Laminina-11	Laminina-521	$\alpha 5\beta 2\gamma 1$	$\alpha 3\beta 1, \alpha 6\beta 1$
Laminina-12	Laminina-213	$\alpha 2\beta 1\gamma 3$	ND
Laminina-13	Laminina-323	$\alpha 3\beta 2\gamma 3$	ND
Laminina-14	Laminina-423	$\alpha 4\beta 2\gamma 3$	ND
Laminina-15	Laminina-523	$\alpha 5\beta 2\gamma 3$	ND

ND Não determinado

Fonte: (BURGESON et al., 1994; KUTLESA et al. 2002; AUMAILLEY et al., 2005)

As lamininas exercem papéis importantes na morfogênese e homeostase tecidual por regular a arquitetura tecidual, adesão celular, espraiamento, sinalização celular, migração, proliferação e crescimento de neuritos (HAMILL et al., 2009; MARTIN e TIMPL, 1987; MALINDA e KLEINMAN, 1996; PONCE et al., 2001; BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003). Além do papel que as lamininas exercem em tecidos normais, algumas de suas atividades já foram relacionadas a importantes eventos da progressão tumoral, como descrito a seguir.

Adesão de células epiteliais malignas à laminina foi a primeira atividade biológica demonstrada para essa proteína na progressão tumoral (MALINDA e KLEINMAN, 1996). A laminina também mostrou atividade quimiotática, o que poderia explicar sua habilidade em estimular os movimentos celulares necessários aos processos de invasão e metástase (MARTIN e TIMPL, 1987; MALINDA e KLEINMAN, 1996). Além disto, células tumorais co-injetadas com laminina em ratos atômicos promoveram aumento da formação de colônias metastáticas no pulmão (IWAMOTO et al., 1987).

Dentre todas as isoformas da laminina, a laminina-111 (antiga laminina-1) é a mais estudada e foi a primeira a ser identificada, estruturalmente analisada e sequenciada. Ela é formada pelas cadeias $\alpha 1$ (400 kDa), $\beta 1$ (200 kDa) e $\gamma 1$ (200 kDa) (TIMPL e BROWN, 1994; AUMAILLEY e SMYTH, 1998; EKBLOM et al., 1998; COLOGNATO e YURCHENCO, 2000).

A laminina-111 é considerada a mais importante nos estágios iniciais do desenvolvimento (TIMPL e BROWN, 1994; SASAKI et al., 2004). Experimentos mostraram que camundongos que não expressavam laminina-111 morriam logo após implantação do embrião, enquanto que na ausência de moléculas como perlecan, colágeno IV ou nidogênio, esta etapa transcorria normalmente, demonstrando a importância desta molécula (SASAKI et al., 2004).

Dentre as cadeias que formam a laminina-111, a cadeia $\alpha 1$ é a mais conhecida e estudada. É encontrada no blastocisto e em uma variedade de locais durante a embriogênese (EKBLOM et al., 1998; COLOGNATO e YURCHENCO, 2000; MINER e YURCHENCO, 2004). Em adultos, sua expressão se restringe às glândulas mamária e salivar, rins, neuroretina (PATARROYO; TRYGGVASON; VIRTANEN, 2002), testículos, tireoide, endométrio e folículos capilares em desenvolvimento (VIRTANEN et al., 2000). Já as cadeias $\beta 1$ e $\gamma 1$ têm uma expressão menos restrita (tabela 2.1). A cadeia $\gamma 1$ da laminina apresenta ligação com alta afinidade ao nidogênio, que está presente em todas as lâminas basais. A interação ocorre através de domínios semelhantes ao EGF, localizados no braço curto da cadeia (EKBLOM, 1996; NOMIZU et al., 1997; EKBLOM et al., 1998).

Ao contrário de muitos tecidos adultos normais que perdem a expressão da laminina-111 por deixarem de expressar a cadeia $\alpha 1$, a glândula mamária normal expressa esta isoforma de laminina. Acredita-se que isto seja devido ao fato de a mama humana permanecer em constantes mudanças durante ciclos menstruais, puberdade, gravidez e menopausa, sendo assim, um órgão em constante desenvolvimento (GUDJOHNSON et al., 2002). Na glândula mamária, a laminina-111 exerce papel chave na determinação da polaridade das células epiteliais luminais. Ela é sintetizada principalmente pelas células mioepiteliais. A cadeia $\alpha 1$ da laminina-111 é a principal responsável pela determinação da polaridade das células epiteliais (GUDJOHNSON et al., 2005; KLEIN et al., 1988). Além da laminina-111, a

lâmina basal da glândula mamária também apresenta a laminina-332, laminina-511 e laminina-521. Entretanto, ao contrário da laminina-111, as outras isoformas não são capazes de induzir polaridade das células luminas (BISSELL e BILDER, 2003).

Durante o desenvolvimento do câncer de mama ocorrem alterações na composição e no nível de expressão das diferentes isoformas da laminina, o que contribui com a progressão da doença. A excessiva atividade proteolítica resulta em menor deposição e dissolução parcial da lâmina basal, uma característica de tumores invasivos. Está claro, porém, que algumas isoformas da laminina continuam sendo expressas nas células tumorais e contribuem funcionalmente para o fenótipo invasivo do tumor (CHIA et al., 2007). A glândula mamária frequentemente deixa de expressar a laminina-111, levando à perda de polaridade e da organização das células epiteliais. Gudjohnson et al. (2002) observaram que 75% das células mioepiteliais derivadas de câncer de mama não expressavam a laminina-111 (GUDJOHNSON et al., 2002; GUDJOHNSON et al., 2005). Isto ocorre porque as células de câncer de mama deixam de expressar a cadeia $\alpha 1$. Por outro lado, a expressão das cadeias $\alpha 5$, $\beta 1$ e $\gamma 1$ não é perdida durante a progressão do câncer de mama, ao contrário, aumenta de acordo com o potencial metastático (CHIA et al., 2007).

2.3.3 *Peptídeos bioativos da laminina*

Algumas das funções biológicas atribuídas à laminina são devidas não a molécula como um todo, mas a pequenas porções dessa grande glicoproteína (FAISAL KHAN et al., 2002). Estudos já demonstraram que algumas pequenas sequências de aminoácidos derivadas da laminina são capazes de exercer funções biológicas, sendo algumas destas funções diferentes daquela exercida pela molécula inteira. Essas sequências são conhecidas como peptídeos bioativos (SCHENK e QUARANTA, 2003; HANDSLEY e EDWARDS, 2005).

Alguns dos sítios bioativos da laminina não estão expostos na superfície da molécula íntegra. Neste caso, são denominados de sítios matricrípticos ou matricriptinas. A ativação das funções biológicas exercidas pelos sítios crípticos requer mudança conformacional da molécula íntegra ou processamento proteolítico por proteases presentes na MEC, incluindo as MMPs. Ambos os processos expõem

os sítios crípticos, que então se tornam disponíveis para reconhecimento por receptores celulares e, assim, podem exercer suas funções biológicas. Mudanças conformacionais na molécula íntegra podem ocorrer através de forças mecânicas geradas por células e ligação a outras moléculas, incluindo receptores celulares (SCHENK e QUARANTA, 2003).

A presença de sítios matricrípticos na laminina levanta a seguinte questão: Por que não estão expostos em todas as condições e durante todos os estágios do desenvolvimento? A hipótese mais aceita é a de os sítios matricrípticos fazem parte de uma estratégia evolutiva para controlar diferentes atividades celulares. Dessa forma, determinadas instruções podem permanecer escondidas na molécula intacta até serem requeridas, não havendo necessidade de inibidores ou bloqueio de atividade que não foi requisitada em determinado momento (SCHENK e QUARANTA, 2003).

Os sítios matricrípticos não estão presentes apenas nas lamininas. Está cada vez mais evidente que estes sítios estão presentes em basicamente todas as moléculas da MEC, incluindo colágenos, fibronectinas, elastina e outras. Na laminina, estão presentes principalmente nos domínios globulares semelhantes ao fator de crescimento epidermal (domínios LE). Já se demonstrou, inclusive, que alguns dos sítios matricrípticos de domínios LE da laminina podem atuar como ligantes funcionais de EGFR (SCHENK e QUARANTA, 2003).

As várias atividades biológicas estimuladas pela laminina, tanto em células normais quanto neoplásicas, despertaram o interesse em se estudar os diferentes sítios ativos da molécula.

Nomizu et al. realizaram varreduras sistemáticas na molécula de laminina-111 para pesquisar por sequências biologicamente ativas. A seguir, sintetizaram 560 peptídeos derivados das três cadeias da laminina-111 ($\alpha 1$, $\beta 1$ e $\gamma 1$), sendo 208 peptídeos derivados da cadeia $\alpha 1$, 187 derivados da cadeia $\beta 1$ e 165 da cadeia $\gamma 1$. Depois de sintetizados, os peptídeos foram testados quanto à atividade de adesão celular. Dentre os 560 peptídeos, apenas 51 foram identificados como sequências adesivas, sendo 25 da cadeia $\alpha 1$, 14 da cadeia $\beta 1$ e 12 da cadeia $\gamma 1$ (NOMIZU et al., 1997, 1998, 2000, 2001).

Outros estudos mostraram que muitos dos peptídeos derivados da laminina são reguladores de diversos processos biológicos, tanto em células normais quanto em células tumorais, como relatado a seguir.

O peptídeo AG73 (RKRLQVQLSIRT), localizado no quarto domínio globular (LG4) da cadeia $\alpha 1$ da laminina foi identificado por Nomizu et al. (2005) como sendo um peptídeo altamente adesivo (Nomizu et al., 2005). Posteriormente, os efeitos de AG73 foram testados em várias células e sistemas, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (HOFFMAN et al., 1998, 2001; ENGBRING et al., 2002; IKEMOTO et al., 2006). Estudos mostraram que AG73 tem grande relevância em biologia tumoral (SONG et al., 1997; ENGBRING et al., 2002; SUZUKI et al., 2003, 2005; MOCHIZUKI et al., 2007). Por exemplo, quando co-injetado com células de melanoma B16-F10 em camundongos, esse peptídeo promoveu maior número de metástases em pulmões, fígado e tecido ósseo (SONG et al., 1997; KIM et al., 1998; ENGBRING et al., 2008). Adicionalmente, esse peptídeo também está relacionado à angiogênese (MOCHIZUKI et al., 2003). Nosso laboratório também demonstrou que AG73 é capaz de regular a morfologia de células derivadas de neoplasias de glândula salivar (OLIVEIRA, 2004; GAMA-DE-SOUZA et al., 2008), promover migração, invasão e secreção de proteases em carcinoma epidermoide oral através da interação com os receptores sindecana-1 e integrina $\beta 1$ (SIQUEIRA et al., 2010) e promover atividade de adesão e secreção de proteases através da interação com os receptores supracitados em linhagens celulares derivadas de carcinoma adenoide cístico e mioepitelioma humanos (GAMA-DE-SOUZA et al., 2008).

SIKVAV é outro peptídeo derivado da cadeia $\alpha 1$ da laminina. Está localizado no final do braço longo da cadeia, logo acima do domínio globular (TASHIRO et al., 1989). SIKVAV estimula atividades biológicas como adesão, migração, crescimento de neuritos e indução de metástase (TASHIRO et al., 1989; KANEMOTO et al., 1990; GRANT et al., 1992; NOMIZU et al., 1992). Trabalho envolvendo este peptídeo e células derivadas de carcinoma adenoide cístico humano (células CAC2) demonstrou que SIKVAV induz a formação de espaços pseudocísticos em células crescidas em preparados tridimensionais contendo tal peptídeo e que esse fenômeno pode estar relacionado com a secreção de MMPs (FREITAS e JAEGER, 2002). Em um estudo mais recente, foi verificado que SIKVAV estimula, de maneira dose-dependente, a secreção de MMP2 e MMP9 em células CAC2. Além disso, a

regulação dessa atividade pode envolver receptores do tipo integrinas $\alpha 6$, $\alpha 3$ e $\beta 1$ e a via de sinalização ERK1/2 (FREITAS et al., 2007).

Na cadeia $\beta 1$, a sequência YIGSR é capaz de promover adesão e migração celular, bem como inibir angiogênese e metástases tumorais (GRAF et al., 1987; IWAMOTO et al., 1987; MORAIS FREITAS et al., 2007). As sequências PDSGR e F-9 (RYVVLPR), localizadas na mesma cadeia, também promovem adesão celular (CHARONIS et al., 1988; SKUBITZ et al., 1990).

Em relação à cadeia $\gamma 1$ da laminina, Nomizu et al. (1997) realizaram varreduras sistemáticas nesta cadeia e revelaram 20 sequências ativas. Dentre elas, quatro peptídeos apresentavam forte atividade adesiva em células de fibrossarcoma (HT1080) e melanoma (B16-F10). Entre estes peptídeos, foi identificado o peptídeo C16 (NOMIZU et al., 1997), objeto de estudo deste trabalho.

2.4 Peptídeo C16

O peptídeo C16 (KAFDITYVRLKF) está presente no primeiro domínio globular da cadeia $\gamma 1$ da laminina (NOMIZU et al., 1997). Até o momento, não está claro se este peptídeo representa um sítio matricríptico ou se está exposto na molécula íntegra da laminina. No caso de ser um sítio matricríptico, C16 poderia ser liberado para exercer suas funções durante a degradação da lâmina basal (PONCE; NOMIZU; KLEINMAN, 2001), que é uma das primeiras etapas do processo de invasão tumoral, cicatrização e remodelamento tecidual (GHOSH e STACK, 2000; SCHENK e QUARANTA, 2003; MOTT e WERB, 2004).

Estudo realizado por Nomizu et al. (1997) revelou que os aminoácidos YVRL são críticos para que C16 possa promover seus efeitos (NOMIZU et al., 1997). Como receptores para C16, foram identificados, através de ensaio de coluna de afinidade, as integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$ (PONCE; NOMIZU; KLEINMAN, 2001).

O peptídeo C16 já foi relacionado em diversos estudos a processos biológicos associados à evolução tumoral. Trabalho realizado por Kuratomi et al. (2002) mostrou que o peptídeo C16 induz aumento significativo de metástase pulmonar de células de melanoma (B16-F10) em camundongos. Ensaios *in vitro* demonstraram que o peptídeo C16 estimula migração e secreção de MMP9 nas células B16-F10.

Os autores acreditam que C16 desempenhe papel em várias etapas da metástase, como adesão, migração, invasão e angiogênese. Contudo, C16 não parece estimular proliferação celular (KURATOMI et al., 2002).

Utilizando ensaios com membrana corioalantóica, Lugassy et al. (2007) verificaram que o peptídeo C16 estimula migração angiotrópica de células de melanoma humano (linhagem C8161). Os autores sugerem ainda que o peptídeo C16 possa se tornar um alvo molecular na prevenção de metástase tumoral em melanomas (LUGASSY et al., 2007).

Dados de nosso laboratório também mostram que C16 estimula migração, invasão e secreção de proteases em células de carcinoma adenoide cístico (CAC2), através de integrinas $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$, anteriormente identificadas como receptores celulares para o peptídeo C16 em células endoteliais (PONCE; NOMIZU; KLEINMAN, 2001). As vias de sinalização ERK e AKT podem estar envolvidas na resposta induzida por C16 (GAMA-DE-SOUZA, 2008).

