## **HEYDI NORIEGA GUERRA**

# IMPORTÂNCIA DA PROTEASE ADAMTS-1 NA INVASÃO LOCAL E SISTÊMICA DE CÉLULAS DO FIBROSSARCOMA

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

São Paulo 2017

## HEYDI NORIEGA GUERRA

## IMPORTÂNCIA DA PROTEASE ADAMTS-1 NA INVASÃO LOCAL E SISTÊMICA DE CÉLULAS DO FIBROSSARCOMA

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

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Morais Freitas

Versão original

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)

Guerra, Heydi Noriega Importância da protease ADAMTS-1 na invasão local e sistêmica de células do fibrossarcoma. / Heydi Noriega Guerra; orientadora Vanessa Morais Freitas. -- São Paulo, 2017. 93 p.

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

1. ADAMTS-1. 2. Fatores de crescimento. 3. Metaloproteinases. 4. Matriz extracelular. 5. Fibrossarcoma. I. Morais Freitas, Vanessa, orientador. II. Título.

### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Heydi Noriega Guerra.
Título da Tese:	Importância da protease ADAMTS-1 na invasão local e sistêmica de células do fibrossarcoma.
Orientador(a):	Profa. Dra. Vanessa Morais Freitas.
A Comissão Ju públic	ulgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão ca realizada a///, considerou ( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome:



2

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 099 nas fls. 132 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) Vanessa Morais Freitas, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "Importância da protease admts-1 na invasão local e sistêmica de células de fibrossarcoma(2)" do qual participam o(s) aluno(s) Heydi Noriega Guerra , está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em 18.09.2012, com validade de 4 anos.

São Paulo, 19 de setembro de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PÁULA LEPIQUE Secretária- CEUA - ICB/USP

A Deus, por iluminar meu caminho, Ele foi quem me deu força e coragem durante toda esta longa caminhada. Aos meus pais, Ninfa e Vico, a quem tanto admiro por ser exemplos de dedicação, perseverança e prosperidade, a vocês devo meu caráter e disciplina ao trabalho. Ao meu irmão Crhis, pela amizade, generosidade e apoio incondicional, você fez por mim o que irmão nenhum faria. Obrigada familia, pelo amor e incentivo sempre dados, e sobre tudo por ter sido sempre a minha fonte de momentos de alegria e descanso do trabalho. Amo vocês.

### AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa. Dra. Vanessa Morais Freitas, pela orientação, apoio, disponibilidade e sobre todo pela paciência durante a realização deste projeto. Obrigada pela oportunidade de fazer meu doutorado em seu laboratório, e pela confiança depositada em mim. Serei eternamente grata por você ter me recebido de braços abertos, e me incentivar em todos os momentos. Admiro muito sua inteligência e sua liderança. E sempre levarei comigo todos seus ensinamentos, os quais foram fundamentais para minha formação acadêmica. Eu nunca me esquecerei de você, a minha primeira guia por esse mundo da ciência e pesquisa. Muitíssimo obrigada por tudo.

### AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Ruy Gastaldoni Jaeger e sua equipe, pela permissão em utilizar os equipamentos e reagentes do seu laboratorio. Obrigada também pelo espaço cedido em seu laboratório para a realização de alguns experimentos de microinjeção. Sua ajuda foi fundamental para a execução desse projeto.

À Profa. Telma Zorn e sua técnica Fernanda Angela Correia Barrence, por toda atenção e disponibilidade dispensadas ao nosso grupo. Obrigada pelo espaço cedido em seu laboratório para a realização de experimentos de cultura celular, e por permitir o uso de alguns de seus equipamentos.

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

Ao Mário Cruz, funcionário do setor de microscopia confocal do CEFAP-ICB, por sua inestimável ajuda com os experimentos de microscopia confocal e *time-lapse* apresentados neste trabalho. Agradeço pelas várias formas de auxilio prestadas durante o desenvolvimento deste trabalho, incluindo as consultorias experimentais. Mas acima de tudo, gostaria de agradecer sua amizade. Tem toda minha admiração e respeito pois, mais do que exemplo de profissional, é também um exemplo de ser humano.

À Joelcimar Martins da Silva, funcionária do setor de microscopia confocal do CEFAP-ICB, por sua inestimável ajuda com os experimentos de *time-laps*e realizados no sistema de microscopia de fluorescência InCell Analyzer.

Ao Prof. Dr. Richard Klemke, Dr. Huawei Wang e Dr. Jan Strnadel (University of California San Diego, San Diego, CA, EUA) pela ajuda prestada com os experimentos *in vivo* utilizando-se embriões de *zebrafish*.

Às Profa. Dra. Marinilce Fagundes Santos, Profa. Dra. Fernanda Ortis e ao Prof. Dr. André Zelanis pelas relevantes considerações e sugestões feitas durante meu Exame de Qualificação.

À Dra. Thaiomara Silva, por todo o tempo dedicado a me ensinar fazer ciência. Sempre muito organizada, me ensinou cada pequeno detalhe para um experimento bem feito. Obrigada também por se preocupar e cuidar dos peixes.

À todos os meus colegas de laboratório, em especial a Priscilla e ao Iuri. Priscilla, minha companheira de experimentos, obrigada pelo apoio técnico no laboratório, ele foi muito importante para a execução desse projeto. Iuri, obrigada por alimentar aos peixes e por me auxiliar da melhor maneira possivel todas as vezes que eu precisei de algo do laboratório. Sobre todo, agradeço a ambos pela paciência que tiveram comigo nos dias de loucura descontrolada devido aos experimentos.

Às amigas Priscilla, Mari Longhi e Magna, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Conhecê-las foi a mais grata surpresa! Cada uma de vocês, à sua maneira, fez os meus dias aqui serem melhores. Meninas, estarei eternamente agradecida pelo carinho, pelo incentivo nos momentos dificeis, pelas inúmeras conversas e risadas durante os almoços e coffee breaks. Uma vez mais, obrigada pelo convivio maravilhoso, eu sempre levarei vocês no meu coração.

À minha melhor amiga Fachyz por sempre estar ao meu lado, me escutando, apoiando e torcendo por mim, independente da distância entre nós. Obrigada por essa amizade pura e verdadeira, "You're my person you will always be my person".

Ao Jeffrey Reina pelo auxílio informático nos momentos finais da tese. Muitíssimo obrigada por tudo.

Às amigas Adriane e Livia, por compartilharem seus conhecimentos e pela disponibilidade para ajudar nas vezes que foi preciso. Sobre tudo, obrigada pela amizade, risadas, conselhos, incentivo e pela motivação nos momentos de desânimo.

### AGRADECIMENTO

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financiero e institucional. A concessão tanto do Projeto Jovem Pesquisador (2010/07699-1) quanto da bolsa de Doutorado Direto (2012/24108-2) foram de extrema importância para o desenvolvimento do projeto intitulado "A importância da protease ADAMTS-1 na invasão local e sistêmica de células do fibrossarcoma". A Reserva Técnica de ambos os processos contribuiu durante toda a realização do meu projeto, tanto na aquisição de materiais de insumo e materiais permanentes, como no financiamento para a participação de congressos nacionais e internacionais dos quais participei.

### RESUMO

GUERRA, H. N. Importância da protease ADAMTS-1 na invasão local e sistêmica de células do fibrossarcoma. 2017. 93 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O crescimento e a malignidade de um tumor são ditados pelo microambiente circundante. A matriz extracelular, que faz parte do microambiente tumoral, serve como depósito para fatores biologicamente ativos, como fatores de crescimento e proteases, os quais influenciam no comportamento das células tumorais. A ADAMTS-1 (uma desintegrina e metaloproteinase com motivos trombospondina) é uma protease secretada, conhecida por sua capacidade de modificar a matriz extracelular durante os processos fisiológicos e patológicos. Neste trabalho, avaliamos o papel da ADAMTS-1 na regulação das atividades estimuladas pelos fatores de crescimento (HGF e TGF-\beta1), sobre a linhagem celular de fibrossarcoma humano (HT1080). Para tanto, foram geradas células HT1080 e HEK293T que superexpressam a protease ADAMTS-1. Ensaios de incorporação de BrdU e expressão de Ki67 demonstraram que a superexpressão de ADAMTS-1 diminuiu a proliferação das células HT1080, na presenca do HGF. Ademais, as células HT1080 que superexpressam ADAMTS-1 apresentaram uma velocidade de migração de 6.120 ± 0.416 µm/hora, a qual foi 2 vezes menor que a velocidade de migração das células controle (13.763 ± 1,421 µm/hora), ambas na presença do HGF. Da mesma forma, observamos que a proliferação e a velocidade de migração das células HT1080 (tipo selvagem) diminuiu guando estas foram tratadas com o HGF acrescido ao meio condicionado de outro tipo celular (HEK293T) que superexpressa ADAMTS-1. A seguir, demonstramos que a superexpressão da ADAMTS-1 interrompe a ativação do receptor c-Met, após estimulação com o HGF. Consequentemente, as vias de sinalização downstream ERK1/2 e FAK foram perturbadas. Por outro lado, a superexpressão de ADAMTS-1 não afetou a atividade do TGF-B1 associada à proliferação celular e velocidade de migração das celulas HT1080. Embora observamos uma diminuição na fosforilação das smad2/3 nas células que superexpressam ADAMTS-1, esta diminuição não foi suficiente para perturbar as vias de sinalização ERK1/2 e Akt, após o tratamento com o TGF-β1. Adicionalmente, através de cultura 3D em Hanging drop mostramos que na presenca do HGF, a superexpressão de ADAMTS-1 diminuiu o diâmetro das fibrosarcoesferas (~0,7 mm), quando comparado com o controle (diâmetro das fibrosarcoesferas ~1,3 mm). Nos estudos in vivo observamos que na presença do HGF, a superexpressão de ADAMTS-1 perturbou a formação de microtumores. E os poucos microtumores formados, incluindo as células individuais, apresentaram características morfológicas de lesões menos invasivas. Nossos dados sugerem que a ADAMTS-1 está envolvida na regulação das atividades estimuladas pelo HGF, nas células do fibrossarcoma. Esta protease pode então representar um mecanismo endógeno no controle da biodisponibilidade de diferentes fatores de crescimento com influência direta sobre o comportamento das células tumorais.

**Palavras-chave:** Fibrossarcoma. Matriz extracelular. Metaloproteinases da matriz. ADAMTS1. Fator de crescimento do hepatócito. Fator de crescimento transformante beta.

### ABSTRACT

GUERRA, H. N. Importance of ADAMTS-1 protease in local and systemic invasion of fibrosarcoma. 2017. 93 p. PhD Thesis (Cell and Tissue Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The growth and malignancy of a tumor are dictated by the surrounding microenvironment. The extracellular matrix forms part of the tumor microenvironment, and serves as a reservoir for biologically active factors, such as growth factors and proteases that influence the tumor cell behavior. ADAMTS-1 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) is a secreted protease that has the ability to modify the extracellular matrix during physiological and pathological processes. Here, we addressed the role played by ADAMTS-1 regulating HGF and TGF-B1 activities in the high-grade fibrosarcoma cell line (HT1080). For this, we generated HT1080 and HEK293T cells that overexpress ADAMTS-1. BrdU incorporation and Ki67 expression assays demonstrated that ADAMTS-1 overexpression induced a significant decrease of HT1080 cell proliferation, in the presence of HGF. In addition, the HT1080 cells overexpressing ADAMTS-1 presented a migration velocity of 6.120  $\pm$  0.416  $\mu$ m/hour, which was at least 2 times lower than the control cell migration velocity (13.763  $\pm$  1.421  $\mu$ m/hour), both in presence of HGF. Likewise, when HT1080 cells were treated with HGF added into the conditioned medium of other cell type (HEK293T) that overexpressed ADAMTS-1, we observed a decrease of cell proliferation and migration velocity. Next, we demonstrate that ADAMTS-1 overexpression interrupts c-Met activation upon HGF stimulation. Consequently, the downstream ERK1/2 and FAK signaling pathways are disturbed. On the other hand, ADAMTS-1 overexpression failed to affect TGF-B1 activity associated with HT1080 cell proliferation and migration velocity. Although we observed a decrease of smad2/3 phosphorylation in HT1080 cells overexpressing ADAMTS-1, this partial reduction was not sufficient to alter ERK1/2 and Akt activation, after treatment with TGF-B1. Additionally, through 3D culture in Hanging drop we showed that in presence of HGF, ADAMTS-1 overexpression decreased the fibrosarcospheres diameter (~0.7 mm), as compared to the control (fibrosarcospheres diameter of ~1.3 mm). In vivo studies showed that in presence of HGF, ADAMTS-1 overexpression disrupted the formation of microtumors. These microtumors, including individual cells, presented characteristics of low invasive tumor cells (rounded morphology). Our results suggest that ADAMTS-1 is involved in regulating HGF-related functions on fibrosarcoma cells. This protease may then represent an endogenous mechanism in controlling the bioavailability of different growth factors that have a direct influence on tumor cell behavior.

**Keywords:** Fibrosarcoma. Extracellular matrix. Matrix metalloproteinases. ADAMTS1. Hepatocyte growth factor. Transforming growth factor beta.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Capacidades adquiridas pelas células tumorais que favorecem o desenvolvimento tumoral
Figura 2 – Processo de formação de tumores metastáticos a partir de um tumor primário
Figura 3 – Esquema representativo do microambiente tumoral
Figura 4 – Mecanismos de função da MEC31
Figura 5 – Estrutura esquemática das MMPs33
Figura 6 – Representação esquemática das ADAMs, ADAMTSs e MMPs35
Figura 7 – Domínios estruturais e análise filogenética dos membros da família ADAMTS
Figura 8 – Formas da protease ADAMTS-1
Figura 9 – Domínios estruturais do receptor c-Met42
<b>Figura 10 –</b> Componentes do complexo de sinalização recrutados e vias de sinalização ativadas pela ligação do HGF com o seu receptor c-Met
<b>Figura 11 –</b> Representação esquemática do processo de ativação do TGF-β45
<b>Figura 12 –</b> Vias de sinalização intracelular do TGF-β47
Figura 13 – Esquema do vetor lentiviral pReceiver-Lv213
<b>Figura 14 –</b> Eficiência da transdução nas células HT1080 e HEK293T para superexpressar ADAMTS-1
<b>Figura 15 –</b> A superexpressão de ADAMTS-1 diminuiu a proliferação celular de HT1080 estimulada por HGF61
<b>Figura 16 –</b> A superexpressão de ADAMTS-1 diminui a velocidade de migração das células HT1080 estimulada por HGF
Figura 17 – A superexpressão de ADAMTS-1 perturba as vias de sinalização estimuladas por HGF

**Figura 18 –** A superexpressão de ADAMTS-1 perturba a formação de fibrosarcoesferas estimuladas por HGF......67

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADAM do inglês "a disintegrin and metaloproteinase", traduzido como uma desintegrina e metaloproteinase
- ADAMTS do inglês "a disintegrin and metaloproteinase with thrombospondin motif", traduzido como uma desintegrina e metaloproteinase com motivos trombospondina
- Akt do inglês "Protein kinase serine/threonine", traduzido como proteína quinase serina/treonina
- BCA do inglês "Bicinchoninic Acid", traduzido como ácido bicinconínico
- **BSA** do inglês "Bovine Serum Albumine", traduzido como albumina sérica bovina
- BrdU bromodeoxiuridina
- **CBL** do inglês "Casitas B-lineage lymphoma", traduzido como casitas linfoma de linhagem B
- **CEFAP-ICB** Centro de Facilidades para Pesquisa Instituto de Ciências Biomédicas
- **c-Met** do inglês "mesenchymal–epithelial transition factor", traduzido como fator de transição mesênquima–epitélio
- **CMV** citomegalovírus
- DAPI dihidrocloreto de 4', 6'-diamidino-2-fenilindole
- **DMEM** do inglês "Dulbecco's Modified Eagles Medium", traduzido como meio de Eagle modificada por Dulbecco
- DMSO di-metilsulfóxido
- **ECL** do inglês "enhanced chemiluminescence", traduzido como quimioluminescência reforçada
- **ERK** do inglês "Extracellular signal–regulated kinase", traduzido como quinase regulada por sinais extracelulares
- **EGF** do inglês "epidermal growth fator", traduzido como fator de crescimento epidermal
- **EGFP** do inglês "enhanced green fluorescent protein", traduzido como proteína fluorescente verde melhorada
- **FGF** do inglês "fibroblast growth fator", traduzido como fator de crescimento de fibroblasto
- **FAK** do inglês "focal adhesion kinase", traduzido como quinase de adesão focal

Gab1 do inglês "Grb2-associated binder-1", traduzido como ligante 1 associado à Grb2 Grb2 do inglês "growth factor receptor-bound protein 2", traduzido como proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento HB-EGF do inglês "heparin-binding EGF-like growth fator", traduzido como fator de crescimento semelhante ao EGF ligado à heparina HGF "hepatocyte growth fator", traduzido como fator de do inglês crescimento do hepatócito **IPT** "immunoglobulin-plexin-transcription", do inglês traduzido como imunoglobulina-plexina-fatores de transcrição JNK do inglês "c-Jun N-terminal kinase", traduzido como c-Jun aminoterminal guinase LAP do inglês "latency", traduzido como latência LTBP do inglês "latent TGF-ß binding protein", traduzido como proteína ligante do fator de crescimento transformante beta latente MAPK do inglês "Mitogen activated protein kinases", traduzido como proteínaquinase ativada por mitógeno MEC matriz extracelular MMP do inglês "matrix metalloproteinases". traduzido como metaloproteinases de matriz **MT-MMP** do inglês "membrane-type matrix metalloproteinases", traduzido como metaloproteinases de matriz ancorada à membrana MC meio condicionado do inglês "Minimun Essential Medium", traduzido como meio mínimo MEM essencial OMS Organização Mundial da Saúde PBS do inglês "phosphate-buffered saline", traduzido como tampão fosfato salina PI3K do inglês "phosphoinositide 3-kinase", traduzido como fosfatidilinositol 3-quinase do inglês "protein kinase B", traduzido como proteína quinase B PKB do inglês "protein kinase C", traduzido como proteína quinase C PKC do inglês "phospholipase C", traduzido como fosfolipase C PLC PSI do inglês "plexin-semaphorin-integrin", traduzido como plexinasemaforina-integrina PTP proteínas tirosinas fosfatases

	PTU	feniltiouréia
--	-----	---------------

**p53** do inglês "protein 53", traduzido como proteína P53

- **RasGAP** do inglês "p120-Ras GTPase activating protein", traduzido como proteína ativadora de GTPase de 120 kilodalton
- **RFP** do inglês "red fluorescent protein", traduzido como proteína fluorescente vermelha
- **SDS** do inglês "sodium dodecyl sulfate", traduzido como dodecil sulfato de sódio
- SFB soro fetal bovino
- **SMAD** do inglês "Sma and Mad related proteins", traduzido como proteínas relacionadas à Sma e Mad
- **STAT** do inglês "signal transducer and activator of transcription", traduzido como transdutor de sinal e ativador da transcrição
- **STS** do inglês "soft tissue sarcoma", traduzido como sarcoma de tecidos moles
- **TBS** do inglês "Tris-buffered saline", traduzido como tampão tris-salina
- **TSP** trombospondina
- **TGF-**β do inglês "transforming growth factor beta", traduzido como fator de crescimento transformante beta
- **TβR** do inglês "transforming growth factor beta-receptor", traduzido como receptor do fator de crescimento transformante beta
- **TIMP** do inglês "tissue inhibitors of metalloproteinases", traduzido como inhibidor tecidual de metaloproteinases
- VEGF do inglês "vascular endothelial growth factor", traduzido como fator de crescimento endotelial vascular

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
α	alfa
β	beta
Y	gama
cm²	centímetros quadrados
CO2	gás carbônico
G	gradiente de velocidade
HCI	ácido clorídrico
hr	hora
hpf	horas pós fertilização
kDa	kilodalton
М	molar
mm	milímetro
mМ	milimolar
ml	mililitro
ms	milissegundo
mg	miligramas
Ν	normal
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
ng	nanograma
рН	potencial hidrogeniônico
psi	libras por polegada quadrada
μm	micrômetro
μM	micromolar
μg	micrograma
μl	microlitro

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 Sarcomas	23
2.1.1 Fibrossarcoma	23
2.2 Progressão tumoral	24
2.3 Microambiente tumoral	27
2.4 Matriz Extracelular (MEC)	29
2.5 Metaloproteinases de Matriz (MMPs)	32
2.6 Adamalisinas	34
2.6.1 ADAMTS-1	38
2.7 Fator de crescimento de hepatócitos (HGF)	41
2.8 Fator de crescimento transformante beta (TGF-β)	44
3 OBJETIVOS	48
3.1 Objetivo geral	48
3.2 Objetivos específicos	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 Linhagens Celulares	49
4.2 Transdução das linhagens celulares HT1080 e HEK293T	49
4.3 Coleta do meio condicionado (MC)	50
4.4 Ensaio de incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU)	51
4.5 Ensaio de expressão de Ki67	52
4.6 Ensaios de <i>time-lapse</i>	53
4.7 Immunoblot	53
4.8 Cultura 3D em Hanging Drop	55
4.9 Micro-injeção de células tumorais em embriões de zebrafish	56

4.10 Análise dos Resultados57
5 RESULTADOS
5.1 Superexpressão de ADAMTS-1 nas linhagens HT1080 e HEK293T 58
5.2 Efeito da superexpressão de ADAMTS-1 sobre a proliferação celular do fibrossarcoma estimulada por fatores de crescimento (HGF ou TGF-β1)59
5.3 Efeito da superexpressão de ADAMTS-1 sobre a velocidade de migração celular do fibrossarcoma estimulada por fatores de crescimento (HGF ou TGF-β1)61
5.4 Vias de sinalização perturbadas pela superexpressão de ADAMTS-1, após a estimulação por fatores de crescimento (HGF ou TGF-β1)64
5.5 Efeito da superexpressão de ADAMTS-1 sobre a formação de fibrosarcoesferas estimulada por HGF
5.6 Estudo <i>in vivo</i> do efeito da superexpressão de ADAMTS-1 sobre a formação de microtumores estimulada por HGF67
6 DISCUSSÃO
7 CONCLUSÃO
REFERÊNCIAS78

### 1 INTRODUÇÃO

O fibrossarcoma é um câncer de origem mesenquimal, de alta malignidade e agressividade. Deriva-se do tecido conjuntivo denso e se caracteriza pela presença de fibroblastos malignos (imaturos); os quais apresentam uma divisão celular rápida e desorganizada, formando assim tumores sólidos (JAYAMATHI et al., 2010; NIKITOVIC et al., 2013). Na clínica, o fibrossarcoma apresenta elevado índice de recorrência local e baixa incidência de metástase hematogênica e/ou metástase em linfonodos regionais (KOTRASHETTI et al., 2012; NIKITOVIC et al., 2013).

