BASILIO SMUCZEK

**Estudo da clivagem da laminina em tumores de mama, gerando potenciais
peptídeos bioativos**

Tese 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 Doutor em Ciências.

São Paulo

2019

BASILIO SMUCZEK

**Estudo da clivagem da laminina em tumores de mama, gerando potenciais
peptídeos bioativos**

Versão original

Tese 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 Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. Ruy Gastaldoni Jaeger

São Paulo

2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Smuczek, Basilio

Estudo da clivagem da laminina em tumores de
mama, gerando potenciais peptídeos bioativos /
Basilio Smuczek; orientador Ruy Gastaldoni Jaeger. -
- São Paulo, 2019.
180 p.

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

1. Câncer de mama. 2. Matriz Extracelular. 3.
Laminina. 4. Peptídeo C16. 5. Peptídeo C28. I.
Gastaldoni Jaeger, Ruy, orientador. II. Título.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Análise in vitro e in vivo da Clivagem da Laminina em Tumores de Mama, Gerando Potenciais Peptídeos Bioativos*", registrado sob o protocolo nº **122/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **07/12/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Ruy Gastaldoni Jaeger**

- Departamento: *Biologia Celular e do Desenvolvimento*

- Membros da Equipe: *Basílio Smuczek (Pós-graduando), José Braz Melo (Técnico de laboratório)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www2.icb.usp.br/ichb/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*In vitro and in vivo analysis of Laminin Cleavage in Breast Tumors, Generating Potential Bioactive Peptides*", protocol nº **122/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **12/7/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Ruy Gastaldoni Jaeger**

- Team members: *Basílio Smuczek (Graduate Student), José Braz Melo (Laboratory Technician)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Danio rerio</i>	<i>Zebrafish</i>			360

São Paulo, 18 de dezembro de 2017.

Prof. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora CEUA-ICB/USP

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

São Paulo, 14 de agosto de 2015.

PARECER 1256/CEPSH

CAAE: 46098215.0.0000.5467

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Análise in vitro e in vivo da clivagem da laminina em tumores de mama, gerando potenciais peptídeos bioativos*" do pesquisador Prof. Dr. **Ruy Gastaldoni Jaeger** e do aluno **Basilio Smuczek**.

Cabe aos pesquisadores elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: www.icb.usp.br.

Aos pesquisadores cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **05.08.2016**, bem como anexado uma cópia à Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Paolo M. A. Zanotto
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

*Somos definidos pelas nossas atitudes
e não pelas nossas palavras.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao **Prof. Ruy Gastaldoni Jaeger**, pela orientação, apoio e disponibilidade durante a realização deste projeto. Suas ideias e sua vontade de fazer ciência de qualidade foram os meus maiores incentivos pela busca de melhores resultados. Obrigado ainda pela amizade e por todos os seus ensinamentos, que foram fundamentais para minha formação acadêmica.

À **Profa. Dra. Vanessa Moraes Freitas**, agradeço pelas várias formas de auxílio prestadas durante a realização deste trabalho, incluindo consultorias experimentais, cessão de reagentes e permissão para utilizar seus equipamentos e seu laboratório. Quero agradecer também a equipe do seu laboratório, Iuri, Heydi, Ana, Suély e Maíra, agradeço pela ajuda e atenção.

Ao amigo e colega de doutorado Raony, agradeço pela companhia diária nas refeições e o café expresso após o almoço. Todas as nossas conversas filosóficas até mesmo as técnicas faziam com que o dia sempre ficasse mais brando. Além do mais, durante o mestrado conquistei uma amizade para a vida que é a Adriane e dessa vez no doutorado a vida me presenteou com mais uma nova amizade.

Ao querido amigo Nilton, por todos esses anos ter acompanhado e incentivado a minha trajetória, além de sempre ter acreditado nos meus passos. Você é sem sombra de dúvida um exemplo de perseverança, bondade e honestidade não somente para mim, mas para todos aqueles que te cercam.

A todos os membros da minha família: Primeiramente a minha Mãe Sofia que sempre manteve o amor mais puro. Ao meu Pai Gabriel. Aos meus irmãos, Sônia, Luci Mara (em memória), Rosangela, Paulo e Elizangela. Agradeço pelo amor, carinho e atenção que todos proporcionaram em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro. A concessão de bolsa de Doutorado foi de extrema importância não só para a realização deste trabalho, mas também para a minha formação profissional.

Ao auxílio da Bolsa Mobilidade Santander-alunos para a realização do projeto de doutorado-sanduíche no Reino Unido. A experiência adquirida durante esse período trouxe uma experiência profissional e pessoal que levarei para a vida toda.

Ao pessoal do laboratório de Biologia Tumoral: Raquel, Olga, Maria Raquel, Edilberto e Michelli pela ajuda no laboratório durante o desenvolver do projeto. Acredito que fomos não somente colegas de trabalhos, mas sim amigos e espero que essa amizade seja estendida para sempre.

À Profa. Dra. Telma Zorn e sua equipe, obrigado pelo espaço cedido em seu laboratório para a realização de experimentos, e por permitir o uso de alguns de seus equipamentos. Sua ajuda foi fundamental para a execução desse projeto.

Ao Prof. Dr. Edmund Chada Baracat, ao Prof. Dr. José Roberto Filassi e a Médica Laura Maciel Rocha Penteado de Aguiar, obrigado pelo auxílio na coleta e fornecimento de material para o desenvolvimento desse projeto. A ajuda de vocês foi importantíssima.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas, obrigado pelo auxílio e ajuda na obtenção de material, a sua colaboração foi um ponto chave para o desenvolvimento do projeto.

Ao Dr. Leo Kei Iwai e a Profa. Solange M. T. Serrano do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada. A sua ajuda com o processamento e análise das amostras foi outro ponto chave para o desenvolvimento desse trabalho.

Às Profa. Dra. Nathalie Cella, Profa. Dra. Marilene Lopes bem como a seus respectivos grupos, por serem sempre atenciosas e permitirem a utilização de reagentes e equipamentos de seus laboratórios.

Às Dra. Alison Colquhoun, Profa. Dra. Fernanda Ortis e Dra. Cilene Rebouças de Lima, pelas relevantes observações e sugestões feitas durante o meu Exame de Qualificação.

Ao Prof. Dr Yoshifumi Itoh do Instituto Kennedy de Reumatologia da Universidade de Oxford na Inglaterra, por me receber, ensinar e auxiliar durante o estágio no exterior. Agradeço também a sua aluna de Doutorado, Valentina pelo auxílio dentro do laboratório.

Aos membros da Comissão de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Profa. Dra. Patrícia Gama, Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos e a Profa. Dra. Chao Yun Irene Yan, obrigado por buscarem fazer sempre o melhor para os alunos do Programa. Agradeço também aos funcionários da secretaria, em especial à Regina Valbon e Tania Cacheiro pela dedicação e auxílio.

Aos meus amigos de curta e longa data, que de alguma maneira fizeram ou fazem parte desta história. Ian, Simone, Juliano, Carina, João, Decio, Roberto e Reonardo, obrigado pela companhia, torcida e, acima de tudo pela amizade de vocês.

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

RESUMO

SMUCZEK, B. **Estudo da clivagem da laminina em tumores de mama, gerando potenciais peptídeos bioativos**. 2019, 180f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O câncer de mama representa um importante problema de saúde pública. O microambiente onde as células neoplásicas se encontram desempenha importante papel na tumorigênese e progressão tumoral. Nosso Laboratório estuda o efeito da laminina, importante glicoproteína da matriz extracelular (MEC) e seus peptídeos dentro da biologia tumoral. Nesse projeto detectamos, *in vitro* e em amostras de câncer de mama humano, peptídeos derivados da clivagem proteolítica da laminina no câncer de mama. Inicialmente analisamos a distribuição das cadeias da laminina-111 no câncer de mama humano. Análise imuno histoquímica demonstrou aumento da marcação para as cadeias alfa1, beta1 e gama1 da laminina em tumores de mama. Células derivadas de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) foram crescidas sobre Matrigel (substrato enriquecido em laminina). Células de mama normal MCF-10A serviram como grupo controle. Amostras controles e tratadas foram submetidas a eletroforese, “immunoblot” e espectrometria de massas (LC-MS/MS). “Immunoblot” mostrou a clivagem das cadeias da laminina *in vitro* e no câncer de mama humano, com a geração de fragmentos de menor massa molecular. Exploramos a liberação de peptídeos gerados pela clivagem da laminina em amostras de células tumorais em cultura e no câncer de mama humano. Análise proteômica mostrou que as bandas derivadas da laminina exibiram a presença de 31 peptídeos, entre eles C16 (KAFDITYVRL) e C28 (RVTLNRL). Previamente já demonstramos que o peptídeo C16 possui alta relevância na regulação tumoral. Diferentes peptídeos foram sintetizados e suas atividades biológicas avaliadas. Entre eles, C16 e C28 aumentaram significativamente a adesão, proliferação, secreção e ativação de MMPs além de invasão de células derivadas do câncer de mama (MDA-MB-231) e também de células derivadas de fibrossarcoma (HT1080). Investigamos também a ação do peptídeo C16 sobre as células tumorais MDA-MB-231 injetadas em “zebrafish” para avaliação do desenvolvimento tumoral *in vivo*. C16 promoveu aumento da área tumoral *in vivo* em comparação aos grupos controles. Concluímos que as cadeias alfa1, beta1 e gama1 da laminina estão aumentadas no câncer de mama. A clivagem da laminina possivelmente ocorre através da atividade de MMPs. As cadeias da laminina que são clivadas *in vitro* e no câncer de mama humano, geram fragmentos que contêm peptídeos com funções biológicas evidentes. Entre os peptídeos observados, detectamos o peptídeo C16 *in vitro* e *in vivo*, também detectamos o peptídeo C28 *in vitro*. O peptídeo C16 é um grande regulador da invasão de células MDA-MB-231 e células HT1080, além de promover o desenvolvimento tumoral *in vivo*. Já o peptídeo C28 promove a proliferação de células MDA-MB-231 e HT1080.

Palavras chaves: Câncer de mama, matriz extracelular, laminina, peptídeo C16, peptídeo C28.

ABSTRACT

SMUCZEK, B. Study of laminin cleavage in breast tumors, generating potential bioactive peptides. 2019, 180f. PhD Thesis (Cell and Tissue Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Breast cancer represents an important public health problem. The microenvironment plays an important role in tumorigenesis and tumor progression. Our laboratory studies the effect of laminin, an important extracellular matrix glycoprotein (ECM) and its peptides in tumor biology. In this project we detected, *in vitro* and in human breast cancer samples, peptides derived from proteolytic cleavage of laminin. We initially analyzed the distribution of laminin-111 chains in human breast cancer. Immunohistochemistry demonstrated increased laminin alpha1, beta1 and gamma1 chains in breast tumors. Cells derived from breast cancer (MDA-MB-231 and MCF-7) were grown on Matrigel (laminin-enriched substrate). Normal breast cells MCF-10A served as a control group. Control and treated samples were subjected to electrophoresis, immunoblot and mass spectrometry (LC-MS/MS). Immunoblot showed cleavage of the laminin chains *in vitro* and in human breast cancer, with generation of lower molecular mass fragments. We explored the release of peptides, generated by laminin cleavage in tumor cell samples in culture and in human breast cancer. Proteomic analysis showed that the bands derived from laminin exhibited the presence of 31 peptides, among them C16 (KAFDITYVRL) and C28 (RVTLNRL). We have previously demonstrated that the C16 peptide has high relevance in tumor regulation. Different peptides were synthesized, and their biological activities were analyzed. Among them, C16 and C28 peptides, significantly increased adhesion, proliferation, secretion and activation of MMPs and cell invasion in breast cancer cells (MDA-MB-231) as well as fibrosarcoma-derived cells (HT1080). In addition, we investigated the action of the C16 peptide on zebrafish-injected MDA-MB-231 tumor cells for evaluation of tumor development *in vivo*. C16 promoted increase in tumor area *in vivo* compared to control groups. We conclude that, laminin alpha1, beta1 and gamma1 chains are increased in breast cancer. Laminin chains that are cleaved *in vitro* and in human breast cancer, generate fragments containing peptides with obvious biological functions. Among the peptides observed, we detected the C16 peptide *in vitro* and *in vivo*, we also detected the C28 peptide *in vitro*. C16 peptide is a major regulator of the invasion of MDA-MB-231 cells and HT1080 cells, in addition C16 promotes tumor development *in vivo*. C28 peptide promotes the proliferation of MDA-MB-231 and HT1080 cells.

Keywords: Breast Cancer, extracellular matrix, laminin, C16 peptide, C28 peptide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 – Desenho esquemático de mama feminina	28
Ilustração 2 – Desenho esquemático da laminina-111 e seus peptídeos	46
Ilustração 3 – Modelo esquemático da clivagem da cadeia gama1 da laminina....	152

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais subtipos moleculares do câncer de mama	31
Tabela 2 – Nomenclatura antiga e nova da laminina.	41
Tabela 3 – Peptídeos sintetizados.	112

LISTA DAS FIGURAS

Figura 1 – Marcação da cadeia alfa1 da laminina no câncer de mama.....	73
Figura 2 – Marcação da cadeia beta1 da laminina no câncer de mama	77
Figura 3 – Marcação da cadeia gama1 da laminina no câncer de mama	81
Figura 4 – Clivagem das cadeias da laminina <i>in vitro</i>	86
Figura 5 – Amostras submetidas a análise proteômica	90
Figura 6 – Peptídeos da laminina-111 liberados no câncer de mama <i>in vitro</i>	94
Figura 7 – Clivagem da laminina-111 em tumores humano	98
Figura 8 – Aumento de MT1-MMP no câncer de mama.....	102
Figura 9 – Amostras de câncer de mama submetidas a análise proteômica.....	106
Figura 10 – Peptídeos da laminina-111 liberados no câncer de mama humano	110
Figura 11 – Invasão e adesão celular promovidos pelos peptídeos C16 e C28	116
Figura 12 – Ensaio de degradação de substrato com células MDA-MB-231	121
Figura 13 – Ensaio de degradação de substrato com células HT1080	124
Figura 14 – Peptídeo C28 promove aumento no número de células tumorais	127
Figura 15 – C28 aumenta os níveis de pro-MT1-MMP em células MDA-MB-231 ..	131
Figura 16 – C16 e C28 promovem alterações nos níveis e na atividade das MMPs	135
Figura 17 – Aumento da degradação do colágeno por células HT1080 tratadas com C16.....	139
Figura 18 – Dimerização de MT1-MMP analisada por FRET em células HT1080 .	144
Figura 19 – Peptídeo C16 promove o desenvolvimento do câncer de mama <i>in vivo</i>	148

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1	sequência dos aminoácidos KMALYRL (lisina-metionina-alanina-leucina-tirosina-arginina-leucina)
AG73	sequência dos aminoácidos RKRLQVQLSIRT (arginina-lisina-arginina-leucina-glicina-valina-glicina-leucina-serina-isoleucina-arginina-treonina)
B31	sequência dos aminoácidos KITNLRl (lisina-isoleucina-treonina-asparagina-leucina-arginina-isoleucina)
BIV1	sequência de aminoácidos RLLDELAGKL (arginina-leucina-leucina-aspartato-glutamato-leucina-alanina-glicina-lisina-leucina)
BIV2	sequência de aminoácidos KAAQNSGAEYIEKV (lisina-alanina-alanina-glutamina-asparagina-serina-glicina-glutamato-alanina-glutamato-tirosina-isoleucina-glutamato-lisina-valina)
BCA	do inglês “Bicinchoninic Acid”, traduzido como ácido bicinconínico
BSA	do inglês “Bovine Serum Albumine”, traduzido como albumina sérica bovina
C16	sequência dos aminoácidos KAFDITYVRLKF (lisina-asparagina-fenilalanina-aspartato-isoleucina-treonina-tirosina-valina-arginina-leucina-lisina- fenilalanina)
C28	sequência dos aminoácidos RVTLNRL (arginina-valina-treonina-leucina-asparagina-arginina-leucina)
C64	sequência dos aminoácidos RVSVPLIAQGNSYPSETTVKY (arginina-valina-serina-valina-prolina-leucina-isoleucina-alanina-glutamina-glicina-asparagina-serina-tirosina-prolina-serina-glutamato-treonina-treonina-valina-lisina-tirosina)
CAL27	linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide oral humano
CEFAP-ICB	Centro de Facilidades para Pesquisa – Instituto de Ciências Biomédicas
DAB	do inglês “3,3'-diaminobenzidine” traduzido como 3,3-diaminobenzidina.

DMEM F12	do inglês "Dulbecco's Modified Eagles' Medium", traduzido como meio de Eagle modificado por Dulbecco com mistura de nutrientes HAM F-12
DMF	do inglês "N,N-Dimethylformamida" traduzido como "Dimetilformamida"
ECL	do inglês "enhanced chemiluminescence"
EDTA	do inglês "ethylenediamine-tetra acetic acid", traduzido como ácido etilenodiamino tetra acético
EGF	do inglês "epidermal growth factor" traduzido como fator de crescimento epidérmico
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
ERK	do inglês "Extracellular signal-regulated kinase", traduzido como quinase regulada por sinais extracelulares
GFP	do inglês "green fluorescent protein", traduzido como proteína fluorescente verde
GAGs	glicosaminoglicanos
GPI	do inglês "glycosylphosphatidylinositol" traduzido como glicosilfosfatidilinositol
h	horas
HBSS	do inglês "Hank's Balanced Salt Solution" traduzido Solução Salina Balanceada de Hank
HT1080	linhagem celular derivada de fibrossarcoma humano
kDa	do inglês "kilodalton" traduzido como quilodalton
LC-MS/MS	do inglês "Liquid chromatography-mass spectrometry" traduzido como Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LDL-R	do inglês "low-density lipoprotein receptor" traduzido como receptor de lipoproteína de baixa densidade
MCF-10A	linhagem celular derivada de mama normal
MCF-7	linhagem celular derivada de adenocarcinoma de mama
MDA-MB-231	linhagem celular derivada de carcinoma ductal invasivo de mama humana
MEC	matriz extracelular

MMPs	do inglês “matrix metalloproteinases”, traduzido como metaloproteinases de matriz
MT1-MMP	do inglês “membrane-type 1 matrix metalloproteinase”, traduzido como metaloproteinases de matriz ancorada a membrana 1
NaCl	cloreto de sódio
PBS	do inglês “phosphate-buffered saline”, traduzido como tampão fosfato-salina
RP-HPLC	do inglês “reversed-phase high-pressure liquid chromatography”, traduzido como cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa
SBF	soro fetal bovino
SDS-PAGE	do inglês "sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis", traduzido como eletroforese de gel de poliacrilamida, tendo como agente denaturante sulfato dodecil sódico
TBS	do inglês “Tris-buffered saline”, traduzido como tampão tris-salina
™	do inglês "trademark" traduzido como marca comercial
TMA _s	do inglês “Tissue Microarray” traduzido como microarranjo de tecidos
UV	ultravioleta
YIGSR	sequência de aminoácidos YIGSR (tirosina-isoleucina-glicina-serina-arginina)

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
γ	gama
Δ	delta
#	do inglês “pound sign” ou “hashtag” traduzido como cerquilha
*	asterisco
cm ²	centímetros quadrados
CO ₂	gás carbônico
°C	graus Celsius
H ₂ O	molécula de água
g	gravidade
L	litro
Na ⁺	íon de sódio
nm	nanômetro
mg	miligrama
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
M	molar
pH	potencial hidrogeniônico
µg	micrograma
mg/ml	miligrama por mililitro
µg/ml	microgramas por mililitro
ng/ml	nanogramas por mililitro
µl	microlitro
µm ²	micrômetro quadrado
µM	micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1 Desenvolvimento e morfologia da mama normal seguido do desenvolvimento, morfologia e classificação molecular do câncer de mama ..	26
2.2 Epidemiologia e fatores de riscos relacionados ao câncer de mama.....	31
2.3 Matrix extracelular e MMPs	33
2.4 Lâmina basal	36
2.5 Lamininas e seus peptídeos	39
2.6 Peptídeos com funções biológicas derivados da laminina-111	43
2.7 Peptídeo C16	44
2.8 Peptídeo C28	45
2.9 “Zebrafish” (<i>Danio rerio</i>) como modelo xenográfico	47
3 OBJETIVOS.....	48
3.1 Objetivo geral:.....	48
3.1.1 Objetivos específicos:.....	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 Aprovação dos comitês de ética humano e animal	50
4.2 Imuno histoquímica	50
4.3 Clivagem da laminina	51
4.4 Clivagem da laminina <i>in vivo</i> em amostras de câncer de mama humano .	52
4.5 Digestão em gel com tripsina	53
4.6 Análise Proteômica por Espectrometria de Massas	55
4.7 Ensaio de Adesão	56
4.8 Ensaio de invasão celular	57
4.9 Ensaio de tumorigênese	57

4.10 Experimentos realizados na Universidade de Oxford	58
4.10.1 <i>Cultura celular</i>	59
4.10.2 <i>Peptídeos</i>	59
4.10.3 <i>Ensaio de degradação de gelatina</i>	59
4.10.4 <i>“Immunoblot”</i>	62
4.10.5 <i>Zimografia</i>	64
4.10.6 <i>Ensaio de degradação do filme de colágeno</i>	65
4.10.7 <i>FRET – “Fluorescence Resonance Energy Transfer”</i>	66
4.11 Análise estatística.....	68
5 RESULTADOS	70
5.1 Aumento das cadeias alfa1, beta1 e alfa1 da laminina <i>in vivo</i>	70
5.2 Clivagem da laminina <i>in vitro</i> por células tumorais derivadas de câncer de mama	82
5.3 Análise proteômica <i>in vitro</i>	87
5.4 Clivagem da laminina <i>in vitro</i> no câncer de mama libera peptídeos bioativos	91
5.5 Clivagem da laminina por células do câncer de mama humano	95
5.6 Análise proteômica de amostras de câncer de mama e mama normal ...	103
5.7 Peptídeos liberados no câncer de mama humano	107
5.8 Síntese dos peptídeos detectados por espectrometria de massas	111
5.9 Peptídeos apresentam atividades biológicas de adesão e invasão celular	113
5.10 Peptídeo C28 promove proliferação celular	117
5.11 Peptídeos C16 e C28 derivados da laminina promovem alteração dos níveis e na atividade das MMPs em células tumorais	128
5.12 Degradação do filme de colágeno pelas células HT1080 na presença do peptídeo C16	136

5.13	Localização da dimerização de MT1-MMP em células HT1080 analisada por FRET.....	140
5.14	Peptídeo C16 derivado da laminina aumenta o desenvolvimento tumoral em modelo xenográfico	145
5.15	Diagrama resumindo nossos resultados.....	149
6	DISCUSSÃO.....	153
7	CONCLUSÕES.....	160
8	BIBLIOGRAFIA	161
9	APÊNDICE.....	180
9.1	Legendas para figura e dados suplementares	180

1 INTRODUÇÃO

Os tumores de mama são o segundo tipo de câncer mais frequente na população mundial, apresentando alta taxa de mortalidade sendo que o gênero feminino é o mais acometido por esta neoplasia (LIBSON; LIPPMAN, 2014; YAO et al., 2014; YIANNAKOPOULOU, 2014). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima-se que para o ano de 2018, serão diagnosticados 59.700 novos casos de tumores de mama. Observou-se também um aumento de 2,91 % em relação à estimativa do ano de 2016 (INCA, 2017).

Sabemos que alguns fatores, como incidência de radiações nocivas, produtos químicos teratogênicos, idade, peso e taxas hormonais, têm relevante influência na ocorrência de tumores de mama (ADES et al., 2014; LIBSON; LIPPMAN, 2014; PATSIALOU et al., 2012; SIMMONS et al., 2017; YAO et al., 2014).

Esses fatores podem gerar alterações moleculares que levam as células a possuírem um novo genótipo e fenótipo promovendo assim o processo de tumorigênese. Quando observamos as células tumorais elas possuem algumas características claras como, evasão à apoptose maior potencial proliferativo, angiogênese sustentada e capacidade de invadir e formar metástases (HANAHA; WEINBERG, 2000, 2011). Sua progressão ocorre por estágios clínico-patológicos definidos, onde há início da hiperplasia epitelial atípica, seguida por carcinoma *in situ* e posteriormente por carcinoma invasivo, levando à doença metastática (IMAMURA; HIKITA; INOUE, 2012; LOCKE; CLARK, 2012; REINHOLZ et al., 2009; YAGER; DAVIDSON, 2006). Além das alterações adquiridas pelas células neoplásicas, o microambiente que circunda as células promove um importante papel na tumorigênese (LAURENT-MATHA et al., 2012; NIENHUIS et al., 2015).

Dentre os componentes que fazem parte deste microambiente, a matriz extracelular (MEC) tem relevante importância. Essa matriz, é uma rede macromolecular tridimensional formada por colágenos, proteoglicanos e glicoproteínas, que influencia diversos aspectos da tumorigênese e a progressão tumoral (DECLERCK et al., 2004; KELLY et al., 1998; KOONTONGKAEW et al., 2012; LU; WEAVER; WERB, 2012; VAN HORSSSEN et al., 2013; WILLIS et al., 2013). Entre o epitélio e o tecido conjuntivo, a MEC forma a lâmina basal, estrutura constituída por

laminina, colágeno tipo IV, nidogênio e perlecan (KRIEG; AUMAILLEY, 2011; YURCHENCO, 2011; YURCHENCO; AMENTA; PATTON, 2004).

Na lâmina basal, um dos principais componentes são as moléculas de laminina (AUMAILLEY, 2013; AUMAILLEY et al., 2005; MINER; YURCHENCO, 2004; YURCHENCO, 2011). As lamininas são glicoproteínas com estrutura heterotriméricas compostas por cadeias polipeptídicas α (alfa), β (beta) e γ (gama) (AUMAILLEY, 2013; AUMAILLEY et al., 2005; MINER; YURCHENCO, 2004). Sua estrutura cruciforme, com massa molecular entre 400 a 900 kDa, dependendo da isoforma. A família das lamininas apresenta isoformas resultantes da combinação das diferentes cadeias α , β e γ (AUMAILLEY, 2013; AUMAILLEY et al., 2005; KIM; TURNBULL; GUIMOND, 2011; ROUSSELLE; BECK, 2013; YOUSIF; DI RUSSO; SOROKIN, 2013; YURCHENCO, 2011). Subunidades α possuem função de adesão e interação com receptores. As cadeias β e γ são responsáveis por papel estrutural, mas podem auxiliar polimerização e ligação ao nidogênio (AUMAILLEY, 2013; AUMAILLEY et al., 2005; KIM; TURNBULL; GUIMOND, 2011; ROUSSELLE; BECK, 2013; YOUSIF; DI RUSSO; SOROKIN, 2013; YURCHENCO, 2011). Cada cadeia da laminina é expressa de acordo com o tecido local, podendo ocorrer alterações ou até mesmo substituições por outras cadeias da laminina durante processos como o desenvolvimento embrionário ou casos patológicos (AUMAILLEY, 2013). São conhecidos até o presente momento, cinco genes para a cadeia α quatro para a cadeia β e três para a cadeia γ (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003; COLOGNATO; YURCHENCO, 2000; DURBEEJ, 2010; MINER; YURCHENCO, 2004; YURCHENCO; AMENTA; PATTON, 2004). A interação entre essas diferentes cadeias possibilitaria uma variação de 45 combinações, além da possibilidade de mais combinações através do “splicing”. Contudo, as cadeias derivadas da laminina possuem restrições de união e com isso o número de combinações é menor (COLOGNATO; YURCHENCO, 2000; MACDONALD et al., 2010).