Além dos efeitos de C16 na migração celular, invasão tumoral e metástase, trabalhos mostraram que este peptídeo representa um potente sítio angiogênico da cadeia $\gamma 1$ da laminina (PONCE et al., 1999; PONCE; NOMIZU; KLEINMAN, 2001; PONCE e KLEINMAN, 2003). C16 mostrou apresentar atividade adesiva para células endoteliais e estimular formação de tubos semelhantes a capilares quando células endoteliais são cultivadas sobre Matrigel, uma lâmina basal reconstituída. Ensaios realizados *in vivo* também mostraram que C16 é capaz de estimular brotamento de células endoteliais a partir de anéis aórticos e estimular angiogênese em membrana corioalantóica. O processo de angiogênese consiste de várias etapas, que inclui degradação da lâmina basal, migração, proliferação e síntese de nova lâmina basal pelas células endoteliais (PONCE et al., 1999). Ainda não está totalmente esclarecido em quais destas etapas C16 atuaria na indução de angiogênese. Um estudo demonstrou que C16 é capaz de aumentar atividade proteolítica de MMP2 em células HUVEC, células endoteliais humanas derivadas de cordão umbilical (MALINDA et al., 2008). Uma observação interessante é que a laminina, quanto intacta, não possui efeito angiogênico (PONCE e KLEINMAN, 2003).

Além dos efeitos do peptídeo C16 sobre processos biológicos ligados à progressão tumoral, também foi verificado seu papel no processo de cicatrização *in vivo*. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que o peptídeo estimulou migração de fibroblastos, contração de bordas de ferida, reepitelialização e angiogênese (MALINDA et al., 2008).

2.5 Moléculas da matriz extracelular e regulação da expressão gênica

Como apresentado anteriormente, as moléculas da matriz extracelular regulam vários aspectos do comportamento celular, incluindo proliferação e crescimento celular, sobrevivência, morfologia, migração e diferenciação celular (DALEY; PETERS; LARSEN, 2008). Parte desta regulação se dá através da modulação da expressão gênica (BLUM; ZEIGLER; WICHA, 1989).

Uma das primeiras evidências de que moléculas da MEC regulam a expressão gênica de células da glândula mamária veio de um estudo que mostrou que a laminina poderia induzir a síntese de caseína nessas células. Posteriormente, foi demonstrado que a porção E3, localizada na região carboxi-terminal da cadeia $\alpha 1$ da laminina, era a responsável por gerar sinalização intracelular que culminava com a ativação da região promotora do gene codificante da caseína (STREULI et al., 1995).

As proteínas da MEC podem afetar diretamente a expressão gênica através da interação com uma variedade de receptores celulares, principalmente integrinas (JONES; COHEN; CHAMBERS, 2002; STREULI et al., 1995). A ligação de moléculas da MEC a integrinas induz agrupamento destes receptores e formação, em seus domínios citoplasmáticos, de um complexo multiproteico contendo moléculas associadas ao citoesqueleto e moléculas sinalizadoras. As moléculas associadas ao citoesqueleto incluem a vinculina, paxilina, talina, α -actinina e filamina, enquanto que tirosinas e serinas quinases fazem parte do grupo das moléculas sinalizadoras (GUAN, 2010; BALDA e MATTER, 2003).

Um dos componentes mais proeminentes da sinalização via integrina é FAK (quinase de adesão focal). Após sua ativação por integrinas, FAK, direta ou indiretamente, ativa diversas vias de sinalização, dentre elas, a via das MAP

quinases (incluindo a via ERK), a via PI3K e a via AKT (GUAN, 2010). As integrinas podem ainda alterar as concentrações intracelulares de Ca^{2+} , ativar a proteína quinase C (PKC) e afetar os níveis de AMP cíclico (ZIOBER; LIN; KRAMER, 1996).

As vias de sinalização geradas por integrinas frequentemente culminam com a ativação de fatores de transcrição, como por exemplo AP-1, NF- κ B e c-jun. Estes fatores de transcrição se ligam a sequências específicas de regiões promotoras gênicas e induzem a expressão de seus genes-alvo. A expressão destes genes, por sua vez, leva aos efeitos biológicos anteriormente descritos (TROUSSARD et al., 1999).

A regulação da expressão gênica iniciada por integrinas está associada à progressão tumoral (ZIOBER; LIN; KRAMER, 1996). Apesar de muitas evidências mostrarem que peptídeos derivados da laminina regulam processos associados com progressão tumoral, pouco se sabe sobre a função destes peptídeos na regulação da expressão gênica e proteica de células tumorais, com exceção de um estudo realizado por Engbring et al. (2008). Neste estudo, os autores avaliaram o efeito de um peptídeo da cadeia $\alpha 1$ da laminina (AG73) na expressão proteica de células de melanoma metastático. Utilizando microarranjos de anticorpos, eles observaram que o tratamento com este peptídeo aumentou, entre outros, a expressão da proteína de matriz fibronectina, de forma tempo- e dose-dependente (ENGBRING et al., 2008).

Por outro lado, até o momento, o peptídeo C16 não foi avaliado quanto a sua capacidade de regular expressão gênica em células tumorais. Dados de nosso laboratório mostram que este peptídeo pode ligar-se a integrinas e estimular a via de sinalização ERK (GAMA-DE-SOUZA, 2008), uma via associada à regulação da expressão gênica (FARNIER et al., 2003).

A partir do que foi apresentado, surgiu a ideia de avaliarmos o efeito do peptídeo C16 na regulação da expressão gênica de células derivadas de carcinoma invasivo de mama, utilizando a tecnologia de *microarray*. Esta tecnologia se baseia na hibridização entre sequências de cDNA derivadas do espécime biológico em estudo e sondas (oligonucleotídeos) imobilizadas em uma matriz. A tecnologia de *microarray* tem sido largamente utilizada na geração de dados referentes à expressão gênica, pois permite a análise simultânea de muitos genes, de forma qualitativa e quantitativa, possibilitando a comparação de padrões de expressão

gênica em diferentes células ou em diferentes condições celulares (VARELLA-GARCIA, 2004).

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo tem como objetivo avaliar o efeito do peptídeo C16, derivado da cadeia $\gamma 1$ da laminina-111, na regulação gênica e fenotípica de células derivadas de carcinoma ductal invasivo de mama (células MDA-MB-231). O estudo envolveu as seguintes etapas:

1. Verificar, através da técnica de *microarray*, os programas de expressão gênica que são induzidos na linhagem de carcinoma ductal invasivo de mama MDA-MB-231 após tratamento com o peptídeo C16, em comparação ao tratamento com peptídeo controle que não possui atividade biológica.
2. Avaliar o efeito do peptídeo C16 na invasão, proliferação e apoptose de células MDA-MB-231.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho não envolveu manipulação direta de seres humanos e animais e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP-ICB) em 23 de novembro de 2010, parecer número 431/10.

4.1 Cultura celular

Células derivadas de carcinoma ductal invasivo de mama humana (linhagem MDA-MB-231) foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab, Campinas, SP, Brasil). As células foram mantidas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C.

Toda a manipulação das células foi realizada em capela de fluxo laminar. O crescimento celular foi monitorado em microscópio invertido de contraste de fase e o meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular. Ao atingirem a sub-confluência, as células foram coletadas utilizando-se solução de tripsina/EDTA (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) e, a seguir, foram subcultivadas. Amostras representativas da cultura foram congeladas e mantidas em nitrogênio líquido, crio-protegidas com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma).

A caracterização da linhagem MDA-MB-231 foi descrita anteriormente (LACROIX e LECLERCQ, 2004).

4.2 Imunofluorescência

Para detecção da cadeia $\gamma 1$ da laminina e das integrinas αv , $\beta 3$, $\alpha 5$ e $\beta 1$, células MDA-MB-231 foram cultivadas sobre lamínulas de vidro durante 24 horas. Após este período, o meio de cultura foi removido e as células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 20 minutos. Após lavagens em solução tampão fosfato-salina (PBS, pH 7,4), as amostras foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com soro de cabra 10% para bloqueio de sítios inespecíficos.

A seguir, as amostras foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com anticorpos primários contra as proteínas de interesse (tabela 4.1). Após o período de incubação, as lamínulas foram lavadas em PBS.

Tabela 4.1 – Anticorpos primários utilizados para detecção por imunofluorescência da cadeia $\gamma 1$ da laminina e das integrinas αv , $\beta 3$, $\alpha 5$ e $\beta 1$ em células MDA-MB-231

Anticorpo primário	Animal no qual foi gerado	Fornecedor	Diluição*
anti-cadeia $\gamma 1$ da laminina	camundongo	Santa Cruz Biotechnologies (sc-17751)	1:50
anti-integrina αv	camundongo	Zymed (07-5103)	1:500
anti-integrina $\alpha 5$	camundongo	Chemicon (MAB1956)	1:500
anti-integrina $\beta 1$	camundongo	BD Biosciences (610468)	1:500
anti-integrina $\beta 3$, conjugado à biotina	hamster	BD Biosciences (553345)	1:500

*Os anticorpos foram diluídos em solução tampão fosfato-salina (PBS).

Para detecção da cadeia $\gamma 1$ da laminina e das integrinas αv , $\alpha 5$ e $\beta 1$, as amostras foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado ao fluorocromo Alexa-488 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA; diluição: 1/200). Para detecção da integrina $\beta 3$, as amostras foram incubadas com estreptavidina conjugada ao fluorocromo Alexa-568 (Invitrogen; diluição: 1/200).

Após lavagens em PBS, as lamínulas foram montadas com Prolong (Invitrogen) e observadas em microscópio de fluorescência convencional.

4.3 Tratamento das células com o peptídeo C16

O peptídeo C16 pertence à cadeia $\gamma 1$ da laminina-111 e apresenta a seguinte sequência de aminoácidos: KAFDITYVRLKF. A localização do peptídeo C16 na sequência de aminoácidos da cadeia $\gamma 1$ da laminina está demonstrada abaixo (sublinhado). A sequência da cadeia $\gamma 1$ da laminina foi obtida através do portal do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>):

MRGSHRAAPALRPRGRLWPVLAVLAAAAAAGCAQAAMDECTDEGGRPQRCMPEF
VNAAFNVTVVATNTCGTPPEEYCVQTGVTGVTKSCHLCDAGQPHLQHGA AFLTDY
NNQADTTWWQSQTMLAGVQYPSSINLTLHLG KAFDITYVRLKF HTSRPESFAIYKR
TREDGPWIPYQYYSGSCENTYSKANRGFIRTGGDEQQALCTDEFSDISPLTGGNVA
FSTLEGRPSAYNFDNSPVLQVNSHRLA

Utilizamos como controle, um peptídeo contendo os mesmos aminoácidos que o C16, porém com sequência invertida (peptídeo C16-SX: FKLRVYTIDFAK). Este peptídeo não possui função biológica e sua sequência de aminoácidos não está presente em nenhuma proteína humana, de acordo com a ferramenta de bioinformática BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Os peptídeos C16 e C16-SX foram sintetizados pela empresa EZ Biolab (Westfield, IN, EUA), possuindo grau de pureza de 98% (determinado por RP-HPLC) e massa molecular confirmada por espectrometria de massas.

Antes do tratamento com os peptídeos, as células foram incubadas em placas de cultura contendo meio de cultura suplementado com 10% de SFB para possibilitar a adesão celular. No dia seguinte, o meio de cultura foi trocado para meio sem soro e cada peptídeo separadamente foi diluído no meio de cultura, na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$.

4.4 Extração de RNA total

Após tratamento das células MDA-MB-231 com o peptídeo C16 ou peptídeo controle (100 µg/ml) por 24 horas, o RNA total das células foi extraído utilizando o *kit* PureLink RNA Mini (Invitrogen). Para tanto, as células foram lisadas com tampão de lise contendo 1% de 2-mercaptoetanol. O lisado celular foi transferido para microtubo de centrífuga, vortexado e homogeneizado em ultrasonicador (Vibra-Cell, Sonics, Newtown, CT, EUA) por 2 segundos, utilizando amplitude de 20%. O lisado celular foi a seguir centrifugado a 2600 g por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Após adição de etanol 70% às amostras, estas foram transferidas para colunas de afinidade a RNA. As amostras foram então centrifugadas a 12000 g por 15 segundos. Os efluentes foram descartados e tampão de lavagem foi adicionado às colunas. As amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 segundos e os efluentes foram novamente descartados. O processo de lavagem e centrifugação foi repetido mais duas vezes. Após a última lavagem, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 12000 g para secagem das colunas. Posteriormente, foram adicionados 30 µl de água livre de RNase às amostras, para eluição do RNA. Após 1 minuto de incubação à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 12000 g para coleta do RNA total.

O RNA extraído foi quantificado e avaliado quanto a sua pureza por espectrofotometria (NanoDrop, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). Foram consideradas adequadas as amostras que seguiam as seguintes especificações:

- Razão entre A260/A280 maior que 2,0.
- Razão entre A260/A230 maior que 1,7.

Para verificar a integridade do RNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% desnaturante corado com brometo de etídeo. Para tanto, 1 µg de RNA total foi adicionado a 4 µl de tampão de aplicação (52,8% de formamida, 10,5% de MOPS 10X, 16,9% de formaldeído, 7,0% de glicerol e 5,6% de bromofenol *blue*) e 3 µl de água livre de RNase. A mistura foi aquecida a 65 °C por 15 minutos e, a seguir, resfriada por 2 minutos em gelo. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% contendo 10% de MOPS 10X, 5,1% de formaldeído e 1 µl de brometo de etídeo. Somente as amostras que

apresentaram bandas íntegras correspondentes às frações ribossomais 28S e 18S foram utilizadas neste estudo.

O RNA total foi estocado a -80 °C até o momento de uso.

4.5 Análise de expressão gênica por *microarray*

A expressão gênica diferencial induzida pelo peptídeo C16 em células de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231) foi avaliada através da plataforma de *microarray* Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA, EUA). Os *GeneChips* desta plataforma contêm 764.885 sondas distintas para interrogar a expressão de 28.869 genes humanos. Cada gene é representado por aproximadamente 26 sondas diferentes. Além de sondas para transcritos humanos, estão presentes nos *GeneChips* sondas que atuam como controles experimentais, possibilitando monitorar todos os processos experimentais, desde a síntese, amplificação e marcação de cDNA, até o processo de hibridização. A síntese de cDNA para hibridização com os *GeneChips* foi realizada utilizando o *kit* comercial Ambion WT Expression (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). Os experimentos foram realizados em triplicata e de acordo com as recomendações dos fabricantes.

4.5.1 Síntese de cDNA

Nesta etapa, o RNA total obtido na etapa anterior foi utilizado para gerar cDNA em uma reação que utiliza a enzima transcriptase reversa e iniciadores randômicos contendo a sequência promotora T7. Para a síntese de cDNA, foram utilizados 100 ng de RNA total.

Após adição de 5 µl de *mix* de síntese da primeira fita do cDNA (os componentes específicos da *mix* não são fornecidos pelo fabricante), as amostras foram incubadas por 1 hora a 25 °C, seguida de 1 hora a 42 °C e, então, por 2 minutos a 4 °C. Imediatamente a seguir, o cDNA fita simples foi convertido em cDNA dupla fita através de uma reação que utiliza as enzimas RNase H e DNA polimerase para, simultaneamente, degradar RNA e sintetizar a segunda fita do cDNA. Para tanto, foram adicionados às amostras 50 µl de *mix* de síntese da segunda fita do

cDNA e, então, as amostras foram incubadas por 1 hora a 16 °C, 10 minutos a 65 °C e 2 minutos a 4 °C.

4.5.2 Síntese de cRNA (*transcrição in vitro*)

Nessa etapa, o cDNA dupla fita obtido na etapa anterior foi utilizado como molde para a síntese de cRNA através de uma reação de transcrição *in vitro*, utilizando a enzima T7 RNA polimerase. Assim, 30 µl de *mix* de transcrição *in vitro* foram adicionados a cada amostra de cDNA. As amostras foram incubadas por 16 horas a 40 °C e por 2 minutos a 4 °C.