A progressão do câncer não depende apenas de novas habilidades adquiridas pelas células tumorais, mas também da interação com seu microambiente. Como é sabido, a matriz extracelular (MEC) faz parte do microambiente tumoral; e esta matriz é constituída por uma rede complexa de macromoléculas, tais como glicoproteínas, colágenos, glicosaminoglicanos e proteoglicanos (BRESNICK; WEBER; ZIMMER, 2015; DECLERCK et al., 2004; KIM; TURNBULL; GUIMOND, 2011).

No microambiente tumoral, o papel da MEC não está limitado a atuar somente como uma barreira física contra a invasão tumoral. Também serve como depósito para fatores biologicamente ativos, como fatores de crescimento, proteases, hormônios, entre outros, os quais influenciam no comportamento das células tumorais (DECLERCK et al., 2004).

Encontra-se bem estabelecido na literatura que um evento chave na invasão e metástase dos tumores é a clivagem ou degradação dos componentes da MEC por ação de proteases (FOLKMAN; SHING, 1992). Entre estas proteases temos à ADAMTS-1, o primeiro membro identificado da família ADAMTS (uma desintegrina e metaloproteinase com motivos trombospondina). Esta protease se caracteriza por apresentar um peptídeo sinalizador, um pró-domínio, um domínio metaloproteinase dependente de zinco, um domínio semelhante a desintegrina, três motivos trombospondina tipo I (TSP-1), um domínio rico em cisteína e uma região espaçadora. É importante mencionar que todos os membros da família ADAMTS não apresentam o domínio transmembrânico e são, portanto, secretadas na matriz (KUNO et al., 2004).

O mecanismo de ação da ADAMTS-1 na progressão tumoral ainda não está claramente definido. Embora a molécula inteira de ADAMTS-1 promova a metástase,

os fragmentos da molécula que não possuem atividade catalítica e apresentam um motivo TSP1 na sua estrutura, mostraram um efeito antimetastático. Portanto, dependendo do local de auto-clivagem proteolítica, a ADAMTS-1 pode estar relacionada à atividade antitumoral (PORTER et al., 2005) ou atividade pró-tumoral e estimuladora de metástase (LIU; XU; YU, 2006; LU et al., 2009).

Além disso, ADAMTS-1 possui um efeito anti-angiogênico, devido à ligação direta desta protease com o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Esta interação impede então ao VEGF de se ligar e ativar seu respectivo receptor (KUNO et al., 2000; RUSSELL et al., 2003; SANDY et al., 2001). Por outro lado, ADAMTS-1 promove a angiogênese e invasão tumoral, através da sua atividade *sheddase* sobre os precursores transmembrânicos do fator de crescimento epidermal ligado a heparina (HB-EGF), e a subsequente ativação do seu respectivo receptor (LIU; XU; YU, 2006). Dessa forma, ADAMTS-1 representa um mecanismo endógeno no controle da biodisponibilidade dos diferentes fatores de crescimento (LIU; XU; YU, 2006; MARGOSIO et al., 2003).

Neste trabalho, buscamos elucidar o papel da protease ADAMTS-1 e sua íntima ligação com o microambiente tumoral do fibrossarcoma. Nosso enfoque foi estudar o efeito da protease ADAMTS-1 na regulação das atividades estimuladas pelos fatores de crescimento (HGF e TGF-β1), sobre a linhagem celular derivada de fibrossarcoma.

Os ensaios foram então realizados a partir de células de fibrossarcoma humano (HT1080) transduzidas para superexpressar ADAMTS-1, e as quais foram tratadas apenas com os fatores de crescimento de interesse. Por outro lado, células de fibrossarcoma não transduzidas (selvagens) foram tratadas com os fatores de crescimento de interesse adicionados ao meio condicionado coletado de outro tipo celular, o qual também foi transduzido para superexpressar ADAMTS-1. Desta forma, o meio condicionado enriquecido com ADAMTS-1, mimetiza a protease secretada por outros tipos celulares presentes no microambiente tumoral.

A proliferação celular foi analisada através dos ensaios de incorporação de Bromodesoxiuridina (BrdU) e expressão de Ki67. A velocidade de migração foi determinada utilizando-se ensaios de *time-lapse* e o plugin *MTrackJ* do *software Fiji/ImageJ*. Investigamos também os mecanismos através dos quais ADAMTS-1 interfere com as atividades estimuladas por HGF ou TGF-β1. Além disso, estudamos por meio de ensaios de cultura 3D em *Hanging Drop*, a capacidade de formação de

fibrosarcoesferas em diferentes condições. Por outro lado, a capacidade de formação de microtumores *in vivo* foi analisada utilizando-se o ensaio de microinjeção de células tumorais em embriões de *zebrafish* transgênicos Tg (fli1:EGFP).

### 2 REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1 Sarcomas

Os sarcomas constituem um grupo de neoplasias malignas de origem mesenquimal. Foram identificados mais de 70 subtipos, os quais foram classificados de acordo com o tipo de tecido histológico dos quais derivam. Assim, os sarcomas são classificados em duas categorias: Os osteosarcomas, que se desenvolvem no osso; e os sarcomas de tecidos moles (STS). Aproximadamente 80% dos sarcomas são provenientes de partes moles e 20% descendem de ossos (HELMAN; MELTZER, 2003; VALVERDE et al., 2016).

Os sarcomas de tecidos moles são tumores sólidos formados por células malignas rodeadas por uma variedade de células, tais como linfócitos, fibroblastos e células dos vasos sanguíneos e linfáticos. Estas neoplasias podem se desenvolver a partir do músculo, gordura, nervos, tecidos fibrosos, vasos sanguíneos ou tecidos mais profundos da pele. Em cerca de 50% dos casos, os sarcomas de tecidos moles foram encontrados nas extremidades, com destaque para os membros inferiores. Aproximadamente, 35% são intra-abdominais, 10% originam-se no tronco e 5% na cabeça e pescoço (ALJABAB et al., 2011; CRAGO; BRENNAN, 2015; ILASLAN et al., 2010; KUSZYK et al., 2001; MORRISON, 2003).

Os diferentes subtipos de sarcomas de tecidos moles diferem em termos do tecido de origem, alterações genéticas, comportamento clínico ou sensibilidade a certas terapias, agressividade e padrão de crescimento. Entre os subtipos histológicos mais comuns está o fibrossarcoma (ENGELLAU et al., 2004; GUSTAFSON, 1994; WIBMER et al., 2010).

#### 2.1.1 Fibrossarcoma

O fibrossarcoma é um tumor sólido derivado do tecido conjuntivo denso. Esta neoplasia se caracteriza pela presença de células fusiformes com diferenciação fibroblástica, e pela formação variável de colágeno. As células derivadas de fibrossarcoma sintetizam grandes quantidades de componentes da matriz extracelular (MEC), incluindo hialuronam, proteoglicanos, colágenos (tipo I, tipo III e tipo V), fibronectina e laminina. Desta forma, as células neoplásticas alteram a

composição e organização da MEC, facilitando assim o crescimento, sobrevivência e invasão do fibrossarcoma (COLLINI et al., 2009; JAYAMATHI et al., 2010; NIKITOVIC et al., 2013; SMIRNOV, 1988).

Existem dois tipos de fibrossarcoma, os quais representam distintas entidades genéticas e clínico-patológicas: o fibrossarcoma infantil (congênito) e o fibrossarcoma adulto. Destacaremos este último tipo, devido que a linhagem celular HT1080 utilizada é derivada de um tumor de fibrossarcoma adulto. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais do 80% dos fibrossarcomas de adultos apresentam alto grau de malignidade (grau 2 ou 3), formando lesões bastante agressivas. Portanto, os fibrossarcomas são resistentes à quimioterapia; e apresentam metástase para os pulmões e ossos, particularmente para o esqueleto axial. É importante salientar que não foram identificados os fatores que propiciam o surgimento do fibrossarcoma adulto, porém algumas lesões tendem a formar-se em sítios previamente irradiados (BAHRAMI; FOLPE, 2010; COLLINI et al., 2009; FICHER; VAN DEN BERG; MOLENAAR, 2002; FOLPE, 2014).

Na clínica, o fibrossarcoma apresenta elevado índice de recorrência local e baixa incidência de metástase hematogênica e/ou metástase em linfonodos regionais (KOTRASHETTI et al., 2012).

#### 2.2 Progressão tumoral

O câncer é uma doença heterogênea que envolve alterações dinâmicas no genoma (FOULDS, 1954). Durante o desenvolvimento do câncer, as células normais evoluem progressivamente para um estado neoplásico em resposta ao acúmulo de alterações genéticas. O termo progressão tumoral então inclui todas as alterações que levam às células normais se transformarem em células tumorais (GERDES et al., 2014; HANAHAN; WEINBERG, 2011; THIAGALINGAM, 2006). Porém, a biologia dos tumores não se define simplesmente pelas diversas características que as células tumorais adquirem, mas também engloba contribuições do microambiente tumoral para o processo de tumorigênese (HANAHAN; COUSSENS, 2012; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

No decorrer da progressão tumoral, as células tumorais adquirem uma série de características que lhes permitem crescer em um ambiente estranho e hostil, permitindo-lhes escapar para sistemas endógenos de proteção. Dentre as capacidades adquiridas pelas células tumorais podemos destacar a sustentação do sinal de proliferação, a evasão dos supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, indução da angiogênese, ativação de mecanismos de invasão e metástases (Figura 1) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).



Figura 1 – Capacidades adquiridas pelas células tumorais que favorecem o desenvolvimento tumoral. Adaptado de (Hanahan; Weinberg, 2011).

Uma das características fundamentais da célula tumoral é a clonalidade tumoral, isto é, o desenvolvimento de tumores a partir da proliferação anormal de uma única célula (COOPER, 2000). Para tal fim, as células tumorais produzem de forma anormal fatores de crescimento e citocinas que estimulam sua própria proliferação, bem como o desenvolvimento de mecanismos compensatórios que aumentam a ativação dos receptores de diversos fatores de crescimento. A descontrolada das células tumorais proliferação está acompanhada da insensibilidade destas células aos sinais das moléculas inibidoras de crescimento. Ademais, as células tumorais escapam de sinais anti-proliferativos que mantêm a quiescência celular e a homeostasia tecidual, de forma que as células tumorais sobrevivem e proliferam no tecido (ALLEN; LOUISE JONES, 2011; GHEBRANIOUS; DONEHOWER, 1998; HANAHAN; WEINBERG, 2011; LANDRISCINA et al., 2009; LIPINSKI; JACKS, 1999).

Existem dois tipos de genes que estão principalmente envolvidos na transformação neoplásica: os proto-oncogenes, os quais são responsáveis pela regulação positiva da proliferação celular; e os genes supressores de tumores que se encarregam de inibir a multiplicação das células. Durante o desenvolvimento

tumoral ocorre a ativação de proto-oncogenes simultânea à inativação de genes supressores de tumor. Desta forma, as células tumorais adquirem a habilidade de resistir à morte celular (apoptose) (HANAHAN; WEINBERG, 2011; LODISH et al., 2000). Os mecanismos mais comuns através dos quais as células tumorais resistem à apoptose, consistem em mutações genéticas em genes supressores de tumores, como o gene p53. Normalmente, este gene está encarregado de manter a integridade do DNA e induzir a cascata apoptótica. Porém, nas células que apresentam o gene p53 mutado não acontece a reparação do DNA, levando a estas células à sobrevivência e proliferação com um genoma corrompido (DERKSEN et al., 2006; GIANNONI et al., 2009; HANAHAN; WEINBERG, 2011; HARRIS, 1996).

Por outro lado, as células tumorais têm um metabolismo mais acelerado do que as células normais. Elas então precisam de mais oxigênio e nutrientes, os quais são fornecidos pelo aumento dos vasos sanguíneos que proliferam ao redor da população de células tumorais. A neovascularização é um pré-requisito para a rápida expansão clonal, característica da formação de tumores macroscópicos (Figura 2) (BOUCK; STELLMACH; HSU, 1996; HANAHAN; FOLKMAN, 1996; HANAHAN; WEINBERG, 2011; WEIS; CHERESH, 2011).

A angiogênese representa uma etapa crítica na progressão tumoral. Esse processo não é só importante para o crescimento e sobrevivência do tumor, mas também para favorecer a disseminação das células tumorais para outros tecidos. Desta forma, os novos vasos sanguíneos são facilmente penetrados pelas células tumorais, proporcionando uma oportunidade para que estas células entrem no sistema circulatório e iniciem o processo metastático (Figura 2) (BIANCO et al., 2006; COOPER, 2000; FOLKMAN, 2003; WEIS; CHERESH, 2011).



Figura 2 – Processo de formação de tumores metastáticos a partir de um tumor primário. (A) Tumores primários (B) produzem fatores angiogênicos, os quais promovem a formação de novos vasos sanguíneos. (C) A angiogênese ou neovascularização favorece a rápida expansão do tumor, através (D) do ingresso das células tumorais para a corrente sanguínea. (E) Na corrente sanguínea, as células tumorais interagem com as células endoteliais dos vasos sanguíneos. Para logo, (F) sair através da parede do vaso sanguíneo e (G) migrar para locais proximais às arteríolas, (H) favorencendo assim a formação de micrometástases. (I) A iniciação da angiogênese no sítio secundário libera as colónias metastáticas da dormência e permite um crescimento rápido. Adaptado de (Zetter, 1998).

A metástase é um processo complexo, que inclui uma sucessiva e dinâmica serie de eventos, juntamente com alterações da morfologia celular e função biológica (GUO et al., 2011). Tanto a invasão quanto a metástase são processos intimamente interligados e diretamente relacionados com tumores malignos. Ambos processos envolvem alterações na ligação física das células ao seu microambiente, e a ativação de proteases extracelulares específicas. Por conseguinte, a progressão tumoral é dependente da interação entre as células tumorais e as células do microambiente circundante (CAVALLARO; CHRISTOFORI, 2004; HANAHAN; WEINBERG, 2011; RIDGE; SULLIVAN; GLYNN, 2017).

#### 2.3 Microambiente tumoral

A biologia dos tumores não se define simplesmente pelas diversas características que as células tumorais adquirem, mas também abrange contribuições do microambiente tumoral para a progressão tumoral. Portanto, o

sucesso no desenvolvimento dos tumores é conduzido pelo microambiente tumoral (BHOWMICK; NEILSON; MOSES, 2004; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O microambiente tumoral representa um nicho complexo, o qual é constituído por moléculas e componentes da MEC, assim como, por células normais (estromais) que circundam as células tumorais. Entre as células estromais podemos mencionar os fibroblastos, células endoteliais, adipócitos, células do sistema imunológico e inflamatórias (macrófagos, leucócitos), entre outras (Figura 3). Essa elaborada infraestrutura promove a transformação neoplásica; protegendo o tumor do sistema imune, auxiliando o crescimento do tumor e favorecendo a invasão e metástase tumoral (GKRETSI et al., 2015; HANAHAN; COUSSENS, 2012; KELLER; LI, 2011; SWARTZ et al., 2012).



**Figura 3 – Esquema representativo do microambiente tumoral.** O microambiente tumoral é constituído pelos componentes da matriz extracelular, vasos sanguíneos e células estromais (Fibroblastos, leucócitos, macrófagos, entre outros) que circundam às células tumorais. Adaptado de (Bresnick; Weber; Zimmer, 2015).

O microambiente tumoral é reconhecido por ser um produto da interação entre diferentes tipos celulares (HANAHAN; COUSSENS, 2012). A comunicação intercelular então é conduzida por uma complexa e dinâmica rede de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas de remodelação da MEC, o que produz perturbações às propriedades físicas e químicas do tecido (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

As células estromais têm uma função dinâmica na promoção da progressão tumoral. Assim, os fibroblastos associados ao câncer, por exemplo, propiciam uma rede de comunicação através da secreção de fatores de crescimento e quimiocinas, induzindo alterações na MEC, aumentando a proliferação celular e invasão tumoral (KALLURI; ZEISBERG, 2006; MUELLER; FUSENIG, 2004).

A progressão do tumor não depende só da angiogênese, mas também das células inflamatórias. Além disso, as células tumorais produzem substâncias inflamatórias que desempenham normalmente um papel natural na reparação de feridas, porém, no câncer essas substâncias agem como agentes químicos que favorecem a proliferação celular. A inflamação, portanto, pode acelerar o ciclo celular, prevenir a morte celular e estimular a angiogênese, o qual é essencial para o crescimento de tumores sólidos (DE VISSER; KORETS; COUSSENS, 2005; FOLKMAN, 1971; KUNDU; SURH, 2008; PEEK; MOHLA; DUBOIS, 2005). Encontrase bem estabelecido que a interleucina-8, conhecida como uma citocina pró-inflamatória, desempenha um papel importante no crescimento tumoral e na promoção da angiogênese e metástase (LAI et al., 2011). Assim, a interleucina-8 além de ser responsável pelo recrutamento de leucócitos e neutrófilos, participa na neovascularização do câncer, através da indução de uma resposta migratoria de células endoteliais (BOBROVNIKOVA-MARJON et al., 2004; ZLOTNIK; YOSHIE, 2000).

Por outro lado, as células tumorais secretam diretamente uma variedade de proteínas, que incluem fatores de crescimento e proteinases que degradam a MEC, ou induzem o recrutamento de biomoléculas que são hábeis na degradação da MEC e moléculas de adesão. Portanto, essas proteínas secretadas para a MEC estão envolvidas na adesão celular, motilidade, comunicação intercelular e invasão (HANDSLEY; EDWARDS, 2005; MBEUNKUI; JOHANN, 2009).

#### 2.4 Matriz Extracelular (MEC)

A MEC consiste de uma rede complexa de macromoléculas que preenchem os espaços intercelulares. As macromoléculas são constituídas por proteínas fibrosas e não fibrosas imersas em uma substância fundamental, a qual está formada por glicosaminoglicanos e proteoglicanos. As proteínas fibrosas da MEC, como o colágeno e a elastina, têm função principalmente estrutural, enquanto as proteínas não fibrosas, como a laminina, fibronectina, tenascina, entactina, entre outras, são importantes na adesividade celular (BRASILEIRO, 2004). As proporções entre os componentes fibrosos e não fibrosos, diâmetro das fibras e organização de elementos não fibrosos ditam as propriedades bioquímicas e biomecânicas da matriz extracelular de determinado tecido. As proteínas da MEC são grandes e multifuncionais, e possuem domínios que conferem várias funções a uma mesma macromolécula (LU; WEAVER; WERB, 2012; OZBEK et al., 2010). Essas proteínas podem então estar envolvidas na interação célula-célula, controlando a arquitetura tissular, orquestrando a adesão, a migração, a proliferação e a diferenciação celular (PARAMESWARAN et al., 2006).

A multifuncionalidade da MEC depende de suas diversas propriedades físicas, bioquímicas e biomecânicas. A MEC não propicia só o suporte estrutural e integridade do tecido, mas também funciona como um local de ancoragem à membrana basal, o qual é essencial para vários processos biológicos (como a divisão celular assimétrica, biologia das células precursoras e manutenção da polaridade do tecido). Ademais, a MEC funciona como uma barreira ou um caminho de movimento, desta forma bloqueia ou facilita a migração de células (Figura 4) (LU; WEAVER; WERB, 2012).

Por outro lado, a MEC pode se ligar às moléculas de sinalização impedindo a sua difusão livre. Desta forma, a MEC atua como um dissipador para estes sinais, ajudando a formar gradientes de concentração. Alguns componentes da MEC (como os proteoglicanos) podem se ligar seletivamente a diferentes fatores de crescimento funcionando assim como co-receptores e apresentadores de sinais (HYNES, 2009; LU et al., 2011; NORTON et al., 2005). Porém, a MEC também pode iniciar diretamente eventos de sinalização, através da liberação de fragmentos bioativos, os quais foram processados por proteases (como as MMPs). Finalmente, as células sentem diretamente as propriedades biomecânicas da MEC, incluindo a sua rigidez, o que desencadeia uma grande variedade de comportamentos nas células (Figura 4) (HYNES, 2009; LU et al., 2011).



**Figura 4 – Mecanismos de função da MEC.** Ancoragem à membrana basal (fase 1). Barreira contra o movimento bloqueando a migração celular (fase 2). Caminho que facilita a migração celular (fase 3). Reservatório de moléculas (fase 4). Co-receptor de sinais (fase 5) ou apresentador de sinais (fase 6). Liberação de fragmentos bioativos (fase 7). Alterações no comportamento celular devido a modificações nos componentes da MEC (fase 8). Adaptado de (Lu; Weaver; Werb, 2012).

No microambiente tumoral, o papel da MEC não está limitado a atuar somente como uma barreira física à neoplasia. Também serve como depósito para fatores biologicamente ativos, como fatores de crescimento, citocinas, proteases, hormônios, entre outros, os quais influenciam a migração, aderência, proliferação, grau de diferenciação e predisposição a apoptose (BORNSTEIN; SAGE, 2002; DECLERCK et al., 2004; HEMLER; RUTISHAUSER, 2000).

A invasão e metástase dos tumores envolve a degradação da MEC, por ação de enzimas proteolíticas. Estas enzimas atuam desorganizando a matriz, através de processos que alteram as interações célula-célula e célula-matriz. As enzimas que têm maior importância no comportamento maligno de neoplasias são as metaloproteinases, as quais são produzidas tanto pelas células estromais como pelas próprias células tumorais. Portanto, a degradação da MEC por metaloproteinases é um evento chave na progressão tumoral (DECLERCK et al., 2004; FOLKMAN; SHING, 1992; STAMENKOVIC, 2000).

#### 2.5 Metaloproteinases de Matriz (MMPs)

As MMPs são endopeptidases, que pertencem a uma família de mais de 25 subtipos de proteases dependentes de zinco e cálcio. Estas endopeptidases se caracterizam por ser capazes de clivar macromoléculas presentes não só na MEC, mas também na superfície celular. Tais moléculas incluem colágeno, fibronectina, laminina, proteoglicanos, fatores de crescimento, receptores tirosina-quinase, moléculas de adesão celular, citocinas e quimiocinas, entre outras MMPs e proteases não relacionadas (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010; STERNLICHT et al., 2005; VISSE; NAGASE, 2003).