Atualmente, são conhecidas 16 isoformas da laminina. Suas estruturas moleculares, relações com receptores e algumas das funções diferem entre as isoformas. Contudo todas partilham de uma função base que é a estruturação da lâmina basal (YURCHENCO, 2011). Para a classificação das isoformas utiliza-se a numeração referente as cadeias (α , β e γ) pela qual a isoforma da laminina é composta. Portanto, na laminina-111 observamos a presença das cadeias $\alpha 1$, $\beta 1$ e

γ 1. Na laminina-332 observamos a presença das cadeias α 3, β 3 e γ 2 (AUMAILLEY et al., 2005). Durante a evolução tumoral, a laminina exerce um importante papel no desenvolvimento tumoral (KIKKAWA et al., 2013).

Entre os processos existentes na tumorigênese, destacamos a invasão tumoral. Nessa etapa observa-se a clivagem da membrana basal, em geral mediada por metaloproteinases da matriz (MMPs), o que permite que as células tumorais invadam o tecido conjuntivo circunjacente (BONNANS; CHOU; WERB, 2014). A proteólise da membrana basal não somente abre caminho para a invasão tumoral, mas também ativa moléculas latentes e gera novas moléculas bioativas (SCHENK; QUARANTA, 2003). A clivagem da matriz extracelular e remodelamento depende de ação de proteases, entre elas a MT1-MMP (KOSHIKAWA et al., 2000).

A laminina, assim como outras moléculas da matriz, possui sítios funcionais crípticos, que podem ser expostos por mudança conformacional ou clivagem por proteases como as MMPs. Tais processos potencialmente promoveriam a liberação de fragmentos ou peptídeos biologicamente ativos (FREITAS et al., 2004; SCHENK; QUARANTA, 2003).

Nosso Laboratório vem estudando sistematicamente o efeito *in vitro* dos peptídeos da laminina. Sabemos que os mesmos são responsáveis por importante etapas da biologia tumoral, como migração, invasão, secreção de proteases, e formação de invadopódios (FREITAS; JAEGER, 2002; FREITAS et al., 2004; FREITAS et al., 2007; GAMA-DE-SOUZA et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2016; SMUCZEK et al., 2017). Conhecemos também mecanismos de atuação desses peptídeos. Vale ressaltar que uma importante revisão nesse tema citou sete publicações do nosso grupo (KIKKAWA et al., 2013). No entanto, um ponto a ser esclarecido e que representa contribuição fundamental nessa área é a determinação de quais peptídeos da laminina estariam presentes nos sítios tumorais *in vivo*. Esse aspecto até o momento permanece especulativo.

Cada cadeia da laminina possui massa molecular entre 200-400 kDa. Após clivagem enzimática, essa molécula apresenta, entre diversas outras, bandas de 200 kDa (fragmento E8, que contém o peptídeo SIKVAV), de 300 kDa (fragmento E1, onde C16 está presente) e de 55 kDa (módulo LG4, onde o peptídeo AG73 está localizado) (AUMAILLEY, 2013). Todos esses peptídeos possuem efeitos biológicos (NOMIZU et al., 1997; NOMIZU et al., 2001) e foram estudados pelo nosso grupo (FREITAS;

JAEGER, 2002; FREITAS et al., 2004; FREITAS et al., 2007; GAMA-DE-SOUZA et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2016; SMUCZEK et al., 2017). Dessa forma, a obtenção de bandas de menor massa molecular sugere que a laminina foi clivada por proteases, expondo fragmentos que poderiam conter esses peptídeos bioativos.

Nesse trabalho, investigamos a liberação dos peptídeos derivados da clivagem da laminina *in vitro* e no câncer de mama humano. A distribuição das cadeias da laminina-111 no câncer de mama foi avaliada por imuno histoquímica e comparada com mama normal. Métodos bioquímicos e proteômicos foram utilizados para analisar a clivagem da laminina e a formação de peptídeos *in vitro* e no câncer de mama humano. Peptídeos detectados foram sintetizados (Tabela 3) e submetidos a diversos ensaios biológicos *in vitro*. Finalizamos com ensaios biológicos avaliando os efeitos dos peptídeos no desenvolvimento tumoral *in vivo*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para a revisão de literatura, serão abordados os seguintes temas relacionados a tese: Mama normal, câncer de mama, matriz extracelular, MMPs, lâmina basal, laminina e seus peptídeos bioativos, peptídeo C16, peptídeo C28 e modelo xenográfico “zebrafish” (*Danio rerio*).

2.1 Desenvolvimento e morfologia da mama normal seguido do desenvolvimento, morfologia e classificação molecular do câncer de mama

Para entendermos melhor o desenvolvimento do câncer de mama se faz necessário estudar o desenvolvimento da mama normal, a morfologia da mama normal, seguido do desenvolvimento do câncer de mama assim como a sua morfologia e classificação molecular.

A mama se desenvolve sobre influência genética e hormonal de células precursoras derivadas da ectoderme durante a quarta semana de vida embrionária. Espessamentos ectodérmicos evoluem em humanos no peito ao nível do quarto espaço intercostal e forma um broto mamário até a quinta semana de gestação. A partir da quinta até a décima segunda semana de gestação, o broto mamário cresce em direção ao peito formando brotos secundários e lóbulos mamários. Depois da décima segunda semana de gestação os brotos secundários continuam a aumentar e a ramificar, formando uma rede complexa de ductos mamários radialmente dispostos que conectam o mamilo em desenvolvimento (invertido) com os lóbulos mamários em crescimento (JESINGER, 2014).

O mamilo geralmente sofre transformação após o nascimento devido à proliferação das glândulas sebáceas e o desenvolvimento do tecido erétil enquanto a aréola aumenta a pigmentação. Posteriormente a interrupção dos hormônios maternos após o nascimento, a mama torna-se quiescente até o começo da puberdade (JESINGER, 2014).

Com o começo da puberdade, o aumento da mama em mulheres pode resultar em um tecido retroareolar palpável relativo a uma “massa mamária”. Com o final da

puberdade feminina a mama apresenta um balanço de ductos e tecido conjuntivo que será detalhado abaixo (JESINGER, 2014).

A mama madura está situada sobre o músculo superior na caixa torácica, sendo composta por epitélio especializado e estroma. Na parte interior, a partir do mamilo o epitélio forma ductos e esses ductos se ramificam estendendo-se pelo estroma que é composto por tecido conjuntivo fibroso e tecido adiposo. Na porção final dos ductos em direção do tecido conjuntivo de suporte há a presença de glândulas responsáveis pela produção e secreção do leite durante o período de lactação (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; ROSS, 2011).

Com formato cônico o mamilo pode apresentar variações na coloração, desde rosa a um marrom-escuro, sendo que essa coloração se estende até a região da aréola. Essa coloração pode alterar durante o período da gravidez para uma cor mais escura devido a uma maior deposição de melanina na região. Além disso, o mamilo é recoberto por um epitélio do tipo estratificado pavimentoso e queratinizado que se estende por todo o tecido que reveste a mama (JESINGER, 2014; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; ROSS, 2011).

A partir dos mamilos partem os ductos galactóforos sendo que cada ducto é individual (15 a 25 ductos) e são responsáveis por armazenar e liberar o leite para o exterior durante o período da lactação. Conectados aos túbulos galactóforos observamos os túbulos das glândulas mamárias que são formados por um epitélio cuboide simples sendo responsáveis também pelo armazenamento e condução do leite para a parte exterior durante a lactação. As células que formam as glândulas mamárias primeiramente formam um epitélio simples com células arredondadas e durante a amamentação tornam-se células cuboides devido a ação de hormônios tais como, estrógeno, progesterona, prolactina e lactogênio placentário humano. Além disso, as glândulas mamárias estão envolvidas por uma lâmina basal que reveste toda a glândula e essa lâmina basal faz contato direto com a matriz extracelular ao redor. Também observamos junto as células secretoras na porção basal encontramos células mioepiteliais que estão na lâmina basal e são responsáveis pela contração e ejeção do leite (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; ROSS, 2011).

Ilustração 1 – Desenho esquemático de mama feminina

Modelo esquemático da mama normal com suas respectivas glândulas e ductos.

Desenho adaptado a partir de (JESINGER, 2014; JUNQUEIRA, 2013).

Existem muitos tipos de cânceres de mama, podendo aparecer em diversas áreas, tais como os ductos, os lóbulos ou até mesmo no tecido conjuntivo de suporte.

Os tipos de cânceres de mama são primeiramente determinados pelas células que são afetadas. Baseada na origem celular, cânceres de mama são divididos dentro de duas amplas classificações, carcinomas e sarcomas. Carcinoma é o tipo de câncer de mama que surge a partir dos epitélios que compõem a mama, os quais constituem os lóbulos e os ductos. Já o sarcoma que se origina de células do tecido conjuntivo, fibroblastos, miofibroblastos e células dos vasos sanguíneos é muito raro (<1% do câncer de mama primário). Em algumas situações é possível observar uma combinação de diferentes tipos de células em um câncer de mama (FENG et al., 2018).

Dentro do amplo grupo dos carcinomas, há subdivisões baseado no grau de invasão a partir do tumor primário. Discernir os vários subtipos é vital para cada prognóstico e tratamento específico. Baseada no critério de características patológicas e invasivas dos carcinomas de mama esses ainda podem ser divididos em três grandes grupos: não invasivos (*in situ*), invasivos e câncer de mama metastático (FENG et al., 2018).

O mais importante tipo observado e relatado é o carcinoma ductal invasivo que representa aproximadamente 75% dos casos, enquanto o carcinoma lobular invasivo representa aproximadamente 10% dos casos. Juntos essas duas entidades representam aproximadamente 90% dos casos de câncer de mama. Além disso as demais categorias que preenchem os restantes 10% que são formados por carcinoma medular, tubular, metaplásico, mucinoso (A e B), inflamatório, adenoide cístico e tipos micropapilares (BERTOS; PARK, 2011).

Subtipos intrínsecos ou classificação molecular para o câncer de mama compreende a heterogeneidade e diferentes fenótipos que essa doença pode apresentar devido à presença ou ausência de determinadas moléculas. Estudos da expressão dos genes identificaram distintos subtipos do câncer de mama que diferem significativamente no prognóstico bem como nos alvos terapêuticos presentes nas células do câncer. A lista de genes intrínsecos que diferenciam esses subtipos é agora composta de vários aglomerados de genes relacionados à expressão do receptor de estrógeno (ER) (o aglomerado luminal), expressão do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), progesterona (PR), proliferação e um conjunto único de genes chamado de aglomerado basal. Através da utilização destes conhecimentos, os cânceres da mama são geralmente divididos em cinco subtipos intrínsecos ou

moleculares que se baseiam no padrão de expressão de certos genes e suas respectivas proteínas (FENG et al., 2018).

Utilizando as informações mencionadas acima mais a literatura, na tabela abaixo observamos as principais subdivisões moleculares do câncer de mama.

Tabela 1 – Principais subtipos moleculares do câncer de mama.

Subtipos	Assinatura Molecular	Características
Luminal A	ER+, PR±, HER2-, Baixo Ki67	~70%, mais comum, melhor prognóstico
Luminal B	ER+, PR±, HER2±, Alto Ki67	10% - 20%, menor sobrevida que luminal A
Luminal HER2+	ER+, PR+, HER2+	
HER2	ER-, PR-, HER2+	5% - 15%,
“Basal-like” ou triplo negativo	ER-, PR-, HER2-	15% - 20%, mais comum em mulheres negras, pior prognóstico quando detectado em jovens

Adaptado a partir de (FENG et al., 2018; GOLDFIRSCH et al., 2011).

2.2 Epidemiologia e fatores de riscos relacionados ao câncer de mama

O câncer de mama acomete principalmente o gênero feminino, sendo que somente no Brasil estima-se que de cada 100 mil mulheres, 56,33 desenvolveram essa neoplasia até o ano de 2019 (INCA, 2017). A nível mundial, existe uma variação nessa proporção do surgimento do câncer de mama, quando observamos de acordo com o desenvolvimento do país, onde ocorre uma taxa de sobrevivência maior, teremos consequentemente uma taxa de ocorrência do câncer de mama maior. Na Ásia oriental a proporção é de 92 casos para 100 mil mulheres (FERLAY et al., 2015).

No aspecto global, a incidência do câncer de mama tem aumentado. Contudo, países considerados altamente desenvolvidos demonstram estabilidade ou queda na incidência dessas neoplasias. Isso provavelmente ocorre devido a uma detecção precoce e intervenções terapêuticas mais eficazes (FERLAY et al., 2015; INCA, 2017).

Não se conhece etiologia específica para o câncer de mama até o momento. Contudo, diversos fatores parecem fortemente influenciar no surgimento dessa neoplasia. Entre esses fatores destacamos idade, radiação, menarca precoce,

predisposição genética como alterações para os genes BRCA 1 e BRCA 2 e álcool (CHIRIAC; BABAN; DUMITRASCU, 2018; INCA, 2017; RONCO; DE STEFANI; DENEOP-PELLEGRINI, 2012).

Quando observamos a incidência do câncer mama em homens, apenas 1% é acometido. Já o gênero feminino, é o maior fator de risco do surgimento dessa neoplasia segundo o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (“National Cancer Institute”), (<http://www.cancer.gov>).

Além do câncer de mama ter como alvo principalmente o gênero feminino, dentro desse grupo, mulheres idosas são as mais acometidas por essa doença. Estima-se que um terço das mulheres com câncer de mama possuam mais de 70 anos, sendo que essa população possui uma taxa menor de sobrevivência em relação as mulheres mais jovens diagnosticadas com câncer de mama (GOSAIN; POLLOCK; JAIN, 2016). Além disso, quando diagnosticado o câncer de mama em paciente idosas, geralmente apresentam tumores maiores em relação as mais jovens onde os linfonodos parecem participar da manutenção do tumor (WILDIERS et al., 2009).

Outro fator como a radiação ionizante do tipo raio-X ou elétrons de alta energia induzem a elevados níveis de estresse em células normais podendo gerar mutações genéticas (GREEN, 2013). Mulheres expostas a radiação devido ao acidente em Chernobyl na Ucrânia, demonstraram um aumento de duas vezes a mais no desenvolvimento do câncer de mama entre os anos de 1997-2001 em relação a locais não contaminados (PUKKALA et al., 2006).

Menarca precoce é outro fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama sendo que, mulheres que apresentaram até os 13 anos de idade o primeiro ciclo de menstruação, observou um aumento duas vezes maior no surgimento da neoplasia quando o tumor apresenta receptor hormonal positivo em relação as que não apresentam receptor hormonal (SHAH; ROSSO; NATHANSON, 2014).

Aproximadamente de 10-30% de todos os casos do câncer de mama são atribuídos a fatores hereditários (COSTA; SALDANHA, 2017). Mutações em genes supressores de tumores, podem levar a sustentação da sinalização da proliferação celular, evasão dos supressores de crescimento celular, ativação da migração, invasão e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011). Mutações germinativas nos genes BRCA1 e BRCA2 (genes supressores de tumores) são responsáveis por

aproximadamente 50% dos riscos totais de câncer hereditário (COSTA; SALDANHA, 2017; DALEY; PETERS; LARSEN, 2008; HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011).

O consumo do álcool tem sido também associado com o aumento do risco de câncer de mama. Em um estudo de Saúde das Enfermeiras, realizou-se um levantamento feito entre 1980 e 2008 sobre o consumo de álcool onde 2.4 milhões de pacientes que consumiam de 3-6 copos por semana de bebida alcóolica no total 7.690 pacientes desenvolveram a neoplasia (CHEN et al., 2011).

Dentro do câncer de mama o microambiente onde as células tumorais se encontram desempenha um papel importante na progressão tumoral. Entre os elementos do microambiente destacamos a matriz extracelular.

2.3 Matrix extracelular e MMPs

Há duas divisões da matriz extracelular (MEC): matriz extracelular intersticial e a lâmina basal. Será abordado em seguida aspectos gerais sobre os componentes da matriz extracelular intersticial, o papel das metaloproteinases (MMPs) na MEC e posteriormente será discutido tópico específico sobre a lâmina basal, seus componentes e suas funções. Especial enfoque será dado na laminina, um dos principais componentes da lâmina basal.

A MEC é uma rede macromolecular tridimensional presente nos espaços extracelulares que dá suporte a diversos órgãos, além disso a matriz extracelular intersticial possui um papel importante no câncer de mama (POLTAVETS et al., 2018; SONBOL, 2018).

A rede tridimensional que compõe toda a MEC contém diversas moléculas. Entre as principais está o colágeno, elastina, laminina, fibronectina, glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos (HYNES; NABA, 2012). A participação e quantidade de cada uma dessas moléculas varia de acordo com o tecido.

O colágeno é a proteína extracelular mais abundante nos vertebrados sintetizado principalmente pelos fibroblastos. Formado por uma superfamília de 28 isoformas que apresentam diversidade na sua organização molecular e macromolecular, distribuição e função. (BRETAUD et al., 2018). Os colágenos não

são somente essenciais para a resistência mecânica e resiliência dos organismos multicelulares, mas também são moléculas sinalizadoras que definem a forma e o comportamento das células. (BRETAUD et al., 2018; DESHMUKH et al., 2016).

A elastina é o principal componente das fibras elásticas sintetizado principalmente pelos fibroblastos. As fibras elásticas são elementos essenciais da MEC que promove elasticidade para vários tecidos incluindo artérias, pulmão, tendão, pele e cartilagem elástica. (DUQUE LASIO; KOZEL, 2018).

A laminina é uma glicoproteína com estrutura cruciforme composta das cadeias alfa (α), beta (β) e gama (γ). A laminina encontra-se na lâmina basal logo abaixo do polo basal das células, mediando a interação dessas células com a matriz intersticial. Entre algumas de suas funções destacam-se, proliferação, adesão e desenvolvimento celular (AUMAILLEY et al., 2005; DURBEEJ, 2010; KIKKAWA et al., 2013)

Outro componente da MEC é a fibronectina que é sintetizada principalmente pelos fibroblastos além de algumas células epiteliais. A fibronectina é uma glicoproteína dimérica que contém três módulos apresentando sítios de ligação para glicosaminoglicanos, células (RGD) e colágeno. Essa característica da fibronectina permite a interação das células e da MEC durante o processo de adesão celular e migração (ZOLLINGER; SMITH, 2017).

Glicosaminoglicanos (GAGs) é uma classe de longos e não ramificados polímeros de açúcares, formados por unidades dissacarídicas compostas por uma hexosamina (açúcar de seis carbonos com grupo amina, como a N-acetilglicosamina) ligada a um monossacarídeo não nitrogenado, em geral um ácido urônico (IOZZO; SCHAEFER, 2015). Na superfície da célula, o GAGs pode atuar como um ativador que ajuda a montar um complexo receptor / ligante (SMOCK; MEIJERS, 2018).

Os proteoglicanos contém um core proteico, com cadeias laterais de GAGs que se repetem, Devido a presença de carga negativa nas cadeias dos GAGs, os proteoglicanos atraem diversas moléculas e íons, como Na^+ além de moléculas de H_2O . Os proteoglicanos também atuam como componentes que estruturam a MEC auxiliando a célula a se ancorar na matriz extracelular (IOZZO, 1984; IOZZO; BOLENDER; WIGHT, 1982). Entre os proteoglicanos destacam-se agregam, versicam, biglicam, decorim, perlecam, entre outros (IOZZO; SCHAEFER, 2015).

A comunicação entre células e a MEC ocorre através de proteínas transmembrana denominadas integrinas (HYNES, 1987). As integrinas são formadas por duas subunidades, α e β , que conectam o ambiente extracelular com o intracelular enviando sinais para os filamentos de actina, podendo regular processos como a adesão celular, migração, entre outros (HYNES; NABA, 2012; WEAVER et al., 2014). Células tumorais são capazes de alterar os tipos de integrinas, para promover uma melhor interação com a MEC (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Além disso todas as moléculas que compõem a MEC e citadas acima, sofrem constante remodelação por proteases entre elas as MMPs que serão descritas abaixo.

Metaloproteinases de matriz (MMPs), também nomeadas de matrixinas que hidrolisam as moléculas da MEC (LEVIN et al., 2017; LINDSEY, 2018). Contendo 23 tipos descritos na literatura e presentes em humanos essas proteases são capazes de clivar as moléculas da matriz extracelular tanto em processos fisiológicos quanto em processos patológicos. Sua estrutura molecular apresenta pelo menos duas regiões, a saber: 1) pró-peptídeo e 2) sítio catalítico que contém zinco (ITOH et al., 2011; ITOH; SEIKI, 2006; TURUNEN; TATTI-BUGAEVA; LEHTI, 2017). Adicionalmente outros domínios estão presentes, sendo um dos mais importantes a região C-terminal hemopexina (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010).

Quando sintetizadas as MMPs são inicialmente liberadas na sua forma inativa, existe uma interação de um resíduo de cisteína do pró-peptídeo com o zinco presente no sítio catalítico. Somente após a interrupção dessa interação por um mecanismo chamado troca de cisteína, que geralmente é mediada pela remoção proteolítica do pró-domínio ou modificação química do resíduo de cisteína, a enzima torna-se proteoliticamente ativa. O pró-domínio contém uma sequência de consenso e requer clivagem proteolítica por convertases, que, dependendo das sequências, ocorre intracelularmente pela furina ou extracelularmente por outras MMPs ou serina proteinases, como a plasmina (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010). As MMPs podem ser subdividas em MMPs ancoradas a membrana e MMPs solúveis.

As metaloproteinases de matriz ancoradas a membrana (MT-MMP) são reguladores centrais da invasão, crescimento e sobrevivência celular. Preso às membranas celulares por um domínio transmembrana ou âncora GPI (glicosilfosfatidilinositol). Existe seis MT-MMPs que podem exercer as funções da proteólise da matriz extracelular estando presas a membranas, podendo inclusive

clivar parte de receptores presentes na membrana, moléculas adesivas, fatores de crescimento e outras proteínas pericelulares. Os diferentes tipos de MT-MMPs são diferentemente expressas no câncer (TURUNEN; TATTI-BUGAEVA; LEHTI, 2017). Entre as MT-MMPs mais amplamente expressa no câncer de origem epitelial e mesenquimal é a MMP14 ou também conhecida como MT1-MMP (ITOH et al., 2011; ITOH; SEIKI, 2006; TURUNEN; TATTI-BUGAEVA; LEHTI, 2017).

MT1-MMP (62 kDa) foi a primeira MMP do tipo transmembrana a ser descoberta. Essa MT-MMP degrada diversos componentes da MEC próximo a superfície da célula, incluindo colágeno I, II e III, fibronectina, vitronectina, lamininas e núcleos proteicos de agregam. MT1-MMP também ativa pro-MMP2 e pro-MMP13 (ITOH et al., 2003; ITOH, 2006; ITOH et al., 2011; ITOH; SEIKI, 2006; WEAVER et al., 2014). MT1-MMP é identificada como a principal protease responsável pela transmigração de células derivadas de carcinomas através da lâmina basal em modelos de cultura *ex vivo* de lâmina basal derivada de peritônio. MT1-MMP é um grande regulador da disseminação de tumores, incluindo pulmão, gástrico, colón, mama, carcinoma cervical, gliomas e melanomas atuando como o principal remodelador da matriz durante o crescimento e metástase tumoral (CASTRO-CASTRO et al., 2016).

Entre as MMP solúveis que são secretadas e não ancoradas a membrana das células está a MMP2 e a MMP 9. MMP2 e MMP9 são gelatinases que possuem massa molecular de 72 kDa e 92 kDa respectivamente. Ambas MMPs estão associadas com um comportamento tumoral mais agressivo (ITOH et al., 2003).

Alvo importante das ações de MMPs é a lâmina basal, cujas características serão descritas a seguir.

2.4 Lâmina basal

A lâmina basal é uma especialização da MEC que faz a interface das células epiteliais com a matriz do tecido conjuntivo. O termo lâmina basal deriva primeiramente do reconhecimento de uma camada depositada logo abaixo das células epiteliais de uma diversidade de epitélios (MAK; MEI, 2017). Já o termo membrana

basal é utilizado para descrever a estrutura composta pela lâmina basal mais as fibrilas de ancoragem (BREITKREUTZ et al., 2013).

Quando analisada por microscopia óptica a lâmina basal é fracamente visualizada como uma banda eosinofílica logo abaixo de epitélio no tecido em uma coloração por hematoxilina e eosina. A lâmina basal é melhor visualizada utilizando-se o tratamento por ácido periódico seguido de Reativo de Schiff (PAS), onde aparece como linha eosinofílica destacada. Na microscopia eletrônica é possível visualizar três estruturas, a região mais próxima da superfície basal do epitélio é uma camada menos eletro-densa, com 50 nm de espessura, chamada de lâmina lúcida. A lâmina densa é a camada do meio, consistindo de um material elétron-denso, com 20-300 nm de largura, dependendo da localização. A camada externa é a lâmina fibroreticular. Contém uma matriz fibrilar de espessura variável que se fundem imperceptivelmente na matriz do tecido conjuntivo (MAK; MEI, 2017). Na prática a lâmina lúcida e a lâmina densa formam a lâmina basal, já a lâmina lúcida, lâmina densa e a lâmina reticular formam a membrana basal.

A lâmina basal, pode ser secretada por, células epiteliais, adiposas, de Schwann e musculares sendo uma estrutura multifuncional que regula o comportamento celular, organogênese, promove reparo do tecido, forma uma barreira de filtração e para a metástase tumoral, liga-se a fatores de crescimento além de mediar a angiogênese (YURCHENCO, 2011). As moléculas que compõem a lâmina basal sofrem variações em suas isoformas dependendo do tecido em que se encontra. Contudo, toda lâmina basal possui as seguintes moléculas, colágeno tipo IV, laminina, nidogênio e perlecan (MAK; MEI, 2017; YURCHENCO, 2011).

