SUÉLY VIEIRA DA SILVA

Influência do estrógeno, progesterona e testosterona nos níveis de expressão e na distribuição de ADAMTS-1 (uma desintegrina e metaloproteinase com domínios trombospondinas 1) em células mamárias humanas normais e tumorais

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

São Paulo
2014

SUÉLY VIEIRA DA SILVA

Influência do estrógeno, progesterona e testosterona nos níveis de expressão e na distribuição de ADAMTS-1 (uma desintegrina e metaloproteinase com domínios trombospondinas 1) em células mamárias humanas normais e tumorais

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Prof.^a. Dr^a. Vanessa Morais Freitas

Versão original

São Paulo
2014

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

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Suély Vieira da.

Influência do estrógeno, progesterona e testosterona nos níveis de expressão e na distribuição de ADAMTS-1 (uma desintegrina e metaloproteinase com domínios trombospondina) em células mamárias humanas normais e tumorais / Suély Vieira da Silva. – São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Vanessa Moraes Freitas.

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

Versão do título para o inglês: Influence of estrogen, progesterone and testosterone on ADAMTS-1 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1) levels and distribution in normal and tumoral breast cells.

1. Câncer de mama 2. Matriz extracelular 3. Metaloproteinases da matriz 4. ADAMTS-1 5. Hormônios 6. Núcleo I. Freitas, Profa. Dra. Vanessa Moraes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0173/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Suély Vieira da Silva.

Título da Dissertação: Influência do estrógeno, progesterona e testosterona nos níveis de expressão e na distribuição de ADAMTS-1 (uma desintegrina e metaloproteinase com domínios trombospondina) em células mamárias humanas normais e tumorais.

Orientador(a): Profa. Dra. Vanessa Moraes Freitas.

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

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

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

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 555/12 referente ao projeto intitulado: *"Influência do estrógeno, progesterona e testosterona nos níveis de expressão e na distribuição de ADAMTS-1 em células mamárias humanas normais e tumorais"* sob a responsabilidade de **Suély Vieira da Silva**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 10 de outubro de 2012.

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

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

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Gostaria de agradecer à Profa. Dra. Vanessa Moraes Freitas, por todo apoio e orientação. Muito obrigada pela oportunidade, pela confiança, ensinamentos e pela SUPER PACIÊNCIA (que não foi pouca). Serei eternamente grata por você ter me recebido de braços abertos e aceito realizar este projeto comigo. Admiro muito sua inteligência e sua liderança. Sua postura profissional é um exemplo para mim. Muito obrigada!

Agradeço ao Prof. Dr. Ruy Gastaldoni Jaeger, pela colaboração neste estudo, e por todas as sugestões feitas durante o processo de escrita do meu artigo, especialmente na formatação das figuras. Obrigada pela permissão em utilizar os equipamentos e reagentes do seu laboratório.

Aos meus pais, por tudo o que sempre fizeram por mim. Ao meu pai (in memoriam), que onde quer que ele esteja, nunca deixou de me amar, nem de confiar em mim. À minha mãe, exemplo de amor incondicional e prosperidade. A vocês que muitas vezes renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus, lhes dedico esta conquista. Pai e mãe, meus amores eternos.

Aos meus irmãos que tanto amo, Alisson e Thainan, por sempre estarem ao meu lado, em todos os momentos.

Ao Daniel, meu namorado e companheiro. Agradeço toda compreensão e carinho que sempre teve comigo. Amo você.

À todos os meus colegas de laboratório, em especial Maíra e Thaiomara, que sempre me ajudaram com experimentos e compartilharam comigo boas risadas.

AGRADECIMENTOS

À fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro. A concessão de bolsa de mestrado e reserva técnica foi de extrema importância para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. 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 também permitir o uso de alguns de seus equipamentos.

À Profa. Dra. Patrícia Gama e Daniela Ogias, pelas dicas no início dos experimentos de obtenção das frações celulares.