Em geral, as MMPs são constituídas por um peptídeo sinalizador, um pródomínio auto inibitório (ou domínio pró-peptídico), um domínio catalítico com um sítio de ligação para o zinco, e um domínio C-terminal hemopexina. Este último contribui para o reconhecimento adeguado do substrato, ativação, localização, internalização e degradação da enzima (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010; OVERALL, 2002; OVERALL; BLOBEL, 2007). As MMPs são inicialmente sintetizadas na forma de precursores latentes, denominados pró-enzimas ou zimogênios, cuja latência é mantida através da interação entre o resíduo de cisteína presente no pró-domínio com o íon zinco do domínio catalítico. A quebra desta interação pode acontecer através da remoção proteolítica do pró-domínio ou modificações químicas (como estresse oxidativo e detergentes) do resíduo de cisteína (OVERALL, 2002; PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007; RA; PARKS, 2007; ROZANOV et al., 2004). A clivagem proteolítica do pró-domínio é realizada por convertases, e essa clivagem pode ocorrer intracelularmente por uma furina ou extracelularmente por outras MMPs ou proteinases serina (como a plasmina). Desta forma, a clivagem do domínio pró-peptídico deixa o sítio catalítico da enzima livre para a interação com o respectivo substrato (Figura 5A) (DERYUGINA et al., 2004; REMACLE; MURPHY; ROGHI, 2003; ROZANOV et al., 2004; STERNLICHT; WERB, 2001).

De acordo com a sua estrutura, especificidade de substrato e propriedades funcionais, as MMPs podem ser classificadas em solúveis e MMPs ancoradas à membrana celular (MT-MMP) (Figura 5B) (PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007; ROWE; WEISS, 2009). As MMPs solúveis são classificadas em colagenases, gelatinases, estromelisinas, matrilisinas e outras (HUA et al., 2011). A maioria das MMPs solúveis é secretada como pró-enzimas e requerem ativação no meio extracelular (HARPER; BLOCH; GROSS, 1971), enquanto que as MT-MMPs são ativadas intracelularmente e expressas na superfície celular na forma ativa (NABESHIMA et al., 2002).



**Figura 5 – Estrutura esquemática das MMPs. (A)** As MMPs são constituídas por um pródomínio, um domínio catalítico e um domínio C-terminal hemopexina. A ativação das MMPs acontece através da clivagem proteolítica do pró-domínio. **(B)** Simplificadamente, as MMPs podem ser divididas em MMPs solúveis e MMPs ancoradas à membrana (MT-MMP). Adaptado de (Page-Mccaw; Ewald; Werb, 2007).

A regulação da atividade proteolítica das MMPs pode ser feita através de inibidores fisiológicos, especialmente pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). O equilíbrio tecidual entre MMPs e TIMPs é primordial para a dinâmica da degradação da MEC, tanto em condições fisiológicas quanto em eventos patológicos. Portanto, é necessário que haja um controle rígido das atividades das proteases, para evitar danos teciduais indesejáveis (DEVY et al., 2002; HUA et al., 2011).

As MMPs regulam uma variedade de processos fisiológicos e eventos de sinalização. Estas enzimas participam então das etapas de proliferação celular, diferenciação, remodelamento da matriz extracelular, vascularização e migração celular (CHANG; WERB, 2001; KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010). Além

disso, as MMPs desempenham uma função importante em processos patológicos, como a comunicação molecular entre o tumor e o estroma (GRASSO; BONNET, 2014; KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010). Assim, as MMPs são abundantemente expressas em várias neoplasias malignas e estão implicadas em todos os estágios de sua progressão (IKEJIRI et al., 2005).

As MMPs produzidas tanto pelas células tumorais como pelas células estromais ampliam o processo de invasão tumoral através da degradação da MEC. Elas podem criar espaços para a migração, regular a arquitetura celular (por meio de efeitos na matriz e nas junções intercelulares), bem como ativar, desativar ou modificar moléculas de sinalização (PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007; SHARMA et al., 2013). As MMPs podem então processar moléculas da superfície celular, proteínas da MEC ou fatores de crescimento e citocinas armazenados na MEC, causando alterações no microambiente e favorecendo o crescimento tumoral, migração, invasão, angiogênese e seleção de clones celulares resistentes a apoptose (LYNCH; MATRISIAN, 2002). Portanto, as metaloproteinases são importantes para a criação de um ambiente que facilite o início e manutenção do crescimento de tumores primários e metastáticos (CHAMBERS; MATRISIAN, 1997).

### 2.6 Adamalisinas

As adamalisinas pertencem à superfamília de metaloproteinases dependentes de zinco. Distinguem-se dois grupos de metaloproteinases: as ADAMs que são proteases ancoradas à membrana plasmática, e as ADAMTS que são secretadas à MEC (Figura 6B) (ROCKS et al., 2008; WOLFSBERG et al., 1995).

As ADAMs (*uma desintegrina e metaloproteinase*) são uma família de proteínas transmembrânicas, caracterizadas pela presença de múltiplos domínios estruturais conservados. A estrutura complexa destas proteínas consiste em um sinal de sequência N-terminal, seguido por um pró-domínio, um domínio metaloproteinase (domínio catalítico), um domínio semelhante a desintegrina, um domínio rico em cisteína, um domínio similar ao EGF (fator de crescimento epidermal), um domínio transmembrânico e uma cauda citoplasmática (Figura 6A). Da mesma forma como nas MMPs, a ativação das ADAMs acontece após a remoção ou clivagem do pró-domínio, e mudança da sua distribuição intracelular (REISS; SAFTIG, 2009). Os diferentes domínios das ADAMs apresentam funções

independentes, porém complementares. Desta forma, estas proteínas são dotadas com características de metaloproteinases e moléculas de adesão (BLOBEL, 1997; ZHANG et al., 1998).

As ADAMs exercem um papel fundamental na regulação do fenótipo celular: modulando a interação célula-célula, a adesão à MEC, o processamento proteolítico de diversas moléculas de superfície e de sinalização intra e intercelular (EDWARDS: HANDSLEY: PENNINGTON, 2008; PRIMAKOFF: MYLES, 2000). Assim, a ativação das ADAMs influencia tanto a promoção da adesão celular em tumores, através da interação entre os domínios desintegrina com as integrinas e proteoglicanos; como a invasão tumoral e metástase, através da clivagem e liberação de moléculas de superfície celular e fatores solúveis presentes na MEC (ARRIBAS; BECH-SERRA; SANTIAGO-JOSEFAT, 2006; FLUHRER; HAASS, 2007). Por outro lado, a desregulação das ADAMs pode contribuir para mecanismos patológicos, tais como o câncer. doencas neurológicas е cardiovasculares, infeccão inflamação е (CHRISTIAN, 2012; EDWARDS; HANDSLEY; PENNINGTON, 2008).



Figura 6 – Representação esquemática das ADAMs, ADAMTSs e MMPs. (A) Domínios estruturais das ADAMs, ADAMTSs e MMPs. As ADAMs e ADAMTSs apresentam pródomínios e domínios catalíticos homólogos às MMPs. As três metaloproteinases diferem nos seus domínios auxiliares C-terminais, os quais medeiam a interação com substratos e outras proteínas. (B) Em contraste com as ADAMs, as ADAMTSs são metaloproteinases secretadas que não possuem domínios transmembrânicos e citoplasmáticos. Adaptado de (Yang; Chanalaris; Troeberg, 2017).
ADAMTSs (uma desintegrina e metaloproteinase As com motivos trombospondina) são enzimas semelhantes às MMPs, dependentes de zinco e cálcio (PORTER et al., 2005). As ADAMTSs atuam em muitos processos bioquímicos e biológicos (fisiológicos ou patológicos), incluindo a degradação específica dos proteoglicanos agrecam e versicam, ativação de receptores de superfície celular e fatores de crescimento (LE GOFF; CORMIER-DAIRE, 2011). Além disso, as ADAMTSs estão envolvidas em diversas funções, tais como a angiogênese (IRUELA-ARISPE; CARPIZO; LUQUE, 2003; LE GOFF; CORMIER-DAIRE, 2011), organogênese (PORTER et al., 2004), migração celular (KELLER; BRADLEY; ACOTT, 2009), processamento do colágeno (LE GOFF; CORMIER-DAIRE, 2011) e clivagem da protease do fator de Von Willebrand para a homeostase de coagulação sanguínea e inflamação (APTE, 2009; KUNO et al., 1997).

Foram descritos 19 membros da família ADAMTSs, todas elas compartilham de uma estrutura em comum. Esta estrutura compreende a partir da região Nterminal: um sinal de sequência, um pró-domínio, um domínio metaloproteinase, um domínio semelhante a desintegrina, um domínio trombospondina (TSP) na região central, um domínio rico em cisteína e uma região espaçadora. A diferença entre os diferentes membros das ADAMTSs está na quantidade de motivos TSP e a presença de alguns domínios adicionais (como os domínios protease & lacunina, domínios Gon-1, domínios semelhantes à mucina e domínios Cub) presentes na região C-terminal (Figura 7) (APTE, 2004; KUNO et al., 1997; PORTER et al., 2005; TORTORELLA et al., 2009).



**Figura 7 – Domínios estruturais e análise filogenética dos membros da família ADAMTS.** Adaptado de (Stanton et al., 2011).

Da mesma forma que as MMPs, as ADAMTSs precisam ser ativadas através da clivagem do pró-domínio por convertasas (como a furina). O pró-domínio não só mantem as ADAMTSs em estado latente, por ficar próximo ao sítio catalítico e dificultar o reconhecimento do substrato e hidrólise; mas também mantem a correta conformação das ADAMTSs para a sua secreção (PORTER et al., 2005; ROCKS et al., 2008; STANTON et al., 2011).

O domínio catalítico possui uma sequência de ligação ao zinco (HEBxHxBGBxH), na qual três resíduos de histidina coordenam a um íon de zinco, essencial para a hidrólise (GOMIS-RÜTH, 2009). Próximo ao domínio catalítico se encontra um domínio semelhante a desintegrina, este tem um 35 a 45% de similaridade com as desintegrinas do veneno de cobra (HUANG, 1998). Assim, o domínio semelhante a desintegrina funciona regulando a atividade das ADAMTSs, provavelmente fornecendo uma superfície auxiliar de ligação ao substrato (GERHARDT et al., 2007). Já, o domínio rico em cisteína e a região espaçadora,

determinam tanto o reconhecimento e a ligação da protease aos substratos, assim como a localização das ADAMTSs na MEC (FUSHIMI et al., 2008; GENDRON et al., 2007).

Entre o domínio semelhante a desintegrina e o domínio rico em cisteína se encontra um motivo TSP central. Este motivo TSP é altamente conservado entre todas as ADAMTSs, e possui atividade antiangiogênica e antitumoral (LIU; XU; YU, 2006). Por outro lado, os motivos TSP adicionais presentes na região C-terminal, atuam juntamente com o domínio semelhante a desintegrina. Desta forma, os motivos TSP adicionais apresentam papéis importantes na localização apropriada da protease na MEC e no reconhecimento de substratos (como a heparina ou outros receptores) (PORTER et al., 2005; STANTON et al., 2011).

A estrutura multidomínios das ADAMTSs, confere-lhes de características distintivas e habilidades funcionais, como o reconhecimento de substratos e propriedades de ligação e ancoramento (APTE, 2009). Porém, quando as ADAMTSs sofrem proteólise na sua região C-terminal, propiciam a expansão das propriedades funcionais. Desta forma, as modificações nas ADAMTSs alteram a ligação e o reconhecimento de proteínas da MEC e da superfície celular. Ademais, alguns dos fragmentos C-terminais libertados podem exibir atividades biológicas autónomas (RODRIGUEZ-MANZANEQUE et al., 2000).

Com base na sua estrutura e/ou funcionalidade, a família ADAMTS é geralmente subdividida em quatro classes: agrecanases ou proteoglicanases (ADAMTS -1, -4, -5, -8, - e -15), pró-colageno-n-peptidase (ADAMTS -2, -3 e -14), clivagem do fator de Von Willebrand (ADAMTS-13), e aquelas proteases com funções indefinidas (APTE, 2009; PORTER et al., 2005).

#### 2.6.1 ADAMTS-1

A protease ADAMTS-1 é o primeiro membro identificado da família ADAMTS. Inicialmente, ADAMTS-1 foi descrita como um mediador da inflamação (KUNO et al., 1997). Entretanto, a atividade desta protease tem sido associada na organogênese (GÜNTHER et al., 2005; THAI; IRUELA-ARISPE, 2002), foliculogênese ovariana e formação de vasos sanguíneos e linfáticos (BROWN et al., 2006; LUQUE; CARPIZO; IRUELA-ARISPE, 2003). Esta protease foi denominada de ADAMTS-1 devido à presença de três motivos trombospondina do tipo 1 (TSP1) dentro da sua estrutura. O primeiro motivo TSP1 está localizada na região média da sequência de aminoácidos desta protease, no entanto que os dois motivos TSP1 restantes estão localizados na região C-terminal (Figura 8) (COUSSENS; WERB, 1996; KUNO et al., 1997).

Inicialmente, ADAMTS-1 é sintetizada como um pró-zimogênio (110 kDa). Logo após da tradução da ADAMTS-1, ela sofre glicosilação e passa por dois eventos de processamento independentes e sequenciais, os quais liberam para a MEC as formas maduras de 87 kDa e 65 kDa. A secreção da forma madura de 87 kDa requer a excisão do pró-domínio por endopeptidases furina. Um segundo evento de processamento produz a forma madura de 65 kDa, isto por meio da autoclivagem proteolítica dos dois motivos TSP1 localizados na região C-terminal da ADAMTS-1 (Figura 8) (REHN et al., 2007; RODRIGUEZ-MANZANEQUE et al., 2000).



**Figura 8 – Formas da protease ADAMTS-1.** Estrutura geral da ADAMTS-1, indicando os dois eventos de processamento independentes e sequenciais (setas pretas). ADAMTS-1 é sintetizada como um pró-zimogênio de 110 kDa. A excisão do pró-domínio por endopeptidases furina, produz a forma madura de 87 kDa. A forma madura de 65 kDa resulta de um segundo evento de auto-clivagem proteolítica na região espaçadora da ADAMTS-1. Adaptado de (Rodriguez-Manzaneque et al., 2000).

A forma madura da ADAMTS-1 remodela a MEC através da degradação proteolítica de substratos. O domínio catalítico metaloproteinase facilita então a clivagem de colágeno tipo I (REHN et al., 2007), proteoglicanos (agrecam, versicam, sindecam-4) (HU et al., 2012; NAKAMURA et al., 2005), proteínas da membrana basal (nidogênio 1 e 2) e proteínas TSP1 (CANALS et al., 2006; TAN; RICCIARDELLI; RUSSELL, 2013). Por outro lado, o motivo TSP1 central apresenta

sequências de aminoácidos que interagem diretamente com a forma latente do TGFβ (fator de crescimento transformante beta) (BOURD-BOITTIN et al., 2011). Já os dois motivos TSP1 presentes na região C-terminal, associa-se com glicosaminoglicanos sulfatados e fibulina-1. Ademais, estes motivos interagem diretamente com os receptores para TSP1 (CD36 e CD47) e glicoproteínas lb (TAN; RICCIARDELLI; RUSSELL, 2013).

ADAMTS-1 é uma metaloproteinase multifuncional, e sua expressão pode ser detectada em uma variedade de neoplasias e eventos de remodelação da MEC (PORTER et al., 2005; ROCKS et al., 2008). A desregulação da ADAMTS-1 está associada a vários tipos de cânceres. Assim, uma diminuição da expressão de ADAMTS-1 ocorre frequentemente com o início de muitos cânceres primários. Porém, o aumento de ADAMTS-1 confere mudanças no comportamento das células tumorais, auxiliando e promovendo a invasão tumoral e metástase. Por conseguinte, os níveis reduzidos de ADAMTS-1 durante o desenvolvimento do tumor, e o aumento desses níveis durante a progressão metastática, indicam que ADAMTS-1 possui um papel relevante no câncer (LIU; XU; YU, 2006; MASUI et al., 2001; MINN et al., 2005; RICCIARDELLI et al., 2011; TAN; RICCIARDELLI; RUSSELL, 2013).

O mecanismo de ação da ADAMTS-1 na progressão tumoral ainda não está claramente definido. Embora a molécula inteira de ADAMTS-1 promova a metástase, os fragmentos da molécula que não possuem atividade catalítica mostraram um efeito inibitório contra a metástase. A atividade anti-tumoral dos fragmentos de ADAMTS-1 depende então do motivo TSP-1, o qual é mascarado na molécula de comprimento total. Portanto, dependendo do local de auto-clivagem proteolítica, ADAMTS-1 pode estar relacionada à atividade antitumoral (PORTER et al., 2005) ou atividade pró-tumoral e estimuladora de metástase (LIU; XU; YU, 2006; LU et al., 2009).

Ademais, ADAMTS-1 atua como um fator anti-angiogênico, através do sequestro de fatores de crescimento, como o VEGF 165 (fator de crescimento endotelial vascular). Desta forma, ADAMTS-1 impede a interação do fator de crescimento com seu respectivo receptor (KUNO et al., 2000; RUSSELL et al., 2003; SANDY et al., 2001). A interação direta do VEGF 165 com a ADAMTS-1 acontece na região espaçadora junto com o motivo TSP1 localizado na região C-terminal (IRUELA-ARISPE; CARPIZO; LUQUE, 2003; LUQUE; CARPIZO; IRUELA-ARISPE, 2003). Por outro lado, ADAMTS-1 pode promover a angiogênese e invasão tumoral,

através da sua atividade *sheddase* sobre os precursores transmembrânicos do fator de crescimento epidermal ligado a heparina (HB-EGF) e ativação do seu receptor (LIU; XU; YU, 2006). Por conseguinte, ADAMTS-1 pode afetar as atividades de diferentes fatores de crescimento envolvidos na progressão tumoral, tornando a esta protease um importante alvo de investigação.

A interação da protease ADAMTS-1 com as proteínas da MEC e receptores celulares tumorais, torná-la uma candidata a modular o microambiente tumoral, influenciando a progressão tumoral (PORTER et al., 2005). Porém, não está bem estabelecido se a atividade da ADAMTS-1 está relacionada com a função proteolítica exercida pelo domínio metaloproteinase ou pela presença das repetições de TSP1 localizadas na região C-terminal. Ademais, os motivos TSP-1 não estão limitados somente a interagir com um fator de crescimento específico, sendo assim um mecanismo endógeno no controle da biodisponibilidade dos diferentes fatores de crescimento (LIU; XU; YU, 2006; MARGOSIO et al., 2003).

#### 2.7 Fator de crescimento de hepatócitos (HGF)

O HGF atua tanto como um fator pleiotrópico, assim como uma citocina. Este fator de crescimento é secretado principalmente pelas células mesenquimais, tais como fibroblastos e adipócitos (BASILICO et al., 2008; DIRAT et al., 2011; YOSHINAGA et al., 1993). Inicialmente, o HGF é secretado como um precursor biologicamente inerte de cadeia simples. A ativação deste fator de crescimento acontece então após a clivagem proteolítica da ligação entre a Arg494 e Val495 na sua cadeia simples. Assim, a forma madura do HGF consiste em uma cadeia  $\alpha$  e uma cadeia  $\beta$ , ambas ligadas por pontes dissulfídicas (ORGAN; TSAO, 2011).

O HGF se liga e ativa ao receptor tirosina quinase c-Met. Este receptor é um heterodímero, formado por duas unidades dissulfídicas ligadas: uma cadeia  $\alpha$  extracelular e uma cadeia  $\beta$  transmembrânica (COOPER, 1992). A porção extracelular é composta por três tipos de domínios: O domínio semaforina (Sema), o qual engloba a cadeia  $\alpha$  inteira e uma parte da cadeia  $\beta$ ; o domínio PSI (Plexina–Semaforina–Integrina) e o domínio IPT (Imunoglobulina–Plexina–Fatores de transcrição). Intracelularmente, o receptor c-Met é composto por um domínio justamembrana que contém um resíduo de tirosina Y1003; um domínio catalítico de tirosina quinase com resíduos Y1234 e Y1235; e um local de ancoragem

multifuncional que contém as tirosinas Y1349 e Y1356, os quais recrutam várias proteínas adaptadores uma vez ativado o c-Met (Figura 9) (ORGAN; TSAO, 2011).



**Figura 9 – Domínios estruturais do receptor c-Met.** Adaptado de (Comoglio; Giordano; Trusolino, 2008).

A ativação do receptor c-Met desencadeia uma serie de eventos de sinalização. Assim, a ligação do HGF ao seu receptor c-Met induz a homodimerização do c-Met e a fosforilação dos resíduos de tirosinas Y1234 e Y1235 (RODRIGUES; PARK, 1994). Subsequentemente, as tirosinas Y1349 e Y1356 são fosforiladas, o que, promove ao recrutamento e ativação de proteínas adaptadoras e transdutores de sinais intracelulares. Entre os componentes do complexo de sinalização recrutados temos as proteínas adaptadoras Grb-2, Gab-1, SHC, Crk, e outras proteínas transdutoras como PI3K, rasGAP, PLC-γ, src, o fator de troca de nucleotídeos de guanina SOS, as fosfatases SHP2 e SHP1, e o fator de transcrição STAT-3. A formação desses complexos estimula diferentes vias de sinalização, tais como ERK/MAPK, JNK, FAK (quinase de adesão focal), Akt/PKB, STAT 3/5, os quais são essenciais para a regulação do crescimento, sobrevivência, motilidade, invasão e modificações no citoesqueleto das células (Figura 10) (BIRCHMEIER et

al., 2003; FURGE; ZHANG; VANDE WOUDE, 2000; TRUSOLINO; BERTOTTI; COMOGLIO, 2010).



Figura 10 – Componentes do complexo de sinalização recrutados e vias de sinalização ativadas pela ligação do HGF com o seu receptor c-Met. Adaptado de (Organ; Tsao, 2011).

Embora a fosforilação das tirosinas Y1234 e Y1235 modulem positivamente a atividade do c-Met, a fosforilação da tirosina Y1003 regula negativamente a este receptor. Esta regulação negativa acontece com o recrutamento da proteína adaptadora Cbl, após a fosforilação da tirosina Y1003. Assim, forma-se o complexo Cbl-CIN85-endofilina, o qual promove a internalização do c-Met, mediada por vesículas revestidas de clatrina. Portanto, o Cbl facilita a ubiquitinação e degradação proteossomal do c-Met (LI et al., 2007; PETRELLI et al., 2002; RAIBORG; RUSTEN; STENMARK, 2003). Por outro lado, o c-Met pode ser regulado negativamente por ação de várias proteínas tirosina fosfatases (PTPs), ativação da proteína quinase C

(PKC) ou um aumento intracelular dos níveis de cálcio (Figura 10) (GANDINO et al., 1990; GANDINO et al., 1991; GANDINO et al., 1994).