O colágeno do tipo IV (Col IV) é amplamente distribuído e somente encontrado na lâmina basal em forma de rede. O Col IV não é fibrilar e se caracteriza por formar uma rede na lâmina basal. Nos mamíferos existem 6 tipos geneticamente distintos de cadeias que compõem o colágeno IV, $\alpha 1(IV)$ até $\alpha 6(IV)$ que são codificados pelos genes COL4A1 – COL4A6 sendo que todos possuem domínios estruturais similares (KRUEGEL; MIOGGE, 2010; MAK; MEI, 2017). A cadeia α tem 400 nm de comprimento e pode ser separada em três domínios, um domínio N-terminal não colagenoso 7S curto (26 kDa, 28 nm de comprimento), um domínio colagenoso helicoidal médio longo (120 kDa, 320 nm ou 1400 aminoácidos de comprimento) e um domínio não colagenoso globular C-terminal, NCI (25 kDa, 52 nm ou 230 aminoácidos

de comprimento). Excepcionalmente, a parte helicoidal central da cadeia α que contém sequências de 1400 Gly-X-Y é interrompida por 20 regiões não colagenosas curtas, dando flexibilidade à molécula e assim às membranas basais. O domínio 7S é assim chamado por sua propriedade de sedimentação após centrifugação após a digestão proteolítica de Col IV (LEBLEU; MACDONALD; KALLURI, 2007). Ambos os domínios 7S e NCI estão envolvidos na formação da rede Col IV. A rede de Col IV está ligada à rede de laminina via nidogênio formando assim agregados supramoleculares na lâmina basal (MAK; MEI, 2017).

A estrutura e função da lâmina basal depende da laminina. A laminina é uma glicoproteína com forma heterotrimérica que consiste das cadeias α (alfa), β (beta) e γ (gama). Os mamíferos possuem um total de cinco cadeias α diferentes ($\alpha 1$ - $\alpha 5$, codificadas pelos genes LAMA1-LAMA5), quatro cadeias β diferentes ($\beta 1$ - $\beta 4$, codificadas pelos genes LAMAB1 - LAMAB4) e três cadeias γ diferentes ($\gamma 1$ - $\gamma 3$, codificadas pelos genes LAMC1 - LAMC3). Durante a síntese e a secreção das cadeias α , β e γ ocorre a montagem por interações específicas de suas regiões enroladas. Até o presente momento 16 isoformas de lamininas foram descritas devido as suas possíveis combinações, sendo que cada uma difere no seu padrão e sua função (MINER; YURCHENCO, 2004; YURCHENCO, 2011; YURCHENCO et al., 2018).

Nidogênios são proteínas ligantes de laminina que possuem seu próprio domínio globular (G1-G3) separado por domínios do tipo EGF (geralmente seis cisteínas cada, repetições de tireoglobulinas (Ty) do tipo I e um único segmento semelhante a haste adjacente ao G1. Já o perlecan é um proteoglicano de heparan sulfato. O core proteico exibe cinco domínios estruturais distintos. Do domínio amino-terminal I se projetam cadeias de sulfato de heparan. O domínio II possui repetições do receptor LDL-R. O domínio III é homólogo às regiões L4 e LE da laminina. O domínio IV possui série de módulos Ig (imunoglobulinas). O domínio C-terminal V é homólogo aos domínios LG da laminina, separados por repetições do tipo EGF (YURCHENCO, 2011).

A lâmina basal sofre normalmente ruptura durante o desenvolvimento embrionário devido ao processo de invasão celular. É possível observar essa ruptura durante as fases de gastrulação, implantação do trofoblasto, migração dos mioblastos entre diversos outros processos durante o desenvolvimento do embrião. Essa invasão

celular ocorre em processos patológicos também, como asma, artrite reumatoide e câncer (HAGEDORN; SHERWOOD, 2011). Durante o processo de invasão celular a lâmina basal é a primeira barreira física entre o epitélio e o tecido conjuntivo adjacente, sendo assim a célula neoplásica epitelial precisa romper essa barreira para posteriormente atingir o tecido próximo (SCHENK; QUARANTA, 2003). Para romper a lâmina basal e realizar o processo de invasão, a célula se utiliza de metaloproteinases de entre elas estão as MMPs. Essas proteases realizam a fragmentação das moléculas que compõem a lâmina basal facilitando assim a passagem da célula para o tecido adjacente ou passagem para um vaso sanguíneo ou mesmo um vaso linfático (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010).

2.5 Lamininas e seus peptídeos

A laminina foi primeiramente identificada em 1979 por Timpl e colaboradores. Essa glicoproteína foi isolada a partir de uma neoplasia de camundongo denominada tumor Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). Esse tumor possui uma espessa lâmina basal sendo que a principal molécula dessa lâmina basal é a laminina (TIMPL et al., 1979).

Cada molécula de laminina é composta de uma cadeia α , uma cadeia β e uma cadeia γ e suas massas moleculares vão de 400 a 900 kDa. Além disso, há cinco variantes da cadeia α , quatro da cadeia β e três da cadeia γ que foram identificadas até o presente momento. Na teoria os genes que codificam a laminina possibilitaria formar 45 moléculas heterotriméricas, sem contar as variantes de “splicing” alternativo. Entretanto, devido a especificidade de interação entre as cadeias α , β e γ são 16 o número de isoformas da laminina identificadas até o presente momento (COLOGNATO; YURCHENCO, 2000; YAO, 2017).

Dois sistemas foram desenvolvidos para nomear as diferentes isoformas da laminina. A primeira (antiga) se baseava em números arábicos de acordo com a sua descoberta, tais exemplos são, laminina-1, laminina-2, laminina-3, etc (AUMAILLEY et al., 2005). Embora essa nomenclatura seja simples de utilizar, ela falha ao prover informações sobre a sua composição trimérica. Com isso a nomenclatura nova propôs a indicação das cadeias polipeptídicas. Especificamente, as lamininas são nomeadas por letras gregas seguido dos números de suas variantes. Por exemplo, a antiga

laminina-1 é agora escrita como a laminina $\alpha1\beta1\gamma1$ ou de forma simplificada como laminina-111. Algumas vezes, uma letra grega e um número são usados para definir todas as isoformas da laminina que contém essa subunidade. Por exemplo, “lamininas $\alpha3$ ” é sobre todas as lamininas que contém a cadeia $\alpha3$ (AUMAILLEY, 2013; AUMAILLEY et al., 2005; YAO, 2017).

Alguns genes que codificam a laminina podem produzir mais de um peptídeo devido ao “splicing” alternativo. Para essas cadeias, as letras A e B são adicionadas depois dos números para indicar baixa massa molecular e alta massa molecular respectivamente. Por exemplo, o gene que codifica a cadeia $\alpha3$ pode produzir um variante cadeia $\alpha3A$ da laminina ou o variante cadeia $\alpha3B$ da laminina (YAO, 2017). A combinação dessas cadeias α , β e γ mais as variantes de “splicing” permite a formação de um grande número de moléculas de laminina como podemos ver na tabela abaixo.

Tabela 2 – Nomenclatura antiga e nova da laminina.

Nomenclatura antiga	Nomenclatura nova	
	Padrão	Abreviação
Laminina-1	Laminina- $\alpha 1\beta 1\gamma 1$	Laminina-111
Laminina-2	Laminina- $\alpha 2\beta 1\gamma 1$	Laminina-211
Laminina-3	Laminina- $\alpha 1\beta 2\gamma 1$	Laminina-121
Laminina-4	Laminina- $\alpha 2\beta 2\gamma 1$	Laminina-221
Laminina-5	Laminina- $\alpha 3(A)\beta 3\gamma 2$	Laminina-3(A)32
Laminina-5B	Laminina- $\alpha 3B\beta 3\gamma 2$	Laminina-3B32
Laminina-6	Laminina- $\alpha 3\beta 1\gamma 1$	Laminina-311
Laminina-7	Laminina- $\alpha 3\beta 2\gamma 1$	Laminina-321
Laminina-8	Laminina- $\alpha 4\beta 1\gamma 1$	Laminina-411
Laminina-9	Laminina- $\alpha 4\beta 2\gamma 1$	Laminina-421
Laminina-10	Laminina- $\alpha 5\beta 1\gamma 1$	Laminina-511
Laminina-11	Laminina- $\alpha 5\beta 2\gamma 1$	Laminina-521
Laminina-12	Laminina- $\alpha 2\beta 1\gamma 3$	Laminina-213
Laminina-13	Laminina- $\alpha 3\beta 2\gamma 3$	Laminina-323
Laminina-14	Laminina- $\alpha 4\beta 2\gamma 3$	Laminina-423
Laminina-15	Laminina- $\alpha 5\beta 2\gamma 3$	Laminina-523
	* Laminina- $\alpha 2\beta 1\gamma 2$	Laminina-212
	* Laminina- $\alpha 2\beta 2\gamma 2$	Laminina-222
	* Laminina- $\alpha 3\beta 3\gamma 3$	Laminina-333
	* Laminina- $\alpha 5\beta 2\gamma 2$	Laminina-522

Adaptado de (YAO, 2017). * Quatro novas isoformas propostas segundo estudos realizados *in vivo* e *in vitro* (DURBEEJ, 2010).

Sabe-se que os trímeros de laminina são montados antes mesmo de serem secretados para a matriz extracelular. A montagem começa combinando as cadeias β e γ , seguido pela associação de uma cadeia α ao dímero β / γ . Uma vez secretada as lamininas juntamente com outras moléculas da MEC, incluindo colágeno IV, nidogênio e perlecan, formam uma camada molecular logo abaixo a membrana da célula de chamada lâmina basal (AUMAILLEY et al., 2005; COLOGNATO; YURCHENCO, 2000; DURBEEJ, 2010; MINER; YURCHENCO, 2004; YURCHENCO, 2011).

As cadeias tipo α possuem função de adesão e interação com receptores. Já as cadeias β e γ tem função de estruturação da molécula de laminina, mas podem

auxiliar na polimerização e ligação ao nidogênio (AUMAILLEY, 2013; AUMAILLEY et al., 2005; KIM; TURNBULL; GUIMOND, 2011; ROUSSELLE; BECK, 2013; YURCHENCO, 2011; YURCHENCO; AMENTA; PATTON, 2004).

Entre as 16 isoformas a laminina-111 é a mais estudada pois ela pode ser isolada a partir do tumor Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) que produz abundantemente essa isoforma (TIMPL et al., 1979). A laminina-111 é encontrada primeiramente durante o desenvolvimento embrionário e posteriormente só é observada durante o desenvolvimento de tumores como os de mama por exemplo (LEONOUidakis et al., 2014). Possui três cadeias, $\alpha 1$ (400 kDa), $\beta 1$ (210 kDa) e $\gamma 1$ (200 kDa) que se associam em uma estrutura cruciforme. A cadeia $\alpha 1$ possui três estruturas globulares e três repetições de sequência do tipo EGF enquanto as outras duas cadeias são menores e possuem dois domínios globulares e duas repetições de sequência do tipo EGF. As três cadeias possuem uma cauda helicoidal de tamanhos similares que se estendem até a região C-terminal. A cadeia $\alpha 1$ na região C-terminal (domínio LG) possui 5 regiões tandem de 100 kDa (LG1 - LG5) que possui um papel biológico importante na função da laminina-111 (KIKKAWA et al., 2013; KIKKAWA et al., 2011; OTAGIRI et al., 2013).

Laminina-111 se liga a outros componentes da lâmina basal os quais incluem o colágeno IV, perlecan e nidogênio. Tais interações são específicas e importantes na montagem da lâmina basal. Além disso, a laminina-111 interage com as células através das integrinas desempenhando atividades biológicas, incluindo adesão celular, migração, crescimento de tumor e metástase (KIKKAWA et al., 2013).

Muitas moléculas da MEC sofrem clivagem, resultando na liberação de fragmentos com atividades biológicas as quais usualmente diferem das moléculas integras. Adsorção, ligação heterotípica, metaloproteinases, forças mecânicas mediadas por células, denaturação e espécies reativas de oxigênio podem expor sítios crípticos bioativos na MEC (moléculas matricrípticas). A atividade biológica matricríptica desses sítios revela mecanismos biológicos exercidos que são desconhecidos quando se observa as moléculas integras (RICARD-BLUM; SALZA, 2014). Entre as moléculas da MEC que sofrem essas alterações na sua estrutura está a laminina-111 (KIKKAWA et al., 2013).

Fragmentos proteolíticos e sintéticos derivados da laminina-111 tem sido usados para localizar e estudar as atividades dessa glicoproteína, além de observar

também funções isoladas a determinadas sequências que não apresentam na forma íntegra da molécula (KIKKAWA et al., 2013; NOMIZU et al., 1998; NOMIZU et al., 2000; NOMIZU et al., 1997).

2.6 Peptídeos com funções biológicas derivados da laminina-111

Nomizu e seu grupo estudou sistematicamente a sequências das três cadeias que compõem a laminina-111 e demonstrou que pelo menos 51 peptídeos derivados dessa glicoproteína promovem a adesão de células derivadas de fibrossarcoma HT1080 (NOMIZU et al., 1998; NOMIZU et al., 2000; NOMIZU et al., 1997).

Dentro da cadeia $\beta 1$ existe a sequência YIGSR que promove efeitos biológicos e foi uma das primeiras sequências a ser estudada. Entre as funções foi observado que o peptídeo inibe a progressão de tumores (GRAF et al., 1987; IWAMOTO et al., 1987). O peptídeo YIGSR promove o bloqueio de metástase para os ossos e para os pulmões além de inibir angiogênese em modelo *in vivo* (FRIDMAN et al., 1990; GRANT et al., 1989; NAKAI et al., 1992). Lipossomos conjugados com o peptídeo YIGSR foi utilizado como droga quimioterápica (DUBEY; SINGODIA; VYAS, 2010) além de ser utilizado como um radiofármaco na localização de neoplasias (HU et al., 2005; SILVA et al., 2017).

No domínio globular LG4 da cadeia $\alpha 1$ da laminina, Nomizu e seu grupo identificaram o peptídeo AG73 com a sequência RKRLQVQLSIRT que possui uma alta taxa de adesão (NOMIZU et al., 1998). Os efeitos do peptídeo AG73 foram avaliados em diversos ensaios *in vitro* e *in vivo* (ENGBRING et al., 2002; ENGBRING et al., 2008; HOFFMAN et al., 2001). O peptídeo AG73 também possui efeitos biológicos em tumores de mama (ENGBRING et al., 2008). Células B16-F10 injetadas em camundongos junto com o peptídeo AG73 promoveram um aumento da metástase para tecidos ósseo, pulmão e fígado (ENGBRING et al., 2002; SONG et al., 1997). Mochizuki e seu grupo também demonstrou que o peptídeo AG73 possui atividade de angiogênese (MOCHIZUKI et al., 2007). Além de tudo, o nosso grupo já demonstrou que o peptídeo AG73 regula a morfologia de células derivadas de glândula salivar (GAMA-DE-SOUZA et al., 2008). Também observamos que esse peptídeo promove a secreção de proteases, migração e invasão em células derivadas de carcinoma

epidermoide oral através de interação com receptores como a integrina $\beta 1$ e sindecana-1 (SIQUEIRA et al., 2010). O peptídeo AG73 é um ligante para receptores do tipo sindecam, um dos maiores proteoglicanos transmembrana que contém cadeias de heparan sulfato. Devido à alta quantidade de sindecam-2 em várias linhagens de células de câncer, isso faz com que esse peptídeo possa ser conjugado e usado para a entrega de drogas como foi realizado por Hamano e seu grupo (HAMANO et al., 2013).

Acima dos domínios globulares da laminina-111 no braço longo da cadeia $\alpha 1$ está o peptídeo SIKVAV (TASHIRO et al., 1989). Entre os efeitos biológicos observados estão, angiogênese, secreção de MMPs, metástase, adesão, migração e crescimento tumoral (KANEMOTO et al., 1990; NOMIZU et al., 1992; SWEENEY et al., 1991; TASHIRO et al., 1989). Nosso grupo também demonstrou que o peptídeo SIKVAV promove a secreção de MMPs em adenocarcinomas (FREITAS et al., 2004; FREITAS et al., 2007). Experimentos em camundongos demonstram que esse peptídeo quando aplicado junto com um hidrogel de quitosana sobre um ferimento na pele, acelera o processo de cicatrização e formação de um novo epitélio (CHEN et al., 2018).

2.7 Peptídeo C16

Na cadeia $\gamma 1$ da laminina no primeiro domínio globular encontra-se o peptídeo C16 com a sequência KAFDITYVRLKF (NOMIZU et al., 1997). Até o presente estudo, ainda não está claro se esse peptídeo representa um sítio críptico ou encontra-se exposto na molécula íntegra da cadeia $\gamma 1$ da laminina.

Diversos trabalhos previamente demonstram que entre as funções que o peptídeo C16 promove está, secreção de MMPs, diferenciação de hepatócitos, crescimento de neuritos e formação de metástase pulmonar (KIKKAWA et al., 2013; KURATOMI et al., 2002; PONCE; NOMIZU; KLEINMAN, 2001). O peptídeo C16 pode prevenir inflamação e infiltração leucocitária em casos de encefalomielite provocada por processo alérgico (FANG et al., 2013) e também estimula a hiperpolarização de membranas de células híbridas derivadas de glioblastoma e neuroblastoma (KOWTHA et al., 1998). Devido a atividade biológica pró-angiogênica, esse peptídeo

combinado com implantes poliméricos foi utilizado como cicatrizante (OTAGIRI et al., 2013).

Nosso grupo previamente demonstrou que o peptídeo C16 regula a atividade e os níveis de GPNMB uma glicoproteína que é utilizada como marcador para o câncer de mama do tipo “basal-like” (SMUCZEK et al., 2017). Em outro trabalho demonstramos que o peptídeo C16 também pode regular a atividade de invadopódios de células derivadas de adenocarcinoma, fibrossarcoma e células de carcinoma epidermóide, possivelmente através da integrina $\beta 1$ utilizando as vias de sinalizações Src e ERK1/2 (SIQUEIRA et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2011).

).

2.8 Peptídeo C28

O peptídeo C28 com a sequência RVTLNRL está na cadeia $\gamma 1$ da laminina no primeiro domínio globular assim como o peptídeo C16 que foi descrito anteriormente (NOMIZU et al., 1997).

Esse peptídeo também foi detectado pela espectrometria de massas em amostras derivadas de câncer de mama de ensaios realizados *in vitro*. Ao nosso conhecimento, apenas a atividade biológica de adesão para as células de fibrossarcoma HT1080 havia sido relatada até presente momento (NOMIZU et al., 1997). Nesse trabalho demonstramos novas funções para esse peptídeo, entre elas está a proliferação celular.

Abaixo um diagrama da laminina-111 com suas respectivas cadeias $\alpha 1$, $\beta 1$ e $\gamma 1$. Além disso é possível visualizar a localização de alguns dos peptídeos com atividades biológicas já conhecidas e descritas pela literatura.

Ilustração 2 – Desenho esquemático da laminina-111 e seus peptídeos

Modelo esquemático da estrutura da laminina-111 com os principais peptídeos bioativos descritos na literatura. Desenho adaptado a partir de (DURBEEJ, 2010; KIKKAWA et al., 2013).

2.9 “Zebrafish” (*Danio rerio*) como modelo xenográfico

Tradicionalmente o modelo murinho tem sido utilizado para a pesquisa como um organismo modelo para ensaios *in vivo*. Contudo *Danio rerio*, também conhecido como “zebrafish” ou peixe-zebra, possui um tamanho pequeno, produz diversos indivíduos em uma ninhada, crescimento rápido, tem surgido como um importante modelo de estudo para o câncer tendo respostas complementares para estudos realizados em camundongos e células *in vitro* (WHITE; ROSE; ZON, 2013). Um amplo campo de experimentos pode ser desenvolvido nesse modelo, desde a descoberta de um alvo, estudos toxicológicos a geração de tumores para a realização de teste *in vivo* (LETRADO et al., 2018; WHITE; ROSE; ZON, 2013).

“Zebrafish” possui vantagens únicas que o classificam como uma ferramenta de pesquisa versátil. “Zebrafish” gera um grande número de progenitores oferecendo uma análise estatística confiável. Humanos e “zebrafish” compartilham uma elevada taxa de similaridade: 71% das proteínas humanas e 82% das proteínas humanas causadoras de doenças têm um ortólogo em “zebrafish”. As despesas de criação de animais são reduzidas em comparação com os mamíferos, devido à manutenção barata que exigem. “Zebrafish” são capazes de absorver moléculas dissolvidas na água, permitindo assim fácil administração de drogas. Alguns processos podem ser observados diretamente no animal vivo devido à transparência dos embriões (LETRADO et al., 2018; WHITE; ROSE; ZON, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Dando continuidade à linha de pesquisa realizada do Laboratório de Biologia Tumoral investigamos a ação dos peptídeos derivados da clivagem laminina, obtidos em ensaios *in vitro* e *in vivo* de células tumorais derivadas de câncer de mama, usando-os em ensaios biológicos para avaliação de atividade e de função.

3.1.1 Objetivos específicos:

- 1) Estudo *in vivo*, por imuno histoquímica, da marcação para as diferentes cadeias da laminina-111 em tumores de mama humanos utilizando “Tissue Microarray” (TMAs).
- 2) Análise do perfil de clivagem bioquímica *in vivo* da laminina em amostras de tumores de mama humanos, comparada com o perfil observado em mama normal.
- 3) Análise do perfil de clivagem bioquímica *in vitro* da laminina-111 induzida por células derivadas de câncer de mama, comparada com a clivagem determinada por células normais.
- 4) Bandas de clivagem da laminina *in vitro* e *in vivo* foram submetidas à cromatografia líquida e espectrometria de massas (LC-MS/MS), seguido de “peptide fingerprint”. Essa análise visa identificar potenciais peptídeos bioativos nas bandas de clivagem da laminina.
- 5) Para analisar a função dos peptídeos derivados da clivagem da laminina, investigamos a adesão e invasão celular *in vitro* na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231. Peptídeos C16 e C28 apresentaram resultados significantes para o ensaio de adesão.
- 6) Papel dos peptídeos C16 e C28 na proliferação de células MDA-MB-231 e HT1080.

- 7)** Atividade invasiva de C16 e C28 em células MDA-MB-231 e HT1080 crescidas sobre filmes de colágeno.
- 8)** C16 e C28 regulando níveis proteicos e atividade de MMP2, MMP9 e MT1-MMP.
- 9)** Peptídeo C16 influenciando dimerização da MT1-MMP. Estudo por FRET.
- 10)** Avaliação do efeito dos peptídeos C16 e C28 em células tumorais de mama (MDA-MB-231) injetadas em embriões de “zebrafish”.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aprovação dos comitês de ética humano e animal

Para o desenvolvimento do projeto, obtivemos a aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos – (CEPSH) / Parecer: 1256 / CAEE: 46098215.0.0000.5467. Para os estudos com modelo animal, obtivemos a aprovação do Comitê de Ética Animal local, CEUA, protocolo 122/2017.

4.2 Imuno histoquímica

Para identificar as diferentes cadeias da laminina-111 presentes no câncer de mama e mama normal utilizamos lâminas de “Tissue Microarray” (TMAs) (IMGENEX, San Diego, CA, USA). As lâminas de TMAs que foram utilizadas, contém 35 amostras de carcinoma ductal invasivo, 9 amostras de mama normal, 1 amostra de carcinoma papilífero atípico, 1 amostra de carcinoma metaplásico, 1 amostra de carcinoma sarcomatoide e 10 amostras de carcinoma metastático de linfonodo. Os cortes foram desparafinizados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 90% e 80%). Em seguida, foi realizada a recuperação de antígeno em tampão citrato (10 µM ácido cítrico, 0.05% Tween 20, pH 6) em banho-maria por 30 minutos (95 – 100 °C). Para os passos seguintes foi utilizado o “Kit” da Leica (RE7280-K). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizada por 5 minutos utilizando o “peroxidase block” seguido de duas lavagens em TBS por 5 minutos. Para o bloqueio dos sítios inespecíficos foi utilizado o “protein block” por 5 minutos seguido de duas lavagens em TBS por 5 minutos. Anticorpos contra as cadeias alfa1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-5585, 1:300), beta1 (Sigma, HPA004056, 1:400) e gama1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-13144, 1:600) da laminina foram diluídos em TBS e aplicados sobre os cortes “overnight” a 4°C em câmara úmida. Posteriormente foram feitas duas lavagens das lâminas em TBS por 5 minutos. Foi realizada a incubação com anticorpo secundário por 30 minutos utilizando o “post primary” seguido de duas lavagens das lâminas em TBS por 5 minutos. Para a ampliação do sinal foi utilizado o “Novolink Polymer” por 30 minutos seguido de duas lavagens com TBS por 5 minutos. Como cromogênio foi utilizado 3,3’ – diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos em seguida as

lâminas foram lavadas em água corrente por mais 5 minutos. Os cortes foram contra-corados utilizando hematoxilina de Mayer por 3 minutos seguido de lavagem em água corrente por 5 minutos. Para a desidratação dos cortes foi utilizado concentrações crescentes de etanol (80%, 90% e 100%) seguido da diafanização em xilol. As lâminas foram montadas utilizando o meio de montagem e ERV-Mount – (Easypath). Foram feitas 5 fotos de cada amostra utilizando o microscópio óptico Primostar (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) com o aumento de 400x, contendo câmera Axiocam HRc (Carl Zeiss) acoplada. Quantificação da fração da área epitelial marcada pelos anticorpos foi realizada utilizando o “software” ImageJ (plug in Color deconvolution, <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>).

4.3 Clivagem da laminina

Células derivadas de carcinoma ductal invasivo de mama humana, linhagem MDA-MB-231 classificada como “basal-like” (triplo negativo para receptores de estrógeno, progesterona e HER), células derivadas de adenocarcinoma de mama (células MCF-7 classificada como “luminal B HER2+”, com receptores para progesterona, estrógeno e “HER2”) foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco com mistura de nutrientes HAM F-12 (DMEM/F12, Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e mantidas em frascos de 75 cm² em atmosfera de 5% CO₂ a 37 °C. Como controle foram utilizadas as células normais de glândula mamária (MCF-10A) cultivadas em meio DMEM/F12, suplementado com 5% de soro bovino adulto, 20 ng/ml de EGF (fator de crescimento epidérmico), 10 µg/ml de insulina, 0,5 µg/ml de hidrocortisona e 100 ng/ml de toxina colérica (Sigma) e também foram mantidas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C.

Células tumorais foram crescidas sobre Matrigel (1 mg/ml, Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) ou laminina-111 (1 mg/ml, # 3446-005-01 Cultrex, Minneapolis, MN, USA) por 24 horas, para posterior análise bioquímica da clivagem desses substratos por eletroforese e “immunoblot”. Foram analisados o lisado total contendo células-laminina, bem como o meio condicionado por células tratadas e controles. Uma placa com Matrigel ou laminina livre de células foi mantida na incubadora a 37°C, pelo mesmo tempo anteriormente descrito, com posterior análise

desse substrato por eletroforese e “immunoblot”. Esse controle visa observar o efeito de outros fatores que não as células sobre a laminina.