A seguir, o cRNA obtido foi purificado para remover enzimas, sais, fosfatos inorgânicos e nucleotídeos não incorporados. Para tanto, 60 µl de uma solução contendo *beads* magnéticos com afinidade a ácido nucleico e 60 µl de isopropanol 100% foram adicionados a cada amostra de cRNA. As amostras foram agitadas e transferidas para estante magnética para captura dos *beads* magnéticos ligados ao cRNA. Após captura dos *beads*, o sobrenadante foi aspirado e as amostras foram retiradas da estante magnética. A seguir, foram adicionados 100 µl de solução de lavagem a cada amostra e, após agitação, as amostras foram transferidas novamente para estante magnética. O sobrenadante foi retirado e o processo de lavagem foi repetido. Em seguida, foram adicionados 40 µl de solução de eluição previamente aquecida (58 °C) às amostras. Após 2 minutos de incubação, as amostras foram agitadas e transferidas para estante magnética. O sobrenadante, contendo o cRNA purificado, foi transferido para um novo microtubo e, a seguir, foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop).

4.5.3 Segundo ciclo de síntese de cDNA

Nessa etapa, o cRNA foi utilizado como molde para síntese de cDNA fita simples marcado com desoxiuridina trifosfato (dUTP), através de uma reação de transcrição reversa utilizando iniciadores randômicos e uma mistura de dUTP e outros dinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP).

Para a síntese, foram utilizados 10 µg de cRNA. Após adição de 2 µl de iniciadores randômicos às amostras, estas foram incubadas por 5 minutos a 70 °C, 5 minutos a 25 °C e 2 minutos a 4 °C. Em seguida, foram adicionados 16 µl da *mix* de segundo ciclo de síntese de cDNA. As amostras foram incubadas por 10 minutos a 25 °C, seguida de 90 minutos a 42 °C, 10 minutos a 70 °C e, por fim, 2 minutos a 4 °C.

Imediatamente após a síntese do cDNA, as amostras foram tratadas com RNase H para degradar o cRNA. Assim, 2 µl de RNase H foram adicionados a cada amostra e, em seguida, estas foram incubadas por 45 minutos a 37 °C, 5 minutos a 95 °C e, então, por 2 minutos a 4 °C.

As amostras de cDNA *fitas simples* foram a seguir purificadas para remover enzimas, sais e dinucleotídeos não incorporados. Para tanto, 60 µl de uma solução contendo *beads* magnéticos com afinidade a ácido nucleico e 120 µl de etanol 100% foram adicionados a cada amostra de cDNA. As amostras foram agitadas e transferidas para estante magnética para captura dos *beads* magnéticos ligados ao cDNA. Após a captura dos *beads*, o sobrenadante foi aspirado e as amostras foram retiradas da estante magnética. Foram adicionados, a seguir, 100 µl de solução de lavagem a cada amostra e, após agitação, as amostras foram transferidas novamente para estante magnética. O sobrenadante foi retirado e o processo de lavagem foi repetido. Posteriormente, foram adicionados 30 µl de solução de eluição previamente aquecida (58 °C) às amostras. Após 2 minutos de incubação, as amostras foram agitadas e transferidas para estante magnética. O sobrenadante, contendo o cDNA purificado, foi transferido para um novo microtubo. O cDNA purificado foi então quantificado por espectrofotometria (NanoDrop).

4.5.4 Fragmentação do cDNA *fitas simples*

Nessa etapa, o cDNA *fitas simples* foi fragmentado nos locais de incorporação do dinucleotídeo dUTP. A fragmentação foi realizada utilizando a enzima uracila-DNA glicosilase e a endonuclease APE1. A primeira reconhece a uracila incorporada no DNA e a remove do açúcar desoxirribose. A segunda reconhece a falha resultante da remoção da base e rompe a ligação fosfodiéster nesta região.

Na reação de fragmentação foram utilizados 2,5 µg de cDNA. Após adição da *mix* de fragmentação às amostras, estas foram incubadas a 37 °C por 60 minutos, 93 °C por 2 minutos e 4 °C por 2 minutos.

4.5.5 Marcação do cDNA

O cDNA fita simples fragmentado foi a seguir marcado. A marcação foi realizada utilizando a enzima TdT (deoxinucleotidil Transferase Terminal), a qual adiciona na região 3' dos fragmentos de cDNA, uma molécula marcadora específica contendo biotina (*Biotin Allomide Triphosphate*). Após adição da *mix* de marcação do cDNA, as amostras foram incubadas a 37 °C por 60 minutos, 70 °C por 10 minutos e 4 °C por 2 minutos.

4.5.6 Hibridização

O cDNA marcado com biotina foi nesta etapa hibridizado com o *GeneChip* Human Gene 1.0 ST Array. Para tanto, para cada amostra, 100 µl de solução de hibridização contendo 2,5 µg de cDNA foi aquecida a 99 °C por 5 minutos para desnaturação do cDNA e, a seguir, mantida por 5 minutos a 45 °C. A solução de hibridização foi então inserida no *GeneChip*, o qual foi a seguir incubado em forno de hibridização (GeneChip Hybridization Oven, Affymetrix) por 17 horas a 45 °C, sob agitação constante de 60 rotações por minuto.

4.5.7 Lavagem, marcação e escaneamento

Após hibridização, os *chips* foram lavados para retirar as moléculas de cDNA que não hibridizaram com as sondas. A seguir, foram marcados com estreptavidina conjugada com o corante fluorescente ficoeritrina. Esta marcação se dá através da ligação da estreptavidina com a biotina presente nas moléculas de cDNA. Por fim, os *GeneChips* foram escaneados para posterior análise.

Os procedimentos de lavagem e marcação foram realizados na plataforma Fluidics Station 450 (Affymetrix). Estes procedimentos são automatizados e controlados pelo programa Affymetrix GeneChip Command Console. De acordo com

o protocolo utilizado (FS450_0007), os *chips* foram lavados 10 vezes com tampão de lavagem A (NaCl 0,9 M; NaH₂PO₄ 60 µM; EDTA 6 µM; Tween-20 0,01%) a 30 °C, seguido de 6 ciclos de lavagens com tampão de lavagem B (MES 100 mM; [Na⁺] 0.1 M; Tween-20 0,01%) a 50 °C. A seguir, foi realizada a marcação das amostras por 5 minutos a 35 °C com solução de marcação 1 (MES 100 mM; [Na⁺] 1 M; Tween-20 0,05%; BSA 2 mg/ml; estreptavidina-ficoeritrina 10 µg/ml). Posteriormente, os *chips* foram novamente lavados com tampão de lavagem A (10 ciclos de lavagens a 30 °C) e incubados por 5 minutos a 35 °C com solução de marcação 2 para amplificação do sinal fluorescente (MES 100 mM; [Na⁺] 1 M; Tween-20 0.05%; BSA 2 mg/ml; anticorpo anti-estreptavidina biotilado 3 µg/ml (cabra); anticorpo IgG de cabra 0,1 mg/ml). Os *GeneChips* foram então novamente incubados com solução de marcação 1 por 5 minutos a 35 °C e lavados com tampão de lavagem A (15 ciclos de lavagens a 35 °C). Ao final, os *chips* foram preenchidos com solução tampão (MES 100 mM, [Na⁺] 1M, Tween-20 0.01%) e escaneados.

O escaneamento foi realizado no GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix). Após o escaneamento, a identificação de cada sonda individual foi realizada no programa Affymetrix GeneChip Command Console, através do alinhamento de uma grade específica para o Human Gene 1.0 ST Array com a imagem obtida através do escaneamento. A intensidade de marcação de cada sonda foi convertida em um valor numérico para posterior análise.

4.5.8 Normalização, correção de fundo e sumarização

Ao realizar experimentos de *microarray* é importante remover fontes de variação não-biológica entre as diferentes amostras. Através do processo de normalização, é possível reduzir estas variações. Neste estudo, foi realizada normalização pelo método *quantile*, o qual iguala a distribuição de intensidade de sinais das diferentes amostras (BOLSTAD et al., 2003).

Além do processo de normalização, para evitar viés nos resultados, é importante eliminar os sinais gerados pela ligação inespecífica do cDNA com as sondas presentes no *GeneChip*. Isto é realizado através do processo de correção do fundo. Existem nos *GeneChips* sondas que não apresentam complementaridade

com nenhum transcrito humano. Qualquer sinal detectado nestas sondas é considerado fundo. Neste estudo, foi aplicado o método “PM – GCBG” para correção de fundo, onde PM (*Perfect Match*) representa a sonda de interesse, com complementaridade perfeita a um determinado transcrito humano, e GCBG representa sondas de *background* com mesmo conteúdo de guanina e citosina da sonda *Perfect Match*.

Na plataforma de *microarray* utilizada neste estudo, cada gene individual é representado por 26 sondas em média. Utilizando o método de sumarização *iterPlier*, os vários valores de intensidade observados para cada gene foram combinados em uma única medida. Este método de sumarização realiza uma série de estimações sequenciais e descarta sondas que não representam o sinal principal. Ao final, é gerado um valor de intensidade baseado nas 11 melhores sondas.

4.5.9 Análise estatística

Os dados de *microarray* normalizados foram inseridos no programa TIGR Multi-Experiment Viewer 4.6 (TM4: Microarray Software Suite, Boston, MA, EUA) para análise estatística. Foi realizado teste t de Student para identificar os genes com diferença estatística entre as amostras tratadas com C16 e C16-SX ($P \leq 0,05$). Dentre estes, aqueles que mostraram uma diferença de expressão de pelo menos 1,2 vezes entre os tratamentos com C16 e peptídeo controle foram considerados diferencialmente expressos.

4.5.10 Heatmap

Os dados de *microarray* foram representados graficamente através de *Heatmap*, utilizando-se o programa Heatmap Builder 1.1 (Stanford University, Stanford, CA, EUA).

4.6 Confirmação dos resultados de expressão gênica diferencial pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real

Devido ao fato de a técnica de *microarray* ser de natureza semi-quantitativa e apresentar resultados falso-positivos, a determinação da expressão gênica diferencial requer validação dos resultados. Para isto, a técnica de PCR em tempo real foi utilizada neste estudo.

4.6.1 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores

Os iniciadores usados nas reações de PCR quantitativa foram desenhados utilizando o programa Primer Express (Applied BioSystems). Para evitar amplificação de DNA genômico, sempre que possível, os iniciadores diretos e reversos foram desenhados de modo a hibridizar em éxons diferentes. As sequências dos iniciadores para o gene *FGFR3* foram obtidas a partir da literatura (CHENG et al., 2006).

O programa OligoTech (Oligo Etc. Inc., Wilsonville, EUA) foi utilizado para avaliar as características estruturais e físico-químicas dos iniciadores fornecidos pelo programa Primer Express. Somente aqueles que não possuíam a propensão para formação de estruturas secundárias e dimerização foram selecionados. Por fim, o par de iniciadores foi testado em uma reação de PCR *in silico* através do portal NCBI Electronic PCR (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/e-pcr/>). Os oligonucleotídeos selecionados foram sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, EUA).

As sequências dos iniciadores utilizados nas reações de PCR, bem como o tamanho dos produtos amplificados, estão indicados na tabela 4.2.

4.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real

As reações de PCR quantitativa em tempo real foram realizadas utilizando-se o kit Express SYBR GreenER SuperMix Universal (Invitrogen). Nas reações, foram utilizadas 100 ng de cDNA, 200 nM de iniciadores para o gene *GAPDH* ou 400 nM

para os demais iniciadores, 10 µl de SYBR GreenER SuperMix (incluindo a enzima *Taq* DNA polimerase, o fluoróforo SYBR GreenER, MgCl₂, dNTPs e estabilizadores) e água livre de nuclease para um volume final de 20 µl. As reações de PCR foram realizadas no termociclador Corbett Rotor-Gene 3000 (Qiagen, Hilden, Alemanha). As condições para amplificação foram as seguintes: 95 °C por 10 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 20 segundos, 55 °C por 20 segundos e 72 °C por 30 segundos. Ao final da reação, foi realizada curva de dissociação (*melting*) para avaliar a especificidade da reação. Para isto, ao final dos ciclos de amplificação, as amostras foram incubadas em temperaturas crescentes, de 72 °C a 95 °C. Os produtos de PCR também foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo para se confirmar a amplificação de um produto único e específico.

O gene de expressão constitutiva *GAPDH* (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi utilizado como normalizador das reações de PCR. A expressão relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde Ct é o ciclo de início de quantificação do transcrito, ΔCt é o Ct do gene de interesse menos o Ct do gene de referência (*GAPDH*) e $\Delta\Delta Ct$ é o ΔCt da amostra tratada com C16 menos o ΔCt da amostra tratada com peptídeo controle (C16-SX). Os experimentos foram realizados em triplicata. Para análise estatística, os valores de ΔCt de amostras tratadas com C16 foram comparados com os valores de ΔCt de amostras tratadas com peptídeo C16-SX através de teste t de Student (intervalo de confiança de 95%). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad, São Diego, CA, EUA).

Tabela 4.2 – Iniciadores utilizados nas reações de PCR quantitativa em tempo real e tamanho do produto amplificado (*amplicon*) em pares de bases (pb)

Gene	Iniciador direto	Iniciador reverso	<i>Amplicon</i>
FGFR3	CTGCCAGCCGAGGAGGAG	CACCACCAGGATGAACAGGAAG	102 pb
GAPDH	ACCCACTCCTCCACCTTTGA	CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT	101 pb
GPNMB	GCCGCCAAACGATTTTCAT	TTAATTGATTGTGCTCCCTCATGT	73 pb
SNORD116	TCCTTGGAAGCTGAACAAA	GGACCTCAGTTCCGATGAGA	65 pb
SPOCK1	GTGTGTCAGCCGCAAGCA	CAGTGTTTCTGGGCCACGTT	63 pb

4.7 Ensaios de invasão

Para avaliar se o peptídeo C16 aumenta a invasão de células de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231), foi utilizado um sistema de câmaras de Boyden (NeuroProbe Inc., Gaithersburg, MD, EUA). Esse sistema é formado por duas câmaras (superior e inferior), as quais foram separadas por membrana de policarbonato porosa recoberta por Matrigel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA). Matrigel é uma lâmina basal reconstituída que contém em sua composição importantes moléculas, como laminina e colágeno tipo IV (KLEINMAN et al., 1986).

Os poços da câmara inferior foram preenchidos com: 1) meio sem soro acrescido do peptídeo C16 (100 µg/ml); 2) meio sem soro acrescido do peptídeo controle C16-SX (100 µg/ml); 3) meio sem soro (controle negativo não-peptídico); 4) meio contendo 10% de SFB (controle positivo não-peptídico). Os poços da câmara superior foram preenchidos com células MDA-MB-231 (15×10^4) em meio sem soro.

As células foram então incubadas por 48 horas a 37 °C em estufa de CO₂. A seguir, a membrana foi removida da câmara de Boyden e a superfície superior da membrana foi delicadamente raspada para retirar as células que não invadiram. As células da superfície inferior da membrana foram fixadas em paraformaldeído 4% por 15 minutos e então coradas com violeta cristal 0,2%. O número de células que invadiram foi obtido através de aquisição de imagens utilizando câmera digital acoplada a microscópio óptico. Cinco campos aleatórios foram fotografados e as

células presentes nas imagens foram contadas. O experimento foi realizado em triplicata. Para análise estatística, foi aplicado o teste One-Way ANOVA utilizando o programa GraphPad Prism 5 (intervalo de confiança de 95%).

4.8 Ensaios de proliferação celular

O efeito do peptídeo C16 na proliferação de células de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231) foi avaliado pelo método do MTT. Este é um método colorimétrico, no qual o reagente MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é endocitado e acumulado pelas células. O anel tetrazólico do MTT é reduzido pela enzima hidrogenase succínica presente em mitocôndrias de células viáveis, o que resulta na formação de cristais de formazan, um produto de cor púrpura. A quantidade de formazan produzido é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis.