Fisiologicamente, o c-Met é responsável pelo desenvolvimento embrionário e cicatrização de feridas (CORSO; COMOGLIO; GIORDANO, 2005). Assim, com a estimulação do HGF, o c-Met induz inúmeras respostas biológicas, tais como a proliferação celular, sobrevivência, motilidade, dispersão, diferenciação e morfogênese (BIRCHMEIER et al., 2003; TRUSOLINO; COMOGLIO, 2002).

A ativação constitutiva ou prolongada do c-Met está envolvida na formação e progressão tumoral, contribuindo na proliferação, crescimento, dissociação, sobrevivência, transição epitélio-mesênquima (TEM), motilidade, angiogênese, invasão e metástase de uma grande variedade de tumores sólidos (DE HERDT; BAATENBURG DE JONG, 2008; JIANG et al., 1999; SUGAWARA et al., 1997; TRUSOLINO; COMOGLIO, 2002). Ademais, a interação tumor–estroma facilita a disseminação metastática do câncer. Devido que o HGF pode ser secretado tanto pelas células tumorais como pelas células do estroma (TUCK et al., 1996).

Portanto, a desregulação no receptor c-Met tem sido implicada no desenvolvimento e progressão de muitos tipos de cânceres (KRAUSE; VAN ETTEN, 2005). Estudos recentes indicaram um papel importante do c-Met no desenvolvimento e progressão do fibrossarcoma. Isto, devido à expressão de elevados níveis do receptor c-Met nas células tumorais de fibrossarcoma, e a fosforilação constitutiva deste receptor (LIANG et al., 2004; UCHIDA et al., 2001).

2.8 Fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ )

A superfamília TGF-β compreende uma série de fatores estruturalmente relacionados, capazes de regular inúmeros processos celulares, tais como a proliferação, o crescimento, a migração, a motilidade e a diferenciação, além da regulação de componentes da MEC (LAWRENCE, 1996; MASSAGUÉ, 1998).

Na natureza, os TGF-βs podem ser encontradas nas isoformas de TGF-β1, TGF-β2 e TGF-β3, as quais estão relacionadas estrutural e funcionalmente, e codificadas por diferentes genes (BURT; LAW, 1994).

Inicialmente, as isoformas do TGF-β são codificadas sobre a forma de grandes proteínas precursoras. Logo após, elas passam por vários eventos de processamento intracelular, como a clivagem proteolítica por furina endopeptidases.

Assim, as isoformas do TGF- $\beta$  encontram-se organizadas em um dímero proteico localizado na região N-terminal, chamado de peptídeo associado à latência (LAP); e um segundo dímero proteico localizado na região C-terminal, chamado de TGF- $\beta$ maduro (KHALIL, 1999). O LAP então permanece ligado ao TGF- $\beta$  maduro por interações não covalentes, formando um complexo de latência. Porém, uma outra proteína, denominada LTBP (*latent TGF-\beta binding protein*) também compõe este complexo, através da sua ligação ao LAP por pontes dissulfeto (PIEK; HELDIN; TEN DIJKE, 1999). Esta proteína LTBP não é responsável por conferir latência ao TGF- $\beta$ , mas sim está relacionada ao controle da secreção, armazenamento na MEC e ainda à ativação do TGF- $\beta$  (Figura 11) (MASSAGUÉ, 1998).



**Figura 11 – Representação esquemática do processo de ativação do TGF-β.** O TGF-β é sintetizado como uma grande proteína precursora (Pre-pro-TGF-β), a qual sofre clivagem proteolítica por uma furina. Então, forma-se um complexo de latência que está constituído por um dímero LAP (peptídeo associado à latência), um dímero de TGF-β maduro e uma proteína LTBP. Esta última proteína facilita a secreção deste complexo para a MEC, onde torna-se ativo por meio da clivagem por diferentes fatores, como proteases. Desta forma, o TGF-β ativo se liga a seus respectivos receptores (TβR) para iniciar a cascata de sinalização intracelular. Adaptado de (Gressner; Weiskirchen; Gressner, 2007).

Para que o TGF- $\beta$  se ligue ao seu respectivo receptor de membrana e desencadeie o processo de transdução de sinal intracelular, precisa-se quebrar a associação entre o LAP e o TGF- $\beta$  maduro (KHALIL, 1999; MASSAGUÉ, 1998). Portanto, o TGF- $\beta$  torna-se ativo através da clivagem proteolítica entre LAP e o TGF- $\beta$  maduro, por diferentes fatores tais como pH ácido, altas temperaturas, espécies reativas de oxigênio, integrinas, trombospondina e proteases (Figura 11) (GANTT et al., 2003; GUO et al., 2002; MUNGER et al., 1997; MUNGER et al., 1999; SOMANNA; MUNDODI; GEDAMU, 2002).

Os ligantes TGF-ß possuem três receptores de superfície, denominados: receptor de TGF-β do tipo I (TβRI), receptor de TGF-β do tipo II (TβRII) e receptor de TGF-ß do tipo III (TßRIII). A sinalização do TGF-ß ocorre principalmente através dos receptores TBRI e TBRII, os quais são receptores serina/treonina quinase transmembrânicas (MASSAGUÉ, 1998; TEN DIJKE; HILL, 2004). Assim, a ativação da transdução do sinal tem início após a ligação do TGF-β ao seu receptor tipo II (TβRII) e a sua subsequente ligação com o receptor tipo I (TβRI). Esta dimerização leva à fosforilação de proteínas citoplasmáticas denominadas R-SMADs. Dois tipos de proteínas R-SMADs participam da transdução de sinal do TGF-B, SMAD2 e SMAD3, e sua fosforilação promove a formação de homodímeros (pSMAD2/2 ou pSMAD3/3) ou heterodímeros (pSMAD2/3). A transdução do sinal é então mediada por uma proteína SMAD co-estimulatória (C-SMAD), comum à transdução de outros membros da superfamília de TGF-β, SMAD4. O dímero pSMAD liga-se à SMAD4 translocando-se para o núcleo e controlando a transcrição de diversos genes alvo (Figura 12A) (HELDIN; MIYAZONO; TEN DIJKE, 1997; KRETZSCHMAR; MASSAGUÉ, 1998).

Por outro lado, algumas evidências bioquímicas apoiam a ideia de que vias alternativas ou independentes de SMADs também participam da sinalização por TGF-β (MOUSTAKAS; HELDIN, 2005). Assim, o TGF-β pode estar associado a outras vias de sinalização, incluindo as vias MAPKs, ERK, JNK, p38, PI3K, fosfatases PP2A e ainda membros da família Rho. Algumas dessas vias regulam a ativação de SMADs, mas outras podem induzir respostas não relacionadas à transcrição (Figura 12B) (DERYNCK; ZHANG, 2003).



**Figura 12 – Vias de sinalização intracelular do TGF-** $\beta$ **. (A)** Ativação da via clássica de sinalização de TGF- $\beta$ , a qual é dependente da participação das proteínas SMADs. (B) Ativação das vias alternativas de sinalização de TGF- $\beta$ , também denominadas de vias não SMADs. Adaptado de (Akhurst; Hata, 2012).

O TGF-β1 por ser uma proteína multifuncional, tem sido implicada em várias condições fisiológicas e patológicas, incluindo o controle do ciclo celular, invasão e metástase de células tumorais (MASSAGUÉ, 1998). Este fator de crescimento mostrou ter função dupla na progressão tumoral, diminuindo ou promovendo a invasão das células tumorais, dependendo do tipo de tumor e da fase de progressão (MARKOWITZ; ROBERTS, 1996; MASSAGUÉ; ATTISANO; WRANA, 1994). Assim, no caso do fibrossarcoma o TGF-β1 apresenta um efeito anti-invasivo e anti-migratório (KWAK et al., 2006).

# **3 OBJETIVOS**

### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel da protease ADAMTS-1 e sua ligação com o microambiente tumoral do fibrossarcoma. Nosso enfoque foi estudar o efeito da protease ADAMTS-1 na regulação das atividades estimuladas pelos fatores de crescimento (HGF e TGF- β1), sobre a linhagem celular derivada de fibrossarcoma.

## 3.2 Objetivos específicos

- i.) Analisar *in vitro*, o efeito da protease ADAMTS-1 nos processos de proliferação, migração e formação de fibrosarcoesferas nas células de fibrossarcoma (HT1080) tratadas com HGF ou TGF-β1.
- ii.) Elucidar as vias de sinalização clássicas perturbadas pela protease ADAMTS-1, após o estímulo com HGF ou TGF-β1 em células de fibrossarcoma (HT1080).
- iii.) Estudar *in vivo*, o efeito da protease ADAMTS-1, nas células de fibrossarcoma (HT1080) tratadas com HGF, na formação de microtumores em embriões de *zebrafish*.

# **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Esse trabalho envolveu manipulação direta com animais, e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP-IB), parecer nº 99/2012, de 18 de setembro de 2012.

## 4.1 Linhagens Celulares

A linhagem celular derivada de fibrossarcoma (HT1080) foi cultivada em meio mínimo essencial de Eagle (MEM; Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab, Campinas, SP, Brasil). A linhagem derivada de células embrionárias de rim transformadas com adenovírus (HEK293T), foi cultivada em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de SFB (Cultilab).

As células foram mantidas em frascos de 25 cm<sup>2</sup> a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O crescimento das células foi monitorado diariamente em microscópio invertido de contraste de fase, e o meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular. Após atingirem a sub-confluência, as células foram sub-cultivadas. Amostras representativas da cultura foram congeladas e mantidas em recipientes contendo nitrogênio líquido, crio-protegidas com 10% de di-metil sulfóxido (DMSO; Sigma).

# 4.2 Transdução das linhagens celulares HT1080 e HEK293T

Obtivemos comercialmente as partículas virais HPK-LvTR-20 (GeneCopoeia<sup>™</sup>, Rockville, MD, USA) contendo o vetor lentiviral pReceiver-Lv213 (GeneCopoeia<sup>™</sup>) para superexpressar ADAMTS-1. Entre as características do vector lentiviral podemos mencionar a presença do promotor CMV, o gene repórter mCherry (RFP) e o gene de resistência ao antibiótico puromicina (Figura 13). As células HEK293T e HT1080 foram então transduzidas de acordo com as instruções do fabricante.



**Figura 13 – Esquema do vetor lentiviral pReceiver-Lv213.** Adaptado de (GeneCopoeia<sup>™</sup>).

Um dia antes da transdução, as células HT1080 e HEK293T foram cultivadas com seus respectivos meios de cultura, suplementados com 10% de SFB na ausência de antibiótico. Ambas células foram incubadas durante 1 hora a 4 °C, com partículas virais e 10 µg/ml de polibreno (Sigma), ambos adicionados no meio de cultura suplementado com 5% de SFB. Em seguida, o meio contendo as partículas virais foi substituído por meio suplementado com 10% de SFB, e as células foram então mantidas em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Após 5 dias, as células transduzidas para superexpressar ADAMTS-1 foram selecionadas com 1 mg/ml de puromicina durante 2 semanas. Como controle utilizou-se o mesmo vetor sem a sequência para superexpressar ADAMTS-1.

## 4.3 Coleta do meio condicionado (MC)

O meio condicionado foi coletado a partir das células transduzidas HEK293T que superexpressam ADAMTS-1 (chamadas de HEK293T-MPA) e células HEK293T do tipo selvagem (Controle). Ambas células foram cultivadas em placas de 100 mm (Corning, New York, NY, USA) até atingir um 85% de confluência. Logo após, o meio DMEM suplementado com 10% SFB foi substituído por MEM sem soro e mantidas na estufa durante 36 horas. Finalmente, o meio condicionado foi coletado e filtrado em membrana de tamanho de poro de 0,45 µm (Corning) com a finalidade de remover os fragmentos de células.

O meio condicionado das células HEK293T-MPA (MC enriquecido com ADAMTS-1) e o meio condicionado das células HEK293T do tipo selvagem (MC Controle) foram imediatamente usados nos ensaios de incorporação de

bromodeoxiuridina (BrdU), expressão de Ki67, velocidade de migração, *immunoblot* e *hanging drop*.

4.4 Ensaio de incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU)

As células HT1080 transduzidas para superexpressar ADAMTS-1 (chamadas de HT1080-MPA) e células HT1080 controle (HT1080-MPC) foram cultivadas na concentração de 5000 células/lamínula redonda de 13 mm. Após as células passarem pelo período de carenciamento de 48 horas, as células foram tratadas com 10 ng/ml de TGF-β1 (Life Technologies, Eugene, Oregon, USA) ou 10 ng/ml de HGF (Life Technologies) durante 20 horas.

Por outro lado, células HT1080 do tipo selvagem foram cultivadas na concentração de 5000 células/lamínula redonda de 13 mm. A seguir, as células passaram por um período de carenciamento de 48 horas. Após este período as células foram tratadas com 10 ng/ml de HGF, o qual foi acrescido ao MC enriquecido com ADAMTS-1 ou ao MC Controle, durante 20 horas.

Analisamos então a proliferação destas células, através do ensaio de incorporação de BrdU. Para tal fim, as células foram incubadas com 5 µM de bromodeoxiuridina (BrdU; Sigma) adicionado no meio durante as últimas 3 horas de tratamento com os fatores de crescimento. Após as células serem fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos, o DNA das células foi desnaturado com 2 N de HCI durante 30 minutos, para logo ser neutralizado com 0.1 M de tampão borato (0.1 M ácido bórico, 0.15 M NaOH, pH 8.4) durante 10 minutos. As células foram então incubadas com 0.3% de Triton X-100 (Sigma) em PBS por 15 minutos, e bloqueadas com 5% de albumina do soro bovino (BSA; Sigma) e 0.3% de Triton X-100 em PBS durante 1 hora. Subsequentemente, as células foram incubadas overnight com o anticorpo primário anti-BrdU (anticorpo monoclonal gerado em camundongo conjugado a biotina, clone PRB-1, MAB 3252B, Millipore, Billerica, MA, USA), diluído 1:100 em PBS 0.1% de Triton X-100 e 1% de BSA (Sigma). O anticorpo biotinilado foi detectado com estreptavidina-Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) na concentração de 1:500 durante 1 hora. Finalmente, as lamínulas foram montadas com Pro Long with DAPI (Invitrogen) e analisadas em microscópio de fluorescência (Axio vert A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), utilizando objetiva LD-Plan 20 X.

As imagens foram adquiridas de pelo menos cinco campos, usando a câmera digital AxionCam MRc (Carl Zeiss). E através do *software Fiji/ImageJ* foi calculado a percentagem de núcleos que incorporaram BrdU sobre o número total de núcleos (corados com DAPI).

#### 4.5 Ensaio de expressão de Ki67

A proliferação celular do fibrossarcoma foi revisada através do ensaio de expressão do marcador de proliferação Ki67.

Neste ensaio, as células HT1080 do tipo selvagem foram cultivadas na concentração de 5000 células/lamínula redonda de 13 mm durante 24 horas. A seguir, as células passaram por um período de carenciamento de 48 horas, para logo serem tratadas com 10 ng/ml de HGF (Life Technologies), o qual foi acrescido ao MC enriquecido com ADAMTS-1 ou ao MC Controle, durante 20 horas.

Depois desse período de tratamento, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 10 minutos. Em seguida as lamínulas foram permeabilizadas com 0,05% de Triton X-100 (Sigma) durante 1 hora, e bloqueadas com 5% de soro normal de cabra (KPL, Gaithersburg, MD, USA). Logo após o bloqueio dos sítios inespecíficos as amostras foram incubadas *overnight* com o anticorpo primário anti-Ki67 (anticorpo policional gerado em coelho, sc-15402, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), na concentração de 1:50, diluído em PBS 0.1% de Triton X-100 e 1% de BSA (Sigma). As lamínulas foram então incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho IgG produzido em cabra, conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 568 (Invitrogen), na concentração de 1:500 durante 1 hora no escuro. Finalmente, as lamínulas foram montadas com Pro Long with DAPI (Invitrogen) e analisadas em microscópio de fluorescência (Axio vert A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), utilizando objetiva LD-Plan 20 X.

As imagens foram adquiridas de pelo menos cinco campos, usando a câmera digital AxionCam MRc (Carl Zeiss). E através do *software Fiji/ImageJ* foi calculado a percentagem de núcleos positivos para Ki67, a partir do número total de núcleos (corados com DAPI).

#### 4.6 Ensaios de time-lapse

Concomitante à análise de proliferação celular através da incorporação de BrdU e expressão de Ki67, determinamos também a velocidade de migração das células de fibrossarcoma em diferentes condições.

As células transduzidas HT1080-MPA e HT1080-MPC foram cultivadas na concentração de 10.000 células/poço em placas de 12 poços (Corning) durante 24 horas. Após as células passarem por um período de carenciamento de 24 horas, as células foram tratadas com 10 ng/ml de TGF-β1 (Life Technologies) ou 10 ng/ml de HGF (Life Technologies).

Adicionalmente, células HT1080 do tipo selvagem foram cultivadas na concentração de 10.000 células/poço em placas de 12 poços (Corning) durante 24 horas. Após as células passarem por um período de carenciamento de 24 horas, as células foram tratadas com 10 ng/ml de HGF (Life Technologies), o qual foi acrescido ao MC enriquecido com ADAMTS-1 ou ao MC Controle.

As imagens foram adquiridas imediatamente após o tratamento com os fatores de crescimento, através do sistema de microscopia de fluorescência IN Cell Analyzer 2000 (Amersham, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburg, PA, USA). Por meio deste sistema, as células foram mantidas em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. E as imagens foram adquiridas em intervalos de 10 minutos durante o tempo total de 12 horas, utilizando objetiva Plan Apo 10 X/0.45 NA.

Para medir a velocidade de migração celular em µm/hr utilizamos o plugin *MTrackJ* do *software Fiji/ImageJ* (escrito por Erik Meijering, Biomedical Imaging Group Rotterdam, Erasmus MC University Medical Center Rotterdam, the Netherlands), o qual facilita o rastreamento manual das células que não sofreram divisão celular e das células que não tiveram contato umas com as outras.

#### 4.7 Immunoblot

Para elucidar as vias de sinalização estimuladas pelos fatores de crescimento e perturbadas pela protease ADAMTS-1, células transduzidas HT1080-MPA e HT1080-MPC foram cultivadas na concentração de 50.000 células/poço em placas de 6 poços (Corning) durante 24 horas. Após as células passarem por um período de carenciamento de 48 horas, as células foram tratadas com 10 ng/ml de TGF-β1 (Life Technologies) ou 10 ng/ml de HGF (Life Technologies) durante diferentes intervalos de tempo.

Por outro lado, células HT1080 do tipo selvagem foram cultivadas na concentração de 50.000 células/poço em placas de 6 poços (Corning) durante 24 horas. A seguir, as células passaram por um período de carenciamento de 48 horas. Após este período as células foram tratadas com 10 ng/ml de HGF (Life Technologies), o qual foi acrescido ao MC enriquecido com ADAMTS-1 ou ao MC Controle, durante diferentes intervalos de tempo.

As células foram lisadas em tampão RIPA (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxicolato de sódio, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0), contendo inibidores de proteases e fosfatases. O lisados foram sonicados e, em seguida, centrifugados a 15500 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante contendo as proteínas solúveis foram recuperados e quantificados através do Kit de BCA (Pierce Inc, Rockford, IL, USA). Em seguida, foram ressuspendidas em tampão de amostras (*sample buffer*), contendo 150 mM Tris pH 6.8, 3% de SDS, 30% de glicerol, 15% de mercaptoetanol e 0,01% de azul de bromofenol.

A eletroforese foi realizada seguindo o método SDS-PAGE. Foram carregadas 30 µg de proteína por poço, que foram separadas em gel de poliacrilamida 10% (preparado com 1.5 M Tris-HCl, 10% de SDS, 30% de bisacrilamida, 10% de persulfato de amônia e TEMED). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburg, PA, USA).

A fim de marcar proteínas fosforiladas, as membranas foram bloqueadas *overnight* com 5% de BSA (Sigma) em solução salina tamponada com Tris (TBS). E para marcação das proteínas totais (não fosforiladas), as membranas foram bloqueadas em TBS com 5% de leite em pó desnatado e 0.05% de Tween 20 (TTBS) durante 1 hora. Após três lavagens em TTBS, as membranas foram marcadas com os anticorpos primários anti p-cMet (Y1349) (1:500, 130H2, mAB 3133, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), anti p-cMet (Y1003) (1:500, 13D11, mAB 3135, Cell Signaling), anti p-smad2/3 (1:1000, D27F4, mAB 8828, Cell Signaling), anti p-Akt (1:1000, 9275S, Cell Signaling), anti p-ERK1/2 (1:1000, E-4, sc-7383, Santa Cruz), anti p-FAK (1:500, 3282S, Cell Signaling), anti cMet (1:1000, D1C2, mAB 8198, Cell Signaling), anti smad2/3 (1:1000, AB 3102, Cell Signaling), anti Akt

(1:1000, AB 9272, Cell Signaling), anti ERK1/2 (1:1000, C-16, sc-93, Santa Cruz), anti FAK (1:1000, 3285, Cell Signalling) e β-actina (1:4000, Sigma).

Por outro lado, verificamos a superexpressão de ADAMTS-1 nas células HT1080 e HEK293T, a partir da precipitação com etanol absoluto de 1 ml de meio condicionado. As amostras precipitadas foram ressuspendidas em tampão de amostra (*sample buffer*) e sujeitas a eletroforese em géis de poliacrilamida 10%. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose Hybond ECL (GE Healthcare Life Sciences). Em seguida as membranas foram bloqueadas em TBS com 5% de leite em pó desnatado e 0.05% de Tween 20 (TTBS) durante 1 hora. Após três lavagens em TTBS, as membranas foram marcadas com o anticorpo primário anti ADAMTS-1 (1:1.000, Abcam 28284) e  $\beta$ -actina (1:4.000, Sigma).

Os anticorpos primários foram detectados por anticorpos secundários apropriados (anti-camundongo ou anti-coelho) conjugados com peroxidase. As membranas foram então submetidas à revelação utilizando o kit de quimioluminescência *Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e o equipamento MF-ChemiBIS 3.2 (DNR Bio-Imaging Systems, Biocompare). Para possibilitar a marcação com mais de um anticorpo, as membranas foram *stripped* com *Restore Western Blot Stripping Buffer* (Pierce) e submetida a novas marcações.

#### 4.8 Cultura 3D em Hanging Drop

As células HT1080 do tipo selvagem foram cultivadas na concentração de 10<sup>6</sup> células em placas de 100 mm (Corning). Após 24 horas, as células passarem pelo período de carenciamento de 48 horas. Em seguida, a monocamada de células foi tripsinizada e as células foram ressuspendidas com o MC enriquecido com ADAMTS-1 ou MC Controle, na presença ou ausência de 10 ng/ml de HGF (Life Technologies) ou 10% de SFB (Cultilab).