4.4 Clivagem da laminina *in vivo* em amostras de câncer de mama humano

Para comparar a fragmentação da laminina observada *in vitro* com *in vivo*, 4 amostras derivadas de câncer de mama foram coletadas. A idade, peso e medidas dos pacientes não foram determinadas. O tipo de carcinoma selecionado foi o invasivo de ducto como modelo de estudo e os pacientes não sofreram qualquer tipo de tratamento. Em seguida três amostras de três pacientes diagnosticados com câncer de mama, subtipo “basal-like” (triplo negativo para receptores de estrógeno, progesterona e “HER2”) foram coletadas e um paciente com classificação “luminal B” (triplo positivo para receptores de estrógeno, progesterona e “HER2”). As amostras descritas acima foram obtidas através do Biobanco do ICESP (Instituto do Câncer do Estado de São Paulo) dirigido pelo Prof. Dr. Roger Chammas. Além disso, três amostras derivadas de mama normal serviram como grupo controle. Essas amostras foram obtidas a partir de pacientes com idade, peso e medidas indeterminadas, submetidas a mamoplastias. Os pacientes selecionados não foram submetidos a qualquer tipo de tratamento. As amostras de mama normal foram obtidas junto ao Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Após obtidas, as amostras foram lisadas e submetidas ao protocolo de eletroforese em gel seguido de “immunoblot”, conforme descrito a seguir.

Amostras tratadas e controles foram lisadas em tampão RIPA contendo 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 0,15M de NaCl, 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 1% de NP-40, 0,5% deoxicolato de sódio e coquetel de inibidores de protease (Sigma). As concentrações proteicas foram analisadas pelo método BCA (Pierce, Rockford, IL, USA). Após isso, foram ressuspendidas em tampão de amostra contendo 3% de SDS, 15 mM de Tris (pH 6,8), 15% de beta-mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol. As amostras, em igual quantidade proteica, 20 µg para amostras *in vitro* e 30 µg para amostras *in vivo*, foram carregadas em gel de gradiente de 4-15% de poliacrilamida (BIO-RAD). Após a eletroforese, as bandas proteicas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Life Technologies). As membranas

foram bloqueadas com 5% de leite desnatado diluído em 0.05% Tween-20 em TBS (TTBS) e incubadas com anticorpos primário contra as cadeias alfa1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-5585, 1:1000), beta1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-17763, 1:250) e gama1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-13144, 1:1000) da laminina “overnight” a 4°C. Os anticorpos primários foram detectados por anticorpos secundários conjugados com peroxidase. Protocolo de quimioluminescência (ECL kit, Life Technologies) foi utilizado para revelar a reação.

Para a preparação do meio condicionado primeiramente foi adicionado inibidor de protease nas amostras e em seguida foram centrifugadas a 2000 RPM por 10 minutos a 4 °C repetindo o processo uma vez mais para o descarte de células mortas. Posteriormente foi adicionado etanol (Merck KGaA, Darmstadt, German).na proporção 800 µl de etanol para cada 1 ml de meio condicionado em seguida as amostras foram depositadas por 15 minutos em gelo seco. As amostras então foram centrifugadas a 11.000 RPM por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Tampão de lise RIPA foi adicionado nos tubos contendo as amostras (50 µl) e as concentrações protéicas foram analisadas pelo método BCA, separadas (20µg) e submetidas ao protocolo de eletroforese e “immunoblot” descritos acima.

Em paralelo a eletroforese e o “immunoblot”, um segundo gel de gradiente de 4-15% de poliacrilamida (BIO-RAD) contendo as mesmas amostras submetidas ao protocolo descrito acima foi corado com “Coomassie blue”. Bandas sugestivas da clivagem da laminina foram recortadas do gel e submetidas à protocolo de “in-gel digestion” descrito abaixo.

4.5 Digestão em gel com tripsina

Bandas protéicas correspondentes à fragmentação da laminina (200 kDa, 70 kDa, 52 kDa e 30 kDa) foram recortadas do gel de SDS-poliacrilamida e colocadas em tubos de centrífuga de 1500 µl, previamente lavados com etanol absoluto e secos em estufa.

Cada fragmento de gel foi incubado em solução de metanol 50% e ácido acético 5% durante três horas para remoção do SDS (dodecil sulfato de sódio). Após este período a solução foi removida e o gel foi desidratado com acetonitrila 100% durante

5 minutos por duas vezes; o gel então foi seco por centrifugação à vácuo (Speed Vac – RVC-218, Christ) por 3 minutos e após secagem foi adicionada uma solução de DTT (Ditiotreitol) 10 mM em bicarbonato de amônio 100 mM (30 µl), para redução de pontes dissulfeto, por um período de 30 minutos. Após uma rápida centrifugação a solução de DTT foi removida e foram adicionados 30 µl de iodoacetamida 50 mM em bicarbonato de amônio 100 mM por 30 minutos para alquilação dos grupos SH das cadeias laterais de cisteína. Após uma rápida centrifugação o sobrenadante foi removido e o gel foi lavado com solução de bicarbonato de amônio 100 mM e novamente desidratado com acetonitrila 100% por 5 minutos, reidratado com bicarbonato de amônio 100 mM por 10 minutos e desidratado com acetonitrila 100% por 5 minutos por duas vezes.

Após secagem do gel por centrifugação à vácuo por 3 minutos, foram adicionados 30 µl de solução de tripsina 50 µg/ml (Sigma) preparada em bicarbonato de amônio 50 mM gelado. A incubação foi realizada durante 30 minutos em banho de gelo. Depois desta etapa a solução de tripsina foi removida (sobrenadante) e ao fragmento de gel foram adicionados 20 µl de bicarbonato de amônio 50 mM e a incubação foi prolongada por 16h a 37 °C.

Para extração de peptídeos foram adicionados 10 µl de ácido fórmico 5% ao gel por 10 minutos a temperatura ambiente; após rápida centrifugação o sobrenadante foi transferido para outro tubo de 500 µl, e ao fragmento de gel foram adicionados 12 µl de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%. Após incubação por 10 minutos a temperatura ambiente, seguida de rápida centrifugação, o sobrenadante foi coletado e transferido para o mesmo tubo de 500 µl no qual já fora coletado o sobrenadante anterior. As etapas de extração foram repetidas mais duas vezes e os sobrenadantes reunidos foram concentrados por centrifugação à vácuo.

A extração de peptídeos foi feita utilizando-se ponteiras Zip Tip™ C-18 (Millipore). Para tanto, à amostra concentrada foram adicionados 5 µl de TFA 0,1% e a ponteira foi lavada lentamente com acetonitrila 100% por 2 vezes. A seguir, a resina contida na ponteira foi equilibrada lentamente com TFA 0,1% por sucessivas lavagens. Para adsorver os peptídeos à resina, a amostra foi introduzida por cuidadosas etapas de aspiração e descarte com a pipeta (7 a 10 vezes). Para eluição dos peptídeos da resina, esta foi lavada lentamente com TFA 0,1% e acetonitrila 50% e o eluato foi coletado em outro tubo.

4.6 Análise Proteômica por Espectrometria de Massas

Cinco microlitros das amostras obtidas pela digestão “in gel” foram analisadas no espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific, Estados Unidos) acoplado ao cromatógrafo líquido de nano-fluxo EASY-nLC (Thermo Scientific, Estados Unidos). Os peptídeos provenientes do gel foram separados por um programa de gradiente total de 35 minutos onde a separação foi feita no gradiente de 5 a 95% do solvente B (90% acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico) em 15 minutos. A amostra para análise peptidômica foi realizada em um gradiente de 120 minutos, da seguinte forma: 5-40% do solvente B por 90 minutos, seguido por 40-90% do solvente B por 20 minutos. O fluxo em ambas as análises foi de 200 nL/min usando uma pré coluna empacotada com 5 cm de polímeros de C18 de 10µm (Jupiter, Phenomenex) em um capilar de dimensões ID 100µm x OD 360 µm e uma coluna analítica de ponta com “frit” empacotada com 15 cm de polímeros C18 de 5 µm (Aqua, Phenomenex) em um capilar de dimensões ID 75 µm x OD 360 µm.

O espectrômetro de massas foi operado em modo de aquisição dependente de dados (DDA, do inglês: Data Dependent Acquisition), onde os 5 íons para amostras de gel e 10 íons para as amostras para análise peptidômica mais intensos de cada amostra foram selecionados para a fragmentação no “ion-trap” linear utilizando a dissociação por fragmentação por colisão induzida por dissociação (CID) em MS/MS. A aquisição dos dados foi controlada pelo programa de computador Xcalibur 1.4 (Thermo Scientific). De modo geral, as condições de análise foram: voltagem no capilar do nano-electrospray de 2,3 kV, temperatura da fonte a 250 °C, tempo de injeção no “ion-trap” ajustado a 100 ms e no FT-MS em 1000 ms com uma resolução de 60.000 em m/z 300-1800. O tempo de exclusão dinâmica foi ajustada para 70 segundos. Os arquivos de dados do massa (.raw) foram convertidos para .mgf usando o software MS Convert (v.3.0.4445, ProteoWizard, SourceForge) e analisados no software Mascot (v.2.4, Matrix Science Ltda., Boston, MA, USA). As proteínas foram identificadas através da pesquisa de dados MS e MS/MS contra o banco de dados Homo sapiens baixados do Uniprot.

A análise proteômica foi realizada no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, Resposta Imune e Sinalização Celular (LETA / CeTICS), Instituto Butantan

de São Paulo, contando com a colaboração do Dr. Leo Kei Iwai e da Prof.^a Solange M. T. Serrano.

4.7 Ensaio de Adesão

Os peptídeos, foram diluídos em água milli-Q e adicionados a placas multipoços (50 µl/poço), em concentrações variando de 1 a 200 µg/ml. Essas placas foram cobertas e guardadas “overnight” a 4°C. Posteriormente foi adicionada uma pequena quantidade (25 µl) de solução de bloqueio (3% BSA em PBS). Essa pequena quantidade de solução de bloqueio foi adicionada aos poços antes de ser aspirada a solução contendo os peptídeos.

Em seguida, cada poço foi novamente bloqueado (200 µl/poço) por 30 minutos à 37 °C. Essa solução de bloqueio foi colocada também em poços sem peptídeos, que serviram como controle negativo. Em seguida, aspiramos a solução de bloqueio e os poços foram lavados (1x) com PBS contendo 0,1% de BSA e 1 mM de MgCl₂. Essa solução foi removida por aspiração. O eventual líquido residual foi removido por inversão da placa multipoços sobre papel absorvente.

As células foram retiradas dos frascos com solução de Versene (0,02% de EDTA em HBSS) e não tripsina-EDTA, isso para evitar o “shaving” dos receptores de membrana, centrifugadas, lavadas com PBS (1X), contadas e ressuspensas em DMEM F12 sem soro, para ser obtida a concentração de $3,5 \times 10^4$ células por poço em um volume de 100µl. As células foram incubadas durante 20 min. à 37 °C. Após esse período, elas foram removidas, os poços lavados com PBS e fixados/corados com uma solução de metanol e cristal violeta. As células que aderiram foram lisadas com uma solução de 10% de SDS. As placas foram lidas em espectrofotômetro a 595 nm. Esses ensaios foram feitos em triplicata, para obtenção de media ± erro de ligação tanto dos poços com peptídeos como dos poços que serviram como controle negativo.

Os peptídeos com atividade de adesão significantes (C16 e C28) foram selecionados para ensaios posteriores *in vitro* de invasão celular e ensaios *in vivo* de tumorigênese em embriões de “zebrafish”, além de serem selecionados para o desenvolvimento do projeto do doutorado-sanduíche sob o título “Regulação da metaloproteinase MT1-MMP no câncer pelos peptídeos C16 e C28 derivados da

clivagem da laminina-111” podendo ser consultado na íntegra em Dados Suplementares 1.

4.8 Ensaio de invasão celular

Para avaliar se os peptídeos induzem fenótipo invasivo em células MDA-MB-231, foi utilizado um sistema de câmaras bipartites de 10 poços (Neuro Probe Inc. Gaithersburg, MD, USA), separadas por membrana porosa de policarbonato (diâmetro dos poros = 8 μ m). Os poços da câmara inferior foram preenchidos com peptídeos C16, C28 e seus controles C16SX e C28SX (100 μ g/ml) sendo diluídos em meio sem soro. Células ressuspensas em meio com 0,5% de SFB (15×10^4 /poço) foram cultivadas na porção superior da câmara sobre a membrana coberta por 5 μ l de Matrigel (13 mg/ml, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Como controles não peptídicos, poços da câmara inferior foram preenchidos com meio sem soro (controle negativo) ou contendo meio mais 10% de SFB (controle positivo).

A câmara foi incubada por 48 horas a 37 °C em estufa de CO₂. Posteriormente a membrana foi removida da câmara e sua porção superior, sobre a qual as células foram plaqueadas, foi delicadamente raspada para a remoção de restos de células que não invadiram. Assim, restaram somente células da face inferior da membrana, que foram as células que invadiram. Essa membrana junto com as células, foi fixada em paraformaldeído 4% e corada com violeta cristal. O número de células em cada poço foi observado através da aquisição de 7 imagens no aumento de 10x, utilizando câmera digital acoplada ao microscópio e posteriormente as imagens foram quantificadas

4.9 Ensaio de tumorigênese

Foram preparadas as microagulhas de injeção segundo o protocolo adaptado de (BENARD et al., 2012). Utilizamos microcapilares (Glass, Standard, 626000 1 mm de diâmetro externo x 0,5 mm de diâmetro) e um dispositivo puxador de micropipeta (Sutter Instruments Inc., Flaming / Brown p-97).

Foi utilizado o modelo *in vivo* de “zebrafish” transgênico Tg (fli:EGFP). Os ovos recém-obtidos (hora zero) foram colocados em água Red Sea Salt a 28 °C e mantidos na incubadora até o período de “Pharyngula” 24 h.p.f. (horas pós-fertilização). Após 24 h a água “Red Sea Salt” foi substituída por meio de embrião (EM) com 0,003% de “N-Phenylthiourea” (PTU) para evitar a melanização. Os embriões foram mantidos na incubadora até o período “Hatching” (48 h.p.f.).

Com uma pipeta Pasteur os embriões foram colocados dentro de uma placa contendo uma camada de agarose. Seguidamente foram anestesiados com 3-aminobenzoico (Tricaine, Sigma-Alcrich) (preparado com solução estoque de tricaina 0.4% tamponada). Os embriões foram orientados com o lado dorsal para cima e foi realizado microinjeções de 50 nl (aproximadamente 1000 células por animal). As células MDA-MB-231 antes de receberem qualquer tratamento foram coradas com “CellTracker Orange” (Life Technologies, 1:1000, C34551). Em um grupo de embriões foram realizadas injeções de células MDA-MB-231 contendo os peptídeos C16 ou C28 (100 µg/ml), e em outro grupo foram realizadas injeções de células MDA-MB-231 contendo os peptídeos controles C16SX ou C28SX (100 µg/ml). Células MDA-MB-231 sem tratamento foram injetadas sem qualquer tratamento como grupo controle. Todas as injeções foram realizadas na veia cardinal comum (CCV). Usou-se um picoinjetor-1000 BTX Harvard, e os parâmetros de injeção foram: pressão de injeção = 24 p.s.i., balance = 3 p.s.i., tempo de injeção = 10 ms. Após a microinjeção os embriões foram transferidos para o meio de embrião com PTU, e levados para a incubadora (35.5 °C) para a recuperação.

Após 4 dias da injeção, os embriões sofreram eutanásia. Posteriormente, os embriões foram fixados em 4% de paraformaldeído e observados no microscópio de fluorescência (Zeiss Axio Vert.A1) e também no microscópio confocal LSM-780 NLO (CEFAP-ICB-USP).

4.10 Experimentos realizados na Universidade de Oxford

Experimentos realizados durante o doutorado-sanduíche sob a supervisão do Professor Yoshifumi Itoh obedeceram aos protocolos e normas locais padronizadas em seu laboratório dentro do Instituto de Reumatologia da Universidade de Oxford,

Reino Unido. Resultados obtidos durante esse período podem ser observados a partir da Figura 12 até a Figura 18. Além disso, o relatório completo pode ser visualizado em Dados Suplementares 1.

4.10.1 Cultura celular

Células derivadas de carcinoma ductal invasivo de mama humana, linhagem MDA-MB-231 classificada como “basal-like” (triplo negativo para receptores de estrógeno, progesterona e “HER2”) e células HT1080 derivadas de fibrossarcoma, foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco com mistura de nutrientes HAM F-12 (DMEM/F12, Sigma, D0547) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco by Life Technologies, REF 10500-064) e na presença de antibióticos (penicilina / estreptomicina, Gibco by Life Technologies, REF 15140-1222, 1:1000) e mantidas em frascos de 75 cm² em atmosfera de 5% CO² a 37 °C. As células HT0180 foram utilizadas como modelo de reprodução de resultados.

4.10.2 Peptídeos

Peptídeos derivados da clivagem da laminina detectados por LC-MS/MS foram sintetizados comercialmente (EZ Biolab, Westfield, IN, USA). Grau de pureza foi 98% (RP-HPLC), sendo a massa molecular confirmada por espectrometria de massas. O peptídeo C28 (RVTLNRL) e seu peptídeo controle (LNTRVLR) foram diluídos em dH₂O em uma concentração de 10 mg/ml e mantidos a 4 °C. Já o peptídeo C16 (KAFDITYVRLKF) e seu peptídeo controle (FKLRVYTIDFAK) foram diluídos em DMSO (Dimethyl Sulfoxide, Sigma, D5879) na concentração de 10 mg/ml e mantidos a 4°C. Todos os experimentos foram realizados utilizando a concentração de 100 µg/ml de peptídeo, essa concentração já foi previamente padronizada em trabalhos anteriores dentro do nosso grupo de pesquisa.

4.10.3 Ensaio de degradação de gelatina

- Preparação da gelatina

O corante (Alexa 488, Succinimidyl Ester, ThermoFisher Scientific, A20100) foi diluído em N,N-Dimethylformamida (DMF, Sigma, 227056) para uma concentração de 10 mg/ml (1 mg do corante dissolve em 100 µl de DMF). Foram feitas alíquotas de 25 µl, deixadas para secar a temperatura ambiente e posteriormente foram guardadas em um frasco escuro a 4 °C, contendo sílica para não hidratar.

Em 1 ml de 0.1 M de Bicarbonato de Sódio (Sigma, S6014) foi dissolvido 20 mg de gelatina (Sigma, G-2625) e aquecida a 80 °C por 20 minutos em uma placa de aquecimento com rotação de 1000 RPM (foi tomado o devido cuidado para não ferver, pois isso fragmenta a gelatina).

Posteriormente foi dissolvido 250 µg do corante (Alexa 488), presente nas alíquotas em 25 µl de DMF misturando gentilmente. Seguidamente essa solução foi adicionada a 250 µl de gelatina preparada anteriormente deixando agitar a solução gentilmente por 1 h à temperatura ambiente (coberto com papel alumínio).

Em seguida a reação foi cessada adicionando 50 µl de 2M Tris-HCl (pH 7.5), 50 µl de PBS 10x ("Phosphate buffered saline, low phosphate", 10X, VWR Chemicals, 437117K) e 150 µl de dH₂O (o volume da solução ficou em 500 µl em uma concentração de 10 mg/ml).

Para remover qualquer corante que não se ligou a gelatina, a solução foi adicionada a um cassete para realizar o processo de diálise (Slide-A-Lyzer, Dialysis Cassette G2, Thermo Scientific, #87722) realizando 2 lavagens primeiramente com 1L de PBS 1X cada a temperatura ambiente por 4 horas e posteriormente realizou-se mais uma lavagem com 1L de PBS 1X "overnight" a 4°C (sempre coberto com papel alumínio).

Após a diálise "overnight" da gelatina, o volume foi medido e diluído 10x em uma solução de glicerol 50% (BDH, 101184K) em PBS 1x (foi utilizado o solvente para auxiliar a remoção total da solução de dentro do cassete). Foram feitas alíquotas de 1 ml sendo que a concentração final da gelatina ficou 1 mg/ml e guardadas no freezer a -20 °C (envolto em papel alumínio). O glicerol impede que a gelatina congele.

- Cobrindo a lamínula com gelatina fluorescente

A gelatina conjugada com Alexa 488 foi diluída em dH₂O na proporção 1:20 (50 µg/ml ou 1%) aquecida a 80 °C por 10 minutos em uma placa de aquecimento com rotação de 1000 RPM (tomando cuidado para não ferver, pois isso fragmenta a gelatina). Para cada lamínula usou-se aproximadamente 100 µl da solução de gelatina.

Sobre um parafilme foi depositado a gelatina (100 µl) e em seguida, lamínulas (VWR International, 18mm, 831-0153) foram depositadas sobre a gelatina por 20 minutos a temperatura ambiente. Não há necessidade de lavar as lamínulas pois isso cria riscos.

Em seguida as lamínulas foram transferidas para uma superfície contendo uma solução de 1% de glutaraldeído (Sigma, G6257) em dH₂O a temperatura ambiente por 5 minutos (100 µl).

As lamínulas foram transferidas para uma superfície contendo 1M de Cloreto de Amônio (Sigma, A9434) em dH₂O por 15 minutos e posteriormente as lamínulas foram transferidas para uma placa de 12 poços contendo 1 ml de etanol 70% e deixadas a 4 °C overnight para o processo de esterilização.

- Cobrindo a gelatina com células

No dia seguinte os poços contendo as lamínulas foram lavados 3x com DMEM F12 suplementado com SFB 10% e as células MDA-MB-231 e HT1080 foram plaqueadas (2×10^5) primeiramente com meio DMEM F12 suplementado com 10% de SFB por 3 horas. Em seguida as células foram lavadas com PBS 1x e em seguida foi adicionado DMEM F12 suplementado com 0.5% de SFB. Os peptídeos foram adicionados aos poços e o tratamento foi realizado por 16 horas ("overnight").

- Fixando e corando as células

Após 16 h as células foram fixadas em uma solução de 3.7% de formaldeído (Sigma, 533998) em dH₂O por 10 minutos e lavadas 3 vezes em PBS 1X contendo 0.02% de Azida (“Sodium Azide”, NaN₃, BHD, 103692K).

Depois das células serem fixadas, em um parafilme foi adicionado 100 µl de uma solução de PBS 1x contendo 0.1% de Triton X-100 (BDH, 306324N) além da faloidina (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, A12380, 1:500) para a visualização da actina e DAPI (1:500) para a visualização do núcleo por 1 h.

Para a montagem da lamínula sobre a lâmina, foi utilizado uma solução de 8% de glicerol diluído em dH₂O com 0.02% de Azida, deixando secar por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida as bordas da lamínula foram seladas usando esmalte.

- Análise das imagens

Foram obtidas 15 imagens de cada lamínula nos três canais (verde, vermelho e azul) no aumento de 10x. O valor da área de degradação (pontos escuros na gelatina verde) foi dividido pelo número de células (núcleo marcado com DAPI) utilizando o “software” ImageJ.

4.10.4 “Immunoblot”

Para avaliar se os peptídeos C16 e C28 derivados da laminina poderiam alterar os níveis de MT1-MMP nas células MDA-MB-231 e HT1080, foram plaqueadas (4 x10⁴) essas células por 24 horas em meio DMEM F12 suplementado com 10% SFB e antibióticos em uma placa de 24 poços. No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS 1x e foi adicionado DMEM F12 suplementado com 0.5% SFB mais antibióticos, seguido dos tratamentos com 100 µg/ml dos peptídeos C16, C16SX, C28 e C28SX. Como controles positivos foram utilizados os seguintes grupos: um contendo 50 µg/ml de colágeno I (PureCol, Advanced BioMatrix, 5005) e o outro contém 10% SFB. Como grupos controles negativos, um contendo 50 µg/ml de colágeno I + 10 µM de CT1746, outro contendo 10 µM de CT1746 e o ultimo contendo somente o meio DMEM F12 suplementado com 0.5% SFB. O tratamento foi realizado por 48 h.

O meio condicionado foi recolhido para a realização da zimografia que será descrita abaixo. As células foram lisadas com 75 µl de tampão de amostra (0.2 g de SDS, 5 ml de “Upper buffer” 4x – 84 mM Amediol, 62 mM HCl, 0.02% NaN₃ - , 500 µl de 0.1% de azul de bromofenol, 4 ml de glicerol, 1 ml de 0.5 M EDTA pH 8.0 e 100 µl 2-Mercapetanol) e posteriormente foram fervidas por 10 minutos.

Para separar as moléculas, foi feito um gel de acrilamida de 7.5%, usando o sistema de corrida “AE-6500 Dual Mini Slab with gel casting set”, ATTO Corporation, Japan e o aparelho PowerPac Basic, BIO-RAD. Para a preparação do gel de 7.5% (receita para 1 gel) foi utilizado: 1.5 ml de 30% “Acrylamide/Bis”, 1.5 ml de 4x “Lower gel buffer”, 1.29 ml de 50% Sucrose, 1.71 ml de dH₂O, 40 µl de APS 10% e 4.5 µl de TEMED. Para nivelar o gel 7.5% durante a polimerização foi utilizado uma solução de butanol em H₂O (depositando somente 300 µl de butanol sobre o gel). Para a preparação do gel 5% “stacking” foi utilizado (receita para 1 gel): 0.433 ml de 30% “Acrylamide/Bis”, 0.642 ml de 4x “Upper gel buffer”, 0.642 ml de 50% “Sucrose”, 0.850 ml de dH₂O, 17 µl de APS 10% e 4.5 µl de TEMED. Após a polimerização completa, o gel foi montado no sistema descrito anteriormente, e os tampões 1x “Lower gel buffer” e 1x “Upper gel buffer” foram adicionados e cada poço do gel foi lavado 3x antes da aplicação das amostras. As amostras foram aplicadas (20 µl) no gel além do padrão (4 µl) para controle de massa molecular. Para a corrida foi aplicado 150 V, 400 mA por 65 minutos.

Após a corrida as amostras foram transferidas para uma membrana de PVDF (Amersham™ Hybond™, 0.2 µm, 10600021) usando o sistema Trans-Blot Turbo, Transfer System (BIO-RAD) com o tampão de transferência Trans-Blot Turbo (600 ml de dH₂O, 200 ml de EtOH e 200 ml Trans-Blot Turbo 5x Transfer Buffer – BIO-RAD, 200007944) por 7 minutos.

Após a transferência, foi usado uma solução de bloqueio com leite 10% por 1 h (50 g de leite em pó, 25 ml de 2M Tris-HCl pH 7.5, 4.383g de Cloreto de Sódio, 0.1g de NaN₃ e 500 ml de dH₂O) seguido da lavagem da membrana 3x por 5 minutos cada em TTBS (25 ml de 2M Tris-HCl pH7.5, 50ml de 3M NaCl, 10 ml de 2% NaN₃, 1 ml de Tween-20 e 914 ml de dH₂O). Os anticorpos primários MT1-MMP (222-1D8, doado pelo Prof. Motoharu Seiki, 1:1000) e β-actina (Santa Cruz Biotechnology, sc47778, 1:1000) foram incubados sobre a membrana “overnight” em uma solução de BSA 1%

(5 g de BSA, 12.5ml de 2M Tris-HCl pH 7.5, 5 ml de 2% NaN₃, 26.5 ml de 3 M NaCl e 456 ml de dH₂O - posteriormente a solução foi filtrada em filtro 0.45 µm).