Previamente ao ensaio, células MDA-MB-231 (1×10^4 células/poço) foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços, em meio DMEM suplementado com 10% de SFB por 24 horas. A seguir, o meio foi trocado por meio DMEM com 0,5% de soro e acrescido de 100 µg/ml de peptídeo C16 ou peptídeo controle (C16-SX). Como controles experimentais não-peptídicos, as células foram mantidas em DMEM com 10% de soro (controle positivo) ou DMEM com 0,5% de soro (controle negativo). A proliferação celular foi avaliada nos tempos de 24, 48 e 72 horas de tratamento com os peptídeos.

Nas últimas 3 horas de tratamento, 10 µl do reagente MTT (5 mg/ml, Sigma) foi adicionado ao meio de cultura das células. Após 3 horas de incubação em estufa de CO₂ a 37 °C, os cristais de formazan foram dissolvidos através da adição de 100 µl de solução de solubilização (HCl 0,1 N, 10% de Triton X-100 em isopropanol). A seguir, as absorbâncias dos poços foram lidas em leitor de microplaca (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA) a 550 nm, com filtro de referência a 655 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata. Para análise estatística, foi aplicado o teste One-Way ANOVA utilizando o programa GraphPad Prism 5 (intervalo de confiança de 95%).

4.9 Ensaios de apoptose

Para avaliar se o peptídeo C16 tem efeito protetor sobre a apoptose de células MDA-MB-231, estas foram tratadas com o peptídeo C16 ou peptídeo controle (100 µg/ml) por 24 horas. As células foram então tratadas, na presença dos peptídeos, com estaurosporina na concentração de 1 µM por 24 horas, para indução de apoptose. Em seguida, a taxa de células em apoptose foi avaliada utilizando o *kit* ApoTarget Annexin-V FITC Apoptosis (Invitrogen). A técnica empregada se baseia na marcação de células apoptóticas com anexina-V-FITC, a qual tem forte afinidade por fosfatidilserina. Em células viáveis, a distribuição de fosfatidilserina se faz primariamente no folheto interno da membrana plasmática. Durante as fases iniciais da apoptose, esse fosfolípido é translocado para o folheto externo da membrana, ficando exposto à anexina-V-FITC. Juntamente com a anexina-V-FITC, foi utilizado iodeto de propídeo para diferenciação dos processos de apoptose e necrose.

Assim, as células foram coletadas e ressuspensas em tampão de ligação à anexina-V (HEPES/NaOH 10 mM, pH 7,4; NaCl 140 mM; CaCl₂ 2,5 mM) e, em seguida, foram incubadas com 5 µl de anexina-V-FITC e 10 µl de iodeto de propídeo em temperatura ambiente por 15 minutos. A detecção da fluorescência emitida pelo fluoróforo FITC foi realizada por citometria de fluxo (excitação a 488 nm). Cinco mil células de cada grupo foram analisadas e os experimentos foram realizados em triplicata. Para análise estatística, foi aplicado o teste Two-Way ANOVA utilizando o *software* GraphPad Prism 5 (intervalo de confiança de 95%).

5 RESULTADOS

5.1 A linhagem de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 expressa a cadeia $\gamma 1$ da laminina

A cadeia $\gamma 1$ da laminina, que contém o peptídeo C16, foi detectada na linhagem de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 através de imunofluorescência. A proteína foi observada como pontos distribuídos ao longo da membrana celular. A marcação para a cadeia $\gamma 1$ da laminina representa a distribuição da proteína na porção externa da membrana celular, uma vez que as células não foram permeabilizadas (Figura 1A). Pelo menos 50 células foram observadas e os resultados se repetiram consistentemente.

5.2 A linhagem de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 expressa as subunidades de integrinas αv , $\beta 3$, $\alpha 5$ e $\beta 1$

Estudo anterior (PONCE et al., 2001) e dados não publicados do laboratório (GAMA-DE-SOUZA, 2008) sugerem que as integrinas $\alpha v \beta 3$ e $\alpha 5 \beta 1$ atuam como receptores para o peptídeo C16. Desta forma, decidimos investigar se estes receptores celulares são expressos na linhagem MDA-MB-231. Nossos resultados de imunofluorescência mostram que as subunidades de integrinas αv , $\beta 3$, $\alpha 5$ e $\beta 1$ são expressas nesta linhagem celular e, desta forma, poderiam participar da transdução de sinais induzidos por C16. As marcações observadas representam a distribuição da porção extracelular das integrinas, uma vez que as células não foram permeabilizadas (Figuras 1B-E). Pelo menos 50 células foram observadas e os resultados se repetiram consistentemente.

FIGURA 1

Figura 1 – Células MDA-MB-231 expressam a cadeia $\gamma 1$ da laminina e as subunidades de integrinas αv , $\beta 3$, $\alpha 5$ e $\beta 1$. Imunofluorescências mostram que a cadeia $\gamma 1$ da laminina, onde está presente o peptídeo C16, é expressa na linhagem de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 (A), da mesma forma que as subunidades das integrinas $\alpha v \beta 3$ e $\alpha 5 \beta 1$, prováveis receptores para o peptídeo C16 (B-E).

Figura 1 – Células MDA-MB-231 expressam a cadeia $\gamma 1$ da laminina e as subunidades de integrinas αV , $\beta 3$, $\alpha 5$ e $\beta 1$.

5.3 O peptídeo C16 regula expressão gênica em células MDA-MB-231

Para avaliar o efeito do peptídeo C16 sobre a expressão gênica de células MDA-MB-231, estas foram tratadas com o peptídeo C16 ou peptídeo controle C16-SX (100 µg/ml) por 24 horas. Após o tratamento, o RNA total foi extraído, sendo que todas as amostras de RNA obtidas mostraram-se adequadas para prosseguimento no estudo. A expressão gênica diferencial induzida pelo peptídeo C16 foi avaliada através da plataforma de *microarray* Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Nossos resultados de *microarray* revelaram que o peptídeo C16 regula significativamente a expressão de 80 genes na linhagem MDA-MB-231, quando comparado ao tratamento com peptídeo controle (C16-SX). Dentre eles, 33 genes foram estimulados e 47 genes foram inibidos pelo peptídeo C16. A sequência mais estimulada por C16 foi *SNORD116-1*, a qual codifica um pequeno RNA nucleolar, enquanto que o gene codificante do receptor *KIR3DL3* foi o mais inibido por C16 (Tabela 5.1). Os níveis de expressão gênica entre as diferentes amostras tratadas com C16 ou C16-SX foram representadas graficamente através de *Heatmap* (Figura 2).

Tabela 5.1 – Lista de genes diferencialmente expressos encontrados em células de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231) tratadas com peptídeo C16 em comparação ao tratamento com peptídeo controle (C16-SX). Valores de diferença de expressão (FC) positivos indicam aumento de expressão, enquanto valores negativos indicam diminuição da expressão gênica.

(continua)

Gene	Descrição	FC*	Valor de P
ACSF3	acyl-CoA synthetase family member 3	-1.21	0.0002
ACVR2B	activin A receptor, type IIB	-1.21	0.0154
ADAMTS15	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 15	-1.25	0.0133
ADAMTSL1	ADAMTS-like 1	-1.25	0.0108
ANKMY2	ankyrin repeat and MYND domain containing 2	-1.25	0.0206
ANTXRL	anthrax toxin receptor-like	1.29	0.0450
AQP3	aquaporin 3	-1.29	0.0010
C10orf10	chromosome 10 open reading frame 10	-1.25	0.0468
C1orf126	chromosome 1 open reading frame 126	1.27	0.0245
C20orf194	chromosome 20 open reading frame 194	-1.25	0.0043
C20orf26	chromosome 20 open reading frame 26	-1.36	0.0120
C22orf43	chromosome 22 open reading frame 43	1.23	0.0332
C6orf138	chromosome 6 open reading frame 138	1.38	0.0355
CACNB3	calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit	-1.26	0.0477
CDH9	cadherin 9, type 2	1.23	0.0216
CNFN	Cornifelin	-1.26	0.0388
CNPY4	canopy 4 homolog (zebrafish)	-1.21	0.0107
DENND2C	DENN/MADD domain containing 2C	1.35	0.0215
DSG3	desmoglein 3	-2.48	0.0040
EYS	eyes shut homolog (Drosophila)	-1.54	0.0262
FAM161A	family with sequence similarity 161, member A	-1.20	0.0334
FGFBP1	fibroblast growth factor binding protein 1	-1.39	0.0462
FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3	1.46	0.0468
FLCN	Folliculin	1.24	0.0065

Tabela 5.1 – Lista de genes diferencialmente expressos encontrados em células de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231) tratadas com peptídeo C16 em comparação ao tratamento com peptídeo controle (C16-SX). Valores de diferença de expressão (FC) positivos indicam aumento de expressão, enquanto valores negativos indicam diminuição da expressão gênica.

(continuação)

FTMT	ferritin mitochondrial	1.68	0.0484
GAL3ST4	galactose-3-O-sulfotransferase 4	-1.30	0.0429
GPNMB	glycoprotein non-metastatic melanoma protein B	1.40	0.0050
GSR	glutathione reductase	1.20	0.0111
HIST1H1C	histone cluster 1, H1c	-1.26	0.0069
ITK	IL2-inducible T-cell kinase	1.40	0.0018
KCND3	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 3	1.43	0.0144
KCNIP4	Kv channel interacting protein 4	-1.27	0.0222
KIR3DL3	killer cell immunoglobulin-like receptor, 3 domains, long cytoplasmic tail, 3	-3.72	0.0467
LOC100133142	zinc finger protein 865	-1.26	0.0429
LOC641367	cyclin Y-like pseudogene	1.26	0.0065
LOC642587	hypothetical protein LOC642587	-1.86	0.0330
LRRC68	leucine rich repeat containing 68	1.26	0.0425
LYPD3	LY6/PLAUR domain containing 3	-1.46	0.0465
MAFG	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog G (avian)	1.25	0.0198
MCART3P	mitochondrial carrier triple repeat 3 pseudogene	1.25	0.0474
MFNG	MFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	-1.44	0.0030
MGAT5	mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase	1.21	0.0253
MMP3	matrix metalloproteinase 3	-1.32	0.0306
MOSC2	MOCO sulphurase C-terminal domain containing 2	-1.21	0.0097
MTP18	MTP18	1.24	0.0008
MYBL1	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 1	-1.23	0.0288
NBEAL2	neurobeachin-like 2	-1.41	0.0497

Tabela 5.1 – Lista de genes diferencialmente expressos encontrados em células de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231) tratadas com peptídeo C16 em comparação ao tratamento com peptídeo controle (C16-SX). Valores de diferença de expressão (FC) positivos indicam aumento de expressão, enquanto valores negativos indicam diminuição da expressão gênica.

(continuação)

NEIL1	nei endonuclease VIII-like 1	-1.27	0.0308
NEUROG1	neurogenin 1	-1.21	0.0326
NIPSNAP3B	nipsnap homolog 3B (C. elegans)	-1.25	0.0416
OR2T10	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 10	1.22	0.0465
PCDHB9	protocadherin beta 9	-1.27	0.0478
PHLDB3	pleckstrin homology-like domain, family B, member 3	1.21	0.0073
PLA2G6	phospholipase A2, group VI	-1.28	0.0476
PML	promyelocytic leukemia	-1.20	0.0162
PPFIA4	protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide, interacting protein, α 4	-1.21	0.0362
PRAGMIN	homolog of rat pragma of Rnd2	-1.21	0.0020
RASSF9	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family (N-terminal) member 9	-1.30	0.0038
RBM14	RNA binding motif protein 14	-1.24	0.0122
RDH10	retinol dehydrogenase 10	1.26	0.0423
RNASE8	ribonuclease, RNase A family, 8	1.24	0.0337
ROGDI	rogdi homolog (Drosophila)	-1.22	0.0424
RRAGD	Ras-related GTP binding D	1.31	0.0450
RYR1	ryanodine receptor 1	1.28	0.0369
SCN1A	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha subunit	-1.27	0.0333
SHMT1	serine hydroxymethyltransferase 1	-1.27	0.0208
SIGLEC16	sialic acid binding Ig-like lectin 16	-1.32	0.0174
SLC28A3	solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 3	-1.32	0.0080
SLC7A11	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	1.41	0.0491
SMPD2	sphingomyelin phosphodiesterase 2, neutral membrane	1.37	0.0102
SNORD115-15	small nucleolar RNA, C/D box 115-15	-1.61	0.0003

Tabela 5.1 – Lista de genes diferencialmente expressos encontrados em células de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231) tratadas com peptídeo C16 em comparação ao tratamento com peptídeo controle (C16-SX). Valores de diferença de expressão (FC) positivos indicam aumento de expressão, enquanto valores negativos indicam diminuição da expressão gênica.

(conclusão)			
SNORD116-1	small nucleolar RNA, C/D box 116-1	7.12	0.0344
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	1.47	0.0237
SPOCK1	sparc/osteonectin, cwcw and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1	1.41	0.0467
SRXN1	sulfiredoxin 1	1.65	0.0020
SUFU	suppressor of fused homolog (Drosophila)	-1.35	0.0042
TRAF3IP3	TRAF3 interacting protein 3	-1.21	0.0439
TRERF1	transcriptional regulating factor 1	-1.21	0.0151
VANGL2	vang-like 2	1.30	0.0165
VPS18	vacuolar protein sorting 18 homolog (S. cerevisiae)	1.25	0.0110

*FC: *Fold Change*, diferença de expressão induzida pelo peptídeo C16

FIGURA 2

Figura 2 – *Heatmap de genes diferencialmente expressos encontrados em células MDA-MB-231 tratadas com C16 em comparação ao tratamento com peptídeo controle (C16-SX). Trinta e três genes foram estimulados e 47 genes foram inibidos por C16. Valores baixos de expressão gênica são representados em verde claro e valores altos são indicados em vermelho claro.*

Figura 2 – *Heatmap* de genes diferencialmente expressos em células MDA-MB-231 tratadas com C16, em comparação ao tratamento com peptídeo controle (C16-SX).

Utilizando a ferramenta *Gene Ontology* e a literatura para obter informações sobre funções gênicas, classificamos os genes diferencialmente expressos de acordo com suas funções biológicas. Dentre os genes regulados por C16, selecionamos aqueles relacionados a processos ligados ao câncer, incluindo genes envolvidos em adesão celular (*CDH9*, *DSG3*, *GPNUMB*, *LYPD3*, *PCDHB9* e *SPOCK1*), migração, invasão e metástase (*ADAMTS15*, *FGFR3*, *GPNUMB*, *LYPD3*, *MGAT5*, *MMP3*, *RYR1*, *SLC7A11*, *SPOCK1*, *SUFU* e *VANGL2*), angiogênese (*ADAMTS15*, *ADAMTSL1*, *FGFR3*, *GPNUMB* e *PML*), proliferação celular (*FGFBP1*, *FGFR3*, *FLCN*, *FTMT*, *PML*, *SOD2* e *TRERF1*) e apoptose (*MTP18*, *PLA2G6*, *PML* e *SOD2*), como indicado na Figura 3.

Entre os genes diferencialmente expressos, os genes *FGFR3*, *GPNUMB*, *SPOCK1* e *SNORD116-1* foram selecionados para validação através de PCR quantitativa em tempo real por apresentarem relevância biológica (*FGFR3*, *GPNUMB*, e *SPOCK1*) ou por representar a sequência mais estimulada por C16 (*SNORD116-1*), de acordo com os dados de *microarray*. Os resultados de PCR quantitativa mostraram que C16 aumenta significativamente a expressão dos genes *FGFR3*, *GPNUMB* e *SPOCK1* ($P < 0,05$). Por outro lado, apesar de aumentar a expressão média de *SNORD116-1* em 2,1 vezes, este aumento não mostrou diferença estatística ($P = 0,15$). Os dados de PCR quantitativa estão representados na Figura 4.