Com o fim de observar a formação de fibrosarcoesferas em condições de perda de adesão (*anoikis*) realizamos a cultura 3D em *Hanging drop*. Para isto, as células foram inoculadas com 20% de metilcelulose (Sigma), na concentração de 5 x 10<sup>4</sup> células em uma gota de 20 µl. Após 8 dias de cultura, as fibrosarcoesferas foram fixadas em paraformaldeído 4% e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma) durante 1 hora. Para logo, as amostras serem incubadas com faloidina

conjugada com Alexa Fluor 488 (Invitrogen), na concentração de 1:100 durante 1 hora. Finalmente as amostras foram montadas com Pro Long with DAPI (Invitrogen) e analisadas em microscópio de fluorescência (Axio vert A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), utilizando objetiva LD-Plan 5 X. As imagens foram adquiridas usando a câmera digital AxionCam MRc (Carl Zeiss). E através do *software Zen* foi calculado o diâmetro das fibrosarcoesferas.

#### 4.9 Micro-injeção de células tumorais em embriões de zebrafish

Para os estudos *in vivo*, foram utilizados embriões de *zebrafish* transgênicos Tg (fli1:EGFP) que expressam a proteína fluorescente EGFP em todas as células endoteliais. Tanto os peixes adultos quanto os embriões foram criados e mantidos de acordo com os regulamentos de bem-estar animal estabelecido pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICB-USP (Protocolo nº 99, p 132, livro 2).

No ensaio de micro-injeção foram utilizados embriões de 48 h.p.f (horas após a fertilização), mantidos em meio de embrião com 0,01% de N-feniltiourea (PTU; Sigma) para evitar a melanização. Após os embriões serem anestesiados com 0,003% de 3-aminobenzoico (Tricaine; Sigma), as células tumorais foram injetadas na cavidade pericárdica.

Previamente ao processo de microinjeção, as células tumorais transduzidas HT1080-MPA e HT1080-MPC, foram carregadas com o corante vital fluorescente vermelho (CellTrace™ calcein orange AM, Life Technologies). Em seguida, as células foram tripsinizadas e ressuspendidas em meio MEM, na presença ou ausência de 10 ng/ml de HGF.

Para a microinjeção utilizou-se o picoinjetor-1000 BTX (Harvard Apparatus Inc, Holliston, MA, USA) equipado com uma agulha de vidro de borosilicato de 0,5 mm (diâmetro de abertura da agulha = 10-20  $\mu$ m, Glass, Standard, 626000). Os parâmetros de injeção foram: pressão de injeção = 24 p.s.i., balance = 3 p.s.i., tempo de injeção = 10 ms.

Os embriões injetados foram mantidos em meio de embrião com 0,01% de PTU (Sigma) a 35,5 °C. Após 4 dias da injeção, os embriões foram eutanasiados com 0.006% de Tricaine (Sigma) e diminuição de temperatura, no qual, a placa petri contendo os embriões com anestésico foi colocada sobre uma superfície gelada (0

<sup>o</sup>C) durante 1 hora. Os embriões foram então lavados com PBS e fixados com paraformaldeído 4% durante 24 horas a 4 <sup>o</sup>C com agitação constante.

Os embriões fixados foram então montados em uma gota de agarose de 0.8%, sobre uma placa petri com lamínula no fundo (MatTek Co., Ashland, MA, USA). As imagens foram adquiridas por meio de microscopia de fluorescência (Zeiss Axio Vert.A1, Carl Zeiss) e microscopia confocal (sistema Zeiss LSM 780, Carl Zeiss), utilizando objetiva EC Plan-Neofluar 20 X/0.5 NA. Utilizou-se o *software Zen* para calcular o diâmetro dos microtumores; e a função *Analyze Particles* do *software Fiji/ImageJ* para analisar a circularidade do cluster celular formado nos embriões.

#### 4.10 Análise dos Resultados

Cada experimento foi realizado em pelo menos três ensaios independentes em triplicata. Os dados obtidos a partir dos experimentos foram analisados usando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). A análise da diferença entre dois grupos foi estimada através do teste t de Student, e a análise da diferença entre três ou mais grupos foi estimada através da análise de variância (ANOVA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para p≤0,05.

#### **5 RESULTADOS**

#### 5.1 Superexpressão de ADAMTS-1 nas linhagens HT1080 e HEK293T

A fim de obter células que superexpressem ADAMTS-1, transduzimos células HT1080 e HEK293T por meio de partículas virais. As células HT1080 que superexpressam ADAMTS-1 foram chamadas de HT1080-MPA (expressão de mCherry-puromicina-ADAMTS-1), enquanto que as células controle foram chamadas de MPC (expressão de mCherry-puromicina). Além disso, as células HEK293T que superexpressam ADAMTS-1 foram chamadas de HEK293T-MPA.

Para confirmar a eficiência da transdução, o lisado total e o meio condicionado das células transduzidas, foram submetidos a *immunoblot*. Através dessa técnica, fomos capazes de observar que as células HT1080-MPA apresentaram no meio condicionado um aumento da forma processada de ~65 kDa da ADAMTS-1, comparado com o meio condicionado das células HT1080-MPC. No entanto que no lisado total não foram observadas diferenças nos níveis de expressão da ADAMTS-1 entre as células HT1080-MPA e HT1080-MPC (Figura 14A).

Por outro lado, observamos que as células HEK293T-MPA apresentaram no meio condicionado um aumento acentuado da forma processada de ADAMTS-1 (~65 kDa) e um aumento discreto nos níveis proteicos da proforma de ADAMTS-1 (~110 kDa). Já no lisado total, observamos um aumento acentuado nos níveis de expressão da proforma de ADAMTS-1 e um aumento discreto nos níveis de expressão da forma de ~65 kDa. Este resultado foi comparado com as células HEK293T do tipo selvagem (Controle: C), as quais não expressam ADAMTS-1 (Figura 14B).



Figura 14 – Eficiência da transdução nas células HT1080 e HEK293T para superexpressar ADAMTS-1. *Immunoblot* do lisado total e meio condicionado das células (A) HT1080-MPC e HT1080-MPA, e (B) HEK293T-C e HEK293T-MPA. MPC representa as células que expressam mCherry-puromicina; MPA representa as células que superexpressam mCherry-puromicina-ADAMTS-1; e C (controle) representa as células HEK293T do tipo selvagem. Os experimentos foram realizados duas vezes com resultados similares.

A seguir, avaliamos se a superexpressão de ADAMTS-1 nas células HT1080 afetava os processos de proliferação e migração celular, estimulados pelos fatores de crescimento (HGF e TGF-β1). Adicionalmente, testamos o efeito do meio condicionado proveniente das células HEK293T-MPA (MC enriquecido com ADAMTS-1) e das células HEK293T de tipo selvagem (MC Controle), sobre a atividade dos fatores de crescimento. Foi utilizado o meio condicionado das células HEK293T-MPA, devido ao fato de que essas células superexpressam e secretam altos níveis de ADAMTS-1 para o meio. Desta forma, o MC enriquecido com ADAMTS-1, mimetiza a protease secretada por outros tipos celulares presentes no microambiente tumoral.

5.2 Efeito da superexpressão de ADAMTS-1 sobre a proliferação celular do fibrossarcoma estimulada por fatores de crescimento (HGF ou TGF-β1)

A fim de analisarmos o padrão de proliferação das células HT1080, realizamos ensaios de incorporação de Bromodeoxiuridina (BrdU) e expressão de Ki67. A partir dos quais observamos que em condições normais (10% SFB), as células HT1080 que superexpressam ADAMTS-1 (HT1080-MPA) apresentaram uma diminuição significativa da proliferação celular, comparado com o respectivo controle (HT1080-MPC, Figura 15A). Porém na ausência de soro (0% SFB) esta diminuição na proliferação celular de HT1080-MPA não foi significativa (Figura 15A). Da mesma

forma, observamos que a proliferação das células HT1080 (tipo selvagem) diminuiu quando estas foram tratadas com o meio condicionado obtido das células HEK293T-MPA (MC enriquecido com ADAMTS-1), isto em condições normais (10% FBS) e na ausência de soro (Figura 15B-C).

Por outro lado, as análises estatísticas demonstraram que a proliferação das células HT1080-MPA diminuiu na presença do HGF, isto comparado com o respectivo controle (HT1080-MPC, Figura 15A). Da mesma forma, observamos uma diminuição significativa na proliferação das células HT1080 (tipo selvagem) quando estas foram tratadas com o HGF, o qual foi acrescido ao MC enriquecido com ADAMTS-1 (Figura 15B - C).

Já na presença de TGF-β1, a proliferação das células que superexpressam ADAMTS-1 (HT1080-MPA) não foi significativamente alterada, quando comparada com as células HT1080-MPC na mesma condição (Figura 15A).



Figura 15 – A superexpressão de ADAMTS-1 diminuiu a proliferação celular de HT1080 estimulada por HGF. Gráficos de barras mostrando (A) percentagem de células HT1080-MPA e HT1080-MPC positivas para BrdU em diferentes condições (0% SFB, 10 ng/ml de HGF ou TGF-B1 e 10% SFB); (B) percentagem de células HT1080 (tipo selvagem) positivas para BrdU tratadas com o MC enriquecido com ADAMTS-1 ou MC Controle em diferentes condições (0% SFB, 10 ng/ml de HGF e 10% SFB); (C) percentagem de células HT1080 (tipo selvagem) positivas para Ki67 tratadas com o MC enriquecido com ADAMTS-1 ou MC Controle, nas condicões anteriormente descritas. (\*) Asteriscos indicam dados estatisticamente significantes em comparação com os respectivos controles (p<0,05 teste tstudent). Os experimentos em B e C foram realizadas em triplicata e repetidas três vezes, resultados semelhantes foram obtidos nos três experimentos independentes. Os experimentos em C foram repetidos pelo menos três vezes e resultados semelhantes foram obtidos nesses três experimentos independentes.

5.3 Efeito da superexpressão de ADAMTS-1 sobre a velocidade de migração celular do fibrossarcoma estimulada por fatores de crescimento (HGF ou TGF-β1)

A velocidade média de migração (µm/hora) das células HT1080 foi determinada por meio da técnica de *time-lapse* e do plugin *MTrackJ* do *software Fiji/ImageJ*. Vale ressaltar que foram quantificadas apenas células isoladas que não

sofreram divisão celular, a fim que a velocidade de migração não seja alterada por outros fatores que não seja o tratamento.

Os resultados mostraram que a superexpressão de ADAMTS-1 (HT1080-MPA) diminuiu a velocidade de migração das células HT1080, na presença do HGF. Assim, quando as células HT1080-MPA e HT1080-MPC foram tratadas com o HGF, as células HT1080-MPA apresentaram uma velocidade média de 6.120  $\pm$  0.416 µm/hora, o qual foi 2 vezes menor que a velocidade média das células HT1080-MPC (13.763  $\pm$  1,421 µm/hora, Figura 16A). Além disso, quando as células HT1080 (tipo selvagem) foram tratadas com HGF acrescido ao MC enriquecido com ADAMTS-1, estas células apresentaram uma diminuição significativa na velocidade de migração (5.357  $\pm$  0.041 µm/hora). Este resultado foi comparado com as células HT1080 do tipo selvagem, tratadas com o MC Controle na presença do HGF (velocidade média de 12,170  $\pm$  1,469 µm/hora, Figura 16B - C).

Por outro lado, na presença do TGF- $\beta$ 1, não se observou diferenças nas velocidades de migração entre as células HT1080-MPA (17,153 ± 0,658 µm/hora) e HT1080-MPC (velocidade média de 17,572 ± 2,121 µm/hora, Figura 16A).

Vale ressaltar que tanto em condições normais (10% SFB) como na ausência de soro (0% SFB), as células HT1080-MPA apresentaram uma diminuição na velocidade de migração, quando comparado com os respectivos controles (HT1080-MPC, Figura 16A). Da mesma forma, observou-se uma diminuição na velocidade de migração das células HT1080 do tipo selvagem, quando estas células foram tratadas com o MC enriquecido com ADAMTS-1, isto nas mesmas condições (Figura 16B e C).



Figura 16 – A superexpressão de ADAMTS-1 diminui a velocidade de migração das células HT1080 estimulada por HGF. Gráficos de barras mostrando (A) velocidade de migração ( $\mu$ m/hora) das células HT1080-MPA e HT1080-MPC em diferentes condições (0% SFB, 10 ng/ml de HGF ou TGF- $\beta$ 1 e 10% SFB); (B) velocidade de migração ( $\mu$ m/hora) das células HT1080 (tipo selvagem) tratadas com o MC enriquecido com ADAMTS-1 ou MC Controle, nas condições de 0% SFB, 10 ng/ml de HGF e 10% SFB. (C) Imagens de contraste de fase sobrepostas com as trajetórias (faixas de cores) percorridas pelas células HT1080 (tipo selvagem) tratadas com o MC enriquecido com ADAMTS-1 ou MC Controle, nas condições anteriormente descritas. (\*) Asteriscos indicam dados estatisticamente significantes em comparação com os respectivos controles (p<0,05 teste *t-student*). Os experimentos em A e B foram realizadas em triplicata e repetidos três vezes, resultados semelhantes foram obtidos nos três experimentos independentes. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

Os resultados então obtidos, sugerem que a ADAMTS-1 não apresenta apenas atividade antiproliferativa, mas também ADAMTS-1 exibe atividade antimigratória sobre as células HT1080. Além disso, a superexpressão de ADAMTS-1 afetou a proliferação e migração das células HT1080 estimuladas por HGF, mas não por TGF-β1.

# 5.4 Vias de sinalização perturbadas pela superexpressão de ADAMTS-1, após a estimulação por fatores de crescimento (HGF ou TGF-β1)

Realizamos ensaios de *immunoblot*, com o intuito de avaliar os mecanismos através dos quais ADAMTS-1 interfere com as atividades de proliferação e migração celular de HT1080, isto depois de serem estimuladas com os fatores de crescimento de interesse.

Nossos resultados mostraram que a protease proveniente do meio condicionado coletado das células HEK293T-MPA (MC enriquecido com ADAMTS-1), reduziu a fosforilação do receptor c-Met na tirosina localizada no sítio de ancoragem multi-substrato (Y1349), após 15 minutos de tratamento com HGF (Figura 17A). Analisamos também a cascata de sinalização *downstream* do HGF/c-Met, que poderia estar envolvida na proliferação e migração celular. Desta forma, observamos uma diminuição na fosforilação do c-Met, após 15 minutos de tratamento com a redução da fosforilação do c-Met, após 15 minutos de tratamento com o HGF acrescido no MC enriquecido com ADAMTS-1 (Figura 17A).

Em relação ao fator de crescimento TGF-β1, avaliamos o estado de ativação das Smad2/3, as quais são moléculas de sinalização citoplasmática fosforiladas após a oligomerização do receptor ativado do TGF-β1. Nossos resultados mostraram uma diminuição na fosforilação das smad2/3 nas células HT1080-MPA, em apenas 5 minutos de tratamento com o TGF-β1. Porém, a redução parcial da fosforilação das smad2/3 não foi suficiente para perturbar a sinalização das vias *downstream* ERK1/2 e Akt nas células HT1080-MPA, após 5 minutos de tratamento com TGF-β1 (Figura 17B). Desta forma, este resultado confirmou que a superexpressão de ADAMTS-1 não perturbou os processos de proliferação e migração celular de HT1080, estimuladas por TGF-β1.

Α



Figura 17 – A superexpressão de ADAMTS-1 perturba as vias de sinalização estimuladas por HGF. *Immunoblots* do lisado total a partir das (A) células HT1080 (tipo selvagem) tratadas com 10 ng/ml de HGF, o qual foi acrescido ao MC enriquecido com ADAMTS-1 ou MC Controle, durante diferentes intervalos de tempo (5, 15 e 30 minutos); e (B) células HT1080-MPA e HT1080-MPC tratadas com 10 ng/ml do TGF- $\beta$ 1 durante 5, 15 e 30 minutos. As amostras no tempo zero (0 minutos) não receberam tratamento com os fatores de crescimento. Como controle de *loading* foram usadas marcações para  $\beta$ -actina e formas não fosforiladas das proteínas c-Met, smad2/3, ERK1/2, FAK e Akt. Os experimentos foram realizados três vezes com resultados similares.

Em síntese, a superexpressão de ADAMTS-1 perturbou a ativação do c-Met (receptor do HGF), levando à diminuição da proliferação e migração das células HT1080 através das vias de sinalização ERK1/2 e FAK respectivamente.

# 5.5 Efeito da superexpressão de ADAMTS-1 sobre a formação de fibrosarcoesferas estimulada por HGF

Realizamos cultura 3D em *Hanging drop* para observar a formação de fibrosarcoesferas em condições de perda de adesão (*anoikis*).

Ao avaliarmos o efeito da ADAMTS-1 sobre a capacidade das células HT1080 de formar fibrosarcoesferas em diferentes condições, vimos que as células HT1080 (tipo selvagem) cultivadas em um MC enriquecido com ADAMTS-1 ou MC Controle, formaram fibrosarcoesferas tanto em condições normais (10% SFB) como na presença do HGF (Figura 18A-D). Adicionalmente, observamos que as fibrosarcoesferas formadas no MC Controle contendo 10 ng/ml do HGF, apresentaram um diâmetro de ~1,3 mm (Figura 18A e 18E), o qual foi 2 vezes maior que o diâmetro das fibrosarcoesferas formadas no MC enriquecido com ADAMTS-1 contendo HGF (~0,7 mm de diâmetro, Figura 18B e 18E).

Por outro lado, as fibrosarcoesferas formadas no MC Controle suplementado com 10% de SFB, apresentaram um diâmetro maior (~1,4 mm de diâmetro, Figura 18C e 18E), comparado com as fibrosarcoesferas formadas no MC enriquecido com ADAMTS-1 suplementado com 10% de SFB (~0,9 mm de diâmetro, Figura 18D e 18E). Já, na ausência de soro, as células HT1080 não tiveram a capacidade de formar fibrosarcoesferas (dados não mostrados).



**Figura 18 – A superexpressão de ADAMTS-1 perturba a formação de fibrosarcoesferas estimuladas por HGF.** Imagens de fibrosarcoesferas marcadas com faloidina (verde) e DAPI (azul), as quais foram cultivadas no **(A)** MC Controle na presença de HGF (10ng/ml); **(B)** MC enriquecido com ADAMTS-1 e contendo 10 ng/ml do HGF; **(C)** MC Controle suplementado com 10% SFB; **(D)** MC enriquecido com ADAMTS-1 suplementado com 10% SFB. **(E)** Gráfico de barras mostrando o diâmetro (mm) das fibrosarcoesferas (n=5) cultivadas no MC enriquecido com ADAMTS-1 ou MC Controle, em diferentes condições (10ng/ml de HGF e 10% SFB). (\*) Asteriscos indicam dados estatisticamente significantes em comparação com os respectivos controles (*P*<0,05 teste *t-student*). Os experimentos foram realizados três vezes com resultados similares. Barra de escala: 200 μm.

5.6 Estudo *in vivo* do efeito da superexpressão de ADAMTS-1 sobre a formação de microtumores estimulada por HGF.

Para este estudo foi utilizado embriões de *zebrafish* transgênicos Tg (fli1:EGFP) de 48 h.p.f., os quais foram submetidos a microinjeção de células tumorais dentro da cavidade pericárdica.

Após 4 dias da injeção (DPI) foram adquiridas as imagens dos embriões fixados. E observamos que na ausência de HGF (grupo controle), as células HT1080 que superexpressam ADAMTS-1 (HT1080-MPA) formaram microtumores menores com um diâmetro de ~12,5 µm (Figura 19D-F e G). Este resultado foi comparado com os microtumores formados pelas células HT1080-MPC, os quais apresentaram um diâmetro de ~18,5 µm (Figura 19A-C e G). Ademais, várias das células HT1080-MPA possivelmente se dissociaram do tumor primário e entraram na circulação sanguínea dos embriões. Sendo assim localizadas em diferentes regiões do embrião, como a cabeça, saco vitelino e cauda (Figura 19D-F). No entanto que as células HT1080-MPC não saíram do local inicial da microinjeção (cavidade

pericárdica), formando assim microtumores com dimensões maiores nessa região (Figura 19A-C).

Por outro lado, na presença do HGF, as células HT1080-MPC formaram microtumores maiores (Figura 19H-K), comparado com os poucos microtumores formados a partir das células HT1080-MPA (Figura 19L-O). Adicionalmente, analisamos a morfologia desses microtumores através do cálculo da circularidade, onde um círculo perfeito possui um valor de circularidade igual a 1, enquanto formas mais irregulares possuem valores <1. Tal quantificação mostrou que na presença do HGF, os poucos microtumores formados e as células HT1080-MPA que não tiveram a capacidade de formar microtumores, exibiram uma maior circularidade (Figura 19O e 19P). No entanto que os microtumores formados pelas células HT1080-MPC na presença do HGF, exibiram uma baixa circularidade com formas mais irregulares (Figura 19K e 19P-O).

Vale ressaltar que tanto no grupo controle como na presença do HGF, observamos várias das células HT1080-MPA localizadas em diferentes regiões do embrião, e isto devido a que estas células entraram na circulação sanguínea (Figura 19D-F e L-N). Já no grupo controle, as células HT1080-MPC formaram microtumores apenas no local da microinjeção (Figura 19A-C). Porém, na presença do HGF estes microtumores se disseminaram para diferentes regiões do embrião (Figura 19H-J).



Figura 19 – A superexpressão de ADAMTS-1 perturba a formação de microtumores estimulada por HGF, in vivo. Imagens de embriões de zebrafish Tg(Fli1:EGFP) fixados 4 dias após a injeção (DPI) de células HT1080-MPC ou HT1080-MPA (em vermelho) na ausência (A-F) ou na presença de 10 ng/ml do HGF (H-N). Zoom dos microtumores formados pelas células HT1080-MPC (K), e de uma célula individual HT1080-MPA (O), ambas na região da cauda. Imagens da linha inferior mostram a ampliação da área marcada pela linha pontilhada nas imagens da linha superior. As pontas das setas indicam as células HT1080-MPA na região da cabeça, saco vitelino e cauda dos embriões. O grupo controle representa às células que foram injetadas com apenas meio de cultura. (G) Gráfico de barras mostrando o diâmetro (µm) dos microtumores formados pelas células HT1080-MPC e HT1080-MPA nos embriões de zebrafish, na ausência de HGF (mean ± SEM, n=6). (P) Gráfico de dispersão mostrando a circularidade dos microtumores formados pelas células HT1080-MPC e HT1080-MPA, na presenca de 10 ng/ml de HGF (mean ± SEM, n=6). Cada ponto representa apenas um microtumor ou célula tumoral dissociada do tumor primario. (\*) Asteriscos indicam dados estatisticamente significantes em comparação com os respectivos controles (p<0,05 teste t-student). Os experimentos foram realizados três vezes com resultados similares. Barra de escala: 200 µm.