Depois da incubação com os anticorpos primários “overnight” a membrana foi lavada 3x por 5 minutos em TTBS e o anticorpo secundário (IRDye 800CW Goat anti-Mouse, 926-32210, 1:5000) foi adicionado em uma solução de BSA 1% por 1 hora (coberto com papel alumínio). Posteriormente a membrana foi lavada 3x por 5 minutos em TTBS e a fluorescência foi visualizada utilizando o aparelho LI-COR, Odyssey CLx-1390.

4.10.5 Zimografia

Para avaliar se os peptídeos C16 e C28 influenciariam na atividade e níveis de MMP2 e MMP9, o meio condicionado das amostras citadas acima na técnica de “immunoblot” foram submetidas a técnica de zimografia. Para as células HT1080 foi adicionado 500 µl de meio e para as células MDA-MB-231 foi utilizado 250 µl de meio durante as 48 horas durante os tratamentos, esse passo foi realizado com a intenção de concentrar o meio.

Uma vez coletado, o meio foi centrifugado a 7000 RPM por 5 minutos para retirar qualquer célula morta e posteriormente o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Em 30 µl de meio foi adicionado 15 µl do tampão para amostra não reduzida (0.2 g de SDS, 5 ml de “Upper buffer” 4x – 84 mM Amediol, 62 mM HCl, 0.02% NaN₃ -, 500 µl de 0.1% de azul de bromofenol, 4 ml de glicerol, 1.100 ml de dH₂O, proporção 1:2).

Para separar as moléculas, foi feito um gel de acrilamida de 7.5%, usando o sistema de corrida “AE-6500 Dual Mini Slab with gel casting set”, ATTO Corporation, Japan e o aparelho PowerPac Basic, BIO-RAD. Para a preparação do gel de 7.5% (1 gel) foi utilizado: 1.5 ml de 30% “Acrylamide/Bis”, 1.5 ml de 4x “Lower gel buffer”, 1.29 ml de 50% “Sucrose”, 1.71 ml de 2.8 mg/ml de gelatina, 40 µl de APS 10% e 4.5 µl de TEMED. Para nivelar o gel 7.5% durante a polimerização foi utilizado uma solução de butanol em H₂O (depositando 300 µl de butanol sobre o gel). Para a preparação do gel 5% “stacking” foi utilizado (receita para 1 gel): 0.433 ml de 30% “Acrylamide/Bis”, 0.642 ml de 4x “Upper gel buffer”, 0.642 ml de 50% “Sucrose”, 0.850 ml de dH₂O, 17

μl de APS 10% e 4.5 μl de TEMED. Após a polimerização completa, o gel foi montado no sistema descrito anteriormente, e os tampões 1x “Lower gel buffer” e 1x “Upper gel buffer” foram adicionados e cada poço foi lavado 3x. Amostras foram aplicadas (30 μl) mais o padrão (4 μl) como controle para a massa molecular. Para a corrida foi aplicado 150 V, 400 mA por 65 minutos.

Após a separação das amostras no gel contendo gelatina, foi realizado 4 lavagens de 15 minutos cada com o tampão de lavagem (1L – 25 ml de Tris-HCl pH7.5, 5 ml de 1M CaCl₂, 25 μl de 1M ZnCl₂, 25 ml de Triton-100X, 10 ml de 2% NaN₃ e 935 ml de dH₂O). Posteriormente o gel foi incubado a 37 °C com o tampão de lavagem para a ativação das metaloproteinases MMP2 e MMP9, para as amostras das células HT1080 a incubação foi de 24 horas e para as amostras das células MDA-MB-231 a incubação foi de 72 horas.

Após a incubação o gel foi corado com uma solução de Coomassie Blue (Coomassie Brilliant Blue R-250, BDH, 443283M) – 500 ml, 0.5 g de Coomassie Blue, 250 ml de Metanol, 100 ml Ácido Acético e 150 ml de dH₂O – por 4 horas para a visualização das bandas de degradação. Em seguida o gel foi lavado com uma solução descorante – 1L, 300 ml de Metanol, 10 ml de Ácido Fórmico e 700 ml de dH₂O – 2x por 30 minutos e 1x “overnight”.

No dia seguinte o gel foi escaneado e posteriormente secado, utilizando folhas de Cellophane (DryEase Mini Cellophane, Novex by life Techonologies, NC2380) mais a solução para secar gel (30% de metanol e 3% de glicerol).

4.10.6 Ensaio de degradação do filme de colágeno

Células HT1080 e MDA-MB-231 foram submetidas ao ensaio de degradação do filme de colágeno na presença dos peptídeos C16 e C28 com seus respectivos peptídeos controles C16SX e C28SX na presença de DMEM F12 + 0.5% SFB + antibióticos. Como controles foram utilizados: 0.5% SFB, 0.5% SFB + CT1746 10 μM, 10% SFB, 10% SFB + CT1746 10 μM e DMSO.

Para a preparação do filme de colágeno, foi realizado uma mistura de 0.9 ml de PureCol (Advanced BioMatrix, 5005) + 0.9 ml de Type-I-A (Cellmatrix, 637-00653) adicionando em um tubo de 50 ml (cuidando para não fazer bolhas). Em seguida foi

adicionado 200 µl de meio RPMI concentrado 10x, esse passo serve para visualizar a coloração e para a posterior correção do pH onde utilizou-se uma solução de 1M NaOH (~43 µl) até a solução ficar rosada (~pH 7.2). A concentração final da solução de colágeno precisa ser ~2.7 mg/ml (o volume de 1.8 ml serve para aproximadamente 10 poços em uma placa de 12 poços). Todo o processo foi realizado sobre o gelo para que não ocorresse a polimerização do colágeno (4°C).

Sobre os poços (Corning CellBIND Surface, Costar, 3336) foi primeiramente depositado 800 µl da solução de colágeno espalhando todo conteúdo sobre o poço e posteriormente foi removido 700 µl. Esse passo auxilia a criar uma superfície plana por toda a base do poço. Em seguida a placa ficou aberta a temperatura ambiente por 15 minutos dentro do fluxo para a evaporação do ácido acético presente no colágeno. Para a completa polimerização do colágeno, levou-se a estufa a 37 °C por 3 horas.

As células MDA-MB-231 e HT1080, primeiramente foram tripsinizadas, contadas (1×10^5) e plaqueadas sobre o filme de colágeno utilizado DMEM F12 + 10% SFB por 3 horas para adesão total das células ao substrato. Em seguida os poços foram lavados uma vez com PBS 1x e em seguida foi depositado DMEM F12 + 0.5% SFB em todos os poços (exceto grupos tratados com 10% de SFB) seguidos dos tratamentos peptídicos e não peptídicos. O ensaio de degradação do filme de colágeno teve duração de 72 horas.

Após 72 horas o filme de colágeno foi tripzinizado “overnight” (dependendo da célula é extremamente difícil retira-la do colágeno) seguido da fixação com 3.7% de formaldeído em PBS 1x por 30 minutos.

Uma vez fixado o filme, foi utilizado uma solução de Coomassie blue + uma solução descorante (1:1) por 20 minutos para a coloração do filme, seguido de 3 lavagens com a solução descorante por 10 minutos cada.

Foram obtidas 12 imagens de cada poço aleatoriamente (aumento de 20x) e a quantificação da área de degradação foi analisada pelo “software” ImageJ.

4.10.7 FRET – “Fluorescence Resonance Energy Transfer”

Durante os experimentos realizados, o peptídeo C16 promoveu nas células HT1080 um aumento da degradação do filme de colágeno e aumento da degradação da gelatina, ativação de MMP2, e aumento dos níveis de MMP9. Posteriormente, fomos analisar se o peptídeo C16 poderia promover a dimerização de MT1-MMP em células HT1080 sobre o filme de colágeno utilizando a técnica de FRET.

- Transfecção

Células HT1080 foram plaqueadas (5×10^4) sobre uma placa contendo 12 poços por 24 horas utilizando o meio DMEM F12 + 10% SFB. Posteriormente em um tubo de 1.5 ml foi adicionado 100 μ l de OPTI-MEM I 1x (Gibco by Life Technologies, 31985-062). Nesse tubo de 1.5 ml, também foi adicionado 0.5 μ g de plasmídeo seguido da adição de 3 μ l de TransIT®-2020 Reagent (Mirus, MIR 5400). Agitou-se gentilmente e em seguida a solução foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Os volumes descritos acima são relacionados para um único poço.

Para observar se o peptídeo C16 desencadearia a dimerização de MT1-MMP, foram utilizados 3 plasmídeos, “MT1F–Sapphire”, MT1F- Δ Cat e MT1F–mRFP1 que foram construídos e fornecidos pelo Prof. Yoshifumi Itoh, do Instituto de Reumatologia da Universidade de Oxford, Reino Unido.

“MT1F-Sapphire” e MT1F-mRFP1 atuam como pares para o FRET. Como controle para o FRET, foi inserido um plasmídeo mutante (MT1F- Δ cat) no qual a região Tyr¹¹²–Pro³¹² onde está o centro catalítico encontra-se deletada, além disso, há uma região FLAG possível de marcação com anticorpo (DYKDDDDK). A homodimerização de MT1-MMP foi caracterizada por FRET, onde a absorbância a 405 nm excita simultaneamente “MT1-MMP-Sapphire” e MT1-MMP mRFP, mostrando que essas moléculas estão em distância <10nm.

Os grupos formados para esse experimento foram: “MT1F–Sapphire” + MT1F- Δ Cat, MT1F–mRFP1 + MT1F- Δ Cat, “MT1F–Sapphire” + MT1F–mRFP1 + peptídeo C16, “MT1F–Sapphire” + MT1F–mRFP1 + peptídeo C16SX e “MT1F–Sapphire” + MT1F–mRFP1.

Após os 30 minutos, as soluções contendo os plasmídeos foram adicionadas sobre os poços em gotas espalhadas gentilmente. A placa foi agitada gentilmente, nunca em movimentos circulares e colocadas a 37 °C durante 24 h.

- Filme de colágeno

Dando prosseguimento ao experimento utilizou-se lâminas Chamber Slide System (LAB-TEK II, 154526), onde primeiramente 5 poços foram cobertos com 50 µl de filme de colágeno (protocolo do filme de colágeno descrito anteriormente) e deixado para polimerizar a 37 °C por 3 horas. Após a polimerização do colágeno, as células transfectadas foram tripsinizadas, contadas (0.8×10^4 por poço) e plaqueadas com DMEM F12 + 10% SFB por 3 horas para a adesão aos substratos. Passado 3 horas, as células foram lavadas com PBS 1x e foi adicionado DMEM F12 + 0.5% SFB junto com os peptídeos C16 e C16SX (100 µg/ml) por 24 h.

Após 24 horas, as células foram fixadas utilizando formaldeído 3.7% por 15 minutos e deixadas em uma solução de PBS 1x mais 0.02% de Azida (foi utilizado parafilme para isolar as lâminas e papel alumínio para a proteção contra a luz) a 4°C até o dia da análise.

No dia da análise a lâmina foi montada em uma solução de glicerol 8% e vedada com esmalte.

- Análise

As imagens fluorescentes das células foram tiradas nos canais “Sapphire-GFP” (405/520), mRFP1(555/640) e FRET (405/640). As imagens obtidas foram utilizadas para calcular o N^{FRET} seguindo o protocolo estabelecido pelo Professor Yoshifumi Itoh (ITOHO et al., 2011).

4.11 Análise estatística

Dados obtidos a partir dos experimentos foram analisados usando o “software” GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). “Teste t de Student” foi utilizado para avaliar diferenças entre dois grupos. Diferenças entre múltiplos grupos foi analisada por análise de variância, seguida de teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Diferenças entre achados de imuno histoquímica e ensaios com “zebrafish” foram estimadas através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis usando o pós-teste de Dunn. Resultados significantes foram considerados quando $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Aumento das cadeias alfa1, beta1 e alfa1 da laminina *in vivo*

As lamininas exercem papéis importantes na morfogênese e homeostase tecidual por regular a arquitetura tecidual, adesão celular, espraçamento, sinalização celular, migração, proliferação e crescimento de neuritos (HAMILL et al., 2009; MALINDA; KLEINMAN, 1996; MALINDA et al., 2008). Além do papel que as lamininas exercem em tecidos normais, algumas de suas atividades já foram relacionadas a importantes eventos da progressão tumoral, como foi descrito acima.

Análise imuno histoquímica revelou maior marcação para a cadeia alfa1 da laminina no carcinoma ductal invasivo (CDI) e carcinoma metastático de linfonodo (CML) em comparação a mama normal (Figura 1A). Esse dado foi confirmado por quantificação da fração de área marcada (Figura 1B). Análise da cadeia alfa1 da laminina levando-se em conta a classificação molecular do câncer de mama, demonstrou um aumento significativo da marcação no câncer do tipo “luminal B” (presença de receptores para progesterona, estrógeno e “HER2”, triplo positivo) e “basal-like” (ausência de receptores para progesterona, estrógeno e “HER2”, triplo negativo) em relação a mama normal (Figura1C).

Figura 1

Figura 1 – Marcação da cadeia alfa1 da laminina no câncer de mama. Marcação imuno histoquímica para a cadeia alfa1 da laminina em amostras de carcinoma ductal invasivo (CDI), carcinoma metastático de linfonodo (CML) e mama normal (**A**). Análise estatística demonstra um aumento significativo da marcação para a cadeia alfa1 da laminina no carcinoma ductal invasivo (CDI) em comparação com a mama normal (**B**). Classificação molecular mostra um aumento da marcação da fração da área para a cadeia alfa1 da laminina nos subtipos tumorais “luminal B” e “basal-like” comparados com a mama normal (**C**). Asteriscos indicam resultados significantes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). n: número de amostras. Barra da escala: 20 μm .

B) Quantificação

C) Classificação molecular

Figura 1 – Marcação da cadeia alfa1 da laminina no câncer de mama

A cadeia beta1 da laminina apresentou intensa marcação para o carcinoma metastático de linfonodo (CML) em comparação a mama normal (Figura 2A). Análise estatística demonstrou aumento da marcação para a cadeia beta1 da laminina em carcinoma ductal invasivo (CDI) em relação a mama normal, já o carcinoma metastático de linfonodo (CML) apresentou duas vezes mais aumento da marcação para a cadeia beta1 da laminina comparado com mama normal (Figura 2B). Na classificação molecular, tumores do tipo “luminal A” (presença de receptores para progesterona, estrógeno e ausência de receptor para “HER2”), “HER2+” (ausência de receptores para progesterona e estrógeno com presença de receptor para “HER2”) e “basal-like” (ausência de receptores para progesterona, estrógeno e “HER2”, triplo negativo) tiveram a marcação para a cadeia beta1 significativamente maior em relação a mama normal (Figura 2C).

Figura 2

Figura 2 – Marcação da cadeia beta1 da laminina no câncer de mama. A cadeia beta1 da laminina também está presente no carcinoma ductal invasivo (CDI), carcinoma metastático de linfonodo (CML) e mama normal (**A**). Quantificação da fração da área marcada demonstrou um aumento de duas vezes da cadeia beta1 no carcinoma metastático de linfonodo (CML) em comparação com a mama normal (**B**). Na classificação molecular os subtipos de carcinoma, “luminal A”, “HER2+” e “basal-like” exibem intensa marcação da cadeia beta1 da laminina em comparação a mama normal (**C**). Asteriscos indicam resultados significantes (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$). n: número de amostras. Barra da escala: 20 μm .

Figura 2 – Marcação da cadeia beta1 da laminina no câncer de mama

Também demonstramos através da reação de imuno histoquímica a marcação para cadeia gama1 da laminina em carcinoma ductal invasivo (CDI) e carcinoma metastático de linfonodo (CML) (Figura 3A). Quantificação da marcação para a cadeia gama1 da laminina demonstrou aumento da cadeia gama1 em carcinoma ductal invasivo (CDI) e carcinoma metastático de linfonodo (CML) em comparação a mama normal (Figura 3B). Análise da marcação para a cadeia gama1 da laminina, na classificação molecular do câncer de mama, demonstrou um aumento significativo da cadeia gama1 da laminina em todos os tipos câncer de mama (Figura 3C), com exceção do carcinoma tipo “luminal B HER2+” (presença de receptor para progesterona, ausência de receptor de estrógeno e presença de receptor para “HER2”).

Soro dos animais (coelho ou camundongo) nas mesmas concentrações utilizadas para os anticorpos contra as cadeias alfa1, beta1 e gama1 da laminina foram utilizados como grupos controles em cortes de mama normal e câncer de mama para as reações de imuno histoquímica. Resultados obtidos nestes ensaios não demonstraram nenhuma marcação significativa em relação aos demais grupos (dados não apresentados).

Figura 3

Figura 3 – Marcação da cadeia gama1 da laminina no câncer de mama. Imuno histoquímica para a cadeia gama1 da laminina no câncer de mama e mama normal (**A**). A área da gama1 no carcinoma ductal invasivo (CDI) e carcinoma metastático de linfonodo (CML) são significativamente maiores em relação a mama normal (**B**). Com exceção do subtipo tumoral “luminal B HER2+”, todos os demais carcinomas apresentam marcação significativa para a cadeia gama1 da laminina comparado com a mama normal (**C**). Asteriscos indicam resultados significantes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). n: número de amostras. Barra da escala: 20 μm .

B) Quantificação

C) Classificação molecular

Figura 3 – Marcação da cadeia gama1 da laminina no câncer de mama

5.2 Clivagem da laminina *in vitro* por células tumorais derivadas do câncer de mama

Cada cadeia da laminina possui massa molecular entre 200 - 400 kDa. Após clivagem enzimática, essa molécula apresenta, entre diversas outras, bandas de 200 kDa (fragmento E8, que contém o peptídeo SIKVAV), de 300 kDa (fragmento E1, onde C16 está presente) e de 55 kDa (módulo LG4, onde o peptídeo AG73 está localizado) (AUMAILLEY et al., 2005; HAMILL et al., 2009). Todos esses peptídeos presentes desses fragmentos possuem efeitos biológicos (DUBEY; SINGODIA; VYAS, 2010; NOMIZU et al., 1997; NOMIZU et al., 2001) e foram estudados pelo nosso grupo (FREITAS; JAEGER, 2002; FREITAS et al., 2004; FREITAS et al., 2007; GAMA-DE-SOUZA et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2016; SMUCZEK et al., 2017).

Utilizamos células derivadas do câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7. Células MCF-10A, derivadas de mama normal, serviram como células controles. As células foram plaqueadas sobre Matrigel por 24 horas. O objetivo desse experimento foi investigar se as células tumorais teriam a capacidade de degradar o Matrigel e, consequentemente, seu componente principal, que é a laminina-111. Em seguida, tanto o lisado como o meio condicionado foram submetidos a eletroforese em gel seguido de “immunoblot” visando detectar as cadeias $\alpha 1$ (alfa1), $\beta 1$ (beta1) e $\gamma 1$ (gama1) da laminina.

A Figura 4A mostra que o meio condicionado e o lisado celular das células MDA-MB-231 exibem as cadeias alfa1, gama1 e beta1 da laminina com suas massas moleculares em torno de ~400 kDa, ~220 kDa e ~200 kDa (seta preta) respectivamente. Adicionalmente são observadas bandas de massas moleculares menores no meio condicionado (seta cinza).

Células MCF-7 também foram plaqueadas sobre Matrigel (Figura 4B) podendo ser observado as cadeias que compõem a laminina-111 com suas respectivas massas moleculares ~400 kDa, ~220 kDa e ~200 kDa (seta preta). Em comparação com as células MDA-MB-231 foi observado somente uma banda com massa molecular de aproximadamente 60 kDa (seta cinza) na canaleta da cadeia gama1 do meio condicionado das células MCF-7.

Como controle das células tumorais, células MCF-10A não tumorais também foram plaqueadas sobre Matrigel e analisadas (Figura 4C) observando somente as cadeias alfa1, gama1 e beta1 da laminina (seta preta), sem nenhuma fragmentação visível. Para avaliar se as células MDA-MB-231 estavam realmente clivando a laminina-111, essas mesmas células foram submetidas ao mesmo ensaio usando dessa vez a laminina-111 purificada. Fragmentos observados por “immunoblot” das cadeias alfa1, beta1 e gama1 da laminina apresentam massas moleculares similares aquelas observadas nos ensaios anteriores (Figura Suplementar 1).

Figura 4

Figura 4 – Clivagem das cadeias da laminina *in vitro*. Amostras de células MDA-MB-231 crescidas sobre o Matrigel e submetidas ao ensaio de “immunoblot” exibem as cadeias alfa1, beta1 e gama1 da laminina com suas massas moleculares aproximadas de ~400 kDa, ~220 kDa e ~200 kDa respectivamente (**A**, seta preta). Resultados de fragmentação das cadeias da laminina-111 são observados principalmente no meio condicionado. “Immunoblot” demonstra clivagem das cadeias alfa1, beta1 e gama1 gerando bandas com massas moleculares aproximadas de ~200 kDa, ~70 kDa, 52 kDa e 30 kDa (**A**, seta cinza). As células MCF-7 também foram crescidas sobre o Matrigel apresentando somente uma discreta banda de ~60 kDa (**B**, seta cinza). Além disso observamos as típicas cadeias alfa1, beta1 e gama1 da laminina nessas amostras com as massas moleculares esperadas (**B**, seta preta). Células controle MCF-10A cultivadas sobre o Matrigel apresentam somente a marcação para as massas moleculares das cadeias alfa1, beta1 e gama1 da laminina (**C**, seta preta) sem fragmentações visíveis. Resultados apresentados nessa figura representam pelo menos três experimentos independentes por cada linhagem celular.

Figura 4 – Clivagem das cadeias da laminina *in vitro*

5.3 Análise proteômica *in vitro*

Células MDA-MB-231 podem clivar a laminina resultando bandas com massas moleculares menores (Figura 4A). Em um outro gel as mesmas amostras aplicadas para o ensaio de “immunoblot” foram também aplicadas em um segundo gel para análise proteômica. Bandas representativas da fragmentação da laminina-111 observadas no “immunoblot”, foram separadas no segundo gel que foi corado com Comassie Blue (Figura 5, retângulo pontilhado) e submetidas a análise pela espectrometria de massas (LC-MS/MS). Bandas com massas moleculares iguais foram selecionadas no Matrigel (Figura 5, retângulo contínuo) para servir como grupo controle.

Figura 5

Figura 5 – Amostras submetidas a análise proteômica. As mesmas massas moleculares detectadas na clivagem da laminina previamente (Figura 4A, seta cinza) foram selecionadas no gel de eletroforese corado contendo as mesmas amostras e em seguida foram analisadas por espectrometria de massas (5, retângulos pontilhados). Bandas com as mesmas massas moleculares, contudo correspondentes do grupo Matrigel foram usados como grupo controle (retângulos contínuos).

Figura 5 – Amostras submetidas a análise proteômica

5.4 Clivagem da laminina *in vitro* no câncer de mama libera peptídeos bioativos

Análise proteômica das bandas derivadas da clivagem da laminina por células derivadas do câncer de mama apresentaram 29 peptídeos detectados somente na amostra Matrigel/célula (Figura 6). Entre os peptídeos, 4 (em negrito) contém atividade de adesão já previamente descrita (KIKKAWA et al., 2013). Também observamos a presença do peptídeo C16 (KAFDITYVRL) derivado da cadeia gama1 da laminina (Figura 6, amarelo). Previamente o nosso grupo já demonstrou que esse peptídeo regula a invasão, migração e formação de invadopódios em células tumorais (NASCIMENTO et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2016; SMUCZEK et al., 2017).

Somente peptídeos com significância estatística ($p < 0.05$) da clivagem da laminina foram incluídos nessa análise. Peptídeos encontrados mais de uma vez em diferentes bandas não foram repetidos no diagrama. Além dos peptídeos derivados das cadeias da laminina-111, foram detectados peptídeos derivados da cadeia $\beta 2$ (beta2) e $\beta 4$ (beta4) da laminina. Resultados brutos da análise obtida pela espectrometria de massas podem ser consultados em Dados Suplementares 2. O diagrama da laminina-111 com a liberação dos peptídeos foi desenvolvido e adaptado a partir do trabalho de Kikkawa e seu grupo (KIKKAWA et al., 2013).

Figura 6

Figura 6 – Peptídeos da laminina-111 liberados no câncer de mama *in vitro*. Composta por três cadeias (α , β e γ) a laminina-111 quando clivada por proteases pode expor sítios crípticos com funções biológicas. Um peptídeo é detectado para a cadeia α 1, cinco peptídeos detectados para a cadeia β 1 e 23 peptídeos detectados na cadeia γ 1. Quatro peptídeos (**em destaque**) são conhecidos por suas atividades de adesão celular. O peptídeo C16 destacado em especial (**amarelo**) é um grande regulador de invasão, formação de invadopódio, migração e angiogênese.

Figura 6 – Peptídeos da laminina-111 liberados no câncer de mama *in vitro*

5.5 Clivagem da laminina por células do câncer de mama humano

Amostras derivadas de câncer de mama foram submetidas a análise por eletroforese, “immunoblot” seguido de análise por espectrometria de massas usando amostras de tecido de mama normal como controle.

A clivagem das cadeias alfa1, beta1 e gama1 da laminina foram observadas principalmente no câncer de mama do subtipo “basal-like” comparado com a mama normal (Figura 7A-C). Setas cinzas na Figura 7 indicam possíveis fragmentos da laminina. A cadeia gama1 da laminina apresentou vários possíveis fragmentos com massas moleculares menores em relação as cadeias integras (Figura 7C). Principalmente as amostras derivadas de câncer de mama apresentam massas moleculares esperadas para as cadeias alfa1, beta1 e gama1 (Figura 7A-C, setas pretas).

Figura 7

Figura 7 – Clivagem da laminina-111 em tumores de mama humano. A clivagem da laminina e suas cadeias alfa1, beta1 e gama1 é observada principalmente em tumores mais agressivos do subtipo “basal-like” (**A-C**). As fragmentações da laminina estão indicadas pelas setas cinzas. Diversas fragmentações são observadas para a cadeia gama1 da laminina (**C**). Amostras derivadas do câncer de mama apresentaram típicas massas moleculares para as cadeias alfa1, beta1 e gama1 da laminina (**seta preta**). Não foram observadas fragmentações significantes para as amostras controles de mama normal.