FIGURA 3

Figura 3 – *O peptídeo C16 regula a expressão de genes associados ao câncer na linhagem MDA-MB-231. A) Número relativo de genes regulados por C16 e associados a diferentes processos biológicos ligados ao câncer. B) Diferença de expressão induzida por C16. As funções biológicas de cada gene estão indicadas através de números à frente do símbolo gênico (vide legenda na região inferior da figura).*

A

B

Figura 3 – O peptídeo C16 regula a expressão de genes associados ao câncer na linhagem MDA-MB-231.

FIGURA 4

Figura 4 – Validação de resultados de microarray: PCR quantitativa em tempo real para os genes *SPOCK1*, *GNMB*, *FGFR3* e *SNORD116*. Similar ao resultado obtido com a técnica de *microarray*, o tratamento com o peptídeo C16 aumentou significativamente a expressão dos genes *FGFR3*, *GNMB* e *SPOCK1* quando comparado ao tratamento com peptídeo controle (indicado pelos asteriscos). Apesar de induzir aumento na expressão média de *SNORD116-1*, este aumento não mostrou significância estatística.

Figura 4 – Validação de resultados de *microarray*: PCR quantitativa em tempo real para os genes *SPOCK1*, *GPNMB*, *FGFR3* e *SNORD116*.

5.4 O peptídeo C16 estimula a invasão de células MDA-MB-231

O peptídeo C16 regulou a expressão de genes envolvidos em migração, invasão e metástase na linhagem de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231. Isto nos motivou a avaliar o efeito que este peptídeo tem sobre a invasão destas células. Ensaio de invasão realizados em câmaras de Boyden recobertas com Matrigel mostraram que o peptídeo C16 aumenta significativamente ($P=0,03$) o número de células invasivas quando comparado ao peptídeo controle (C16-SX). O tratamento com C16 induziu um aumento de mais de 3 vezes na invasão de células MDA-MB-231 quando comparado aos controles (Figura 5).

5.5 C16 não tem efeito sobre a proliferação de células MDA-MB-231

Nossos dados de *microarray* mostraram que C16 controla a expressão de genes envolvidos com regulação de proliferação celular (*FGFBP1*, *FGFR3*, *FLCN*, *FTMT*, *PML*, *SOD2* e *TRERF1*). Para avaliar o efeito final de C16 sobre a proliferação de células de adenocarcinoma de mama, realizamos ensaios de MTT após tratamento das células MDA-MB-231 por 24, 48 e 72 horas com peptídeo C16 ou C16-SX. Nossos resultados sugerem que C16 não influencia na taxa de proliferação destas células quando comparado ao controle C16-SX ou ao controle não peptídico DMEM + 0,5% de SFB (Figura 6).

5.6 C16 não tem efeito sobre a apoptose de células MDA-MB-231

Os resultados de *microarray* indicam que C16 regula genes envolvidos em apoptose (*MTP18*, *PLA2G6*, *PML* e *SOD2*). Para verificar se o peptídeo C16 poderia conferir resistência ou induzir apoptose em células MDA-MB-231, realizamos ensaios baseados na dupla marcação das células com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo após indução ou não-indução de apoptose com estaurosporina. Nossos resultados sugerem que o peptídeo C16 não estimula, nem protege as células MDA-MB-231 de apoptose induzida por estaurosporina (Figura 7).

FIGURA 5

Figura 5 – *C16 estimula invasão de células MDA-MB-231*. Ensaios de invasão realizados em câmaras de Boyden mostram que o peptídeo C16 aumenta significativamente a invasão de células MDA-MB-231 quando comparado ao tratamento com peptídeo controle. A) Fotomicrografias representativas de células tratadas com C16 e peptídeo controle (C16-SX). B) Representação gráfica do número de células que invadiram $\pm$ erro padrão de três experimentos. O asterisco indica diferença estatística ($P=0,004$) entre células tratadas com C16 e peptídeo controle. As linhas pontilhadas horizontais mostram resultados referentes ao controle não-peptídico negativo (DMEM sem soro) e positivo (DMEM + 10% soro).

A**C16** **C16-SX** **B**

Figura 5 – C16 estimula invasão de células MDA-MB-231.

FIGURA 6

Figura 6 – *C16 não influencia na proliferação de células MDA-MB-231.* Ensaios de MTT mostram que o peptídeo C16 não influencia na proliferação de células MDA-MB-231 em comparação ao tratamento com peptídeo controle (C16-SX) ou ao controle negativo não peptídico (DMEM suplementado com 0,5% de SFB). Nos diferentes grupos experimentais, a absorbância (A550 – A655), proporcional ao número de células viáveis, foi avaliada nos tempos de 24, 48 e 72 horas de tratamento com os peptídeos. Células mantidas em DMEM suplementado com 10% de soro SFB serviram como controle positivo.

Figura 6 – C16 não influencia na proliferação de células MDA-MB-231.

FIGURA 7

Figura 7 – *C16 não tem efeito sobre a apoptose de células MDA-MB-231. (A) Painéis de citometria de fluxo de células marcadas duplamente com anexina V-FITC (fluorescência verde) e iodeto de propídeo (fluorescência vermelha). (B) O gráfico mostra a porcentagem de células viáveis, células em apoptose inicial, células em apoptose tardia/necrose e células em necrose. Não foram observadas diferenças entre as porcentagens de células em apoptose após tratamento com C16 em comparação ao tratamento com peptídeo controle (C16-SX), em ambos os casos de não-indução e indução de apoptose com estaurosporina.*

Figura 7 – C16 não tem efeito sobre a apoptose de células MDA-MB-231.

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostram que a cadeia $\gamma 1$ da laminina, que contém o peptídeo C16, é expressa na linhagem de carcinoma invasivo de mama MDA-MB-231, assim como as subunidades de integrinas αv , $\beta 3$, $\alpha 5$ e $\beta 1$, que poderiam atuar como receptores celulares para este peptídeo. Nossos dados mostram que C16 regula expressão gênica nas células MDA-MB-231, incluindo genes associados ao câncer. Dentre eles, os genes *FGFR3*, *GPNMB* e *SPOCK1* tiveram suas expressões aumentadas após tratamento com C16, como confirmado por PCR quantitativo. Neste estudo, ensaios de invasão em câmaras de Boyden recobertas com Matrigel mostraram que C16 estimula a invasão de células MDA-MB-231. Entretanto, C16 não mostrou possuir efeito sobre a proliferação celular e apoptose.

Os estudos relacionados à tumorigênese e progressão tumoral, durante muito tempo, tinham como alvo apenas as células neoplásicas. Contudo, atualmente está bem estabelecido que o estroma que circunda as células tumorais está diretamente relacionado ao seu comportamento biológico (LIOTTA e KOHN, 2001; DECLERCK et al., 2004).

A matriz extracelular representa o componente não celular do estroma. Ela é uma rede complexa de macromoléculas, composta principalmente por colágenos, glicoproteínas e proteoglicanos (LIU e XU, 1996). Devido ao fato de ela conter enzimas proteolíticas, citocinas e moléculas regulatórias (LUKASHEV e WERB, 1998), ela pode influenciar em vários processos biológicos associados ao câncer, como proliferação celular, apoptose, diferenciação, migração celular (DALEY et al., 2008), angiogênese (STUPACK e CHERESH, 2002), invasão e metástase (ECCLES e WELCH, 2007). Na interface entre o epitélio e o tecido conjuntivo, a matriz forma a lâmina basal, constituída predominantemente por laminina, colágeno tipo IV, perlecan e nidogênio (AUMAILLEY, 1995; COLOGNATO e YURCHENCO, 2000; SASAKI et al., 2004; MAO e SCHWARZBAUER, 2005). Longe de ser uma estrutura inerte, a lâmina basal também participa ativamente na regulação de diversas funções celulares (COLOGNATO e YURCHENCO, 2000; BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003; YURCHENCO et al., 2004).

Várias das moléculas que compõem a MEC e a lâmina basal apresentam em sua estrutura sítios matricrípticos. Estes sítios, que apresentam função biológica, quando são expostos por proteólise dão origem a fragmentos ou peptídeos bioativos (FAISAL KHAN et al., 2002; SCHENK e QUARANTA, 2003; MOTT e WERB, 2004).

Durante o processo de invasão tumoral, as células tumorais degradam componentes da lâmina basal e da MEC e podem ficar expostas aos peptídeos bioativos derivados da clivagem destes componentes (WILSON et al., 1999). Um número crescente de estudos tem demonstrado que o peptídeo C16, derivado da cadeia $\gamma 1$ da laminina, está associado à progressão tumoral por estimular migração celular, invasão tumoral, angiogênese e metástase (GAMA-DE-SOUZA, 2008; MALINDA et al., 2008; KURATOMI et al., 2002; PONCE et al., 1999; PONCE; NOMIZU; KLEIMAN, 2001). Neste estudo, avaliamos a função deste peptídeo na regulação da expressão gênica, invasão, proliferação e apoptose de células derivadas de carcinoma ductal invasivo de mama (MDA-MB-231).

Primeiramente, verificamos por imunofluorescência que a cadeia $\gamma 1$ da laminina, onde está presente o peptídeo C16, é expressa na linhagem MDA-MB-231 (Fig. 1A). Estudo anterior demonstrou que esta cadeia da laminina é expressa em diversas linhagens celulares derivadas de carcinoma de mama de camundongos e que a expressão de seu transcrito é maior em linhagens altamente metastáticas (CHIA et al., 2007).

Através de ensaio de coluna de afinidade, um estudo verificou que o peptídeo C16 interage com as integrinas $\alpha\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$ (PONCE; NOMIZU; KLEIMAN, 2001). Trabalho realizado em nosso laboratório também observou que a inibição destas integrinas diminui os efeitos de C16 em células de carcinoma adenoide cístico, sugerindo que estes receptores celulares modulam a resposta induzida por C16 (GAMA-DE-SOUZA, 2008). Desta forma, decidimos avaliar se a linhagem MDA-MB-231 expressa as subunidades de integrinas α , $\beta 3$, $\alpha 5$ e $\beta 1$. Nossos resultados de imunofluorescência (Fig. 1B-E) mostram que estes receptores são expressos nesta linhagem tumoral, sugerindo que C16 poderia regular o comportamento da linhagem MDA-MB-231.

Uma vez que muitas das sinalizações geradas por integrinas levam à modulação da expressão de genes-alvo (TROUSSARD et al., 1999), investigamos

neste trabalho, através da técnica de *microarray* se o peptídeo C16 teria efeito sobre a regulação da expressão gênica em células MDA-MB-231.

Análises de *microarray* revelaram 80 genes diferencialmente expressos em células MDA-MB-231 tratadas com o peptídeo C16 em comparação ao tratamento com peptídeo controle (C16-SX). Dentre eles, 33 genes foram estimulados e 47 genes foram inibidos pelo peptídeo C16 (Figura 2).

A sequência mais estimulada por C16, de acordo com os dados de *microarray*, foi *SNORD116-1*. Os resultados de qPCR não mostraram diferença significativa na expressão desta sequência em amostras tratadas com C16 em comparação ao tratamento com peptídeo controle. Porém, uma tendência de aumento em sua expressão foi observada (Fig. 4). *SNORD116* codifica um pequeno RNA nucleolar (snoRNA) contendo sequências conservadas, denominadas caixas C e D. No genoma humano existem 27 cópias da sequência *SNORD116*. Os snoRNAs estão associados com modificação pós-transcricional de RNAs-alvo. Eles contêm sequências complementares com seus alvos, com os quais pareiam transitoriamente. Um dos membros desta família de pequenos RNAs (*SNORD115*) também já foi associado com regulação de *splicing* alternativo (KISHORE et al., 2009). Os RNAs-alvo de *SNORD116* ainda não foram identificados e seus sítios putativos de pareamento com outros RNAs não se mostraram complementares com nenhum RNA conhecido. Camundongos *knockout* para *SNORD116* são viáveis, porém apresentam diminuição do tamanho corpóreo devido à deficiência de hormônio de crescimento e redução da expressão de IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina 1). *SNORD116* também já foi associado com o fenótipo da Síndrome de Prader-Willi (DING et al., 2008), porém sua função no câncer é desconhecida.

Por outro lado, o gene *KIR3DL3* foi o gene mais inibido por C16 na linhagem de carcinoma mamário. Em células *Natural Killers* (NK), o receptor codificado por este gene modula a citólise de células anormais, protegendo células normais da morte induzida pelas células NK (ARNHEIM; DILLNER; SANJEEVI, 2005). Entretanto, sua função no câncer de mama ainda é desconhecida.

Estudos anteriores mostraram que o peptídeo C16 está associado à migração celular, invasão e metástase (KURATOMI et al., 2002; GAMA-DE-SOUZA, 2008).

Neste trabalho, o peptídeo C16 regulou a expressão de 11 genes envolvidos nestes processos na linhagem MDA-MB-231. Os genes *FGFR3*, *GPNMB*, *MGAT5*, *RYR1*, *SLC7A11*, *SPOCK1* e *VANGL2* tiveram suas expressões aumentadas com o tratamento com C16, enquanto que os genes *ADAMTS15*, *MMP3*, *SUFU* e *LYPD3* foram inibidos por este peptídeo. Dentre os genes citados, o aumento de expressão induzido por C16 em *GPNMB*, *SPOCK1* e *FGFR3* foi validado por qPCR em tempo real (Fig. 4).

O gene *GPNMB* (*Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B*) codifica uma proteína transmembrana de 572 aminoácidos também conhecida como osteoactivina. Esta proteína contém um motivo RGD (de ligação a integrinas) e um domínio PKD (*Polycystic Kidney Disease*) em sua porção extracelular, um domínio transmembrana e uma pequena cauda citoplasmática. A função do domínio PKD ainda é desconhecida, mas a hipótese mais aceita é que ele esteja envolvido em interações proteína-proteína. Quanto à cauda citoplasmática, acredita-se que esteja envolvida com sinalização intracelular, porém ainda não foi caracterizada (ROSE e SIEGEL, 2010). *GPNMB* é expresso em uma variedade de tecidos normais, incluindo osso, sistema hematopoiético e pele. No tecido ósseo, *GPNMB* promove diferenciação de osteoclastos e osteoblastos. Além de seu papel em células normais, expressão aberrante de *GPNMB* tem sido associada a várias doenças, como glaucoma, osteoartrite e muitos tipos de câncer, incluindo o câncer de mama (ROSE et al., 2010). Inicialmente acreditava-se que este gene funcionava como supressor de metástase, daí seu nome. Foi só em 2003 que sua função no câncer foi revista e hoje se sabe que ele estimula a progressão tumoral (ROSE e SIEGEL, 2010). *GPNMB*, em células de câncer de mama, está associada à maior migração celular, invasão e metástase para tecido ósseo (ROSE e SIEGEL, 2007, 2010). *GPNMB* estimula metástase de câncer de mama para tecido ósseo por conferir a estas células tumorais características osteomiméticas, o que permite seu crescimento no microambiente do tecido ósseo. Osteomimetismo é um termo usado para descrever o fato de que alguns tipos de câncer preferencialmente formam metástase em tecido ósseo por expressar genes normalmente associados a osteoblastos (ROSE et al., 2007). Vale ressaltar que o tecido ósseo é o sítio mais comum de metástase de câncer de mama. Em geral, quando atinge o tecido ósseo, o câncer de mama é considerado incurável (ROSE e SIEGEL, 2010). Análises de

expressão gênica mostraram que 48 de 51 linhagens celulares derivadas de câncer de mama apresentavam expressão aumentada de *GPNUMB* em comparação à linhagem de glândula mamária normal MCF-12A. A expressão de *GPNUMB* em câncer de mama está também associada à menor sobrevida do paciente (ROSE et al., 2010).