## 6 DISCUSSÃO

Demonstramos neste trabalho que tanto a superexpressão de ADAMTS-1 nas células HT1080, como o tratamento com um MC enriquecido com ADAMTS-1 proveniente de outro tipo celular; interrompe a ativação do c-Met após estimulação com o HGF. Consequentemente, as vias de sinalização *downstream* ERK1/2 e FAK foram prejudicadas, conduzindo a uma diminuição na proliferação e migração das células HT1080. Adicionalmente, a superexpressão de ADAMTS-1 perturbou a formação de fibrosarcoesferas *in vitro* e microtumores *in vivo*. Vale ressaltar que os resultados apresentados são os primeiros relatos que estabelecem uma relação entre a ADAMTS-1 e o HGF no fibrossarcoma.

A ADAMTS-1 é uma metaloproteinase multifuncional, cuja desregulação está associada a vários tipos de cânceres. Assim, no inicio do câncer (tumor primário), a protease ADAMTS-1 apresenta uma baixa expressão, a qual aumenta à medida em que acontece a progressão metastática (LIU; XU; YU, 2006; ROCKS et al., 2008; TAN; RICCIARDELLI; RUSSELL, 2013). Estudos monstraram a expressão de mRNA de ADAMTS-4 tanto em células derivadas do sarcoma de Ewing (CASAL et al., 2010), como em tecidos de pacientes com este tipo sarcoma. Ademais, através de imuno-histoquímica foi observado elevados níveis de expressão proteica de ADAMTS-4 nas amostras tumorais dos pacientes com sarcoma de Ewing, isto comparado com tumores benignos que não mostraram expressão da ADAMTS-4. Esta protease também foi detectada em 2 dos 3 casos estudados de osteossarcoma (MINOBE et al., 2010). Vale ressaltar que a protease ADAMTS-4 está estruturalmente e funcionalmente relacionada com ADAMTS-1, devido à semelhança dos motivos trombospondina que estas compartilham (KARAGIANNIS; POPEL, 2007).

Durante a progressão tumoral, a matriz extracelular e as células estromais apresentam um papel muito importante. Devido a que as células estromais e tumorais secretam diversas moléculas que favorecem ao crescimento e invasão do tumor. Entre estas moléculas secretadas encontram-se a protease ADAMTS-1 e vários fatores de crescimento (APTE, 2009; BREMNES et al., 2011; FRIEDL; ALEXANDER, 2011).

A partir das observações feitas sobre nossos resultados obtidos, pode-se verificar que a ADAMTS-1 proveniente tanto das células HT1080 como de outro tipo

celular, apresenta um efeito antitumoral sobre o fibrossarcoma. Deste modo, ADAMTS-1 afeta os processos de proliferação e migração das células de fibrossarcoma humano (HT1080). Estes resultados corroboram os dados obtidos inicialmente por nosso grupo de pesquisa, onde observaram que a baixa expressão de ADAMTS-1 tanto em tumores de mama humanos como nas células MDA-MB-231, regulava positivamente o crescimento tumoral por meio da estimulação da invasão e migração celular (FREITAS et al., 2013).

O mecanismo de ação da ADAMTS-1 na progressão tumoral ainda não está claramente definido. Porém, a estrutura multidomínios da ADAMTS-1 poderia atribuir-lhe diversas funções. Esta protease pode então apresentar atividade pró- ou antitumoral, dependendo da combinação dos domínios pela qual é formada. Alguns trabalhos demostram que a molécula inteira de ADAMTS-1 promove a angiogênese e invasão tumoral, ademais de apresentar atividade *sheddase* sobre alguns fatores de crescimento, como o HB-EGF. Por outro lado, os fragmentos da ADAMTS-1 que apresentam os motivos TSP-1 na estrutura, exibem atividade antitumoral. Isto devido ao fato que os motivos TSP-1 se ligam diretamente com alguns fatores de crescimento, como o VEGF165, modulando negativamente as funções biológicas destes fatores (GUPTA et al., 1999; INOKI et al., 2002; LIU; XU; YU, 2006; LUQUE; CARPIZO; IRUELA-ARISPE, 2003; PORTER et al., 2005). Portanto, o efeito da ADAMTS-1 pode não estar limitado a um fator de crescimento específico.

Nossos resultados sugerem que ADAMTS-1 está envolvido na regulação das funções do HGF sobre as células de fibrossarcoma. Este fator de crescimento é uma molécula de sinalização, a qual é liberada para o microambiente tumoral. O HGF é principalmente expresso e secretado pelas células de origem mesenquimal. Porém, algumas células de carcinoma parecem expressar tanto o HGF quanto o c-Met (SIERRA; TSAO, 2011). Por outro lado, vários tipos de células estromais e tumorais expressam o receptor c-Met (BOTTARO et al., 1991; NAKAMURA et al., 1997; NALDINI et al., 1991). O HGF então apresenta um papel importante no *crosstalk* entre as células estromais e as células do tumor primário (LESKO; MAJKA, 2008; MATSUMOTO; NAKAMURA, 2006; STEFFAN; COLEMAN; CARDELLI, 2011).

Sabe-se que a ativação do c-Met após a ligação com o seu ligando HGF, conduz à indução de diferentes fenótipos, tais como a proliferação e angiogênese de tumores primários, deslocamento e infiltração das células tumorais através do estroma circundante para formar micrometástases e recuperar o fenótipo de
proliferação para formar metástases evidentes (GAO; VANDE WOUDE, 2005). Adicionalmente, o HGF produzido pelas células estromais (fibroblastos) atua sobre as células tumorais estimulando-os não apenas a metástase, mas também a secretar fatores indutores de HGF. Estes indutores são moléculas envolvidas em processos como proliferação celular, angiogênese e inflamação, mecanismos capazes de modificar o microambiente tumoral e favorecer o crescimento tumoral (MATSUMOTO; NAKAMURA, 2006; MATSUMOTO; OKAZAKI; NAKAMURA, 1995; NAKAMURA et al., 1997).

Estudos recentes monstraram que a linhagem celular de fibrossarcoma expressa normalmente o receptor c-Met; e ademais, este receptor encontra-se constituvamente fosforilado (ativo). Porém, quando acontece uma diminuição ou supressão da expressão do c-Met nas células de fibrossarcoma, os processos de motilidade e invasão são afetados *in vitro*, e o crescimento tumoral é inibido completamente *in vivo*. Portanto, o c-Met apresenta um papel importante no desenvolvimento e progressão do fibrossarcoma (GUO et al., 2008; LIANG et al., 2004; UCHIDA et al., 2001).

Neste estudo, observamos que ADAMTS-1 interrompeu a ativação do c-Met após estimulação com HGF, através da diminuição na fosforilação do resíduo de tirosina Y1349, a qual é necessária para o recrutamento de proteínas de sinalização. Desta forma, ADAMTS-1 prejudicou a ativação das vias de sinalização ERK 1/2 e FAK, vias relacionadas com os processos de proliferação e motilidade celular.

Após a fosforilação no sítio da tirosina 1349, o c-Met torna-se um local de encaixe para o recrutamento das proteínas adaptadoras Grb-2, Gab-1, SHC, Crk, e outras proteínas transdutoras, como o STAT-3 (BIRCHMEIER et al., 2003; WEIDNER et al., 1995). Assim, o STAT-3 contribui na criação de um ambiente permissivo para a via de sinalização HGF/c-Met, nas linhagens celulares humanas de câncer de mama e linhagens celulares de mama não tumorigênicas (SAM; ELLIOTT; MUELLER, 2007). Embora o STAT3 seja necessário para a tumorigênese mediada por c-Met, este não tem efeito sobre a proliferação e invasão das células mamarias, nem sobre a morfogênese de ramificação da mama (ZHANG et al., 2002).

Weidner et al. (1995) mostraram que os resíduos de tirosina Y1349 e Y1356, localizados na região C-terminal do c-Met, têm a capacidade de induzir os processos de proliferação, motilidade, diferenciação e sobrevivência (WEIDNER et al., 1995). Por outro lado, a fosforilação da tirosina Y1003 conduz ao recrutamento da ubiquitina ligase c-Cbl, o qual tem como alvo a degradação proteossômica do c-Met. Assim, a inibição da formação do complexo Cbl-CIN85-endofilina bloqueia a internalização do c-Met, aumentando as respostas biológicas induzidas pela ligação do HGF ao c-Met (MAULIK et al., 2002; PETRELLI et al., 2002). Apesar de que a fosforilação dos resíduos de tirosina Y1349 e Y1003 possam acontecer ao mesmo tempo, não existem relatos sobre a correlação entre a fosforilação de ambas tirosinas.

Nossos resultados mostram que a superexpressão de ADAMTS-1 não somente afeta os processos de proliferação e motilidade celular de HT1080, mas também perturba a formação de fibrosarcoesferas *in vitro*, e a formação de microtumores *in vivo*, após estimulação com o HGF. Adicionalmente, os poucos microtumores formados e as células que não tiveram a capacidade de formar microtumores, apresentaram formas arredondadas, característica morfológica de tumores pouco invasivos.

O estudo de Liu e colaboradores (2012) mostrou que as fibrosarcoesferas formadas a partir de células de tumores primários de fibrossarcoma, apresentavam uma capacidade maior de auto-renovação, invasão e resistência aos fármacos; isto em comparação com as células aderentes (LIU et al., 2012). Vale ressaltar que as células tumorais mantidas em cultura 3D, somente irão formar fibrosarcoesferas aquelas que apresentem propriedades similares às células-tronco. Desta forma, as células tumorais podem proliferar através da interação célula-célula, e produzir alguns componentes da matriz extracelular (FRISCH; FRANCIS, 1994; RUOSLAHTI; REED, 1994).

Alguns estudos mostram que os tumores de fibrossarcoma apresentam uma mistura de células tumorais com um modo de migração ameboidal e mesenquimal (PETRIE et al., 2012; SAHAI; MARSHALL, 2003; WOLF et al., 2003). Assim, as células que passam a migrar no modo mesenquimal, adquirem forma de fuso, possuem protrusões proeminentes (lamelipódios), adesões que interagem fortemente com o substrato e liberam proteases capazes de clivar a MEC (KURNIAWAN; CHAUDHURI; LIM, 2016; WELCH, 2015;). Já na migração ameboide, as células adquirem um fenótipo arredondado, possuem interações fracas com os substratos adesivos e não têm a capacidade de liberar enzimas proteolíticas (WELCH, 2015; WOLF et al., 2013).

Nossos dados de *in vivo* mostraram também que várias das células que superexpressam ADAMTS-1 não tiveram a capacidade de formar microtumores. Assim, a falta de interações célula-célula leva às células migrar individualmente. Estas células podem então exibir tanto um fenótipo ameboide como um fenótipo mesenquimatoso. No movimento ameboide, as células que mudam rapidamente a sua morfologia e apresentam protrusões finas, se movem com altas velocidades. No entanto que as células que apresentam uma morfologia caótica com protrusões curtas associadas à atividade proteolítica, se movimentam com baixas velocidades. Já no fenótipo mesenquimatoso, as longas protrusões das células permitem-lhes avançar com relativa rapidez. Porém, em alguns casos, a parte traseira das células permanece imóvel, levando a uma translocação relativamente lenta (CLARK; VIGNJEVIC, 2015)

Por outro lado, na migração coletiva, os grupos de células se movimentam como cadeias lineares estreitas, lideradas por uma célula líder; ou como folhas largas e de forma irregular, conduzidas por várias células líderes (ALEXANDER et al., 2013; FRIEDL; ALEXANDER, 2011). A migração coletiva é tipicamente o modo mais lento de migração celular, durante a progressão tumoral. Porém, foi observada uma migração coletiva mais rápida *in vivo* (CAUSSINUS; COLOMBELLI; AFFOLTER, 2008; HAAS; GILMOUR, 2006; PRASAD; MONTELL, 2007).

Volpert e colaboradores (1998) mostraram *in vivo* que as células HT1080 são capazes de inibir o crescimento de futuras metástases; isto devido à atividade antiangiogênica da TSP-1, a qual é libertada pelas células tumorais (VOLPERT; LAWLER; BOUCK, 1998). Ademais, Lawler (2002) mostra que a superexpressão da trombospondina (TSP-1) suprime parcialmente a invasão celular estimulada por HGF (LAWLER, 2002).

Vale ressaltar que não existe evidencia do mecanismo através do qual a protease ADAMTS-1 interfere com a atividade do HGF. ADAMTS-1 poderia estar interferindo nas atividades do HGF; por meio da clivagem do HGF, ou sequestro deste fator de crescimento através dos motivos TSP-1.

Em relação ao fator de crescimento transformante beta 1 (TGF-β1), podemos mencionar que o papel deste fator de crescimento varia com o tipo celular. Assim sendo, TGF-β1 apresenta atividade antitumoral (invasão e migração) sobre as células derivadas do fibrossarcoma (JAKOWLEW, 2006; KUBOTA; FRIDMAN; YAMADA, 1991).

Os resultados obtidos com as células HT1080, mostraram que a superexpressão de ADAMTS-1 não afetou as respostas celulares de proliferação, migração e sobrevivência, induzidas pelo TGF-β1. Apesar de ADAMTS-1 ter induzido diminuição da fosforilação das Smad2/3, isso não foi suficiente para alterar as vias de sinalização *downstream* ERK1/2 e Akt. Assim, a ativação de ERK1/2 poderia ser induzida por moléculas que não pertencem à via de sinalização dependente de SMADs. Enquanto que Akt pode estar sequestrando o Smad3, prejudicando a sua fosforilação e translocação para o núcleo (CHEN et al., 2014; CONERY et al., 2004).

Assim como o HGF, não existe evidencia de uma interação física entre ADAMTS-1 e a forma ativa do TGF- $\beta$ 1. Porém, sabe-se da interação direta entre o peptídeo associado à latência do TGF- $\beta$ 1 (LAP-TGF- $\beta$ ) e o peptídeo KTFR da ADAMTS-1 (presente nos motivos TSP-1) (BOURD-BOITTIN et al., 2011).

O efeito da ADAMTS-1 não é limitado somente a um fator de crescimento específico. Esta protease pode então representar um mecanismo endógeno no controle da biodisponibilidade de diferentes fatores de crescimento (LIU; XU; YU, 2006; MARGOSIO et al., 2003). Embora foi demonstrado que a protease ADAMTS-1 prejudica as atividades estimuladas pelo HGF no fibrossarcoma (Figura 20), mais estudos precisam ser realizados para aumentar o entendimento do mecanismo através do qual a protease ADAMTS-1 interfere na atividade do HGF.



Figura 20 – Diagrama esquemático resumindo a compreensão atual do efeito da superexpressão de ADAMTS-1 sobre a atividade do HGF, no microambiente tumoral do fibrossarcoma. (A) Células de fibrossarcoma com níveis normais de expressão de ADAMTS-1. Neste cenário, o HGF encontra-se livremente disponível para se ligar ao receptor c-Met, conduzindo à ativação dos processos de proliferação, migração, formação de fibrosarcoesferas *in vitro* e formação de microtumores com formas irregulares *in vivo*. (B) Células de fibrosarcoma com elevados níveis de expressão de ADAMTS-1. Neste caso, ADAMTS-1 prejudica a ligação do HGF ao seu receptor c-Met; diminuindo a proliferação, migração, formação da svias *downstream* ERK1/2 e FAK.

## 7 CONCLUSÃO

Baseados nos resultados dos experimentos realizados, concluímos que a superexpressão de ADAMTS-1:

- i.) afeta os processos celulares de proliferação e migração das células de fibrossarcoma (HT1080), estimulados pelo fator de crescimento de hepatócitos (HGF);
- ii.) não afeta as respostas celulares de proliferação e migração em células HT1080, estimuladas pelo fator de crescimento transformante beta (TGFβ1);
- iii.) interrompe a ativação do receptor c-Met, além das suas vias de sinalização downstream ERK1/2 e FAK, nas células HT1080 após 15 minutos de estimulação com o HGF;
- iv.) prejudica a formação de fibrosarcoesferas a partir das células HT1080 estimuladas com HGF;
- v.) perturba a formação de microtumores de HT1080 *in vivo*, após estimulação com o HGF. Os microtumores e as células que não tiveram a capacidade de formar microtumores apresentaram características morfológicas de lesões menos invasivas.

## **REFERÊNCIAS**<sup>\*</sup>

AKHURST, R. J.; HATA, A. Targeting the TGFβ signalling pathway in disease. **Nat Rev Drug Discov**, v. 11, n. 10, p. 790-811, Oct 2012.

ALEXANDER, S.; WEIGELIN, B.; WINKLER, F.; FRIEDL, P. Preclinical intravital microscopy of the tumour-stroma interface: invasion, metastasis, and therapy response. **Curr Opin Cell Biol**, v. 25, n. 5, p. 659-671, Oct 2013.

ALJABAB, A. S.; NASON, R. W.; KAZI, R.; PATHAK, K. A. Head and neck soft tissue sarcoma. Indian J Surg Oncol, v. 2, n. 4, p. 286-290, Dec 2011.

ALLEN, M.; LOUISE JONES, J. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. **J Pathol**, v. 223, n. 2, p. 162-176, Jan 2011.

APTE, S. S. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 6, p. 981-985, Jun 2004.

\_\_\_\_\_. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. **J Biol Chem**, v. 284, n. 46, p. 31493-31497, Nov 2009.

ARRIBAS, J.; BECH-SERRA, J. J.; SANTIAGO-JOSEFAT, B. ADAMs, cell migration and cancer. **Cancer Metastasis Rev,** v. 25, n. 1, p. 57-68, Mar 2006.

BAHRAMI, A.; FOLPE, A. L. Adult-type fibrosarcoma: A reevaluation of 163 putative cases diagnosed at a single institution over a 48-year period. **Am J Surg Pathol**, v. 34, n. 10, p. 1504-1513, Oct 2010.

BASILICO, C.; ARNESANO, A.; GALLUZZO, M.; COMOGLIO, P. M.; MICHIELI, P. A high affinity hepatocyte growth factor-binding site in the immunoglobulin-like region of Met. **J Biol Chem**, v. 283, n. 30, p. 21267-21277, Jul 2008.

BHOWMICK, N. A.; NEILSON, E. G.; MOSES, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 332-337, Nov 2004.

BIANCO, R.; MELISI, D.; CIARDIELLO, F.; TORTORA, G. Key cancer cell signal transduction pathways as therapeutic targets. **Eur J Cancer**, v. 42, n. 3, p. 290-294, Feb 2006.

BIRCHMEIER, C.; BIRCHMEIER, W.; GHERARDI, E.; VANDE WOUDE, G. F. Met, metastasis, motility and more. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 4, n. 12, p. 915-925, Dec 2003.

BLOBEL, C. P. Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. **Cell**, v. 90, n. 4, p. 589-592, Aug 1997.

BOBROVNIKOVA-MARJON, E. V.; MARJON, P. L.; BARBASH, O.; VANDER JAGT, D. L.; ABCOUWER, S. F. Expression of angiogenic factors vascular endothelial growth factor and

<sup>\*</sup> De acordo com:

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

interleukin-8/CXCL8 is highly responsive to ambient glutamine availability: role of nuclear factor-kappaB and activating protein-1. **Cancer Res,** v. 64, n. 14, p. 4858-4869, Jul 2004.

BORNSTEIN, P.; SAGE, E. H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. **Curr Opin Cell Biol**, v. 14, n. 5, p. 608-616, Oct 2002.

BOTTARO, D. P.; RUBIN, J. S.; FALETTO, D. L.; CHAN, A. M.; KMIECIK, T. E.; VANDE WOUDE, G. F.; AARONSON, S. A. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. **Science**, v. 251, n. 4995, p. 802-804, Feb 1991.

BOUCK, N.; STELLMACH, V.; HSU, S. C. How tumors become angiogenic. Adv Cancer Res, v. 69, p. 135-174, 1996.

BOURD-BOITTIN, K.; BONNIER, D.; LEYME, A.; MARI, B.; TUFFERY, P.; SAMSON, M.; EZAN, F.; BAFFET, G.; THERET, N. Protease profiling of liver fibrosis reveals the ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1 as a central activator of transforming growth factor beta. **Hepatology**, v. 54, n. 6, p. 2173-2184, Dec 2011.

BRASILEIRO, G. Bogliolo Patologia Geral. 3. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BREMNES, R. M.; DØNNEM, T.; AL-SAAD, S.; AL-SHIBLI, K.; ANDERSEN, S.; SIRERA, R.; CAMPS, C.; MARINEZ, I.; BUSUND, L. T. The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. **J Thorac Oncol**, v. 6, n. 1, p. 209-217, Jan 2011.

BRESNICK, A. R.; WEBER, D. J.; ZIMMER, D. B. S100 proteins in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 15, n. 2, p. 96-109, Feb 2015.

BROWN, H. M.; DUNNING, K. R.; ROBKER, R. L.; PRITCHARD, M.; RUSSELL, D. L. Requirement for ADAMTS-1 in extracellular matrix remodeling during ovarian folliculogenesis and lymphangiogenesis. **Dev Biol**, v. 300, n. 2, p. 699-709, Dec 2006.

BURT, D. W.; LAW, A. S. Evolution of the transforming growth factor-beta superfamily. **Prog Growth Factor Res**, v. 5, n. 1, p. 99-118, 1994.

CANALS, F.; COLOMÉ, N.; FERRER, C.; PLAZA-CALONGE, M. E. C.; RODRÍGUEZ-MANZANEQUE, J. C. Identification of substrates of the extracellular protease ADAMTS1 by DIGE proteomic analysis. **Proteomics**, v. 6 Suppl 1, p. S28-35, Apr 2006.

CASAL, C.; TORRES-COLLADO, A. X.; PLAZA-CALONGE, M. E. C.; MARTINO-ECHARRI, E.; RAMÓN Y CAJAL, S.; ROJO, F.; GRIFFIOEN, A. W.; RODRÍGUEZ-MANZANEQUE, J. C. ADAMTS1 contributes to the acquisition of an endothelial-like phenotype in plastic tumor cells. **Cancer Res**, v. 70, n. 11, p. 4676-4686, Jun 2010.

CAUSSINUS, E.; COLOMBELLI, J.; AFFOLTER, M. Tip-cell migration controls stalk-cell intercalation during Drosophila tracheal tube elongation. **Curr Biol**, v. 18, n. 22, p. 1727-1734, Nov 2008.

CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 2, p. 118-132, Feb 2004.

CHAMBERS, A. F.; MATRISIAN, L. M. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. **J Natl Cancer Inst**, v. 89, n. 17, p. 1260-1270, Sep 1997.

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

CHEN, X.; XIAO, W.; WANG, W.; LUO, L.; YE, S.; LIU, Y. The complex interplay between ERK1/2, TGF $\beta$ /Smad, and Jagged/Notch signaling pathways in the regulation of epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelium cells. **PLoS One,** v. 9, n. 5, p. e96365, 2014.

CHRISTIAN, L. M. The ADAM family: Insights into Notch proteolysis. Fly (Austin), v. 6, n. 1, p. 30-34, 2012 Jan-Mar 2012.

CLARK, A. G.; VIGNJEVIC, D. M. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. **Curr Opin Cell Biol**, v. 36, p. 13-22, Oct 2015.

COLLINI, P.; SORENSEN, P. H.; PATEL, S.; BLAY, J. Y.; ISSELS, R. D.; MAKI, R. G.; ERIKSSON, M.; DEL MURO, X. G. Sarcomas with spindle cell morphology. **Semin Oncol**, v. 36, n. 4, p. 324-337, Aug 2009.

COMOGLIO, P. M.; GIORDANO, S.; TRUSOLINO, L. Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. **Nat Rev Drug Discov,** v. 7, n. 6, p. 504-516, Jun 2008.

CONERY, A. R.; CAO, Y.; THOMPSON, E. A.; TOWNSEND, C. M.; KO, T. C.; LUO, K. Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis. **Nat Cell Biol**, v. 6, n. 4, p. 366-372, Apr 2004.

COOPER, C. S. The met oncogene: from detection by transfection to transmembrane receptor for hepatocyte growth factor. **Oncogene**, v. 7, n. 1, p. 3-7, Jan 1992.

COOPER, G. The Development and Causes of Cancer. In: 2 (Ed.). **The Cell: A Molecular Approach**. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000.

CORSO, S.; COMOGLIO, P. M.; GIORDANO, S. Cancer therapy: can the challenge be MET? **Trends Mol Med**, v. 11, n. 6, p. 284-292, Jun 2005.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. **Chem Biol**, v. 3, n. 11, p. 895-904, Nov 1996.

CRAGO, A. M.; BRENNAN, M. F. Principles in Management of Soft Tissue Sarcoma. **Adv** Surg, v. 49, p. 107-122, 2015.

DE HERDT, M. J.; BAATENBURG DE JONG, R. J. HGF and c-MET as potential orchestrators of invasive growth in head and neck squamous cell carcinoma. **Front Biosci**, v. 13, p. 2516-2526, Jan 2008.

DE VISSER, K. E.; KORETS, L. V.; COUSSENS, L. M. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. **Cancer Cell**, v. 7, n. 5, p. 411-423, May 2005.

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. **Am J Pathol**, v. 164, n. 4, p. 1131-1139, Apr 2004.

DERKSEN, P. W.; LIU, X.; SARIDIN, F.; VAN DER GULDEN, H.; ZEVENHOVEN, J.; EVERS, B.; VAN BEIJNUM, J. R.; GRIFFIOEN, A. W.; VINK, J.; KRIMPENFORT, P.; PETERSE, J. L.; CARDIFF, R. D.; BERNS, A.; JONKERS, J. Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. **Cancer Cell**, v. 10, n. 5, p. 437-449, Nov 2006.

DERYNCK, R.; ZHANG, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGFbeta family signalling. **Nature**, v. 425, n. 6958, p. 577-584, Oct 2003.

DERYUGINA, E. I.; RATNIKOV, B. I.; YU, Q.; BACIU, P. C.; ROZANOV, D. V.; STRONGIN, A. Y. Prointegrin maturation follows rapid trafficking and processing of MT1-MMP in Furin-Negative Colon Carcinoma LoVo Cells. **Traffic**, v. 5, n. 8, p. 627-641, Aug 2004.

DEVY, L.; BLACHER, S.; GRIGNET-DEBRUS, C.; BAJOU, K.; MASSON, V.; GERARD, R. D.; GILS, A.; CARMELIET, G.; CARMELIET, P.; DECLERCK, P. J.; NÖEL, A.; FOIDART, J. M. The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. **FASEB J**, v. 16, n. 2, p. 147-154, Feb 2002.

DIRAT, B.; BOCHET, L.; DABEK, M.; DAVIAUD, D.; DAUVILLIER, S.; MAJED, B.; WANG, Y. Y.; MEULLE, A.; SALLES, B.; LE GONIDEC, S.; GARRIDO, I.; ESCOURROU, G.; VALET, P.; MULLER, C. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. **Cancer Res**, v. 71, n. 7, p. 2455-2465, Apr 2011.

EDWARDS, D. R.; HANDSLEY, M. M.; PENNINGTON, C. J. The ADAM metalloproteinases. **Mol Aspects Med**, v. 29, n. 5, p. 258-289, Oct 2008.

ENGELLAU, J.; ANDERSON, H.; RYDHOLM, A.; BAUER, H. C.; HALL, K. S.; GUSTAFSON, P.; AKERMAN, M.; MEIS-KINDBLOM, J.; ALVEGÅRD, T. A.; NILBERT, M.; GROUP, S. S. Time dependence of prognostic factors for patients with soft tissue sarcoma: a Scandinavian Sarcoma Group Study of 338 malignant fibrous histiocytomas. **Cancer,** v. 100, n. 10, p. 2233-2239, May 2004.

FICHER, C.; VAN DEN BERG, E.; MOLENAAR, W. Adult Fibrosarcoma. In: FLETCHER, C. M.;UNNI, K., *et al* (Ed.). World Healt Organization Classification of Tumours - Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone: Lyon: IARC Press, 2002. p.100-101.

FLUHRER, R.; HAASS, C. Signal peptide peptidases and gamma-secretase: cousins of the same protease family? **Neurodegener Dis**, v. 4, n. 2-3, p. 112-116, 2007.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N Engl J Med,** v. 285, n. 21, p. 1182-1186, Nov 1971.

\_\_\_\_\_. Fundamental concepts of the angiogenic process. **Curr Mol Med,** v. 3, n. 7, p. 643-651, Nov 2003.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. J Biol Chem, v. 267, n. 16, p. 10931-10934, Jun 1992.

FOLPE, A. L. Fibrosarcoma: a review and update. **Histopathology,** v. 64, n. 1, p. 12-25, Jan 2014.

FOULDS, L. The experimental study of tumor progression: a review. **Cancer Res**, v. 14, n. 5, p. 327-339, Jun 1954.

FREITAS, V. M.; DO AMARAL, J. B.; SILVA, T. A.; SANTOS, E. S.; MANGONE, F. R.; PINHEIRO, J. E. J.; JAEGER, R. G.; NAGAI, M. A.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Decreased expression of ADAMTS-1 in human breast tumors stimulates migration and invasion. **Mol Cancer**, v. 12, p. 2, 2013.

FRIEDL, P.; ALEXANDER, S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. **Cell**, v. 147, n. 5, p. 992-1009, Nov 2011.

FRISCH, S. M.; FRANCIS, H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. **J Cell Biol**, v. 124, n. 4, p. 619-626, Feb 1994.

FURGE, K. A.; ZHANG, Y. W.; VANDE WOUDE, G. F. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. **Oncogene**, v. 19, n. 49, p. 5582-5589, Nov 2000.

FUSHIMI, K.; TROEBERG, L.; NAKAMURA, H.; LIM, N. H.; NAGASE, H. Functional differences of the catalytic and non-catalytic domains in human ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in aggrecanolytic activity. **J Biol Chem**, v. 283, n. 11, p. 6706-6716, Mar 2008.

GANDINO, L.; DI RENZO, M. F.; GIORDANO, S.; BUSSOLINO, F.; COMOGLIO, P. M. Protein kinase-c activation inhibits tyrosine phosphorylation of the c-met protein. **Oncogene**, v. 5, n. 5, p. 721-725, May 1990.

GANDINO, L.; LONGATI, P.; MEDICO, E.; PRAT, M.; COMOGLIO, P. M. Phosphorylation of serine 985 negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase. **J Biol Chem**, v. 269, n. 3, p. 1815-1820, Jan 1994.

GANDINO, L.; MUNARON, L.; NALDINI, L.; FERRACINI, R.; MAGNI, M.; COMOGLIO, P. M. Intracellular calcium regulates the tyrosine kinase receptor encoded by the MET oncogene. **J Biol Chem**, v. 266, n. 24, p. 16098-16104, Aug 1991.

GANTT, K. R.; SCHULTZ-CHERRY, S.; RODRIGUEZ, N.; JERONIMO, S. M.; NASCIMENTO, E. T.; GOLDMAN, T. L.; RECKER, T. J.; MILLER, M. A.; WILSON, M. E. Activation of TGF-beta by Leishmania chagasi: importance for parasite survival in macrophages. **J Immunol**, v. 170, n. 5, p. 2613-2620, Mar 2003.

GAO, C. F.; VANDE WOUDE, G. F. HGF/SF-Met signaling in tumor progression. **Cell Res**, v. 15, n. 1, p. 49-51, Jan 2005.

GENDRON, C.; KASHIWAGI, M.; LIM, N. H.; ENGHILD, J. J.; THØGERSEN, I. B.; HUGHES, C.; CATERSON, B.; NAGASE, H. Proteolytic activities of human ADAMTS-5: comparative studies with ADAMTS-4. **J Biol Chem**, v. 282, n. 25, p. 18294-18306, Jun 2007.

GERDES, M. J.; SOOD, A.; SEVINSKY, C.; PRIS, A. D.; ZAVODSZKY, M. I.; GINTY, F. Emerging understanding of multiscale tumor heterogeneity. **Front Oncol**, v. 4, p. 366, 2014.

GERHARDT, S.; HASSALL, G.; HAWTIN, P.; MCCALL, E.; FLAVELL, L.; MINSHULL, C.; HARGREAVES, D.; TING, A.; PAUPTIT, R. A.; PARKER, A. E.; ABBOTT, W. M. Crystal structures of human ADAMTS-1 reveal a conserved catalytic domain and a disintegrin-like domain with a fold homologous to cysteine-rich domains. **J Mol Biol**, v. 373, n. 4, p. 891-902, Nov 2007.

GHEBRANIOUS, N.; DONEHOWER, L. A. Mouse models in tumor suppression. **Oncogene**, v. 17, n. 25, p. 3385-3400, Dec 1998.

GIANNONI, E.; FIASCHI, T.; RAMPONI, G.; CHIARUGI, P. Redox regulation of anoikis resistance of metastatic prostate cancer cells: key role for Src and EGFR-mediated prosurvival signals. **Oncogene**, v. 28, n. 20, p. 2074-2086, May 2009.

GKRETSI, V.; STYLIANOU, A.; PAPAGEORGIS, P.; POLYDOROU, C.; STYLIANOPOULOS, T. Remodeling Components of the Tumor Microenvironment to Enhance Cancer Therapy. **Front Oncol**, v. 5, p. 214, 2015.

GOMIS-RÜTH, F. X. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. J Biol Chem, v. 284, n. 23, p. 15353-15357, Jun 2009.

GRASSO, G.; BONNET, S. Metal complexes and metalloproteases: targeting conformational diseases. **Metallomics**, v. 6, n. 8, p. 1346-1357, Aug 2014.

GRESSNER, O. A.; WEISKIRCHEN, R.; GRESSNER, A. M. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. **Comp Hepatol**, v. 6, p. 7, Jul 2007.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, Mar 2010.

GÜNTHER, W.; SKAFTNESMO, K. O.; ARNOLD, H.; BJERKVIG, R.; TERZIS, A. J. Distribution patterns of the anti-angiogenic protein ADAMTS-1 during rat development. **Acta Histochem**, v. 107, n. 2, p. 121-131, 2005.

GUO, B. H.; FENG, Y.; ZHANG, R.; XU, L. H.; LI, M. Z.; KUNG, H. F.; SONG, L. B.; ZENG, M. S. Bmi-1 promotes invasion and metastasis, and its elevated expression is correlated with an advanced stage of breast cancer. **Mol Cancer**, v. 10, n. 1, p. 10, Jan 2011.

GUO, M.; MATHIEU, P. A.; LINEBAUGH, B.; SLOANE, B. F.; REINERS, J. J. Phorbol ester activation of a proteolytic cascade capable of activating latent transforming growth factorbetaL a process initiated by the exocytosis of cathepsin B. **J Biol Chem**, v. 277, n. 17, p. 14829-14837, Apr 2002.

GUO, Y.; XIE, J.; RUBIN, E.; TANG, Y. X.; LIN, F.; ZI, X.; HOANG, B. H. Frzb, a secreted Wnt antagonist, decreases growth and invasiveness of fibrosarcoma cells associated with inhibition of Met signaling. **Cancer Res,** v. 68, n. 9, p. 3350-3360, May 2008.

GUPTA, K.; GUPTA, P.; WILD, R.; RAMAKRISHNAN, S.; HEBBEL, R. P. Binding and displacement of vascular endothelial growth factor (VEGF) by thrombospondin: effect on human microvascular endothelial cell proliferation and angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 3, n. 2, p. 147-158, 1999.

GUSTAFSON, P. Soft tissue sarcoma. Epidemiology and prognosis in 508 patients. Acta Orthop Scand Suppl, v. 259, p. 1-31, Jun 1994.

HAAS, P.; GILMOUR, D. Chemokine signaling mediates self-organizing tissue migration in the zebrafish lateral line. **Dev Cell**, v. 10, n. 5, p. 673-680, May 2006.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 309-322, Mar 2012.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 353-364, Aug 1996.

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

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

HARPER, E.; BLOCH, K. J.; GROSS, J. The zymogen of tadpole collagenase. **Biochemistry**, v. 10, n. 16, p. 3035-3041, Aug 1971.

HARRIS, C. C. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic-an abridged historical perspective. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 6, p. 1187-1198, Jun 1996.

HELDIN, C. H.; MIYAZONO, K.; TEN DIJKE, P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. **Nature**, v. 390, n. 6659, p. 465-471, Dec 1997.

HELMAN, L. J.; MELTZER, P. Mechanisms of sarcoma development. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 9, p. 685-694, Sep 2003.

HEMLER, M. E.; RUTISHAUSER, U. Cell-to-cell contact and extracellular matrix. Editorial overview. **Curr Opin Cell Biol**, v. 12, n. 5, p. 539-541, Oct 2000.

HU, L.; JONSSON, K. B.; ANDERSÉN, H.; EDENRO, A.; BOHLOOLY-Y, M.; MELHUS, H.; LIND, T. Over-expression of Adamts1 in mice alters bone mineral density. **J Bone Miner Metab**, v. 30, n. 3, p. 304-311, May 2012.

HUA, H.; LI, M.; LUO, T.; YIN, Y.; JIANG, Y. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 23, p. 3853-3868, Dec 2011.

HUANG, T. F. What have snakes taught us about integrins? **Cell Mol Life Sci**, v. 54, n. 6, p. 527-540, Jun 1998.

HYNES, R. O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. **Science,** v. 326, n. 5957, p. 1216-1219, Nov 2009.

IKEJIRI, M.; BERNARDO, M. M.; BONFIL, R. D.; TOTH, M.; CHANG, M.; FRIDMAN, R.; MOBASHERY, S. Potent mechanism-based inhibitors for matrix metalloproteinases. **J Biol Chem**, v. 280, n. 40, p. 33992-34002, Oct 2005.

ILASLAN, H.; SCHILS, J.; NAGEOTTE, W.; LIETMAN, S. A.; SUNDARAM, M. Clinical presentation and imaging of bone and soft-tissue sarcomas. **Cleve Clin J Med**, v. 77 Suppl 1, p. S2-7, Mar 2010.

INOKI, I.; SHIOMI, T.; HASHIMOTO, G.; ENOMOTO, H.; NAKAMURA, H.; MAKINO, K.; IKEDA, E.; TAKATA, S.; KOBAYASHI, K.; OKADA, Y. Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. **FASEB J**, v. 16, n. 2, p. 219-221, Feb 2002.

IRUELA-ARISPE, M. L.; CARPIZO, D.; LUQUE, A. ADAMTS1: a matrix metalloprotease with angioinhibitory properties. **Ann N Y Acad Sci**, v. 995, p. 183-190, May 2003.

JAKOWLEW, S. B. Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, v. 25, n. 3, p. 435-457, Sep 2006.

JAYAMATHI, P.; KEERTHIDAA, G.; VIDYALAKHSMI, K.; BHAVANI, G.; RUKMANI DEVI, S. Antioxidant Property of Plumbagin on Fibrosarcoma Induced Rats. **Recent Research in** 

## Science and Technology, v. 2, n. 11, 2010.

JIANG, W.; HISCOX, S.; MATSUMOTO, K.; NAKAMURA, T. Hepatocyte growth factor/scatter factor, its molecular, cellular and clinical implications in cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 29, n. 3, p. 209-248, Feb 1999.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nat Rev Cancer,** v. 6, n. 5, p. 392-401, May 2006.

KARAGIANNIS, E. D.; POPEL, A. S. Anti-angiogenic peptides identified in thrombospondin type I domains. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 359, n. 1, p. 63-69, Jul 2007.

KELLER, E. T.; LI, L. Y. The first Tianjin, China forum on tumor microenvironment. **Cancer Res**, v. 71, n. 2, p. 310-313, Jan 2011.

KELLER, K. E.; BRADLEY, J. M.; ACOTT, T. S. Differential effects of ADAMTS-1, -4, and -5 in the trabecular meshwork. **Invest Ophthalmol Vis Sci,** v. 50, n. 12, p. 5769-5777, Dec 2009.

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

KHALIL, N. TGF-beta: from latent to active. **Microbes Infect,** v. 1, n. 15, p. 1255-1263, Dec 1999.

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, May 2011.

KOTRASHETTI, V. S.; KALE, A. D.; HALLIKEREMATH, S. R.; MANE, D. R.; V ANGADI, P.; BHATT, P. Intraosseous fibrosarcoma of maxilla in an HIV patient. **Arch Iran Med**, v. 15, n. 1, p. 59-62, Jan 2012.

KRAUSE, D. S.; VAN ETTEN, R. A. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. **N Engl J Med,** v. 353, n. 2, p. 172-187, Jul 2005.

KRETZSCHMAR, M.; MASSAGUÉ, J. SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling. **Curr Opin Genet Dev,** v. 8, n. 1, p. 103-111, Feb 1998.

KUBOTA, S.; FRIDMAN, R.; YAMADA, Y. Transforming growth factor-beta suppresses the invasiveness of human fibrosarcoma cells in vitro by increasing expression of tissue inhibitor of metalloprotease. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 176, n. 1, p. 129-136, Apr 1991.

KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. Inflammation: gearing the journey to cancer. **Mutat Res**, v. 659, n. 1-2, p. 15-30, 2008 Jul-Aug 2008.

KUNO, K.; BANNAI, K.; HAKOZAKI, M.; MATSUSHIMA, K.; HIROSE, K. The carboxylterminal half region of ADAMTS-1 suppresses both tumorigenicity and experimental tumor metastatic potential. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 319, n. 4, p. 1327-1333, Jul 2004.

KUNO, K.; KANADA, N.; NAKASHIMA, E.; FUJIKI, F.; ICHIMURA, F.; MATSUSHIMA, K. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. **J Biol Chem**, v. 272, n. 1, p. 556-562, Jan 1997.

KUNO, K.; OKADA, Y.; KAWASHIMA, H.; NAKAMURA, H.; MIYASAKA, M.; OHNO, H.; MATSUSHIMA, K. ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan. **FEBS Lett**, v. 478, n. 3, p. 241-245, Aug 2000.

KURNIAWAN, N. A.; CHAUDHURI, P. K.; LIM, C. T. Mechanobiology of cell migration in the context of dynamic two-way cell-matrix interactions. **J Biomech**, v. 49, n. 8, p. 1355-1368, May 2016.

KUSZYK, B. S.; CORL, F. M.; FRANANO, F. N.; BLUEMKE, D. A.; HOFMANN, L. V.; FORTMAN, B. J.; FISHMAN, E. K. Tumor transport physiology: implications for imaging and imaging-guided therapy. **AJR Am J Roentgenol**, v. 177, n. 4, p. 747-753, Oct 2001.

KWAK, H. J.; PARK, M. J.; CHO, H.; PARK, C. M.; MOON, S. I.; LEE, H. C.; PARK, I. C.; KIM, M. S.; RHEE, C. H.; HONG, S. I. Transforming growth factor-beta1 induces tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression via activation of extracellular signal-regulated kinase and Sp1 in human fibrosarcoma cells. **Mol Cancer Res,** v. 4, n. 3, p. 209-220, Mar 2006.

LAI, Y.; SHEN, Y.; LIU, X. H.; ZHANG, Y.; ZENG, Y.; LIU, Y. F. Interleukin-8 induces the endothelial cell migration through the activation of phosphoinositide 3-kinase-Rac1/RhoA pathway. **Int J Biol Sci**, v. 7, n. 6, p. 782-791, 2011.

LANDRISCINA, M.; MADDALENA, F.; LAUDIERO, G.; ESPOSITO, F. Adaptation to oxidative stress, chemoresistance, and cell survival. **Antioxid Redox Signal,** v. 11, n. 11, p. 2701-2716, Nov 2009.

LAWLER, J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **J Cell Mol Med**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2002 Jan-Mar 2002.

LAWRENCE, D. A. Transforming growth factor-beta: a general review. **Eur Cytokine Netw**, v. 7, n. 3, p. 363-374, Sep 1996.

LE GOFF, C.; CORMIER-DAIRE, V. The ADAMTS(L) family and human genetic disorders. **Hum Mol Genet**, v. 20, n. R2, p. R163-167, Oct 2011.

LESKO, E.; MAJKA, M. The biological role of HGF-MET axis in tumor growth and development of metastasis. **Front Biosci**, v. 13, p. 1271-1280, Jan 2008.

LI, N.; LORINCZI, M.; IRETON, K.; ELFERINK, L. A. Specific Grb2-mediated interactions regulate clathrin-dependent endocytosis of the cMet-tyrosine kinase. **J Biol Chem**, v. 282, n. 23, p. 16764-16775, Jun 2007.

LIANG, H.; O'REILLY, S.; LIU, Y.; ABOUNADER, R.; LATERRA, J.; MAHER, V. M.; MCCORMICK, J. J. Sp1 regulates expression of MET, and ribozyme-induced down-regulation of MET in fibrosarcoma-derived human cells reduces or eliminates their tumorigenicity. **Int J Oncol**, v. 24, n. 5, p. 1057-1067, May 2004.