Figura 7 – Clivagem da laminina-111 em tumores humano

A lâmina basal pode ser clivada por metaloproteinases e entre elas as MMPs. Permitindo assim, que as células tumorais consigam invadir os tecidos próximos (BONNANS; CHOU; WERB, 2014; MOTT; WERB, 2004; SCHENK; QUARANTA, 2003). A proteólise da lâmina basal não somente abre caminho para a invasão tumoral assim como pode gerar novas moléculas com atividades biológicas até então ausentes na molécula íntegra (BONNANS; CHOU; WERB, 2014; MOTT; WERB, 2004; RICARD-BLUM; SALZA, 2014; SCHENK; QUARANTA, 2003).

Investigamos se os níveis de algumas MMPs no câncer de mama humano poderiam estar alterados em relação ao tecido normal de mama. Resultados obtidos através do “immunoblot” sugerem que a metaloproteinase de membrana MT1-MMP e a gelatinase MMP9 possuem um aumento dos níveis no câncer de mama em relação a mama normal (Figura 8A). Análise da densitometria das bandas demonstrou que há um aumento significativo de MT1-MMP no câncer de mama em relação a mama normal (Figura 8B). Já a MMP9 não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos (Figura 8C).

Figura 8

Figura 8 – Aumento de MT1-MMP no câncer de mama. Os níveis proteicos de algumas MMPs foram avaliados no câncer de mama e comparados a mama normal. “Immunoblot” sugere que os níveis de MT1-MMP e MMP9 no câncer de mama estão aumentados em relação a mama normal (**A**). Densitometria do gel apresentou um aumento significativo de MT1-MMP comparado com a mama normal (**B**). MMP9 exibe uma tendência ao aumento dos seus níveis, contudo não demonstrou resultado significativo. Asterisco indica resultado significativo (*p <0.05).

Figura 8 – Aumento de MT1-MMP no câncer de mama

5.6 Análise proteômica de amostras de câncer de mama e mama normal

Resultados obtidos anteriormente através do “immunoblot” (Figura 7) demonstram que os tumores de mama dos subtipos “luminal B” e “basal-like”, apresentam possíveis fragmentações das cadeias que compõem a laminina-111 quando comparadas com a mama normal. As mesmas amostras derivadas do câncer de mama e mama normal aplicadas no gel e analisadas por “immunoblot” foram aplicadas em um segundo gel o qual posteriormente foi corado com Comassie blue para a uma melhor visualização das bandas.

Baseando-se nas mesmas massas moleculares da clivagem da laminina-111 observadas anteriormente na Figura 7A-C foram selecionadas no gel corado com Comassie blue as mesmas bandas contendo as mesmas massas moleculares e posteriormente foram submetidas a análise proteômica (Figura 9, retângulo pontilhado). Como controle experimental, as mesmas massas moleculares correspondentes do câncer de mama foram selecionadas nas amostras de mama normal para análise (Figura 9, retângulo contínuo).

Figura 9

Figura 9 – Amostras de câncer de mama submetidas a análise proteômica.

Baseado nos resultados da clivagem da laminina em amostras de tumor de mama e mama normal observados anteriormente (7A-C), as bandas correspondentes da fragmentação da laminina foram selecionadas no gel corado com Comassie blue e submetidas a análise proteômica (retângulo pontilhado). Como controle, bandas das amostras de mama normal nas mesmas massas moleculares foram enviadas para análise (retângulo contínuo).

Figura 9 – Amostras de câncer de mama submetidas a análise proteômica

5.7 Peptídeos liberados no câncer de mama humano

Resultados obtidos através da análise proteômica demonstrou a presença de dois peptídeos com efeitos biológicos desconhecidos (Figura 10). Somente peptídeos estatisticamente significantes derivados do câncer de mama foram incluídos ($p < 0.05$). Análise proteômica também detectou na banda de 120 kDa o peptídeo C16 presente da cadeia gama 1 da laminina (Figura 10, amarelo). Resultados brutos da análise podem ser consultados em Dados Suplementares 3.

Figura 10

Figura 10 – Peptídeos da laminina-111 liberados no câncer de mama humano. Amostras do câncer de mama subtipo “basal-like”, apresentam três peptídeos com resultados estatisticamente significantes. O peptídeo C16 (em destaque) com sucesso foi detectado em amostras de câncer de mama (Dados Suplementares 3). Análise proteômica para a mama normal não apresentou nenhum resultado significativo para as cadeias da laminina-111 (dados não apresentados).

Figura 10 – Peptídeos da laminina-111 liberados no câncer de mama humano

5.8 Síntese dos peptídeos detectados por espectrometria de massas

Peptídeos derivados da clivagem da laminina detectados por LC-MS/MS foram sintetizados comercialmente (EZ Biolab, Westfield, IN, USA) com grau de pureza de 98% (RP-HPLC), sendo que a massa molecular confirmada por espectrometria de massas. Para a síntese foram selecionados 2 peptídeos detectados nas amostras de câncer de mama humano e 4 peptídeos detectados nos ensaios *in vitro* e 1 peptídeo detectado *in vitro* e *in vivo*. Para cada sequência dos peptídeos, foi sintetizado um peptídeo controle com os mesmos aminoácidos, porém com suas sequências embaralhadas (“scrambled”) ou sequência amino-terminal invertida (C16SX).

Tabela 3 – Peptídeos sintetizados.

Peptídeo	Sequência	Observação
A1	KMALYRL	Sequência derivada da cadeia alfa1 da laminina (<i>in vitro</i>).
A1SX	RKLAYLM	Sequência embaralhada do peptídeo A1 (controle).
B31	KITNLRI	Sequência derivada da cadeia beta1 da laminina (<i>in vitro</i>).
B31SX	TRILIKN	Sequência embaralhada do peptídeo B31 (controle).
C28	RVTLNRL	Sequência derivada da cadeia gama1 da laminina (<i>in vitro</i>).
C28SX	LNTRVLR	Sequência embaralhada do peptídeo C28 (controle).
C64	RVSVPILIAQGNSYPSETTVKY	Sequência derivada da cadeia gama1 da laminina (<i>in vitro</i>).
C64SX	AQYPITERSGSKYPSVTLVNV	Sequência embaralhada do peptídeo C64 (controle).
BIV1	RLLDELAGKL	Sequência derivada da cadeia beta1 da laminina (<i>in vivo</i>).
BIV1SX	RKGLLELLAD	Sequência embaralhada do peptídeo BIV1-SX (controle).
BIV2	KAAQNSGAEYIEKV	Sequência derivada da cadeia beta1 da laminina (<i>in vivo</i>).
BIV2SX	EVAEARSNGNAEKQIKY	Sequência embaralhada do peptídeo BIV1-SX (controle).
C16	KAFDITYVRLKF	Sequência derivada da cadeia gama1 da laminina (<i>in vitro e in vivo</i>).
C16SX	FKLRVYTIDFAK	Sequência reversa do peptídeo C16 (controle).

Peptídeos derivados da clivagem da laminina pelas células do câncer de mama e sintetizados para a realização dos ensaios de função biológica. Acima na tabela estão descritos o nome e a sequência de cada peptídeo, se foram detectados em experimentos *in vitro* ou em amostras de câncer de mama de humanos (*in vivo*) além dos nomes e sequências dos peptídeos controles.

5.9 Peptídeos apresentam atividades biológicas de adesão e invasão celular

Peptídeos C16 e C28 possuem atividade de adesão celular já descritos anteriormente (KIKKAWA et al., 2013; NOMIZU et al., 1997). Submetemos as células MDA-MB-231 ao protocolo de ensaio de adesão na presença dos peptídeos citados anteriormente em diferentes concentrações (1-200 µg/ml) para avaliação de dose resposta. Os peptídeos C16 e C28 apresentaram resultados significantes de adesão para as células MDA-MB-231 (Figura 11A). Laminina-111 foi utilizado como controle positivo. Células sem substrato e BSA (albumina de soro bovino) foram usados como controle negativo. Os peptídeos A1, B31, C64, BIV1 e BIV2 também foram submetidos ao ensaio de adesão, porém nenhum desses peptídeos demonstrou atividade de adesão (dados não apresentados).

Além disso, os peptídeos C16 e C28 foram submetidos ao ensaio de invasão celular. Imagens obtidas da membrana demonstram um aumento do número de células MDA-MB-231 na presença do peptídeo C16 comparado ao peptídeo controle (Figura 11B). Resultado significativo foi observado no grupo contendo o peptídeo C16 em relação ao peptídeo C16SX (Figura 11C). Os peptídeos C28 e C28SX não apresentam atividade de invasão significativa. Como esperado o controle positivo de invasão celular contendo 10% SFB, apresenta um aumento significativo de invasão celular.

Figura 11

Figura 11 – Invasão e adesão celular promovidos pelos peptídeos C16 e C28. O peptídeo C16 apresentou resultado significativo de adesão celular para as células MDA-MB-231 em diferentes concentrações, 50, 100 e 200 ($\mu\text{g/ml}$), além disso o peptídeo C28 também promoveu resultado significativo de adesão celular na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$. A laminina-111 foi utilizada como grupo controle positivo. Células não tratadas e BSA 3% foram utilizados como grupo controles negativos (**A**). Células MDA-MB-231 submetidas ao ensaio de invasão por 48 horas apresentaram um aumento de atividade na presença do peptídeo C16 comparado ao peptídeo controle (**B**). Resultados significantes para o grupo contendo o peptídeo C16 foi observado em relação ao seu peptídeo controle, já o peptídeo C28 não apresentou resultados significantes. O controle positivo (SFB 10%), apresentou um forte aumento da invasão celular (**C**). Três experimentos para cada ensaio foram realizados de forma independente. Asteriscos indicam resultados significantes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Aumento 10x.

Figura 11 – Invasão e adesão celular promovidos pelos peptídeos C16 e C28

5.10 Peptídeo C28 promove proliferação celular

Devido aos achados sobre o aumento significativo dos níveis de MT1-MMP no câncer de mama e a fragmentação da laminina além da presença de MMP9, analisamos em seguida a atividade dos peptídeos C16 e C28 no processo de invasão celular e ativação de metaloproteinases como MT1-MMP, MMP2 e MMP9 usando células MDA-MB-231 e HT1080. A obtenção dos resultados descritos a seguir vem do projeto “*Regulação da metaloproteinase MT1-MMP no câncer pelos peptídeos C16 e C28 derivados da clivagem da laminina-111*” que foi financiando pelo Santander e desenvolvido durante o doutorado-sanduíche sob a supervisão do Professor Yoshifumi Itoh, no Instituto de Reumatologia Kennedy da Universidade de Oxford, UK (Dados Suplementares 1).

Para avaliar a capacidade das células tumorais sobre a degradação da gelatina, células MDA-MB-231 e HT1080 foram submetidas ao ensaio de degradação de gelatina fluorescente na presença dos peptídeos C16 e C28 por 16 horas. Células MDA-MB-231 promovem a degradação na gelatina fluorescente somente na presença de SFB 10% e nenhum ponto significativo de degradação foi observado nos demais grupos (Figura 12). Previamente nosso laboratório demonstrou que o peptídeo C16 promove a degradação do substrato de gelatina através das células derivadas do fibrossarcoma (SIQUEIRA et al., 2016). Células HT1080 submetidas ao ensaio de degradação de gelatina demonstra pontos de degradação para os grupos C16, C16SX, C28, C28SX, 0.5% SFB e principalmente SFB 10% (Figura 13). Para uma melhor visualização das células MDA-MB-231 e HT1080, essas foram coradas com faloidina (vermelho) para a visualização do citoesqueleto de actina e DAPI (azul) para a visualização do núcleo e quantificação do número de células.

A quantificação da área de degradação das células MDA-MB-231 sobre o extrato de gelatina fluorescente demonstrou um aumento significativo para o grupo tratado com 10% SFB em relação aos demais grupos. Contudo não foi observado nenhum resultado significativo para os peptídeos C16 e C28 (Figura 14A). Curiosamente um aumento do número de células MDA-MB-231 tratadas com o peptídeo C28 foi observado em relação ao grupo 0.5% SFB, indicando que o peptídeo pode estar influenciando na proliferação celular (Figura 14B).

Na análise de degradação das células HT1080 sobre o extrato de gelatina fluorescente, observamos uma tendência no aumento de degradação na presença do peptídeo C16 em relação ao peptídeo C16SX. O peptídeo C28 não promoveu degradação do substrato (Figura 14C). Contudo, observamos que o peptídeo C28 e C28SX promovem aumento no número das células em relação ao grupo 0.5% SFB, indicando novamente a ação desse peptídeo na proliferação celular (Figura 14D). Fato interessante é que ambos os peptídeos C28 e C28SX apresentam resultados similares.

Figura 12

Figura 12 – Ensaio de degradação de substrato com células MDA-MB-231. Células MDA-MB-231 tratadas com 10% SFB promovem a degradação da gelatina fluorescente após 16 horas, contudo os demais grupos tratados com os peptídeos C16, C28 e 0.5% SFB não apresentam diferenças significantes nos pontos de degradação. O peptídeo C28 promove um aumento no número de células. Aumento 10x. Barra da escala 50 μ m. Ensaio realizado em triplicata.

Figura 12 – Ensaio de degradação de substrato com células MDA-MB-231

Figura 13

Figura 13 – Ensaio de degradação de substrato com células HT1080. Células HT1080 com 10% SFB promovem uma alta taxa de degradação da gelatina fluorescente após 16 horas. O peptídeo C16 promove uma baixa taxa de degradação em relação ao grupo tratado com 10% de SFB. Peptídeo C28 e C28SX promovem um aumento da proliferação celular. Aumento 10x. Barra da escala 50 μ m. Ensaio realizado em triplicata.

Figura 13 – Ensaio de degradação de substrato com células HT1080

Figura 14

Figura 14 – Peptídeo C28 promove aumento no número de células tumorais. A área de degradação do ensaio de gelatina fluorescente foi quantificada em relação ao número de células MDA-MB-231 ou HT1080. Células MDA-MB-231 não apresentam diferença estatística da área de degradação para os grupos tratados com os peptídeos C16 ou C28 (**A**). Células MDA-MB-231 tratadas com o peptídeo C28 tem aumento da proliferação em relação ao grupo tratado com 0.5% de SFB (**B**). Células HT1080 tratadas com o peptídeo C16 demonstra uma tendência na degradação da gelatina fluorescente em relação ao peptídeo C16SX. Células HT1080 tratadas com o peptídeo C28 não apresentam resultados significantes para a degradação da gelatina (**C**), contudo, células HT1080 tratadas com o peptídeo C28 exibem aumento significativo no número de células (**D**). Asteriscos indicam resultados significantes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

MDA-MB-231

HT1080

Figura 14 – Peptídeo C28 promove aumento no número de células tumorais

5.11 Peptídeos C16 e C28 derivados da laminina promovem alteração dos níveis e na atividade das MMPs em células tumorais

Durante a migração e invasão as células tumorais ativam diversas metaloproteinases para auxiliar nesses processos entre elas estão as MT1-MMP, MMP2 e MMP9 podendo formar um complexo que auxilia na degradação de substratos como o colágeno (ITOH et al., 2003; ITOH, 2006; ITOH et al., 2011). Para avaliar se os peptídeos C16 e C28 derivados da laminina poderiam influenciar nos níveis de MT1-MMP e na atividade de MMP2 e MMP9 em células tumorais, células MDA-MB-231 e HT1080 foram tratadas com os peptídeos C16 e C28 por 48 horas. Em seguida o lisado celular e o meio condicionado foram analisados pela técnica de “immunoblot” e zimografia respectivamente. Como controle positivo para a ativação de MMP2 e aumento dos níveis de MT1-MMP foi utilizado o colágeno I (50 µg/ml). Como controle de inibição da ativação de MMP2 foi utilizado o inibidor de atividade de MMPs CT1746 (10 µM). Além disso células contendo 0.5% SFB e 10% SFB também serviram como controles.

Células MDA-MB-231 tratadas com os peptídeos C16 e C28 apresentam um aumento dos níveis de MT1-MMP em relação ao grupo tratado somente com 0.5% SFB (seta preta). Interessante observar que os peptídeos C28 e C28SX promovem um aumento dos níveis de uma proforma de MT1-MMP. Observamos também um aumento dos níveis do domínio hemopexina da MT1-MMP (fragmento) nas células tratadas com o peptídeo C28 em relação aos demais grupos (seta branca). No ensaio de zimografia as células MDA-MB-231 apresentam baixos níveis de MMP2 e MMP9 e baixa atividade de degradação de gelatina (Figura 15). O grupo de células MDA-MB-231 tratadas com colágeno tipo I não promoveram ativação de MMP2 como esperado, contudo esse resultado já foi previamente descrito para essa célula (MAJKOWSKA et al., 2017).

Figura 15

Figura 15 – C28 aumenta os níveis de pro-MT1-MMP em células MDA-MB-231. Células MDA-MB-231 tratadas com os peptídeos C16 e C28 por 48 horas e analisadas por “immunoblot” apresentam um aumento dos níveis de MT1-MMP em relação a células tratadas com 0.5% SFB (seta preta). Análise pela técnica de zimografia do meio condicionado dessas células tratadas com os peptídeos C16 e C28 não demonstrou alteração dos níveis ou alteração da atividade de MMP9 ou MMP2.

MDA-MB-231

Figura 15 – C28 aumenta os níveis de pro-MT1-MMP em células MDA-MB-231

Nas células HT1080 observamos uma diminuição dos níveis de MT1-MMP nos grupos tratados com os peptídeos C16 e C16SX em relação aos demais grupos controles (seta preta), contudo é possível observar um aumento no fragmento do domínio hemopexina da MT1-MMP para o grupo tratado com o peptídeo C16 que se repetiu solidamente em outros experimentos (seta branca). Por sua vez os peptídeos C28 e C28SX promovem um aumento dos níveis de MT1-MMP (latente e ativo) em relação aos grupos tratados com 0.5% SBF e 10% SFB, contudo não há indício de aumento dos níveis do domínio hemopexina da MT1-MMP nesses grupos. Na análise da atividade de MMP2 e MMP9 das células HT1080 sobre a gelatina no ensaio de zimografia, observamos que ocorre um aumento da quantidade e da atividade da MMP9 na presença dos peptídeos C16 e C16SX. Além disso, nos grupos tratados com os peptídeos C16, C16SX, C28 e C28SX observamos a presença de uma banda em uma proforma de MMP2 localizado logo abaixo da MMP2 latente, sugerindo que os peptídeos auxiliam na produção de uma proforma da MMP2 com massa molecular aproximada de ~70 kDa. Também é possível observar que o peptídeo C16 promove a ativação de MMP2 (67 kDa), podendo ser comparado com o grupo controle positivo tratado com colágeno tipo I. O colágeno tipo I é um controle que foi padronizado e descrito na literatura e que promove a ativação de MMP2 em células de fibrossarcoma, HT1080 (MAJKOWSKA et al., 2017) (Figura 16).

Figura 16

Figura 16 – C16 e C28 promovem alterações nos níveis e na atividade das MMPs.

“Immunoblot” demonstrou que o peptídeo C16 promove um aumento do fragmento hemopexina de MT1-MMP (seta branca) contudo os níveis de MT1-MMP ativo e latente foram reduzidos inclusive nas células tratadas com o peptídeo C16SX (seta preta). Zimografia demonstrou que os peptídeos C16 e C16SX promovem ao mesmo tempo um aumento dos níveis de MMP9, formação da proforma de MMP2 (~70 kDa, seta branca). Além disso, o peptídeo C16 promoveu a ativação de MMP2 (67 kDa) assim como foi observado no grupo controle positivo Colágeno I 50 µg/ml. “Immunoblot” das células HT1080 tratadas com o peptídeo C28 e C28SX demonstrou um aumento dos níveis de MT1-MMP (seta preta). Meio condicionado analisado pela técnica de zimografia demonstrou que os peptídeos C28 e C28SX promovem a formação de uma proforma da MMP2 (~70 kDa, seta branca), mas não a ativação dessa metaloproteinase.

HT1080

Figura 16 – C16 e C28 promovem alterações nos níveis e na atividade das MMPs

5.12 Degradação do filme de colágeno pelas células HT1080 na presença do peptídeo C16

Para que ocorra degradação de colágeno do tipo I é necessário que ocorra a ativação de MMP2 e a dimerização de MT1-MMP (ITOH, 2006; ITOH et al., 2011). Nossos resultados demonstram que o peptídeo C16 da laminina promove aumento do fragmento hemopexina de MT1-MMP além de promover a ativação de MMP2 nas células derivadas de fibrossarcoma HT1080. Com base nesses resultados obtidos em seguida analisamos se as células HT1080 e MDA-MB-231 tratadas com os peptídeos C16 e C28 promoveriam a degradação do filme de colágeno.

Células HT1080 tratadas com o peptídeo C16, 05% SFB e DMSO promovem a degradação do filme de colágeno (Figura 17A). Importante observar que as células HT1080 tratadas com os peptídeos C28 e C28SX não promovem a degradação do colágeno, contudo observamos uma alta taxa de adesão celular sobre o filme de colágeno (pontos escuros). Células MDA-MB-231 tratadas com os peptídeos C16 e C28 não apresentaram qualquer atividade de degradação ou adesão sobre o filme de colágeno (dados não apresentados).

Imagens do ensaio de degradação do filme de colágeno com células HT1080 foram obtidas e quantificadas. Análise estatística demonstra um aumento da atividade de degradação das células HT1080 tratadas com o peptídeo C16 sobre o filme de colágeno pelo menos duas vezes maior em relação aos grupos controles 0,5% SBF e DMSO (Figura 17B).

Figura 17

Figura 17 – Aumento da degradação do colágeno por células HT1080 tratadas com C16. Células HT1080 tratadas com o peptídeo C16, 0.5% SFB e DMSO, promovem a degradação do filme de colágeno em diferentes dimensões (**A**). Já o peptídeo C28 promoveu aumento da taxa de adesão e proliferação celular. Análise estatística demonstra que o peptídeo C16 aumenta em 2x a degradação do filme de colágeno em relação aos grupos controle 0.5% SFB e DMSO (**B**). Barra da escala 50 μm . Asteriscos indicam resultados significantes (***) $p < 0.001$).

Figura 17 – Aumento da degradação do colágeno por células HT1080 tratadas com C16

5.13 Localização da dimerização de MT1-MMP em células HT1080 analisada por FRET

Durante o ensaio de degradação do filme de colágeno as células HT1080 tratadas com o peptídeo C16 promoveram um aumento significativo da degradação do colágeno, além disso, obtivemos resultados consistentes na ativação de MMP2 através do ensaio de zimografia. A dimerização de MT1-MMP é um passo importante na clivagem do colágeno I. Para visualizar os pontos de dimerização em células HT1080, previamente foram desenvolvidos dois plasmídeos que aumentam os níveis de MT1-MMP nas células HT1080, além disso, um desses plasmídeos possui “Sapphire-GFP” (405/520) e o outro possui mRFP1(555/640). A homodimerização de MT1-MMP é caracterizada por FRET, onde a absorção a 405 nm excita simultaneamente “MT1-MMP-Sapphire” e MT1-MMP-mRFP1, mostrando que essas moléculas estão em distância <10nm.

Tendo como base os resultados obtidos das células HT1080 na presença do peptídeo C16, resolvemos avaliar se a localização da dimerização de MT1-MMP nas células HT1080 sobre o filme de colágeno seria alterada na presença do peptídeo C16 e C16SX.

Células HT1080 transfectadas com os plasmídeos “MT1-MMP-Sapphire-GFP” e MT1-MMP-mRFP1 foram plaqueadas sobre o filme de colágeno. Posteriormente essas células foram tratadas com os peptídeos C16 e C16SX. Como controle foram utilizadas as mesmas células, porém sem qualquer tratamento. Além disso, células HT1080 sem tratamento peptídico transfectadas com um plasmídeo de deleção do domínio catalítico para MT1-MMP (MT1F- Δ Cat) mais os plasmídeos MT1-MMP-“Sapphire-GFP” ou MT1-MMP-mRFP1 também foram utilizadas como controle de análise do FRET (dados não apresentados para o plasmídeo de deleção).

Células tratadas com os peptídeos C16 e C16SX apresentam alteração da morfologia em relação as células normais, além disso, foi observado uma maior presença de filopódios das células HT1080 sobre o filme de colágeno. Nas células HT1080 tratadas com o peptídeo C16 observamos que a dimerização de MT1-MMP na área central tem uma diminuição considerável seguido de um leve aumento na borda celular, em relação ao peptídeo C16SX e as células sem tratamento (Figura 18, seta branca). Para analisar a intensidade da dimerização de MT1-MMP em

determinados pontos das células HT1080, foi criado uma escala de cores onde a cor vermelha representa um aumento dos pontos de dimerização, por sua vez, a cor azul demonstra que a dimerização de MT1-MMP na célula não ocorreu.

Figura 18

Figura 18 – Dimerização de MT1-MMP analisada por FRET em células HT1080.

Células HT1080 sobre o filme de colágeno e tratadas com os peptídeos C16 e C16SX apresentam um aumento de formação de filopódios em relação as células sem tratamento. Além disso, análise por FRET demonstra que o peptídeo C16 promove uma menor dimerização de MT1-MMP na região central, possivelmente direcionando a dimerização da metaloproteinase para as bordas da célula (seta branca). Barra da escala 20 μm .

Figura 18 – Dimerização de MT1-MMP analisada por FRET em células HT1080

5.14 Peptídeo C16 derivado da laminina aumenta o desenvolvimento tumoral em modelo xenográfico

O peptídeo C16 pode induzir metástase pulmonar em camundongos (KURATOMI et al., 2002). Analisando se peptídeos derivados da clivagem da laminina possuem efeitos biológicos *in vivo*, células MDA-MB-231 previamente coradas e posteriormente tratadas com os peptídeos C16 ou C28 (100µg/ml) foram injetadas na veia cardinal comum (CCV) de embriões de “zebrafish”. Peptídeos C16SX, C28SX e células sem tratamento foram utilizados como grupos controles.

Células do câncer de mama tratadas com o peptídeo C16 apresentam um aumento no número de colônias tumorais nos embriões de “zebrafish” em comparação ao grupo controle (Figura 19A). Além disso, diferenças no tamanho e migração das colônias também são observadas quando a imagem é ampliada (Figura 19A, quadrado pontilhado). Células tratadas com o peptídeo C28 não apresentaram diferença no número de colônias em relação aos grupos controles (dados não apresentados).

Avaliação do diâmetro dos tumores demonstra que o peptídeo C16 promove um aumento significativamente em relação ao peptídeo C16SX e as células sem tratamento. Já o peptídeo C28 não apresentou diferença significativa em relação ao peptídeo C28SX, contudo observamos resultado significativo em relação as células não tratadas (Figura 19B).