SPOCK1 é um proteoglicano secretado, cujo *core* proteico é semelhante à proteína SPARC (osteonectina). Além de apresentar toda a cadeia polipeptídica de SPARC, *SPOCK1* contém um motivo de 45 aminoácidos similar ao domínio Kazal, envolvido com inibição de serino-proteases, e uma sequência de 46 aminoácidos rica em cisteína contendo a sequência CWCV, que tem papel importante em adesão celular e ligação a fatores de crescimento (ALLIEL et al., 1993). *SPOCK1* contém cadeias de condroitin-sulfato e heparan-sulfato localizadas na porção final de sua região C-terminal (BANDTLOW e ZIMMERMANN, 2000). A função de *SPOCK1* não está totalmente esclarecida, mas sabe-se que está associado à adesão e migração celular (CHARBONNIER et al., 1999; GIUSTI et al., 2005; HOELZINGER et al., 2005). Vale ressaltar que proteoglicanos apresentam afinidade por uma variedade de ligantes, incluindo fatores de crescimento, moléculas de adesão, enzimas e outros componentes da MEC e, desta forma, podem contribuir para adesão, migração e proliferação celular (BANDTLOW e ZIMMERMANN, 2000). Está bem estabelecido que a glicoproteína secretada SPARC, cuja cadeia polipeptídica está contida em *SPOCK1*, como já citado, está associada à adesão e migração celular. SPARC promove, nas células, uma desorganização das fibras de estresse e de complexos de adesão focal, ao mesmo tempo em que mantém a interação célula-matriz através de ligações fracas mediadas por integrinas. Deste modo, SPARC promove um estado intermediário de adesão que favorece a migração celular (CAMPO MCKNIGHT et al., 2006). Não se sabe até o momento se *SPOCK1* poderia atuar da mesma forma, porém estudos já demonstraram que a expressão deste gene está alterada em diversos tumores. Comparando-se o padrão de expressão gênica de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço primários e metastáticos, Roepman et al. (2005) encontrou *SPOCK1* aumentado no último grupo (ROEPMAN et al., 2005). Outro estudo observou um aumento de 10 vezes na expressão gênica de *SPOCK1* em tecido de câncer gástrico quando comparado à mucosa gástrica normal. Os autores também observaram, por imunohistoquímica, aumento da

expressão proteica no tecido tumoral em comparação ao tecido normal (MARIMUTHU et al., 2011). Outro estudo de análise de expressão gênica comparou linhagens de carcinoma de mama de baixo e alto potencial metastático e observou-se que a expressão de *SPOCK1* estava 2,2 vezes mais elevada na linhagem mais agressiva (LI et al., 2006). Além dos tumores citados, superexpressão de *SPOCK1* já foi relatado em glioblastoma, câncer de próstata e carcinoma neuroendócrino gastrointestinal (MARIMUTHU et al., 2011).

FGFR3, outro gene estimulado por C16, pertence à família de receptores de fatores de crescimento de fibroblasto (FGFRs), uma família de receptores tirosina-quinase através dos quais os fatores de crescimento de fibroblasto (FGFs) exercem diversas funções biológicas. A estrutura básica destes receptores consiste em um domínio extracelular que interage com FGFs, um domínio transmembrana e um domínio intracelular com atividade de tirosina quinase envolvido em sinalização intracelular, incluindo a via das MAP quinases (ZAMMIT et al., 2001; PANDITH et al., 2010). FGFs e seus receptores regulam uma variedade de respostas celulares, como migração celular, proliferação e angiogênese (ESWARAKUMAR; LAX; SCHLESSINGER, 2005; PANDITH et al., 2010). O receptor FGFR3 transmite sinais induzidos por FGF1 e FGF2 (KUROSO et al., 2010). Ele já foi associado com diversos cânceres humanos, incluindo carcinomas de células transicionais da bexiga, câncer cervical, câncer colorretal, linfoma de células T, mieloma múltiplo (ESWARAKUMAR; LAX; SCHLESSINGER, 2005) e câncer de mama (KUROSO et al., 2010). Estudo realizado por Kuroso et al. (2010) avaliou a expressão de FGFR3 através de imunohistoquímica em 50 pacientes com câncer de mama. Os autores observaram expressão desta proteína em um terço dos pacientes com carcinoma ductal invasivo, enquanto que a maioria das células não-neoplásicas mostrou baixa imunoreatividade para FGFR3. Os autores também associaram a expressão de FGFR3 com pior prognóstico dos pacientes (KUROSO et al., 2010).

Além dos genes *GPNMB*, *SPOCK1* e *FGFR3*, que foram validados por qPCR, outros genes encontrados diferencialmente expressos por *microarray* exercem funções que poderiam estar associadas aos efeitos de C16 sobre migração, invasão e metástase. Entre eles, *MGAT5*, cuja expressão se mostrou aumentada por C16, codifica uma enzima envolvida na biossíntese do N-glicano ramificado β 1,6GlcNAc, o qual está associado com maior mobilidade celular (DENNIS; GRANOVSKY;

WARREN, 1999). *RYR1*, também estimulado por C16, codifica um canal de cálcio envolvido na mobilização de cálcio intracelular, processo que pode regular migração celular. A expressão deste gene já foi correlacionada com grau de tumores de mama (ABDUL; RAMLAL; HOOSEIN, 2008). *SLC7A11*, cuja expressão também foi aumentada por C16, estimula metástase através da via da caveolina-1/ β -catenina (CHEN et al., 2009). *SUFU*, um gene inibido por C16, é um regulador negativo da via de sinalização Hedgehog, uma via que pode estimular a invasão tumoral (STONE; MURONE; LUOH, 1999; SOUZAKI et al., 2010). Os genes codificantes de proteases *ADAMTS15* e *MMP3* também foram inibidos por C16, de acordo com dados de *microarray*. Estudos já demonstraram que *ADAMTS15* e *MMP3* podem, em certos casos, ter um papel protetor na invasão tumoral (LÓPEZ-OTÍN e MATRISIAN, 2007; LÓPEZ-OTÍN; PALAVALLI; SAMUELS, 2009). A inibição da expressão de *ADAMTS15* já foi associada com pior prognóstico em câncer de mama (PORTER et al., 2006). Semelhantemente, o *knockdown* desta protease em células de câncer colorretal promove crescimento tumoral e invasão, enquanto que sua superexpressão reverte estes fenótipos (LÓPEZ-OTÍN et al., 2009). *ADAMTS15* também inibe migração de células de câncer de mama (WAGSTAFF et al., 2010). *MMP3*, por sua vez, foi inicialmente descrita como sendo uma protease pró-tumorigênica, mas estudos mais recentes já demonstraram seu papel protetor em câncer de pele e câncer de mama (WITTY et al., 1995; MCCAWLEY et al., 2004). A inibição da invasão de células de câncer de mama mediada por *MMP3* envolve degradação de plasminogênio (FARINA et al., 2002).

Além de regular a expressão de genes envolvidos em invasão, neste estudo nós observamos que C16 aumenta a invasão de células MDA-MB-231 (Fig. 5). O aumento na invasão induzido por C16 foi anteriormente observado em células de melanoma de camundongos (KURATOMI et al., 2002) e em células de carcinoma adenoide cístico (GAMA-DE-SOUZA, 2008). Os genes envolvidos em migração, invasão e metástase descritos neste estudo podem ter participação no efeito de C16 sobre este processo.

Nossos dados de *microarray* também mostraram que C16 modula a expressão de genes associados à proliferação celular. C16 regulou a expressão de genes envolvidos na modulação positiva (*FGFR3*, *FTMT* e *FGFBP1*) e negativa (*FLCN*, *SOD2*, *PML* e *TRERF1*) da proliferação celular. Para avaliar o efeito final de

C16 sobre a proliferação de células MDA-MB-231, nós realizamos ensaios de MTT. Foi observado que C16 não tem efeito sobre a proliferação de células MDA-MB-231 (Fig. 6). Resultado similar foi obtido em estudo realizado por Ponce et al. (2003), no qual os autores não observaram diferença na taxa de proliferação de células MDA-MB-231 tratadas com C16 em comparação ao tratamento com peptídeo controle (PONCE et al., 2003). O peptídeo C16 também regulou a expressão de genes envolvidos no controle de apoptose, mas não mostrou induzir apoptose, nem proteger células MDA-MB-231 de apoptose induzida por estaurosporina (Fig. 7). Proliferação celular e apoptose são processos que dependem da interação de múltiplas redes de sinalização. Desta forma, os resultados obtidos neste estudo podem ser explicados como um balanço entre reguladores positivos e negativos destes processos biológicos. Além disto, estes genes podem estar associados a outras funções biológicas além de proliferação e apoptose.

Indução de angiogênese é um passo crucial para o crescimento tumoral e metástase. As células tumorais não entram em fase de crescimento exponencial se não houver suplemento adequado de oxigênio e nutrientes a elas, demonstrando a importância do processo de angiogênese na evolução tumoral (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000). O peptídeo C16 é bem caracterizado como um peptídeo pró-angiogênico (PONCE et al., 1999; PONCE; NOMIZU; KLEINMAN, 2001). Neste estudo, C16 regulou a expressão de genes associados à angiogênese na linhagem MDA-MB-231. *ADAMTS15* e *ADAMTSL1*, os quais foram inibidos por C16, compartilham domínios de trombospondina tipo I (CAL et al., 2002; HIROHATA et al., 2002), envolvidos com inibição da neovascularização (IRUELA-ARISPE et al., 1999). Adicionalmente, C16 inibiu a expressão de *PML*, outro inibidor de angiogênese (BERNARDI et al., 2006). Por outro lado, C16 estimulou a expressão de *GPNMB* e *FGFR3*, ambos associados com promoção de angiogênese (PANDITH; SHAH; SIDDIQI, 2010 - In press; ROSE; ANNIS; DONG, 2010).

O gene *GPNMB* (osteoactivina), anteriormente descrito nesta dissertação como indutor de invasão tumoral e metástase, está também associado à indução de angiogênese. Estudos já demonstraram que a porção extracelular da proteína codificada por este gene é proteoliticamente clivada e liberada no meio extracelular. A protease ADAM10 está envolvida na clivagem desta proteína. De forma interessante, o fragmento derivado da clivagem de osteoactivina é capaz de induzir

migração de células endoteliais. A partir desta observação, um estudo investigou se o fragmento extracelular de GPNMB possuía propriedades angiogênicas, uma vez que a migração de células endoteliais é uma etapa requerida durante a angiogênese. Os resultados deste estudo demonstraram que GPNMB de fato estimula angiogênese através da indução de migração de células endoteliais (ROSE; ANNIS; DONG, 2010).

FGFR3 está também associado com promoção de angiogênese, porém seu papel neste processo biológico ainda não está claro (LILLY e KENNARD, 2008). Sabe-se que seu ligante FGF2 é um forte indutor de angiogênese, sendo altamente expresso durante o desenvolvimento embrionário, cicatrização e câncer. Um estudo demonstrou que o rápido efeito de FGF2 sobre angiogênese só é observado quando seus receptores são expressos em alta densidade (PARSONS-WINGERTER et al., 2000). A sinalização iniciada pela ligação de FGF2 em seus receptores pode induzir secreção de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), levando à proliferação de células endoteliais e angiogênese (ROSENTHAL et al., 2005). Desta forma, o aumento da expressão do receptor *FGFR3* induzido por C16 em células de carcinoma de mama poderia estar associado ao efeito deste peptídeo sobre angiogênese.

Concluindo, nossos dados sugerem que C16, um peptídeo descrito como indutor de angiogênese e invasão tumoral, modula, em células MDA-MB-231, a expressão de genes associados a diversos processos ligados ao câncer. Nós demonstramos também que este peptídeo estimula invasão de células MDA-MB-231, mas não apresenta efeito sobre a proliferação e apoptose destas células. Investigações futuras são necessárias para determinar os papéis específicos dos genes induzidos por C16 nas ações biológicas deste peptídeo.

7 CONCLUSÕES

Baseados nos resultados dos experimentos realizados, concluímos que:

- 1) A linhagem de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 expressa a cadeia $\gamma 1$ da laminina, onde está presente o peptídeo C16, bem como as subunidades de integrinas αv , $\beta 3$, $\alpha 5$ e $\beta 1$.
- 2) O peptídeo C16 regula expressão gênica em células de MDA-MB-231. Dados de PCR quantitativa mostram que C16 aumenta significativamente a expressão dos genes *FGFR3*, *GPNMB* e *SPOCK1*.
- 3) C16 estimula invasão de células MDA-MB-231.
- 4) C16 não influencia nas taxas de proliferação e apoptose de células MDA-MB-231.

REFERÊNCIAS¹

ABDUL, M.; RAMLAL, S.; HOOSEIN, N. Ryanodine receptor expression correlates with tumor grade in breast cancer. **Pathol. Oncol. Res.**, v. 14, n. 2, p. 157-160, 2008.

ALBERTS, B. et al. In: ALBERTS, B. et al. (Ed.). **Molecular Biology of the Cell**. New York: Garland Science, 2002. p. 1065-1126.

ALBRECHTSEN, R et al. Basement membrane changes in breast cancer detected by immunohistochemical staining for laminin. **Cancer Res.**, v. 41, p. 5076-5081, 1981.

ALEXANDROVA, A. Y. Evolution of cell interactions with extracellular matrix during carcinogenesis. **Biochemistry (Mosc.)**, v. 73, n. 7, p. 733-741, 2008.

ALLIEL, P. M. et al. Testican, a multidomain testicular proteoglycan resembling modulators of cell social behaviour. **Eur. J. Biochem.**, v. 214, n. 1, p. 347-350, 1993.

ALTUCCI, L. et al. 17beta-Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells. **Oncogene**, v. 12, n. 11, p. 2315-2324, 1996.

APLIN, A. E. et al. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. **Pharmacol. Rev.**, v. 50, n. 2, p. 197-263, 1998.

ARDINI, E. et al. Identification of a novel function for 67-kDa laminin receptor: increase in laminin degradation rate and release of motility fragments. **Cancer Res.**, v. 62, n. 5, p. 1321-1325, 2002.

ARNHEIM, L.; DILLNER, J.; SANJEEVI, C. B. A population-based cohort study of KIR genes and genotypes in relation to cervical intraepithelial neoplasia. **Tissue Antigens**, v. 65, n. 3, p. 252-259, 2005.

ARNOULD, N. et al. Breast cancer in men: are there similarities with breast cancer in women? **Gynecol. Obstet. Fertil.**, v. 34, n. 5, p. 413-419, 2006.

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Apoptosis control by death and decoy receptors. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 11, n. 2, p. 255-260, 1999.

AUMAILLEY, M. et al. A simplified laminin nomenclature. **Matrix Biol.**, v. 24, n. 5, p. 326-332, 2005.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AUMAILLEY, M. Structure and supramolecular organization of basement membranes. **Kidney Int. Suppl.**, v. 49, p. 4-7, 1995.

AUMAILLEY, M.; SMYTH, N. The role of laminins in basement membrane function. **J. Anat.**, v. 193, p. 1-21, 1998.

AXELROD, R.; AXELROD, D. E.; PIENTA, K. J. Evolution of cooperation among tumor cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 103, n. 36, p. 13474-13479, 2006.

BALDA, M. S.; MATTER, K. Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression. **Trends Cell Biol.**, v. 13, n. 6, p. 310-318, 2003.

BANDTLOW, C. E.; ZIMMERMANN, D. R. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. **Physiol. Rev.**, v. 80, n. 4, p. 1267-1290, 2000.

BECKMANN, M. W. et al. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. **J. Mol. Med.**, v. 75, n. 6, p. 429-439, 1997.

BERNARDI, R. et al. PML inhibits HIF-1 α translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. **Nature**, v. 442, p. 779-785, 2006.

BIDARD, F. C. et al. A "class action" against the microenvironment: do cancer cells cooperate in metastasis? **Cancer Metastasis Rev.**, v. 27, n. 1, p. 5-10, 2008.