LIPINSKI, M. M.; JACKS, T. The retinoblastoma gene family in differentiation and development. **Oncogene**, v. 18, n. 55, p. 7873-7882, Dec 1999.

LIU, W. D.; ZHANG, T.; WANG, C. L.; MENG, H. M.; SONG, Y. W.; ZHAO, Z.; LI, Z. M.; LIU, J. K.; PAN, S. H.; WANG, W. B. Sphere-forming tumor cells possess stem-like properties in human fibrosarcoma primary tumors and cell lines. **Oncol Lett**, v. 4, n. 6, p. 1315-1320, Dec 2012.

LIU, Y. J.; XU, Y.; YU, Q. Full-length ADAMTS-1 and the ADAMTS-1 fragments display proand antimetastatic activity, respectively. **Oncogene**, v. 25, n. 17, p. 2452-2467, Apr 2006.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. Section 24.2, Proto-Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes. In: COMPANY, W. H. F. A. (Ed.). **Molecular Cell Biology**. New York, 2000.

LU, P.; TAKAI, K.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 12, Dec 2011.

LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. **J Cell Biol**, v. 196, n. 4, p. 395-406, Feb 2012.

LU, X.; WANG, Q.; HU, G.; VAN POZNAK, C.; FLEISHER, M.; REISS, M.; MASSAGUÉ, J.; KANG, Y. ADAMTS1 and MMP1 proteolytically engage EGF-like ligands in an osteolytic signaling cascade for bone metastasis. **Genes Dev**, v. 23, n. 16, p. 1882-1894, Aug 2009.

LUQUE, A.; CARPIZO, D. R.; IRUELA-ARISPE, M. L. ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165. **J Biol Chem**, v. 278, n. 26, p. 23656-23665, Jun 2003.

LYNCH, C. C.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. **Differentiation**, v. 70, n. 9-10, p. 561-573, Dec 2002.

MARGOSIO, B.; MARCHETTI, D.; VERGANI, V.; GIAVAZZI, R.; RUSNATI, M.; PRESTA, M.; TARABOLETTI, G. Thrombospondin 1 as a scavenger for matrix-associated fibroblast growth factor 2. **Blood**, v. 102, n. 13, p. 4399-4406, Dec 2003.

MARKOWITZ, S. D.; ROBERTS, A. B. Tumor suppressor activity of the TGF-beta pathway in human cancers. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 7, n. 1, p. 93-102, Jun 1996.

MASSAGUÉ, J. TGF-beta signal transduction. Annu Rev Biochem, v. 67, p. 753-791, 1998.

MASSAGUÉ, J.; ATTISANO, L.; WRANA, J. L. The TGF-beta family and its composite receptors. **Trends Cell Biol**, v. 4, n. 5, p. 172-178, May 1994.

MASUI, T.; HOSOTANI, R.; TSUJI, S.; MIYAMOTO, Y.; YASUDA, S.; IDA, J.; NAKAJIMA, S.; KAWAGUCHI, M.; KOBAYASHI, H.; KOIZUMI, M.; TOYODA, E.; TULACHAN, S.; ARII, S.; DOI, R.; IMAMURA, M. Expression of METH-1 and METH-2 in pancreatic cancer. **Clin Cancer Res,** v. 7, n. 11, p. 3437-3443, Nov 2001.

MATSUMOTO, K.; NAKAMURA, T. Hepatocyte growth factor and the Met system as a mediator of tumor-stromal interactions. **Int J Cancer**, v. 119, n. 3, p. 477-483, Aug 2006.

MATSUMOTO, K.; OKAZAKI, H.; NAKAMURA, T. Novel function of prostaglandins as inducers of gene expression of HGF and putative mediators of tissue regeneration. **J Biochem**, v. 117, n. 2, p. 458-464, Feb 1995.

MAULIK, G.; MADHIWALA, P.; BROOKS, S.; MA, P. C.; KIJIMA, T.; TIBALDI, E. V.; SCHAEFER, E.; PARMAR, K.; SALGIA, R. Activated c-Met signals through PI3K with dramatic effects on cytoskeletal functions in small cell lung cancer. **J Cell Mol Med**, v. 6, n. 4, p. 539-553, 2002 Oct-Dec 2002.

MBEUNKUI, F.; JOHANN, D. J. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 63, n. 4, p. 571-582, Mar 2009.

MINN, A. J.; KANG, Y.; SERGANOVA, I.; GUPTA, G. P.; GIRI, D. D.; DOUBROVIN, M.; PONOMAREV, V.; GERALD, W. L.; BLASBERG, R.; MASSAGUÉ, J. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. **J Clin Invest**, v. 115, n. 1, p. 44-55, Jan 2005.

MINOBE, K.; ONO, R.; MATSUMINE, A.; SHIBATA-MINOSHIMA, F.; IZAWA, K.; OKI, T.; KITAURA, J.; IINO, T.; TAKITA, J.; IWAMOTO, S.; HORI, H.; KOMADA, Y.; UCHIDA, A.; HAYASHI, Y.; KITAMURA, T.; NOSAKA, T. Expression of ADAMTS4 in Ewing's sarcoma. **Int J Oncol**, v. 37, n. 3, p. 569-581, Sep 2010.

MORRISON, B. A. Soft tissue sarcomas of the extremities. **Proc (Bayl Univ Med Cent)**, v. 16, n. 3, p. 285-290, Jul 2003.

MOUSTAKAS, A.; HELDIN, C. H. Non-Smad TGF-beta signals. J Cell Sci, v. 118, n. Pt 16, p. 3573-3584, Aug 2005.

MUELLER, M. M.; FUSENIG, N. E. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 11, p. 839-849, Nov 2004.

MUNGER, J. S.; HARPEL, J. G.; GLEIZES, P. E.; MAZZIERI, R.; NUNES, I.; RIFKIN, D. B. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. **Kidney Int,** v. 51, n. 5, p. 1376-1382, May 1997.

MUNGER, J. S.; HUANG, X.; KAWAKATSU, H.; GRIFFITHS, M. J.; DALTON, S. L.; WU, J.; PITTET, J. F.; KAMINSKI, N.; GARAT, C.; MATTHAY, M. A.; RIFKIN, D. B.; SHEPPARD, D. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. **Cell**, v. 96, n. 3, p. 319-328, Feb 1999.

NABESHIMA, K.; INOUE, T.; SHIMAO, Y.; SAMESHIMA, T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. **Pathol Int,** v. 52, n. 4, p. 255-264, Apr 2002.

NAKAMURA, M.; SONE, S.; TAKAHASHI, I.; MIZOGUCHI, I.; ECHIGO, S.; SASANO, Y. Expression of versican and ADAMTS1, 4, and 5 during bone development in the rat mandible and hind limb. **J Histochem Cytochem**, v. 53, n. 12, p. 1553-1562, Dec 2005.

NAKAMURA, T.; MATSUMOTO, K.; KIRITOSHI, A.; TANO, Y. Induction of hepatocyte growth factor in fibroblasts by tumor-derived factors affects invasive growth of tumor cells: in vitro analysis of tumor-stromal interactions. **Cancer Res,** v. 57, n. 15, p. 3305-3313, Aug 1997.

NALDINI, L.; VIGNA, E.; NARSIMHAN, R. P.; GAUDINO, G.; ZARNEGAR, R.; MICHALOPOULOS, G. K.; COMOGLIO, P. M. Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. **Oncogene**, v. 6, n. 4, p. 501-504, Apr 1991.

NIKITOVIC, D.; KOUVIDI, K.; KARAMANOS, N. K.; TZANAKAKIS, G. N. The roles of hyaluronan/RHAMM/CD44 and their respective interactions along the insidious pathways of fibrosarcoma progression. **Biomed Res Int,** v. 2013, p. 929531, 2013.

NORTON, W. H.; LEDIN, J.; GRANDEL, H.; NEUMANN, C. J. HSPG synthesis by zebrafish Ext2 and Extl3 is required for Fgf10 signalling during limb development. **Development**, v. 132, n. 22, p. 4963-4973, Nov 2005.

ORGAN, S. L.; TSAO, M. S. An overview of the c-MET signaling pathway. Ther Adv Med Oncol, v. 3, n. 1 Suppl, p. S7-S19, Nov 2011.

OVERALL, C. M. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. **Mol Biotechnol**, v. 22, n. 1, p. 51-86, Sep 2002.

OVERALL, C. M.; BLOBEL, C. P. In search of partners: linking extracellular proteases to substrates. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 3, p. 245-257, Mar 2007.

OZBEK, S.; BALASUBRAMANIAN, P. G.; CHIQUET-EHRISMANN, R.; TUCKER, R. P.; ADAMS, J. C. The evolution of extracellular matrix. **Mol Biol Cell**, v. 21, n. 24, p. 4300-4305, Dec 2010.

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

PARAMESWARAN, K.; WILLEMS-WIDYASTUTI, A.; ALAGAPPAN, V. K.; RADFORD, K.; KRANENBURG, A. R.; SHARMA, H. S. Role of extracellular matrix and its regulators in human airway smooth muscle biology. **Cell Biochem Biophys**, v. 44, n. 1, p. 139-146, 2006.

PEEK, R. M.; MOHLA, S.; DUBOIS, R. N. Inflammation in the genesis and perpetuation of cancer: summary and recommendations from a national cancer institute-sponsored meeting. **Cancer Res**, v. 65, n. 19, p. 8583-8586, Oct 2005.

PETRELLI, A.; GILESTRO, G. F.; LANZARDO, S.; COMOGLIO, P. M.; MIGONE, N.; GIORDANO, S. The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. **Nature**, v. 416, n. 6877, p. 187-190, Mar 2002.

PETRIE, R. J.; GAVARA, N.; CHADWICK, R. S.; YAMADA, K. M. Nonpolarized signaling reveals two distinct modes of 3D cell migration. **J Cell Biol**, v. 197, n. 3, p. 439-455, Apr 2012.

PIEK, E.; HELDIN, C. H.; TEN DIJKE, P. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. **FASEB J**, v. 13, n. 15, p. 2105-2124, Dec 1999.

PORTER, S.; CLARK, I. M.; KEVORKIAN, L.; EDWARDS, D. R. The ADAMTS metalloproteinases. **Biochem J**, v. 386, n. Pt 1, p. 15-27, Feb 2005.

PORTER, S.; SCOTT, S. D.; SASSOON, E. M.; WILLIAMS, M. R.; JONES, J. L.; GIRLING, A. C.; BALL, R. Y.; EDWARDS, D. R. Dysregulated expression of adamalysinthrombospondin genes in human breast carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 7, p. 2429-2440, Apr 2004.

PRASAD, M.; MONTELL, D. J. Cellular and molecular mechanisms of border cell migration analyzed using time-lapse live-cell imaging. **Dev Cell**, v. 12, n. 6, p. 997-1005, Jun 2007.

PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. **Trends Genet**, v. 16, n. 2, p. 83-87, Feb 2000.

RA, H. J.; PARKS, W. C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Matrix Biol**, v. 26, n. 8, p. 587-596, Oct 2007.

RAIBORG, C.; RUSTEN, T. E.; STENMARK, H. Protein sorting into multivesicular endosomes. Curr Opin Cell Biol, v. 15, n. 4, p. 446-455, Aug 2003.

REHN, A. P.; BIRCH, M. A.; KARLSTRÖM, E.; WENDEL, M.; LIND, T. ADAMTS-1 increases the three-dimensional growth of osteoblasts through type I collagen processing. **Bone**, v. 41, n. 2, p. 231-238, Aug 2007.

REISS, K.; SAFTIG, P. The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. **Semin Cell Dev Biol**, v. 20, n. 2, p. 126-137, Apr 2009.

REMACLE, A.; MURPHY, G.; ROGHI, C. Membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 19, p. 3905-3916, Oct 2003.

RICCIARDELLI, C.; FREWIN, K. M.; TAN, I. E. A.; WILLIAMS, E. D.; OPESKIN, K.; PRITCHARD, M. A.; INGMAN, W. V.; RUSSELL, D. L. The ADAMTS1 protease gene is required for mammary tumor growth and metastasis. **Am J Pathol**, v. 179, n. 6, p. 3075-3085, Dec 2011.

RIDGE, S. M.; SULLIVAN, F. J.; GLYNN, S. A. Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. **Mol Cancer**, v. 16, n. 1, p. 31, Feb 2017.

ROCKS, N.; PAULISSEN, G.; EL HOUR, M.; QUESADA, F.; CRAHAY, C.; GUEDERS, M.; FOIDART, J. M.; NOEL, A.; CATALDO, D. Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer. **Biochimie**, v. 90, n. 2, p. 369-379, Feb 2008.

RODRIGUES, G. A.; PARK, M. Autophosphorylation modulates the kinase activity and oncogenic potential of the Met receptor tyrosine kinase. **Oncogene**, v. 9, n. 7, p. 2019-2027, Jul 1994.

RODRIGUEZ-MANZANEQUE, J. C.; MILCHANOWSKI, A. B.; DUFOUR, E. K.; LEDUC, R.; IRUELA-ARISPE, M. L. Characterization of METH-1/ADAMTS1 processing reveals two distinct active forms. **J Biol Chem**, v. 275, n. 43, p. 33471-33479, Oct 2000.

ROWE, R. G.; WEISS, S. J. Navigating ECM barriers at the invasive front: the cancer cellstroma interface. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 25, p. 567-595, 2009.

ROZANOV, D. V.; DERYUGINA, E. I.; MONOSOV, E. Z.; MARCHENKO, N. D.; STRONGIN, A. Y. Aberrant, persistent inclusion into lipid rafts limits the tumorigenic function of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignant cells. **Exp Cell Res**, v. 293, n. 1, p. 81-95, Feb 2004.

RUOSLAHTI, E.; REED, J. C. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. **Cell**, v. 77, n. 4, p. 477-478, May 1994.

RUSSELL, D. L.; DOYLE, K. M.; OCHSNER, S. A.; SANDY, J. D.; RICHARDS, J. S. Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation. **J Biol Chem**, v. 278, n. 43, p. 42330-42339, Oct 2003.

SAHAI, E.; MARSHALL, C. J. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. **Nat Cell Biol**, v. 5, n. 8, p. 711-719, Aug 2003.

SAM, M. R.; ELLIOTT, B. E.; MUELLER, C. R. A novel activating role of SRC and STAT3 on HGF transcription in human breast cancer cells. **Mol Cancer**, v. 6, p. 69, Oct 2007.

SANDY, J. D.; WESTLING, J.; KENAGY, R. D.; IRUELA-ARISPE, M. L.; VERSCHAREN, C.; RODRIGUEZ-MAZANEQUE, J. C.; ZIMMERMANN, D. R.; LEMIRE, J. M.; FISCHER, J. W.; WIGHT, T. N.; CLOWES, A. W. Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. **J Biol Chem**, v. 276, n. 16, p. 13372-13378, Apr 2001.

SHARMA, M.; SAH, P.; SHARMA, S. S.; RADHAKRISHNAN, R. Molecular changes in invasive front of oral cancer. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 17, n. 2, p. 240-247, May 2013.

SIERRA, J. R.; TSAO, M. S. c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. **Ther Adv Med Oncol**, v. 3, n. 1 Suppl, p. S21-35, Nov 2011.

SMIRNOV, A. V. [Fibrosarcoma: immunohistochemical study of the extracellular matrix]. Arkh Patol, v. 50, n. 12, p. 17-24, 1988.

SOMANNA, A.; MUNDODI, V.; GEDAMU, L. Functional analysis of cathepsin B-like cysteine proteases from Leishmania donovani complex. Evidence for the activation of latent transforming growth factor beta. **J Biol Chem**, v. 277, n. 28, p. 25305-25312, Jul 2002.

STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Semin Cancer Biol**, v. 10, n. 6, p. 415-433, Dec 2000.

STANTON, H.; MELROSE, J.; LITTLE, C. B.; FOSANG, A. J. Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1812, n. 12, p. 1616-1629, Dec 2011.

STEFFAN, J. J.; COLEMAN, D. T.; CARDELLI, J. A. The HGF-met signaling axis: emerging themes and targets of inhibition. **Curr Protein Pept Sci**, v. 12, n. 1, p. 12-22, Feb 2011.

STERNLICHT, M. D.; SUNNARBORG, S. W.; KOUROS-MEHR, H.; YU, Y.; LEE, D. C.; WERB, Z. Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. **Development**, v. 132, n. 17, p. 3923-3933, Sep 2005.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 17, p. 463-516, 2001.

SUGAWARA, J.; FUKAYA, T.; MURAKAMI, T.; YOSHIDA, H.; YAJIMA, A. Hepatocyte growth factor stimulated proliferation, migration, and lumen formation of human endometrial epithelial cells in vitro. **Biol Reprod,** v. 57, n. 4, p. 936-942, Oct 1997.

SWARTZ, M. A.; IIDA, N.; ROBERTS, E. W.; SANGALETTI, S.; WONG, M. H.; YULL, F. E.; COUSSENS, L. M.; DECLERCK, Y. A. Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. **Cancer Res**, v. 72, n. 10, p. 2473-2480, May 2012.

TAN, I. E. A.; RICCIARDELLI, C.; RUSSELL, D. L. The metalloproteinase ADAMTS1: a comprehensive review of its role in tumorigenic and metastatic pathways. **Int J Cancer**, v. 133, n. 10, p. 2263-2276, Nov 2013.

TEN DIJKE, P.; HILL, C. S. New insights into TGF-beta-Smad signalling. **Trends Biochem Sci**, v. 29, n. 5, p. 265-273, May 2004.

THAI, S. N.; IRUELA-ARISPE, M. L. Expression of ADAMTS1 during murine development. **Mech Dev,** v. 115, n. 1-2, p. 181-185, Jul 2002.

THIAGALINGAM, S. A cascade of modules of a network defines cancer progression. **Cancer Res**, v. 66, n. 15, p. 7379-7385, Aug 2006.

TORTORELLA, M. D.; MALFAIT, F.; BARVE, R. A.; SHIEH, H. S.; MALFAIT, A. M. A review of the ADAMTS family, pharmaceutical targets of the future. **Curr Pharm Des,** v. 15, n. 20, p. 2359-2374, 2009.

TRUSOLINO, L.; BERTOTTI, A.; COMOGLIO, P. M. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 12, p. 834-848, Dec 2010.

TRUSOLINO, L.; COMOGLIO, P. M. Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 4, p. 289-300, Apr 2002.

TUCK, A. B.; PARK, M.; STERNS, E. E.; BOAG, A.; ELLIOTT, B. E. Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma. **Am J Pathol**, v. 148, n. 1, p. 225-232, Jan 1996.

UCHIDA, D.; KAWAMATA, H.; OMOTEHARA, F.; NAKASHIRO KI; KIMURA-YANAGAWA, T.; HINO, S.; BEGUM, N. M.; HOQUE, M. O.; YOSHIDA, H.; SATO, M.; FUJIMORI, T. Role of HGF/c-met system in invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma cells in vitro and its clinical significance. **Int J Cancer**, v. 93, n. 4, p. 489-496, Aug 2001.

VALVERDE, J.; VINAGREIRO, M.; GOUVEIA, P.; KOCH, P.; SOARES, V.; GOMES, T. Sarcoma the great "masquerader" hematoma/deep vein thrombosis manifestation. Int J Surg Case Rep, v. 28, p. 348-351, 2016.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res**, v. 92, n. 8, p. 827-839, May 2003.

VOLPERT, O. V.; LAWLER, J.; BOUCK, N. P. A human fibrosarcoma inhibits systemic angiogenesis and the growth of experimental metastases via thrombospondin-1. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 95, n. 11, p. 6343-6348, May 1998.

WEIDNER, K. M.; SACHS, M.; RIETHMACHER, D.; BIRCHMEIER, W. Mutation of juxtamembrane tyrosine residue 1001 suppresses loss-of-function mutations of the met receptor in epithelial cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 7, p. 2597-2601, Mar 1995.

WEIS, S. M.; CHERESH, D. A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. **Nat Med**, v. 17, n. 11, p. 1359-1370, Nov 2011.

WELCH, M. D. Cell migration, freshly squeezed. Cell, v. 160, n. 4, p. 581-582, Feb 2015.

WIBMER, C.; LEITHNER, A.; ZIELONKE, N.; SPERL, M.; WINDHAGER, R. Increasing incidence rates of soft tissue sarcomas? A population-based epidemiologic study and literature review. **Ann Oncol**, v. 21, n. 5, p. 1106-1111, May 2010.

WOLF, K.; MAZO, I.; LEUNG, H.; ENGELKE, K.; VON ANDRIAN, U. H.; DERYUGINA, E. I.; STRONGIN, A. Y.; BRÖCKER, E. B.; FRIEDL, P. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. **J Cell Biol**, v. 160, n. 2, p. 267-277, Jan 2003.

WOLF, K.; TE LINDERT, M.; KRAUSE, M.; ALEXANDER, S.; TE RIET, J.; WILLIS, A. L.; HOFFMAN, R. M.; FIGDOR, C. G.; WEISS, S. J.; FRIEDL, P. Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. **J Cell Biol**, v. 201, n. 7, p. 1069-1084, Jun 2013.

WOLFSBERG, T. G.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G.; WHITE, J. M. ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. **J Cell Biol**, v. 131, n. 2, p. 275-278, Oct 1995.

YANG, C. Y.; CHANALARIS, A.; TROEBERG, L. ADAMTS and ADAM metalloproteinases in osteoarthritis - looking beyond the 'usual suspects'. **Osteoarthritis Cartilage**, Feb 2017.

YOSHINAGA, Y.; MATSUNO, Y.; FUJITA, S.; NAKAMURA, T.; KIKUCHI, M.; SHIMOSATO, Y.; HIROHASHI, S. Immunohistochemical detection of hepatocyte growth factor/scatter factor in human cancerous and inflammatory lesions of various organs. **Jpn J Cancer Res**, v. 84, n. 11, p. 1150-1158, Nov 1993.

ZETTER, B. R. Angiogenesis and tumor metastasis. Annu Rev Med, v. 49, p. 407-424, 1998.

ZHANG, X. P.; KAMATA, T.; YOKOYAMA, K.; PUZON-MCLAUGHLIN, W.; TAKADA, Y. Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (metargidin, ADAM-15) with integrin alphavbeta3. **J Biol Chem**, v. 273, n. 13, p. 7345-7350, Mar 1998.

ZHANG, Y. W.; WANG, L. M.; JOVE, R.; VANDE WOUDE, G. F. Requirement of Stat3 signaling for HGF/SF-Met mediated tumorigenesis. **Oncogene**, v. 21, n. 2, p. 217-226, Jan 2002.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, v. 12, n. 2, p. 121-127, Feb 2000.