Figura 19

Figura 19 – Peptídeo C16 promove o desenvolvimento do câncer de mama *in vivo*. Imagens de embriões de “zebrafish” transgênico Tg (fli1:egfp) após 4 dias da injeção das células MDA-MB-231 (coradas em laranja) tratadas com os peptídeos C16 ou C16SX. Imagens abaixo das figuras representam ampliação dos quadrados pontilhados para uma melhor visualização dos tumores. Cabeça de setas indicam os tumores formados pelas células MDA-MB-231 em diferentes partes do embrião (**A**). Análise estatística mostrou que o peptídeo C16 promove um aumento da área tumoral (μm) comparado com o peptídeo C16SX e as células não tratadas. O peptídeo C28 apresentou aumento significativo em relação as células não tratadas (**B**). Asteriscos indicam resultados significantes (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$). Barra da escala da embriões = 100 μm . Barra da escala do aumento = 50 μm .

A)

Figura 19 – Peptídeo C16 promove o desenvolvimento do câncer de mama *in vivo*

5.15 Diagrama resumindo nossos resultados

Com base nos resultados obtidos e apresentados até o momento, propomos um diagrama resumido a formação dos peptídeos derivados da clivagem das cadeias da laminina-111 através da ação de MT1-MMP (Ilustração 3). Entre os diversos peptídeos detectados, está o peptídeo C16. Esse peptídeo possivelmente interagiria com receptor do tipo integrina (SIQUEIRA et al., 2016). Essa interação C16-receptor promoveria atividades biológicas de adesão, migração, invasão e metástase.

Ilustração 3

Ilustração 3 – Modelo esquemático da clivagem da cadeia gama1 da laminina.

Reação imuno histoquímica para a cadeia gama1 da laminina no carcinoma ductal invasivo de mama mostra uma intensa marcação nas células tumorais e em destaque uma intensa marcação da cadeia gama1 da laminina presente na lâmina basal que circunda o tumor **(A)**. Partes dessa lâmina basal contém áreas descontínuas (seta azul). Ampliação da área onde ocorre a invasão celular **(B)**. MT1-MMP está presente na membrana das células tumorais promovendo a clivagem da cadeia gama1 da laminina e liberando os peptídeos bioativos. Entre os peptídeos observamos C16, que se liga nas células tumorais, possivelmente através da integrina beta1. Essa interação promoveria atividades biológicas de adesão, migração, invasão e metástase **(C)**. Barra da escala 20 μm .

Ilustração 3 – Modelo esquemático da clivagem da cadeia gama1 da laminina

6 DISCUSSÃO

Nosso trabalho demonstra que a laminina-111 e suas respectivas cadeias alfa1, beta1 e gama1 sofrem processamento proteolítico em tumores de mama humano e com células de câncer de mama subtipo “basal-like” (MDA-MB-231, triplo negativo). Análise proteômica mostrou que entre os diversos peptídeos detectados está a sequência do peptídeo C16 (KAFDITYVRLKF). O peptídeo C16 é um regulador importante da biologia tumoral, que influencia na adesão, migração, secreção de protease, atividade de invadopódios e disseminação celular (GAMA-DE-SOUZA et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2016; SMUCZEK et al., 2017). Além disso na análise proteômica detectou-se o peptídeo C28 em ensaio *in vitro* que possui atividade de adesão celular (KIKKAWA et al., 2013; NOMIZU et al., 1997) e pela primeira vez demonstramos a atividade de proliferação celular promovida por esse peptídeo. Ao nosso conhecimento também essa é a primeira descrição da presença do peptídeo C16 em sítios tumorais *in vitro* e em amostras de tumores de mama humano.

A liberação do peptídeo C16 para os sítios tumorais provavelmente está relacionado com o aumento das cadeias da laminina-111 nos tumores de mama. Análise imuno histoquímica demonstrou que a marcação para as cadeias alfa1, beta1 e gama1 da laminina nos tumores de mama são significativamente maiores em comparação a mama normal. Além disso, quando observamos o câncer de mama subtipo “basal-like” as cadeias que compõem a laminina-111 possui uma marcação ainda maior em relação a mama normal. Acreditamos que quanto mais agressivo for o tumor de mama, maior é a quantidade dessa glicoproteína.

Diversas funções são atribuídas a laminina para a regulação de um fenótipo maligno (ADAIR-KIRK et al., 2005; AUMAILLEY, 2013; ROUSSELLE; BECK, 2013). A literatura demonstra que essa glicoproteína pode promover o crescimento tumoral, adesão celular e metástase em diferentes modelos tumorais *in vitro* e *in vivo* (CAPUANO; JAEGER, 2004; FREITAS; JAEGER, 2002; NASCIMENTO et al., 2011; NOMIZU et al., 1997; NOMIZU et al., 2001; SIQUEIRA et al., 2016; SMUCZEK et al., 2017).

Nossos resultados bioquímicos possuem correlação com achados na imuno histoquímica. Amostras analisadas por “immunoblot” demonstram uma maior

presença das cadeias da laminina-111 no câncer de mama subtipo “basal-like” proveniente de amostras humanas, além disso, resultados do aumento das cadeias da laminina-111 também foram observados em células derivadas do câncer de mama MDA-MB-231 sobre o Matrigel em ensaios *in vitro*. Tanto as células MDA-MB-231 quanto as amostras derivadas do câncer de mama que possuem uma classificação do subtipo “basal-like”, apresentam um aumento da clivagem das cadeias da laminina-111 gerando diversos fragmentos com massas moleculares menores em relação a massa molecular esperada das cadeias da laminina-111. O remodelamento ou a perda da lâmina basal é uma atividade necessária para que as células tumorais se movam através da matriz extracelular, esse passo inicia a invasão seguido de metástase para regiões distantes do sítio primário (CHAMBERS; WERB, 2015). Além disso a clivagem enzimática da laminina pode gerar diferentes bandas, incluindo uma de 200 kDa (fragmento E8) e outro de 55 kDa (módulo LG4) (AUMAILLEY et al., 2005). Nossos resultados demonstraram que o câncer de mama cliva as cadeias da laminina-111 tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Alguns dos fragmentos gerados possuem massa molecular próxima dos fragmentos descritos anteriormente (AUMAILLEY et al., 2005).

A clivagem da laminina-111 nos levou a investigar possíveis proteases envolvidas nesse processo. A clivagem da matriz extracelular depende da atividade de metaloproteínases, entre elas a MT1-MMP (KOSHIKAWA et al., 2005; WEAVER et al., 2014). Em amostras derivadas de câncer de mama humano do principalmente do subtipo “basal-like” exibem um aumento nos níveis de MT1-MMP em relação a mama normal como foi observado na Figura 8A. Curiosamente, a mesma amostra também apresentou um aumento da clivagem da cadeia gama1 da laminina que é claramente observada na Figura 7C. Sabemos através da literatura que as células MDA-MB-231 que são do subtipo “basal-like” também possuem os níveis de MT1-MMP elevados (MAJKOWSKA et al., 2017).

Imuno histoquímica demonstrou que as cadeias alfa1, beta1 e gama1 da laminina estão significativamente aumentadas nos tumores de mama em relação a mama normal. Nossos resultados *in vitro* e em amostras de câncer de mama humano demonstram que as células derivadas do câncer de mama são capazes de clivar a laminina-111 gerando fragmentos menores. Além disso, análise proteômica *in vitro* e *in vivo* detectou a presença de um total de 31 peptídeos derivados de fragmentos da clivagem da laminina-111. Entre os peptídeos, detectado com sucesso está o peptídeo

C16, que por sua vez promoveu funções biológicas como, adesão, invasão em ensaios *in vitro*, além do desenvolvimento tumoral em ensaios *in vivo*. O peptídeo C28 também foi detectado em ensaios *in vitro*, esse peptídeo promoveu adesão celular e também é capaz de atuar sobre a proliferação celular de células derivadas de fibrossarcoma e câncer de mama. Ao nosso conhecimento esta é a primeira vez que foi detectado a presença de peptídeos derivados da laminina em sítios tumorais *in vitro* e *in vivo*.

Inúmeras funções são atribuídas a laminina, entre elas o fenótipo maligno (ADAIR-KIRK et al., 2005; AUMAILLEY, 2013; ROUSSELLE; BECK, 2013). Ensaios *in vivo* e *in vitro* demonstram características como crescimento, adesão e metástase desencadeada por essa glicoproteína que foram observadas em diferentes modelos de tumorais (CAPUANO; JAEGER, 2004; FREITAS; JAEGER, 2002; NASCIMENTO et al., 2011; NOMIZU et al., 1997; NOMIZU et al., 2001; SIQUEIRA et al., 2016; SMUCZEK et al., 2017). Nós demonstramos que há um aumento significativo da presença das cadeias alfa1, beta1 e gama1 da laminina no câncer de mama comparado a mama normal. Quando os tumores são separados dentro de uma classificação molecular, observamos um aumento significativo da marcação para as cadeias da laminina-111 a medida que os tumores apresentam um fenótipo mais agressivo.

Remodelamento ou perda da lâmina basal é uma atividade necessária para que a célula tumoral possa se mover através da matriz extracelular, que por sua vez pode iniciar o processo de invasão e metástase em sítios distantes (CHAMBERS; WERB, 2015). Ensaios *in vitro* demonstram que a laminina-111 pode ser constantemente fragmentada por células tumorais (ARDINI et al., 2002; AUMAILLEY, 2013; KURATOMI et al., 2002). Nesse trabalho demonstramos que o câncer de mama pode clivar os componentes da membrana basal, principalmente a laminina, formando diferentes fragmentos.

A clivagem das proteínas da matriz extracelular pode revelar sítios com funções desconhecidas. A laminina bem como outras moléculas possuem sítios crípticos funcionais, os quais podem ser expostos por mudança conformacional ou clivagem por proteases como as MMPs (FREITAS et al., 2004; SCHENK; QUARANTA, 2003; SIQUEIRA et al., 2016). Esse processo poderia promover potencialmente a liberação de fragmentos com atividade biológica ou peptídeos (SCHENK; QUARANTA, 2003).

Observamos que MT1-MMP e MMP9 tem um aumento dos níveis moleculares no câncer de mama. A clivagem da matriz extracelular e seu remodelamento dependem da ação das proteases, entre elas MT1-MMP (KOSHIKAWA et al., 2005; WEAVER et al., 2014). Sugerimos que tais proteases são importantes na clivagem da laminina-111 no câncer de mama, com geração de peptídeos bioativos.

Análise proteômica dos fragmentos da laminina identificou 29 peptídeos *in vitro*, 4 desses peptídeos foram previamente descritos com funções biológicas (NOMIZU et al., 1998; NOMIZU et al., 2000; NOMIZU et al., 1997). Além disso, peptídeos da cadeia beta 2 e beta 4 também foram observados (Dados Suplementares 2). O subtipo mais agressivo do câncer de mama humano, “basal-like”, foi submetido a análise proteômica, análise da amostra detectou pelo menos a presença de 3 peptídeos entre eles o peptídeo C16 *in vivo* (Dados Suplementares 3). Nenhum peptídeo derivado das cadeias da laminina-111 foi detectado em amostras de mama normal (dados não apresentados).

Nomizu e seu grupo, demonstraram atividade biológica de adesão para os peptídeos C16, C28, B31 e C64 em células derivadas de fibrossarcoma (NOMIZU et al., 2000; NOMIZU et al., 1997). Nossos resultados demonstram que dos 7 peptídeos sintetizados (Tabela 3) incluindo C16, C28, B31 e C64, somente os peptídeos C16 e C28 apresentaram atividade de adesão para as células derivadas do câncer de mama MDA-MB-231. Em trabalhos anteriores do nosso grupo demonstramos que o peptídeo C16 é um grande regulador da formação dos invadopódios e invasão tumoral (SIQUEIRA et al., 2016; SMUCZEK et al., 2017). Células derivadas do câncer de mama submetidas ao ensaio de invasão apresentam resultados significantes na presença do peptídeo C16 em relação ao seu peptídeo controle (C16SX), já o peptídeo C28 não apresentou nenhum resultado significativo para o ensaio de invasão celular.

O peptídeo C16 proveniente da cadeia gama1 da laminina, promove a invasão de células MDA-MB-231 e HT1080 e formação de invadopódios nas células HT1080 possivelmente através da interação com o receptor de membrana integrina $\beta 1$ (SIQUEIRA et al., 2016; SMUCZEK et al., 2017). Com base nesses dados, células HT1080 tratadas com o peptídeo C16 foram submetidas ao ensaio de degradação de gelatina fluorescente, demonstrando uma pequena degradação de substrato, sem resultado significativo. Para o peptídeo C28 derivado da laminina-111, na literatura

observamos apenas a atividade de adesão de células derivadas de fibrossarcoma HT1080 (NOMIZU et al., 1997). Previamente repetimos o resultado de adesão celular, dessa vez para células MDA-MB-231 (Figura 11A) utilizando o peptídeo C28, contudo, não observamos atividade significativa na degradação do substrato de gelatina fluorescente das células MDA-MB-231 ou HT1080 quando tratadas com o peptídeo. Curiosamente observamos que o peptídeo C28 promoveu a proliferação de ambas as células MDA-MB-231 e HT1080 durante o ensaio de degradação do substrato de gelatina fluorescente durante 16 horas, não somente isso, o peptídeo controle C28SX também promoveu aumento da proliferação celular. Essa aparente não especificidade do peptídeo C28 necessita estudos posteriores.

Para a degradação de substratos como a gelatina presente no ensaio descrito anteriormente, a presença de gelatinases tais como a MMP2 e MMP9 são fundamentais para a degradação do substrato (ITOH, 2006; MAJKOWSKA et al., 2017; WEAVER et al., 2014). Além disso, células MDA-MB-231 e HT1080 são capazes de promover essa degradação da gelatina de formas diferentes (MAJKOWSKA et al., 2017). Quando analisado o meio condicionado das células MDA-MB-231 tratadas com os peptídeos C16 e C28 e submetidas ao ensaio de zimografia, observou-se baixos níveis de MMP2, MMP9 e nenhuma diferença entre os grupos controles. Já o meio condicionado de células HT1080 tratadas com os peptídeos C16 e C28 e analisadas pela técnica de zimografia apresentaram a formação de uma proforma de MMP2 com massa molecular aproximado de 70 kDa, inclusive nos peptídeos controles C16SX e C28SX. Mais importante é que o peptídeo C16 promove a ativação de MMP2 nas células HT1080, a mesma ativação de MMP2 é possível visualizar no grupo controle positivo tratado com o colágeno tipo I (Figura 16). Também é observado um aumento dos níveis de MMP9 das células HT1080 tratadas com o peptídeo C16, entretanto esse aumento também ocorre no grupo controle C16SX.

Para que ocorra a degradação de colágeno tipo I é necessário que MT1-MMP esteja na sua forma dimérica (ITOH et al., 2003; ITOH, 2006; ITOH et al., 2011). Os peptídeos C16 e C28 derivados da laminina promovem alterações nos níveis de MT1-MMP nas células MDA-MB-231 e HT1080 de diferentes formas. Especialmente nas células HT1080, o fragmento do domínio hemopexina da MT1-MMP o qual faz interação com MMP2 possui os seus níveis aumentados. Adicionalmente observamos

ativação de MMP2. Isso nos levou a inferir sobre uma provável interação entre MT1-MMP e MMP2 desencadeada pelo peptídeo C16 em células HT1080. Essa interação seria fundamental para a degradação do colágeno tipo I (ITOH et al., 2003; ITOH, 2006; ITOH et al., 2011).

Para que ocorra a degradação do colágeno tipo I durante a invasão celular é necessário haver uma organização de MT1-MMP na forma de dímero para a borda da célula. Esse posicionamento da protease degradaria o substrato peri celular, abrindo caminho para a invasão celular (ITOH et al., 2011). Primeiramente demonstramos que as células HT1080 tratadas com o peptídeo C16 são capazes de aumentar pelo menos duas vezes a degradação do colágeno tipo I em relação ao grupo controle. Posteriormente também demonstramos através da técnica de FRET que o peptídeo C16 reorganiza a dimerização para a borda celular, contribuindo assim na clivagem do substrato durante a invasão tumoral.

Para ampliar os nossos conhecimentos sobre a atividade biológica dos peptídeos da laminina, investigamos os seus efeitos biológicos de células tumorais tratadas com os peptídeos C16 e C28 e posteriormente injetadas em um modelo xenográfico já conhecido, o “zebrafish”.

O “zebrafish” (*Danio rerio*), é um organismo capaz de desenvolver tumores de diferentes origens com morfologia e vias de sinalização comparáveis aos tumores humanos (BONNET et al., 1996; IDILLI et al., 2017). O desenvolvimento do embrião fora do útero e sua transparência antes da vida adulta permite a visualização de moléculas fluorescentes dentro do animal, tornando-se um modelo *in vivo* extremamente importante na pesquisa (WHITE; ROSE; ZON, 2013). Nesse trabalho, mostramos resultados *in vivo* utilizando o “zebrafish” como modelo de estudo, onde células MDA-MB-231, previamente coradas e tratadas com os peptídeos de interesse (C16 e C28) foram injetadas na veia cardinal comum do embrião.

O desenvolvimento tumoral foi observado após o 4 dia. Células tratadas com o peptídeo C16 apresentam um aumento no número de colônias e disseminação tumoral em relação ao peptídeo controle C16SX. Também é possível observar um aumento do tamanho da massa e espalhamento do tumor para a cauda do animal no grupo que recebeu as células tratadas com o peptídeo C16. O peptídeo C28 apresentou resultados significantes somente quando comparado com o grupo de células que não receberam tratamento.

Concluimos que, as cadeias da alfa1, beta1 e gama1 da laminina estão aumentadas no câncer de mama. As cadeias da laminina são clivadas *in vitro* e *in vivo* provavelmente pelo auxílio de MT1-MMP gerando fragmentos com atividades biológicas evidentes. Entre os 31 peptídeos detectados, o peptídeo C28 promoveu atividades biológicas de adesão e proliferação celular além de aumentar os níveis de MT1-MMP *in vitro*. Peptídeo C16 promoveu adesão celular, aumento dos níveis de MMP9, ativação de MMP2, aumento do domínio hemopexina da MT1-MMP, dimerização de MT1-MMP para a borda celular, invasão celular *in vitro*, além disso, o peptídeo C16 também promoveu um aumento da área tumoral *in vivo*.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos através dos experimentos realizados para esse trabalho, concluímos:

- 1) As cadeias alfa1, beta1 e gama1 da laminina estão presentes no câncer de mama, significativamente aumentadas principalmente em tumores agressivos do subtipo “basal-like”.
- 2) As cadeias alfa1, beta1 e gama1 da laminina são clivadas tanto *in vitro* quanto em amostras de câncer humano.
- 3) MT1-MMP exibiu aumento significativo no câncer de mama, provavelmente auxiliando na clivagem da laminina gerando fragmentos com diversas massas moleculares.
- 4) Análise proteômica dos fragmentos da laminina demonstrou a presença de 31 peptídeos. Entre os peptídeos detectados estão os peptídeos C28 e C16.
- 5) Esse trabalho detecta pela primeira vez o peptídeo C16 em amostras de câncer de mama humano. Esse peptídeo possui relevantes funções biológicas já publicadas.
- 6) O peptídeo C28 promove a adesão e proliferação das células derivadas do câncer de mama MDA-MB-231. Essa atividade de proliferação também foi observada em células derivadas de fibrossarcoma HT1080.
- 7) O peptídeo C16 induz a de adesão e invasão de células MDA-MB-231.
- 8) O peptídeo C16 promove degradação do colágeno tipo I. Essa atividade está relacionada a aumento do domínio hemopexina de MT1-MMP ativação de MMP2, aumento de MMP9, e dimerização de MT1-MMP em células HT1080.
- 9) Em modelo xenográfico o peptídeo C16 atua no desenvolvimento tumoral e metástase.

8 BIBLIOGRAFIA

ADAIR-KIRK, T. L.; ATKINSON, J. J.; KELLEY, D. G.; ARCH, R. H.; MINER, J. H.; SENIOR, R. M. A chemotactic peptide from laminin alpha 5 functions as a regulator of inflammatory immune responses via TNF alpha-mediated signaling. **J Immunol**, v. 174, n. 3, p. 1621-1629, 2005.

ADES, F.; ZARDAVAS, D.; BOZOVIC-SPASOJEVIC, I.; PUGLIANO, L.; FUMAGALLI, D.; DE AZAMBUJA, E.; VIALE, G.; SOTIRIOU, C.; PICCART, M. Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 32, n. 25, p. 2794-2803, 2014.

ARDINI, E.; SPORCHIA, B.; POLLEGIONI, L.; MODUGNO, M.; GHIRELLI, C.; CASTIGLIONI, F.; TAGLIABUE, E.; MENARD, S. Identification of a novel function for 67-kDa laminin receptor: increase in laminin degradation rate and release of motility fragments. **Cancer research**, v. 62, n. 5, p. 1321-1325, 2002.

AUMAILLEY, M. The laminin family. **Cell adhesion & migration**, v. 7, n. 1, p. 48-55, 2013.

AUMAILLEY, M.; BRUCKNER-TUDERMAN, L.; CARTER, W. G.; DEUTZMANN, R.; EDGAR, D.; EKBLOM, P.; ENGEL, J.; ENGVALL, E.; HOHENESTER, E.; JONES, J. C.; KLEINMAN, H. K.; MARINKOVICH, M. P.; MARTIN, G. R.; MAYER, U.; MENEGUZZI, G.; MINER, J. H.; MIYAZAKI, K.; PATARROYO, M.; PAULSSON, M.; QUARANTA, V.; SANES, J. R.; SASAKI, T.; SEKIGUCHI, K.; SOROKIN, L. M.; TALTS, J. F.; TRYGGVASON, K.; UITTO, J.; VIRTANEN, I.; VON DER MARK, K.; WEWER, U. M.; YAMADA, Y.; YURCHENCO, P. D. A simplified laminin nomenclature. **Matrix Biol**, v. 24, n. 5, p. 326-332, 2005.

BENARD, E. L.; VAN DER SAR, A. M.; ELLETT, F.; LIESCHKE, G. J.; SPAINK, H. P.; MEIJER, A. H. Infection of zebrafish embryos with intracellular bacterial pathogens. **J Vis Exp**, v., n. 61, p., 2012.

BERTOS, N. R.; PARK, M. Breast cancer - one term, many entities? **J Clin Invest**, v. 121, n. 10, p. 3789-3796, 2011.

BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 12, p. 786-801, 2014.

BONNET, F.; PERIN, J. P.; CHARBONNIER, F.; CAMUZAT, A.; ROUSSEL, G.; NUSSBAUM, J. L.; ALLIEL, P. M. Structure and cellular distribution of mouse brain testican. Association with the postsynaptic area of hippocampus pyramidal cells. **J Biol Chem**, v. 271, n. 8, p. 4373-4380, 1996.

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

BREITKREUTZ, D.; KOXHOLT, I.; THIEMANN, K.; NISCHT, R. Skin basement membrane: the foundation of epidermal integrity--BM functions and diverse roles of bridging molecules nidogen and perlecan. **Biomed Res Int**, v. 2013, n., p. 179784, 2013.

BRETAUD, S.; NAUROY, P.; MALBOUYRES, M.; RUGGIERO, F. Fishing for collagen function: About development, regeneration and disease. **Semin Cell Dev Biol**, v., n., p., 2018.

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.

CASTRO-CASTRO, A.; MARCHESIN, V.; MONTEIRO, P.; LODILLINSKY, C.; ROSSE, C.; CHAVRIER, P. Cellular and Molecular Mechanisms of MT1-MMP-Dependent Cancer Cell Invasion. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 32, n., p. 555-576, 2016.

CHAMBERS, A. F.; WERB, Z. Invasion and metastasis--recent advances and future challenges. **J Mol Med (Berl)**, v. 93, n. 4, p. 361-368, 2015.

CHEN, W. Y.; ROSNER, B.; HANKINSON, S. E.; COLDITZ, G. A.; WILLETT, W. C. Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. **JAMA**, v. 306, n. 17, p. 1884-1890, 2011.

CHEN, X.; CAO, X.; JIANG, H.; CHE, X.; XU, X.; MA, B.; ZHANG, J.; HUANG, T. SIKVAV-Modified Chitosan Hydrogel as a Skin Substitutes for Wound Closure in Mice. **Molecules**, v. 23, n. 10, p., 2018.

CHIRIAC, V. F.; BABAN, A.; DUMITRASCU, D. L. Psychological stress and breast cancer incidence: a systematic review. **Clujul Med**, v. 91, n. 1, p. 18-26, 2018.

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

COSTA, M.; SALDANHA, P. Risk Reduction Strategies in Breast Cancer Prevention. **Eur J Breast Health**, v. 13, n. 3, p. 103-112, 2017.

DALEY, W. P.; PETERS, S. B.; LARSEN, M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. **Journal of cell science**, v. 121, n. Pt 3, p. 255-264, 2008.

DECLERCK, Y. A.; MERCURIO, A. M.; STACK, M. S.; CHAPMAN, H. A.; ZUTTER, M. M.; MUSCHEL, R. J.; RAZ, A.; MATRISIAN, L. M.; SLOANE, B. F.; NOEL, A.;

HENDRIX, M. J.; COUSSENS, L.; PADARATHSINGH, M. Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. **The American journal of pathology**, v. 164, n. 4, p. 1131-1139, 2004.

DESHMUKH, S. N.; DIVE, A. M.; MOHARIL, R.; MUNDE, P. Enigmatic insight into collagen. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 20, n. 2, p. 276-283, 2016.

DUBEY, P. K.; SINGODIA, D.; VYAS, S. P. Polymeric nanospheres modified with YIGSR peptide for tumor targeting. **Drug Deliv**, v. 17, n. 7, p. 541-551, 2010.

DUQUE LASIO, M. L.; KOZEL, B. A. Elastin-driven genetic diseases. **Matrix Biol**, v. 71-72, n., p. 144-160, 2018.

DURBEEJ, M. Laminins. **Cell Tissue Res**, v. 339, n. 1, p. 259-268, 2010.

ENGBRING, J. A.; HOFFMAN, M. P.; KARMAAND, A. J.; KLEINMAN, H. K. The B16F10 cell receptor for a metastasis-promoting site on laminin-1 is a heparan sulfate/chondroitin sulfate-containing proteoglycan. **Cancer research**, v. 62, n. 12, p. 3549-3554, 2002.

ENGBRING, J. A.; HOSSAIN, R.; VANOSDOL, S. J.; KAPLAN-SINGER, B.; WU, M.; HIBINO, S.; KOBLINSKI, J. E. The laminin alpha-1 chain derived peptide, AG73, increases fibronectin levels in breast and melanoma cancer cells. **Clinical & experimental metastasis**, v. 25, n. 3, p. 241-252, 2008.

FANG, M.; SUN, Y.; HU, Z.; YANG, J.; DAVIES, H.; WANG, B.; LING, S.; HAN, S. C16 peptide shown to prevent leukocyte infiltration and alleviate detrimental inflammation in acute allergic encephalomyelitis model. **Neuropharmacology**, v. 70, n., p. 83-99, 2013.