BISSELL, M. J.; BILDER, D. Polarity determination in breast tissue: desmosomal adhesion, myoepithelial cells, and laminin 1. **Breast Cancer Res.**, v. 5, n. 2, p. 117-119, 2003.

BJÖRKLUND, M.; KOIVUNEN, E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1755, n. 1, p. 37-69, 2005.

BLUM, J. L.; ZEIGLER, M. E.; WICHA, M. S. Regulation of mammary differentiation by the extracellular matrix. **Environ. Health Perspect.**, v. 80, p. 71-83, 1989.

BOLSTAD, B. M. et al. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. **Bioinformatics**, v. 19, n. 2, p. 185-193, 2003.

BOMBONATI, A.; SGROI, D. C. The molecular pathology of breast cancer progression. **J. Pathol.**, v. 223, n. 2, p. 307-317, 2011.

BOSMAN, F. T.; STAMENKOVIC, I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. **J. Pathol.**, v. 200, n. 4, p. 423-428, 2003.

BOYLE, P. Breast cancer control: signs of progress, but more work required. **Breast**, v. 14, n. 6, p. 429-438, 2005.

BURGESSON, R. E. et al. A new nomenclature for the laminins. **Matrix Biol.**, v. 14, n. 3, p. 209-211, 1994.

CAL, S. et al. Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. **Gene**, v. 283, p. 49-62, 2002.

CAMPO MCKNIGHT, D. A. et al. Roles of osteonectin in the migration of breast cancer cells into bone. **J. Cell Biochem.**, v. 97, n. 2, p. 288-302, 2006.

CAPUANO, A. C.; JAEGER, R. G. The effect of laminin and its peptide SIKVAV on a human salivary gland myoepithelioma cell line. **Oral Oncol.**, v. 40, n. 1, p. 36-42, 2004.

CARMICHAEL, A.; SAMI, A. S. ; DIXON, J. M. Breast cancer risk among the survivors of atomic bomb and patients exposed to therapeutic ionising radiation. **Eur. J. Surg. Oncol.**, v. 29, n. 5, p. 475-479, 2003.

CERNE, J. Z.; FRKOVIC-GRAZIO, S.; GERSAK, K. Breast Tumor Characteristics in Hormone Replacement Therapy Users. **Pathol. Oncol. Res.**, 2011. In press.

CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends Cell Biol.**, v. 11, n. 11, p. S37-43, 2001.

CHARBONNIER, F. et al. Expression of the proteoglycan SPOCK during mouse embryo development. **Mech. Dev.**, v. 90, n. 2, p. 317-321, 2000.

CHARONIS, A. S. et al. A novel synthetic peptide from the B1 chain of laminin with heparin-binding and cell adhesion-promoting activities. **J. Cell Biol.**, v. 107, n. 3, p. 1253-1260, 1988.

CHEN, R. S. et al. Disruption of xCT inhibits cancer cell metastasis via the caveolin-1/beta-catenin pathway. **Oncogene**, v. 28, n. 4, p. 599-609, 2009.

CHENG, S. L. et al. Toxicogenomics of Kojic Acid on Gene Expression Profiling of A375 Human Malignant Melanoma Cells. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, n. 4, p. 655-669, 2006.

CHIA, J. et al. Evidence for a role of tumor-derived laminin-511 in the metastatic progression of breast cancer. **Am. J. Pathol.**, v. 170, n. 6, p. 2135-2148, 2007.

CICHON, M. A. et al. Microenvironmental influences that drive progression from benign breast disease to invasive breast cancer. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.**, v. 15, n. 4, p. 389-397, 2010.

COLOGNATO, H.; YURCHENCO, P. D. Form and function: the laminin family of heterotrimers. **Dev. Dyn.**, v. 218, n. 2, p. 213-234, 2000.

COOK, L. M.; HURST, D. R.; WELCH, D. R. Metastasis suppressors and the tumor microenvironment. **Semin. Cancer Biol.**, v. 21, n. 2, p. 113-122, 2011.

DALEY, W. P.; PETERS, S. B.; LARSEN, M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. **J. Cell Sci.**, v. 121, p. 255-264, 2008.

DEBNATH, J.; MUTHUSWAMY, S. K.; BRUGGE, J. S. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. **Methods**, v. 30, n. 3, p. 256-268, 2003.

DECLERCK, Y. A. et al. Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. **Am. J. Pathol.**, v. 164, n. 4, p. 1131-1139, 2004.

DENNIS, J. W.; GRANOVSKY, M.; WARREN, C. E. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1473, n. 1, p. 21-34, 1999.

DIETERICH, P. et al. Anomalous dynamics of cell migration. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 105, n. 2, p. 459-463, 2008.

DING, F. et al. SnoRNA Snord116 (Pwcr1/MBII-85) deletion causes growth deficiency and hyperphagia in mice. **PLoS One**, v. 3, n. 3, p. e1709, 2008.

ECCLES, S. A; WELCH, D. R. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. **Lancet**, v. 369, n. 9574, p. 1742-1757, 2007.

EKBLOM, M. et al. Laminin isoforms and epithelial development. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 857, p. 194-211, 1998.

EKBLOM, P. Receptors for laminins during epithelial morphogenesis. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 8, n. 5, p. 700-706, 1996.

ENGBRING, J. A. et al. The B16F10 cell receptor for a metastasis-promoting site on laminin-1 is a heparan sulfate/chondroitin sulfate-containing proteoglycan. **Cancer Res.**, v. 62, n. 12, p. 3549-3554, 2002.

ENGBRING, J. A. et al. The laminin alpha-1 chain derived peptide, AG73, increases fibronectin levels in breast and melanoma cancer cells. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 25, n. 3, p. 241-252, 2008.

EPSTEIN, J. B.; SCHUBERT, M. M. Oropharyngeal mucositis in cancer therapy. Review of pathogenesis, diagnosis, and management. **Oncology (Williston Park)**, v. 17, n. 12, p. 1767-1779, 2003.

ESWARAKUMAR, V. P.; LAX, I.; SCHLESSINGER, J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 16, n. 2, p. 139-149, 2005.

FAISAL KHAN, K. M. et al. Exposure of cryptic domains in the alpha 1-chain of laminin-1 by elastase stimulates macrophages urokinase and matrix metalloproteinase-9 expression. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 16, p. 13778-13786, 2002.

FARINA, A. R. et al. Inhibition of human MDA-MB-231 breast cancer cell invasion by matrix metalloproteinase 3 involves degradation of plasminogen. **Eur. J. Biochem.**, v. 269, n. 18, p. 4476-4483, 2002.

FARNIER, C. et al. Adipocyte functions are modulated by cell size change: potential involvement of an integrin/ERK signalling pathway. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 27, n. 10, p. 1178-1186, 2003.

FOSTER, J. S. et al. Multifaceted regulation of cell cycle progression by estrogen: regulation of Cdk inhibitors and Cdc25A independent of cyclin D1-Cdk4 function. **Mol. Cell Biol.**, v. 21, n. 3, p. 794-810, 2001.

FOSTER, J. S.; WIMALASENA, J. Estrogen regulates activity of cyclin-dependent kinases and retinoblastoma protein phosphorylation in breast cancer cells. **Mol. Endocrinol.**, v. 10, n. 5, p. 488-498, 1996.

FREITAS, V. M. et al. Laminin-1 and SIKVAV a laminin-1-derived peptide, regulate the morphology and protease activity of a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line. **Oral Oncol.**, v. 40, n. 5, p. 483-489, 2004.

FREITAS, V. M. et al. SIKVAV, a laminin alpha1-derived peptide, interacts with integrins and increases protease activity of a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line through the ERK 1/2 signaling pathway. **Am. J. Pathol.**, v. 171, n. 1, p. 124-138, 2007.

FREITAS, V. M.; JAEGER, R. G. The effect of laminin and its peptide SIKVAV on a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line. **Virchows Arch.**, v. 441, n. 6, p. 569-576, 2002.

GAMA-DE-SOUZA, L. N. et al. Adhesion and protease activity in cell lines from human salivary gland tumors are regulated by the laminin-derived peptide AG73, syndecan-1 and beta1 integrin. **Matrix Biol.**, v. 27, n. 5, p. 402-419, 2008.

GAMA-DE-SOUZA, L. N. **Peptídeo C16 derivado da laminina regula migração, invasão e secreção de protease em linhagem celular derivada de carcinoma adenoide cístico humano através de integrinas e das vias de sinalização AKT e ERK.** 2008. 123 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GHOSH, S.; STACK, M. S. Proteolytic modification of laminins: functional consequences. **Microsc. Res. Tech.**, v. 51, n. 3, p. 238-246, 2000.

GIANCOTTI, F. G.; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. **Science**, v. 285, n. 5430, p. 1028-1032, 1999.

GIUSTI, B. et al. A model of anti-angiogenesis: differential transcriptome profiling of microvascular endothelial cells from diffuse systemic sclerosis patients. **Arthritis Res. Ther.**, v. 8, n. 4, p. R 115, 2006.

GRAF, J. et al. A pentapeptide from the laminin B1 chain mediates cell adhesion and binds the 67,000 laminin receptor. **Biochemistry**, v. 26, n. 22, p. 6896-6900, 1987.

GRANT, D. S. et al. Interaction of endothelial cells with a laminin A chain peptide (SIKVAV) in vitro and induction of angiogenic behavior in vivo. **J. Cell. Physiol.**, v. 153, n. 3, p. 614-625, 1992.

GREENE, T. et al. The significance of surgical margins for patients with atypical ductal hyperplasia. **Am. J. Surg.**, v. 192, n. 4, p. 499-501, 2006.

GUAN, J. L. Integrin signaling through FAK in the regulation of mammary stem cells and breast cancer. **I. U. B. M. B Life.**, v. 62, n. 4, p. 268-276, 2010.

GUDJONSSON, T. et al. Myoepithelial cells: their origin and function in breast morphogenesis and neoplasia. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.**, v. 10, v. 3, p. 261-272, 2005.

GUDJONSSON, T. et al. Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. **J. Cell Sci.**, v. 115, p. 39-50, 2002.

GUSTERSON, B. A. et al. Distribution of myoepithelial cells and basement membrane proteins in the normal breast and in benign and malignant breast diseases. **Cancer Res.**, v. 42, n. 11, p. 4763-4770, 1982.

HAMILL, K. J. et al. Laminin deposition in the extracellular matrix: a complex picture emerges. **J. Cell Sci.**, v. 122, p. 4409-4417, 2009.

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

HANDSLEY, M. M.; EDWARDS, D. R. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. **Int. J. Cancer**, v. 115, n. 6, p. 849-860, 2005.

HEGERFELDT, Y. et al. Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. **Cancer Res.**, v. 62, n. 7, p. 2125-2130, 2002.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.

HIROHATA, S. et al. Punctin, a novel ADAMTS-like molecule, ADAMTSL-1, in extracellular matrix. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 12182-12189, 2002.

HOFFMAN, M. P. et al. Cell type-specific differences in glycosaminoglycans modulate the biological activity of a heparin-binding peptide (RKRLQVQLSIRT) from the G domain of the laminin alpha1 chain. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 25, p. 22077-22085, 2001.

HOFFMAN, M. P. et al. Laminin-1 and laminin-2 G-domain synthetic peptides bind syndecan-1 and are involved in acinar formation of a human submandibular gland cell line. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 44, p. 28633-28641, 1998.

HOHENESTER, E; ENGEL, J. Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins. **Matrix Biol.**, v. 21, n. 2, p. 115-128, 2002.

HSIEH, M. H.; NGUYEN, H. T. Molecular mechanism of apoptosis induced by mechanical forces. **Int. Rev. Cytol.**, v. 245, p. 45-90, 2005.

HYNES, R. O. Integrins: a family of cell surface receptors. **Cell**, v. 48, n. 4, 549-554, 1987.

HYNES, R. O. Targeted mutations in cell adhesion genes: what have we learned from them? **Dev. Biol.**, v. 180, n. 2, p. 402-412, 1996.

IKEMOTO, S. et al. Laminin peptide-conjugated chitosan membrane: Application for keratinocyte delivery in wounded skin. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 79, n. 3, p. 716-722, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2010**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. 2009. 100 p.

IRUELA-ARISPE, M. L. et al. Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats. **Circulation**, v. 100, p. 1423-1431, 1999.

IWAMOTO, Y. et al. YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. **Science**, v. 238, n. 4830, p. 1132-1134, 1987.

JOHN, A.; TUSZYNSKI, G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. **Pathol. Oncol. Res.**, v. 7, n. 1, p. 14-23, 2001.

JOHNSEN, M. et al. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 10, n. 5, p. 667-671, 1998.

JONES, J. M.; COHEN, R. L.; CHAMBERS, D. A. Collagen modulates gene activation of plasminogen activator system molecules. **Exp. Cell Res.**, v. 280, n. 2, p. 244-254, 2002.

KANEMOTO, T. et al. Identification of an amino acid sequence from the laminin A chain that stimulates metastasis and collagenase IV production. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 87, n. 6, p. 2279-2283, 1990.

KIM, S. H.; TURNBULL, J.; GUIMOND, S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. **J. Endocrinol.**, v. 209, n. 2, p. 139-151, 2011.

KIM, W. H. et al. Laminin- α 1-chain sequence Leu-Gln-Val-Gln-Leu-Ser-Ile-Arg (LQVQLSIR) enhances murine melanoma cell metastases. **Int. J. Cancer**, v. 77, n. 4, p. 632-639, 1998.

KISHORE, S. et al. The snoRNA MBII-52 (SNORD 115) is processed into smaller RNAs and regulates alternative splicing. **Hum. Mol. Genet.**, v. 19, n. 7, p. 1153-1164, 2010.

KLEIN, G. et al. Role of laminin A chain in the development of epithelial cell polarity. **Cell.**, v. 55, n. 2, p. 331-341, 1988.

KLEINMAN, H. K. et al. Basement membrane complexes with biological activity. **Biochemistry**, v. 25, n. 2, p. 312-318, 1986.

KURATOMI, Y. et al. Laminin gamma 1 chain peptide, C-16 (KAFDITYVRLKF), promotes migration, MMP-9 secretion, and pulmonary metastasis of B16-F10 mouse melanoma cells. **Br. J. Cancer**, v. 86, n. 7, p. 1169-1173, 2002.

KUROSO, K. Immunohistochemical detection of fibroblast growth factor receptor 3 in human breast cancer: correlation with clinicopathological/molecular parameters and prognosis. **Pathobiology**, v. 77, n. 5, p. 231-240, 2010.

KUTLESA, S. et al. Developmentally regulated interactions of human thymocytes with different laminin isoforms. **Immunology**, v. 105, n. 4, p. 407-418, 2002.

LACROIX, M.; LECLERCQ, G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 83, n. 3, p. 249-289, 2004.

LAMALICE, L.; LE BOEUF, F.; HUOT, J. Endothelial cell migration during angiogenesis. **Circ. Res.**, v. 100, n. 6, p. 782-794, 2007.

LI D. Q. Gene expression profile analysis of an isogenic tumour metastasis model reveals a functional role for oncogene AF1Q in breast cancer metastasis. **Eur. J. Cancer**, v. 42, n. 18, p. 3274-3286, 2006.

LILLY, B.; KENNARD, S. Differential gene expression in a coculture model of angiogenesis reveals modulation of select pathways and a role for Notch signaling. **Physiol. Genomics**, v. 36, p. 69-78, 2009.

LIOTTA, L. A.; KOHN, E. C. The microenvironment of the tumour-host interface. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 375-379, 2001.

LIU, B. C.; XU, Z. L. Extracellular matrix. **Sheng Li Ke Xue Jin Zhan.**, v. 27, n. 3, p. 221-226, 1996.

LÓPEZ-OTÍN, C.; MATRISIAN, L. M. Emerging roles of proteases in tumor suppression. **Nat. Rev. Cancer**, v. 7, n. 10, p. 800-808, 2007.

LÓPEZ-OTÍN, C.; PALAVALLI, L. H.; SAMUELS, Y. Protective roles of matrix metalloproteinases: from mouse models to human cancer. **Cell Cycle**, v. 8, n. 22, p. 3657-3662, 2009.

LUGASSY, C. et al. C16 laminin peptide increases angiotropic extravascular migration of human melanoma cells in a shell-less chick chorioallantoic membrane assay. **Br. J. Dermatol.**, v. 157, n. 4, p. 780-782, 2007.

LUKASHEV, M. E.; WERB, Z. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. **Trends Cell Biol.**, v. 8, n. 11, p. 437-441, 1998.

MALINDA, K. M. et al. Angiogenic laminin-derived peptides stimulate wound healing. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 40, p. 2771-2780, 2008.

MALINDA, K. M.; KLEINMAN, H. K. The laminins. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 28, n. 9, p. 957-959, 1996.

MAO, Y.; SCHWARZBAUER, J. E. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. **Matrix Biol.**, v. 24, n. 6, p. 389-399, 2005.

MARIMUTHU, A. et al. Gene Expression Profiling of Gastric Cancer. **J. Proteomics Bioinform.**, v. 4, n. 4, p. 74-82, 2011.

MARTIN, G. R.; TIMPL, R. Laminin and other basement membrane components. **Annu. Rev. Cell Biol.**, v. 3, p. 57-85, 1987.

MASUNAGA, T. Epidermal basement membrane: its molecular organization and blistering disorders. **Connect. Tissue Res.**, v. 47, n. 2, p. 55-66, 2006.

MCCAWLEY, L. J. et al. A protective role for matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma. **Cancer Res.**, v. 64, n. 19, p. 6965-6972, 2004.

MCGOWAN, K.; MARINKOVICH, M. P. Laminins and human disease. **Micro. Res.Tech.**, v. 51, p. 262-279, 2000.

MCMILLAN, J. R.; AKIYAMA, M.; SHIMIZU, H. Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. **J. Dermatol. Sci.**, v. 31, n. 3, p. 169-177, 2003.

MCPHERSON, K.; STEEL, C. M.; DIXON, J. M. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. **B. M. J.**, v. 321, n. 7261, p. 624-628, 2000.

MEDINA D. Mammary developmental fate and breast cancer risk. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 12, n. 3, p. 483-495, 2005.

MELO, E. S. **Laminina e seu peptídeo bioativo AG73 como modulador do fenótipo de linhagem celular derivada de carcinoma adenoide cístico humano.** 2004. 54 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

MINER, J. H.; YURCHENCO, P. D. Laminin functions in tissue morphogenesis. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 20, p. 255-284, 2004.

MOCHIZUKI, M. et al. Angiogenic activity of syndecan-binding laminin peptide AG73 (RKRLQVQLSIRT). **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 459, n. 2, p. 249-255, 2007.

MOCHIZUKI, M. et al. Laminin-1 peptide-conjugated chitosan membranes as a novel approach for cell engineering. **F.A.S.E.B. J.**, v. 17, n. 8, p. 875-877, 2003.

MORAIS FREITAS, V. et al. Malignancy-related 67kDa laminin receptor in adenoid cystic carcinoma. Effect on migration and beta-catenin expression. **Oral Oncol.**, v. 43, n. 10, p. 987-998, 2007.

MOSCATELLI, D. et al. Multiple forms of an angiogenesis factor: basic fibroblast growth factor. **Biochimie.**, v. 70, n. 1, p. 83-87, 1988.

MOTT, J. D.; WERB, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 16, n. 5, p. 558-564, 2004.

NELSON, H. D. et al. **Screening for Breast Cancer: Systematic Evidence Review Update for the US Preventive Services Task Force.** Rockville: Agency for Healthcare Research and Quality (US), 2009. p. 1-89.

NOMIZU, M. et al. Cell adhesive sequences in mouse laminin beta1 chain. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 378, n. 2, p. 311-320, 2000.

NOMIZU, M. et al. Cell binding sequences in mouse laminin alpha1 chain. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 49, p. 32491-32499, 1998.

NOMIZU, M. et al. Identification of cell binding sequences in mouse laminin gamma1 chain by systematic peptide screening. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 32198-32205, 1997.

NOMIZU, M. et al. Identification of cell binding sites in the laminin alpha 1 chain carboxyl-terminal globular domain by systematic screening of synthetic peptides. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 35, p. 20583-20590, 1995.

NOMIZU, M. et al. Identification of homologous biologically active sites on the N-terminal domain of laminin alpha chains. **Biochemistry**, v. 40, n. 50, p. 15310-15317, 2001.

NOMIZU, M. et al. The all-D-configuration segment containing the IKVAV sequence of laminin A chain has similar activities to the all-L-peptide in vitro and in vivo. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 20, p. 14118-14121, 1992.

OLIVEIRA, E. C. **Laminina-1 e seu peptídeo AG73 regulando a morfologia e atividade proteolítica de linhagem celular derivada de mioepitelioma humano.** 2004. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

OVERALL, C. M.; LÓPEZ-OTÍN, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 2, n. 9, p. 657-672, 2002.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 8, n. 3, p. 221-233, 2007.

PANDITH, A. A.; SHAH, Z. A.; SIDDIQI, M. A. Oncogenic role of fibroblast growth factor receptor 3 in tumorigenesis of urinary bladder cancer. **Urol. Oncol.**, 2010. In press.

PARSONS-WINGERTER P. et al. Fibroblast growth factor-2 selectively stimulates angiogenesis of small vessels in arterial tree. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 20, n. 5, p. 1250-1256, 2000.

PATARROYO, M.; TRYGGVASON, K.; VIRTANEN, I. Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. **Semin. Cancer Biol.**, v. 12, n. 3, p. 197-207, 2002.

PECK, J. D. et al. Steroid hormone levels during pregnancy and incidence of maternal breast cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 11, n. 4, p. 361-368, 2002.

PONCE, M. L. et al. Identification of a potent peptide antagonist to an active laminin-1 sequence that blocks angiogenesis and tumor growth. **Cancer Res**, v. 63, n. 16, p. 5060-5064, 2003.

PONCE, M. L. et al. Identification of endothelial cell binding sites on the laminin gamma 1 chain. **Circ. Res.**, v. 84, p. 688-694, 1999.

PONCE, M. L.; KLEINMAN, H. K. Identification of redundant angiogenic sites in laminin alpha1 and gamma1 chains. **Exp. Cell Res.**, v. 285, n. 2, p. 189-195, 2003.

PONCE, M. L.; NOMIZU, M.; KLEINMAN, H. K. An angiogenic laminin site and its antagonist bind through the alpha(v)beta3 and alpha5beta1 integrins. **FASEB J.**, v. 15, p. 1389-1397, 2001.

PORTER, S. et al. ADAMTS8 and ADAMTS15 expression predicts survival in human breast carcinoma. **Int. J. Cancer**, v. 118, n. 5, p. 1241-1247, 2006.

RAMSAY, D. T. et al. Anatomy of the lactating human breast redefined with ultrasound imaging. **J. Anat.**, v. 206, n. 6, p. 525-534, 2005.

RANGANATH, R. M.; NAGASHREE, N. R. Role of programmed cell death in development. **Int. Rev. Cytol.**, v. 202, p. 159-242, 2001.

REGINATO, M. J. et al. Bim regulation of lumen formation in cultured mammary epithelial acini is targeted by oncogenes. **Mol. Cell Biol.**, v. 25, n. 11, p. 4591-4601, 2005.

ROEPMAN, P. et al. An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. **Nat. Genet.**, v. 37, n. 2, p. 182-186, 2005.

ROSE, A. A. et al. Glycoprotein nonmetastatic B is an independent prognostic indicator of recurrence and a novel therapeutic target in breast cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 16, n. 7, p. 2147-2156, 2010.

ROSE, A. A. et al. Osteoactivin promotes breast cancer metastasis to bone. **Mol. Cancer Res.**, v. 5, n. 10, p. 1001-1014, 2007.

ROSE, A. A.; ANNIS, M. G.; DONG, Z. ADAM10 releases a soluble form of the GPNMB/Osteoactivin extracellular domain with angiogenic properties. **PLoS One**, v. 5, n. 8, e12093, 2010.

ROSE, A. A.; SIEGEL, P. M. Emerging therapeutic targets in breast cancer bone metastasis. **Future Oncol.**, v. 6, n. 1, p. 55-74, 2010.

ROSE, A. A.; SIEGEL, P. M. Osteoactivin/HGFIN: is it a tumor suppressor or mediator of metastasis in breast cancer? **Breast Cancer Res.**, v. 9, n. 6, p. 403, 2007.

ROSENTHAL, R. et al. The fibroblast growth factor receptors, FGFR-1 and FGFR-2, mediate two independent signalling pathways in human retinal pigment epithelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 337, n. 1, p. 241-247, 2005.

RUNDHAUG, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. **J. Cell Mol. Med.**, v. 9, n. 2, p. 267-285, 2005.

SASAKI, T. et al. Laminin: the crux of basement membrane assembly. **J. Cell Biol.**, v. 164, n. 7, p. 959-963, 2004.

SCHENK, S. et al. Binding to EGF receptor of a laminin-5 EGF-like fragment liberated during MMP-dependent mammary gland involution. **J. Cell Biol.** V. 161, n. 1, p. 197-209, 2003.

SCHENK, S.; QUARANTA, V. Tales from the crypt[ic] sites of the extracellular matrix. **Trends Cell Biol.**, v. 13, n. 7, p. 366-375, 2003.

SCHMITT, F.; GOBBI, H. Mama. In: BRASILEIRO-FILHO, G. et al. (Ed.). **Bogliolo: patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 613-643.

SIQUEIRA, A. S. et al. Laminin-derived peptide AG73 regulates migration, invasion, and protease activity of human oral squamous cell carcinoma cells through syndecan-1 and beta1 integrin. **Tumour Biol.**, v. 31, n. 1, p. 46-58, 2010.

SKUBITZ, A. P. et al. Definition of a sequence, RYVVLPR, within laminin peptide F-9 that mediates metastatic fibrosarcoma cell adhesion and spreading. **Cancer Res.**, v. 50, n. 23, p. 7612-7622, 1990.

SONG, S. Y. et al. Liver metastasis formation by laminin-1 peptide (LQVQLSIR)-adhesion selected B16-F10 melanoma cells. **Int. J. Cancer**, v. 71, n. 3, p. 436-441, 1997.

SOUZAKI, M. Hedgehog signaling pathway mediates the progression of non-invasive breast cancer to invasive breast cancer. **Cancer Sci.**, v. 102, n. 2, p. 373-381, 2011.

STAMENKOVIC, I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. **J. Pathol.**, v. 200, n. 4, p. 448-464, 2003.

STONE, D. M.; MURONE, M.; LUOH, S. Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. **J. Cell Sci.**, v. 112, p. 4437-4448, 1999.

STREULI, C. H. et al. Laminin mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelia. **J. Cell Biol.**, v. 129, n. 3, p. 591-603, 1995.

STREULI, C. H. Integrins and cell-fate determination. **J. Cell Sci.**, v. 122, p.171-177, 2009.

STUPACK, D. G.; CHERESH, D. A. ECM remodeling regulates angiogenesis: endothelial integrins look for new ligands. **Sci. S. T. K. E.**, v. 2002, n. 119, p. e7, 2002.

SUZUKI, N. et al. Biological activities of homologous loop regions in the laminin alpha chain G domains. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 46, p. 45697-45705, 2003.

SUZUKI, N. et al. Functional sites in the laminin alpha chains. **Connect. Tissue Res.**, v. 46, n. 3, p. 142-152, 2005.

TANZER, M. L. Current concepts of extracellular matrix. **J. Orthop. Sci.**, v. 11, n. 3, p. 326-331, 2006.

TASHIRO, K. et al. A synthetic peptide containing the IKVAV sequence from the A chain of laminin mediates cell attachment, migration, and neurite outgrowth. **J. Biol. Chem.**, v. 264, n. 27, p. 16174-16182, 1989.

TERRANOVA, V. P. et al. Modulation of the metastatic activity of melanoma cells by laminin and fibronectin. **Science**, v. 226, n. 4677, p. 982-985, 1984.

TIMPL, R. et al. Laminin - a glycoprotein from basement membranes. **J. Biol. Chem.**, v. 254, n. 19, p. 9933-9937, 1979.

TIMPL, R.; BROWN, J. C. The laminins. **Matrix Biol.**, v. 14, n. 4, p. 275-281, 1994.

TITZE, J. et al. Glycosaminoglycan polymerization may enable osmotically inactive Na⁺ storage in the skin. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 287, n. 1, p. 203-208, 2004.

TRICHOPOULOS, D. et al. Early life events and conditions and breast cancer risk: from epidemiology to etiology. **Int. J. Cancer**, v. 122, n. 3, p. 481-485, 2008.

TROUSSARD, A. A. et al. Cell-extracellular matrix interactions stimulate the AP-1 transcription factor in an integrin-linked kinase- and glycogen synthase kinase 3-dependent manner. **Mol. Cell Biol.**, v. 19, n. 11, p. 7420-7427, 1999.

VAN DEN HEUVEL, S. Cell-cycle regulation. **WormBook**, v. 21, p. 1-16, 2005.

VARELLA-GARCIA, M. Análise Genômica: do laboratório à prática oncológica. **Arq. Ciênc. Saúde**, v. 11, n. 1, p. 40-43, 2004.

VARNER, J.A.; CHERESH, D. A. Integrins and cancer. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 8, n. 5, p. 724-730, 1996.

VIRTANEN, I. et al. Laminin alpha1-chain shows a restricted distribution in epithelial basement membranes of fetal and adult human tissues. **Exp. Cell Res.**, v. 257, n. 2, p. 298-309, 2000.

WAGSTAFF, L. et al. ADAMTS15 metalloproteinase inhibits breast cancer cell migration. **Breast Cancer Re.**, v. 12, p. 15, 2010. Suppl. 1.

WILSON, D. F. et al. Oral cancer: role of the basement membrane in invasion. **Aust. Dent. J.**, v. 44, n. 2, p. 93-97, 1999.

WITTY, J. P. et al. Decreased tumor formation in 7,12-dimethylbenzanthracene-treated stromelysin-1 transgenic mice is associated with alterations in mammary epithelial cell apoptosis. **Cancer Res.**, v. 55, n. 7, p. 1401-1406, 1995.

WOESSNER JR, J. F. MMPs and TIMPs - an historical perspective. **Mol. Biotechnol.**, v. 22, n. 1, p. 33-49, 2002.

WOESSNER JR, J. F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **FASEB J.**, v. 5, n. 8, p. 2145-2154, 1991.

WOODHOUSE, E. C.; CHUAQUI, R. F.; LIOTTA, L. A. General mechanisms of metastasis. **Cancer**, v. 80, p. 1529-1537, 1997.

YURCHENCO, P. D. et al. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. **Matrix Biol.**, v. 22, n. 7, p. 521-538, 2004.

YURCHENCO, P. D.; WADSWORTH, W. G. Assembly and tissue functions of early embryonic laminins and netrins. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 16, n. 5, p. 572-579, 2004.

ZAMMIT, C. Altered intracellular localization of fibroblast growth factor receptor 3 in human breast cancer. **J. Pathol.**, v. 194, n. 1, p. 27-34, 2001.

ZIOBER, A. F. et al. The extracellular matrix in oral squamous cell carcinoma: friend or foe? **Head Neck**, v. 28, n. 8, p. 740-749, 2006.

ZIOBER, B. L.; LIN, C. S.; KRAMER, R. H. Laminin-binding integrins in tumor progression and metastasis. **Semin. Cancer Biol.**, v. 7, n. 3, p. 119-128, 1996.