FENG, Y.; SPEZIA, M.; HUANG, S.; YUAN, C.; ZENG, Z.; ZHANG, L.; JI, X.; LIU, W.; HUANG, B.; LUO, W.; LIU, B.; LEI, Y.; DU, S.; VUPPALAPATI, A.; LUU, H. H.; HAYDON, R. C.; HE, T. C.; REN, G. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes Dis**, v. 5, n. 2, p. 77-106, 2018.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-386, 2015.

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.

FREITAS, V. M.; SCHEREMETA, B.; HOFFMAN, M. P.; JAEGER, R. G. 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.; VILAS-BOAS, V. F.; PIMENTA, D. C.; LOUREIRO, V.; JULIANO, M. A.; CARVALHO, M. R.; PINHEIRO, J. J.; CAMARGO, A. C.; MORISCOT, A. S.; HOFFMAN, M. P.; JAEGER, R. G. 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. **The American journal of pathology**, v. 171, n. 1, p. 124-138, 2007.

FRIDMAN, R.; GIACCONE, G.; KANEMOTO, T.; MARTIN, G. R.; GAZDAR, A. F.; MULSHINE, J. L. Reconstituted basement membrane (matrigel) and laminin can enhance the tumorigenicity and the drug resistance of small cell lung cancer cell lines. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 17, p. 6698-6702, 1990.

GAMA-DE-SOUZA, L. N.; CYRENO-OLIVEIRA, E.; FREITAS, V. M.; MELO, E. S.; VILAS-BOAS, V. F.; MORISCOT, A. S.; JAEGER, R. G. 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.

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W. C.; COATES, A. S.; GELBER, R. D.; THURLIMANN, B.; SENN, H. J.; PANEL, M. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Ann Oncol**, v. 22, n. 8, p. 1736-1747, 2011.

GOSAIN, R.; POLLOCK, Y.; JAIN, D. Age-related Disparity: Breast Cancer in the Elderly. **Curr Oncol Rep**, v. 18, n. 11, p. 69, 2016.

GRAF, J.; OGLE, R. C.; ROBEY, F. A.; SASAKI, M.; MARTIN, G. R.; YAMADA, Y.; KLEINMAN, H. K. 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.; TASHIRO, K.; SEGUI-REAL, B.; YAMADA, Y.; MARTIN, G. R.; KLEINMAN, H. K. Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. **Cell**, v. 58, n. 5, p. 933-943, 1989.

GREEN, V. L. Breast cancer risk assessment, prevention, and the future. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v. 40, n. 3, p. 525-549, 2013.

HAGEDORN, E. J.; SHERWOOD, D. R. Cell invasion through basement membrane: the anchor cell breaches the barrier. **Curr Opin Cell Biol**, v. 23, n. 5, p. 589-596, 2011.

HAMANO, N.; NEGISHI, Y.; OMATA, D.; TAKAHASHI, Y.; MANANDHAR, M.; SUZUKI, R.; MARUYAMA, K.; NOMIZU, M.; ARAMAKI, Y. Bubble liposomes and

ultrasound enhance the antitumor effects of AG73 liposomes encapsulating antitumor agents. **Mol Pharm**, v. 10, n. 2, p. 774-779, 2013.

HAMILL, K. J.; KLIGYS, K.; HOPKINSON, S. B.; JONES, J. C. Laminin deposition in the extracellular matrix: a complex picture emerges. **Journal of cell science**, v. 122, n. Pt 24, p. 4409-4417, 2009.

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HOFFMAN, M. P.; ENGBRING, J. A.; NIELSEN, P. K.; VARGAS, J.; STEINBERG, Z.; KARMAND, A. J.; NOMIZU, M.; YAMADA, Y.; KLEINMAN, H. K. 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.

HU, J.; ZHANG, Y. X.; LAN, X. L.; QIN, G. M.; ZHANG, J.; HU, Z. H. An imaging study using laminin peptide 99mTc-YIGSR in mice bearing Ehrlich ascites tumour. **Chin Med J (Engl)**, v. 118, n. 9, p. 753-758, 2005.

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

HYNES, R. O.; NABA, A. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 4, n. 1, p. a004903, 2012.

IDILLI, A. I.; PRECAZZINI, F.; MIONE, M. C.; ANELLI, V. Zebrafish in Translational Cancer Research: Insight into Leukemia, Melanoma, Glioma and Endocrine Tumor Biology. **Genes (Basel)**, v. 8, n. 9, p., 2017.

IMAMURA, T.; HIKITA, A.; INOUE, Y. The roles of TGF-beta signaling in carcinogenesis and breast cancer metastasis. **Breast cancer**, v. 19, n. 2, p. 118-124, 2012.

INCA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância., v., n., p. 128, 2017.

IOZZO, R. V. Biosynthesis of heparan sulfate proteoglycan by human colon carcinoma cells and its localization at the cell surface. **The Journal of cell biology**, v. 99, n. 2, p. 403-417, 1984.

IOZZO, R. V.; BOLENDER, R. P.; WIGHT, T. N. Proteoglycan changes in the intercellular matrix of human colon carcinoma: an integrated biochemical and stereologic analysis. **Lab Invest**, v. 47, n. 2, p. 124-138, 1982.

ITOH, S.; YAMAGUCHI, I.; SUZUKI, M.; ICHINOSE, S.; TAKAKUDA, K.; KOBAYASHI, H.; SHINOMIYA, K.; TANAKA, J. Hydroxyapatite-coated tendon chitosan tubes with adsorbed laminin peptides facilitate nerve regeneration in vivo. **Brain Res**, v. 993, n. 1-2, p. 111-123, 2003.

ITOH, Y. MT1-MMP: a key regulator of cell migration in tissue. **IUBMB Life**, v. 58, n. 10, p. 589-596, 2006.

ITOH, Y.; PALMISANO, R.; ANILKUMAR, N.; NAGASE, H.; MIYAWAKI, A.; SEIKI, M. Dimerization of MT1-MMP during cellular invasion detected by fluorescence resonance energy transfer. **The Biochemical journal**, v. 440, n. 3, p. 319-326, 2011.

ITOH, Y.; SEIKI, M. MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. **J Cell Physiol**, v. 206, n. 1, p. 1-8, 2006.

IWAMOTO, Y.; ROBEY, F. A.; GRAF, J.; SASAKI, M.; KLEINMAN, H. K.; YAMADA, Y.; MARTIN, G. R. YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. **Science**, v. 238, n. 4830, p. 1132-1134, 1987.

JESINGER, R. A. Breast anatomy for the interventionalist. **Tech Vasc Interv Radiol**, v. 17, n. 1, p. 3-9, 2014.

JUNQUEIRA, E., CARNEIRO **Histologia Básica**. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan LTDA, 2013.

KANEMOTO, T.; REICH, R.; ROYCE, L.; GREATOREX, D.; ADLER, S. H.; SHIRAISHI, N.; MARTIN, G. R.; YAMADA, Y.; KLEINMAN, H. K. 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.

KELLY, T.; YAN, Y.; OSBORNE, R. L.; ATHOTA, A. B.; ROZYPAL, T. L.; COLCLASURE, J. C.; CHU, W. S. Proteolysis of extracellular matrix by invadopodia facilitates human breast cancer cell invasion and is mediated by matrix metalloproteinases. **Clinical & experimental metastasis**, v. 16, n. 6, p. 501-512, 1998.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52-67, 2010.

KIKKAWA, Y.; HOZUMI, K.; KATAGIRI, F.; NOMIZU, M.; KLEINMAN, H. K.; KOBLINSKI, J. E. Laminin-111-derived peptides and cancer. **Cell adhesion & migration**, v. 7, n. 1, p. 150-256, 2013.

KIKKAWA, Y.; KATAOKA, A.; MATSUDA, Y.; TAKAHASHI, N.; MIWA, T.; KATAGIRI, F.; HOZUMI, K.; NOMIZU, M. Maintenance of hepatic differentiation by hepatocyte attachment peptides derived from laminin chains. **J Biomed Mater Res A**, v. 99, n. 2, p. 203-210, 2011.

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.

KOONTONGKAEW, S.; AMORNPHIMOLTHAM, P.; MONTHANPISUT, P.; SAENSUK, T.; LEELAKRIANGSAK, M. Fibroblasts and extracellular matrix differently modulate MMP activation by primary and metastatic head and neck cancer cells. **Medical oncology**, v. 29, n. 2, p. 690-703, 2012.

KOSHIKAWA, N.; GIANNELLI, G.; CIRULLI, V.; MIYAZAKI, K.; QUARANTA, V. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. **The Journal of cell biology**, v. 148, n. 3, p. 615-624, 2000.

KOSHIKAWA, N.; MINEGISHI, T.; SHARABI, A.; QUARANTA, V.; SEIKI, M. Membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) is a processing enzyme for human laminin gamma 2 chain. **J Biol Chem**, v. 280, n. 1, p. 88-93, 2005.

KOWTHA, V. C.; BRYANT, H. J.; PANCRAZIO, J. J.; STENGER, D. A. Influence of extracellular matrix proteins on membrane potentials and excitability in NG108-15 cells. **Neurosci Lett**, v. 246, n. 1, p. 9-12, 1998.

KRIEG, T.; AUMAILLEY, M. The extracellular matrix of the dermis: flexible structures with dynamic functions. **Experimental dermatology**, v. 20, n. 8, p. 689-695, 2011.

KRUEGEL, J.; MIOSGE, N. Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, n. 17, p. 2879-2895, 2010.

KURATOMI, Y.; NOMIZU, M.; TANAKA, K.; PONCE, M. L.; KOMIYAMA, S.; KLEINMAN, H. K.; YAMADA, Y. 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.

LAURENT-MATHA, V.; HUESGEN, P. F.; MASSON, O.; DEROCQ, D.; PREBOIS, C.; GARY-BOBO, M.; LECAILLE, F.; REBIERE, B.; MEURICE, G.; OREAR, C.; HOLLINGSWORTH, R. E.; ABRAHAMSON, M.; LALMANACH, G.; OVERALL, C. M.; LIAUDET-COOPMAN, E. Proteolysis of cystatin C by cathepsin D in the breast cancer microenvironment. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 26, n. 12, p. 5172-5181, 2012.

LEBLEU, V. S.; MACDONALD, B.; KALLURI, R. Structure and function of basement membranes. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 232, n. 9, p. 1121-1129, 2007.

LEONOUDAKIS, D.; HUANG, G.; AKHAVAN, A.; FATA, J. E.; SINGH, M.; GRAY, J. W.; MUSCHLER, J. L. Endocytic trafficking of laminin is controlled by dystroglycan and is disrupted in cancers. **Journal of cell science**, v. 127, n. Pt 22, p. 4894-4903, 2014.

LETRADO, P.; DE MIGUEL, I.; LAMBERTO, I.; DIEZ-MARTINEZ, R.; OYARZABAL, J. Zebrafish: Speeding Up the Cancer Drug Discovery Process. **Cancer research**, v. 78, n. 21, p. 6048-6058, 2018.

LEVIN, M.; UDI, Y.; SOLOMONOV, I.; SAGI, I. Next generation matrix metalloproteinase inhibitors - Novel strategies bring new prospects. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Res**, v. 1864, n. 11 Pt A, p. 1927-1939, 2017.

LIBSON, S.; LIPPMAN, M. A review of clinical aspects of breast cancer. **International review of psychiatry**, v. 26, n. 1, p. 4-15, 2014.

LINDSEY, M. L. Assigning matrix metalloproteinase roles in ischaemic cardiac remodelling. **Nat Rev Cardiol**, v. 15, n. 8, p. 471-479, 2018.

LOCKE, W. J.; CLARK, S. J. Epigenome remodelling in breast cancer: insights from an early in vitro model of carcinogenesis. **Breast cancer research : BCR**, v. 14, n. 6, p. 215, 2012.

LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. **The Journal of cell biology**, v. 196, n. 4, p. 395-406, 2012.

MACDONALD, P. R.; LUSTIG, A.; STEINMETZ, M. O.; KAMMERER, R. A. Laminin chain assembly is regulated by specific coiled-coil interactions. **J Struct Biol**, v. 170, n. 2, p. 398-405, 2010.

MAJKOWSKA, I.; SHITOMI, Y.; ITO, N.; GRAY, N. S.; ITOH, Y. Discoidin domain receptor 2 mediates collagen-induced activation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human fibroblasts. **J Biol Chem**, v. 292, n. 16, p. 6633-6643, 2017.

MAK, K. M.; MEI, R. Basement Membrane Type IV Collagen and Laminin: An Overview of Their Biology and Value as Fibrosis Biomarkers of Liver Disease. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 300, n. 8, p. 1371-1390, 2017.

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

MALINDA, K. M.; WYSOCKI, A. B.; KOBLINSKI, J. E.; KLEINMAN, H. K.; PONCE, M. L. Angiogenic laminin-derived peptides stimulate wound healing. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 40, n. 12, p. 2771-2780, 2008.

MINER, J. H.; YURCHENCO, P. D. Laminin functions in tissue morphogenesis. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 20, n., p. 255-284, 2004.

MOCHIZUKI, M.; PHILP, D.; HOZUMI, K.; SUZUKI, N.; YAMADA, Y.; KLEINMAN, H. K.; NOMIZU, M. Angiogenic activity of syndecan-binding laminin peptide AG73 (RKRLQVQLSIRT). **Arch Biochem Biophys**, v. 459, n. 2, p. 249-255, 2007.

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

NAKAI, M.; MUNDY, G. R.; WILLIAMS, P. J.; BOYCE, B.; YONEDA, T. A synthetic antagonist to laminin inhibits the formation of osteolytic metastases by human melanoma cells in nude mice. **Cancer research**, v. 52, n. 19, p. 5395-5399, 1992.

NASCIMENTO, C. F.; DE SIQUEIRA, A. S.; PINHEIRO, J. J.; FREITAS, V. M.; JAEGER, R. G. Laminin-111 derived peptides AG73 and C16 regulate invadopodia activity of a human adenoid cystic carcinoma cell line. **Exp Cell Res**, v. 317, n. 18, p. 2562-2572, 2011.

NIENHUIS, H. H.; GAYKEMA, S. B.; TIMMER-BOSSCHA, H.; JALVING, M.; BROUWERS, A. H.; LUB-DE HOOGE, M. N.; VAN DER VEGT, B.; OVERMOYER, B.; DE VRIES, E. G.; SCHRODER, C. P. Targeting breast cancer through its microenvironment: current status of preclinical and clinical research in finding relevant targets. **Pharmacology & therapeutics**, v. 147, n., p. 63-79, 2015.

NOMIZU, M.; KURATOMI, Y.; MALINDA, K. M.; SONG, S. Y.; MIYOSHI, K.; OTAKA, A.; POWELL, S. K.; HOFFMAN, M. P.; KLEINMAN, H. K.; YAMADA, Y. Cell binding

sequences in mouse laminin alpha1 chain. **J Biol Chem**, v. 273, n. 49, p. 32491-32499, 1998.

NOMIZU, M.; KURATOMI, Y.; PONCE, M. L.; SONG, S. Y.; MIYOSHI, K.; OTAKA, A.; POWELL, S. K.; HOFFMAN, M. P.; KLEINMAN, H. K.; YAMADA, Y. Cell adhesive sequences in mouse laminin beta1 chain. **Arch Biochem Biophys**, v. 378, n. 2, p. 311-320, 2000.

NOMIZU, M.; KURATOMI, Y.; SONG, S. Y.; PONCE, M. L.; HOFFMAN, M. P.; POWELL, S. K.; MIYOSHI, K.; OTAKA, A.; KLEINMAN, H. K.; YAMADA, Y. Identification of cell binding sequences in mouse laminin gamma1 chain by systematic peptide screening. **J Biol Chem**, v. 272, n. 51, p. 32198-32205, 1997.

NOMIZU, M.; UTANI, A.; SHIRAISHI, N.; KIBBEY, M. C.; YAMADA, Y.; ROLLER, P. P. 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.

NOMIZU, M.; YOKOYAMA, F.; SUZUKI, N.; OKAZAKI, I.; NISHI, N.; PONCE, M. L.; KLEINMAN, H. K.; YAMAMOTO, Y.; NAKAGAWA, S.; MAYUMI, T. Identification of homologous biologically active sites on the N-terminal domain of laminin alpha chains. **Biochemistry**, v. 40, n. 50, p. 15310-15317, 2001.

OTAGIRI, D.; YAMADA, Y.; HOZUMI, K.; KATAGIRI, F.; KIKKAWA, Y.; NOMIZU, M. Cell attachment and spreading activity of mixed laminin peptide-chitosan membranes. **Biopolymers**, v. 100, n. 6, p. 751-759, 2013.

PATSIALOU, A.; WANG, Y.; LIN, J.; WHITNEY, K.; GOSWAMI, S.; KENNY, P. A.; CONDEELIS, J. S. Selective gene-expression profiling of migratory tumor cells in vivo predicts clinical outcome in breast cancer patients. **Breast cancer research : BCR**, v. 14, n. 5, p. R139, 2012.

POLTAVETS, V.; KOCHETKOVA, M.; PITSON, S. M.; SAMUEL, M. S. The Role of the Extracellular Matrix and Its Molecular and Cellular Regulators in Cancer Cell Plasticity. **Front Oncol**, v. 8, n., p. 431, 2018.

PONCE, M. L.; NOMIZU, M.; KLEINMAN, H. K. An angiogenic laminin site and its antagonist bind through the $\alpha(v)\beta3$ and $\alpha5\beta1$ integrins. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 8, p. 1389-1397, 2001.

PUKKALA, E.; KESMINIENE, A.; POLIAKOV, S.; RYZHOV, A.; DROZDOVITCH, V.; KOVGAN, L.; KYIRONEN, P.; MALAKHOVA, I. V.; GULAK, L.; CARDIS, E. Breast cancer in Belarus and Ukraine after the Chernobyl accident. **Int J Cancer**, v. 119, n. 3, p. 651-658, 2006.

REINHOLZ, M. M.; BRUZEK, A. K.; VISSCHER, D. W.; LINGLE, W. L.; SCHROEDER, M. J.; PEREZ, E. A.; JENKINS, R. B. Breast cancer and aneusomy 17: implications for carcinogenesis and therapeutic response. **The Lancet. Oncology**, v. 10, n. 3, p. 267-277, 2009.

RICARD-BLUM, S.; SALZA, R. Matricryptins and matrikines: biologically active fragments of the extracellular matrix. **Experimental dermatology**, v. 23, n. 7, p. 457-463, 2014.

RONCO, A. L.; DE STEFANI, E.; DENEOPELLEGRINI, H. Risk factors for premenopausal breast cancer: a case-control study in Uruguay. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 13, n. 6, p. 2879-2886, 2012.

ROUSSELLE, P.; BECK, K. Laminin 332 processing impacts cellular behavior. **Cell adhesion & migration**, v. 7, n. 1, p. 122-134, 2013.

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.

SHAH, R.; ROSSO, K.; NATHANSON, S. D. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. **World J Clin Oncol**, v. 5, n. 3, p. 283-298, 2014.

SILVA, A. S.; SOUSA, A. M.; CABRAL, R. P.; SILVA, M. C.; COSTA, C.; MIGUEL, S. P.; BONIFACIO, V. D. B.; CASIMIRO, T.; CORREIA, I. J.; AGUIAR-RICARDO, A. Aerosolizable gold nano-in-micro dry powder formulations for theragnosis and lung delivery. **Int J Pharm**, v. 519, n. 1-2, p. 240-249, 2017.

SIMMONS, A.; BURRAGE, P. M.; NICOLAU, D. V., JR.; LAKHANI, S. R.; BURRAGE, K. Environmental factors in breast cancer invasion: a mathematical modelling review. **Pathology**, v., n., p., 2017.

SIQUEIRA, A. S.; GAMA-DE-SOUZA, L. N.; ARNAUD, M. V.; PINHEIRO, J. J.; JAEGER, R. G. 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.

SIQUEIRA, A. S.; PINTO, M. P.; CRUZ, M. C.; SMUCZEK, B.; CRUZ, K. S.; BARBUTO, J. A.; HOSHINO, D.; WEAVER, A. M.; FREITAS, V. M.; JAEGER, R. G. Laminin-111 peptide C16 regulates invadopodia activity of malignant cells through beta1 integrin, Src and ERK 1/2. **Oncotarget**, v., n., p., 2016.

SMOCK, R. G.; MEIJERS, R. Roles of glycosaminoglycans as regulators of ligand/receptor complexes. **Open Biol**, v. 8, n. 10, p., 2018.

SMUCZEK, B.; SANTOS, E. S.; SIQUEIRA, A. S.; PINHEIRO, J. J. V.; FREITAS, V. M.; JAEGER, R. G. The laminin-derived peptide C16 regulates GPNMB expression and function in breast cancer. **Exp Cell Res**, v. 358, n. 2, p. 323-334, 2017.

SONBOL, H. S. Extracellular Matrix Remodeling in Human Disease. **J Microsc Ultrastruct**, v. 6, n. 3, p. 123-128, 2018.

SONG, S. Y.; NOMIZU, M.; YAMADA, Y.; KLEINMAN, H. K. 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.

SWEENEY, T. M.; KIBBEY, M. C.; ZAIN, M.; FRIDMAN, R.; KLEINMAN, H. K. Basement membrane and the SIKVAV laminin-derived peptide promote tumor growth and metastases. **Cancer Metastasis Rev**, v. 10, n. 3, p. 245-254, 1991.

TASHIRO, K.; SEPHEL, G. C.; WEEKS, B.; SASAKI, M.; MARTIN, G. R.; KLEINMAN, H. K.; YAMADA, Y. 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.

TIMPL, R.; ROHDE, H.; ROBEY, P. G.; RENNARD, S. I.; FOIDART, J. M.; MARTIN, G. R. Laminin--a glycoprotein from basement membranes. **J Biol Chem**, v. 254, n. 19, p. 9933-9937, 1979.

TURUNEN, S. P.; TATTI-BUGAEVA, O.; LEHTI, K. Membrane-type matrix metalloproteases as diverse effectors of cancer progression. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Res**, v. 1864, n. 11 Pt A, p. 1974-1988, 2017.

VAN HORSSSEN, R.; BUCCIONE, R.; WILLEMSE, M.; CINGIR, S.; WIERINGA, B.; ATTANASIO, F. Cancer cell metabolism regulates extracellular matrix degradation by invadopodia. **European journal of cell biology**, v. 92, n. 3, p. 113-121, 2013.

WEAVER, S. A.; WOLTERS, B.; ITO, N.; WOSKOWICZ, A. M.; KANEKO, K.; SHITOMI, Y.; SEIKI, M.; ITOH, Y. Basal localization of MT1-MMP is essential for

epithelial cell morphogenesis in 3D collagen matrix. **J Cell Sci**, v. 127, n. Pt 6, p. 1203-1213, 2014.

WHITE, R.; ROSE, K.; ZON, L. Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 9, p. 624-636, 2013.

WILDIERS, H.; VAN CALSTER, B.; VAN DE POLL-FRANSE, L. V.; HENDRICKX, W.; ROISLIEN, J.; SMEETS, A.; PARIDAENS, R.; DERAEDT, K.; LEUNEN, K.; WELTENS, C.; VAN HUFFEL, S.; CHRISTIAENS, M. R.; NEVEN, P. Relationship between age and axillary lymph node involvement in women with breast cancer. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 27, n. 18, p. 2931-2937, 2009.

WILLIS, A. L.; SABEH, F.; LI, X. Y.; WEISS, S. J. Extracellular matrix determinants and the regulation of cancer cell invasion stratagems. **Journal of microscopy**, v. 251, n. 3, p. 250-260, 2013.

YAGER, J. D.; DAVIDSON, N. E. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. **The New England journal of medicine**, v. 354, n. 3, p. 270-282, 2006.

YAO, Y. Laminin: loss-of-function studies. **Cell Mol Life Sci**, v. 74, n. 6, p. 1095-1115, 2017.

YAO, Z. X.; LU, L. J.; WANG, R. J.; JIN, L. B.; LIU, S. C.; LI, H. Y.; REN, G. S.; WU, K. N.; WANG, D. L.; KONG, L. Q. Discordance and clinical significance of ER, PR, and HER2 status between primary breast cancer and synchronous axillary lymph node metastasis. **Medical oncology**, v. 31, n. 1, p. 798, 2014.

YIANNAKOPOULOU, E. Etiology of familial breast cancer with undetected BRCA1 and BRCA2 mutations: clinical implications. **Cellular oncology**, v. 37, n. 1, p. 1-8, 2014.

YOUSIF, L. F.; DI RUSSO, J.; SOROKIN, L. Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes. **Cell adhesion & migration**, v. 7, n. 1, p. 101-110, 2013.

YURCHENCO, P. D. Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 2, p., 2011.

YURCHENCO, P. D.; AMENTA, P. S.; PATTON, B. L. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. **Matrix Biol**, v. 22, n. 7, p. 521-538, 2004.

YURCHENCO, P. D.; MCKEE, K. K.; REINHARD, J. R.; RUEGG, M. A. Laminin-deficient muscular dystrophy: Molecular pathogenesis and structural repair strategies. **Matrix Biol**, v. 71-72, n., p. 174-187, 2018.

ZOLLINGER, A. J.; SMITH, M. L. Fibronectin, the extracellular glue. **Matrix Biol**, v. 60-61, n., p. 27-37, 2017.

9 APÊNDICE

9.1 Legendas para figura e dados suplementares

Figura suplementar 1 - Clivagem da laminina-111 *in vitro*. “Immunoblot” de amostras de células MDA-MB-231 sobre laminina-111 por 24 horas apresentam massas moleculares esperadas para as cadeias alfa1, beta1 e gama1 da laminina (seta preta). Fragmentos derivados das cadeias da laminina-111 apresentados nesse ensaio (seta cinza) demonstram massas moleculares similares as analisadas anteriormente (**Figura 4A**). Lam-111 abreviatura para laminina-111.

Dados suplementares 1 – Relatório doutorado-sanduíche. Relatório do projeto “*Regulação da metaloproteinase MT1-MMP no câncer pelos peptídeos C16 e C28 derivados da clivagem da laminina-111*” que foi financiando pelo Santander e desenvolvido durante o doutorado-sanduíche sob a supervisão do Professor Yoshifumi Itoh, no Instituto de Reumatologia Kennedy da Universidade de Oxford, UK.

Dados Suplementares 2 – Dados brutos da análise proteômica da clivagem da laminina *in vitro*. Resultados brutos obtidos a partir de amostras de células sobre Matrigel processadas “in gel” e posteriormente analisadas no espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos acoplado ao cromatógrafo líquido de nano-fluxo EASY-nLC.

Dados Suplementares 3 – Dados brutos da análise proteômica da clivagem da laminina em amostras de câncer de mama humano. Resultados brutos obtidos a partir de amostras de câncer de mama humano processadas “in gel” e posteriormente analisadas no espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos acoplado ao cromatógrafo líquido de nano-fluxo EASY-nLC.