Às Profa. Dra Maria Inês Borella, Profa. Dra Claudimara Ferini Pacicco Lotfi e à Luciana Harumi Osaki, pelas relevantes considerações e sugestões feitas durante meu exame de qualificação.

Às secretárias, Elo e Ana. Em especial a Regina, por toda atenção, carinho e educação que sempre teve comigo.

RESUMO

SILVA, S. V. **Influência do estrógeno, progesterona e testosterona nos níveis de expressão e na distribuição de ADAMTS-1 (uma desintegrina e metaloproteinase com domínios trombospondinas 1) em células mamárias humanas normais e tumorais.** 2014. 104 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O câncer de mama é segundo tipo de neoplasia mais frequente no mundo, e no Brasil é o segundo maior causador de morte entre as mulheres. Os hormônios sexuais estão dentre os vários fatores indutores ou promotores da carcinogênese. O microambiente tumoral está ligado ao desenvolvimento e a progressão do câncer. Ele é composto por fibroblastos, células inflamatórias, fatores de crescimento, proteínas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e proteases que remodelam a MEC. ADAMTS (uma desintegrina e metaloproteinase com domínios trombospondinas) é uma enzima dependente de Zn^{2+}/Ca^{2+} . Na literatura o papel da ADAMTS-1 no câncer não está claramente estabelecido, tanto sua alta expressão, quanto sua baixa expressão foram reportados em tumores, quando comparados ao tecido normal. Neste trabalho avaliamos a influência dos hormônios sexuais nos níveis de expressão e na localização da protease ADAMTS-1 em três linhagens celulares de mama. O qPCR demonstrou que a progesterona estimulou o aumento da expressão de mRNA de ADAMTS-1 nas células MCF-10A e nas células MDA-MB-231, o tratamento com estrógeno e progesterona estimulou a diminuição dos níveis desse mRNA. No Western blot, observamos nas linhagens MCF-10A e MCF-7 que os hormônios tendem a aumentar os níveis proteicos de ADAMTS-1, e que o estrógeno estimulou uma acentuada secreção de ADAMTS-1 na linhagem MCF-7. Na linhagem MDA-MB-231, os tratamentos com os hormônios demonstraram uma tendência a diminuir os níveis proteicos de ADAMTS-1 intracelular. Na imunofluorescência e no Western blot que analisou frações citoplasmáticas e nucleares, observamos a predominância de ADAMTS-1 no compartimento nuclear. Nossos resultados sugerem que 1) os hormônios regulam a expressão de ADAMTS-1 nas células normais e tumorais de mama e que esse efeito foi relacionado com a presença dos receptores para esses hormônios e 2) ADAMTS-1 está predominantemente presente no núcleo dessas células mamárias.

Palavras-chave: Câncer de mama. Matriz extracelular. Metaloproteinases da matriz. ADAMTS-1. Hormônios. Núcleo.

ABSTRACT

SILVA, S. V. **Influence of estrogen, progesterone and testosterone on ADAMTS-1 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1) levels and distribution in normal and tumoral breast cells.** 2014. 104 f. Masters thesis (Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Breast cancer is the second most common type of neoplasia in the world, and the second largest cause of death among women in Brazil. Sex hormones are one of the several cancer inducers or promoters. Tumor microenvironment is associated to development and cancer progression. It is composed by fibroblasts, inflammatory cells, growth factors, proteins, proteoglycans and remodeling ECM proteases. ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) are dependent on Zn^{2+}/Ca^{2+} enzymes. The role of ADAMTS-1 in cancer is not clearly established in literature, both up regulation and down regulation were reported in tumors, when compared to normal tissue. In this study we evaluated influence of the sex hormones on ADAMTS-1 levels and localization in three different breast cell lines. qPCR results showed that progesterone stimulated an increase of ADAMTS-1 mRNA expression in MCF-10A cells, however, in MDA-MB-231 cells, the treatment by estrogen and progesterone decreased the expression levels of that mRNA. Western blot analysis showed a tendency to increased ADAMTS-1 protein levels in MCF-10A and MCF-7 cell lines due to the hormone treatment. Additionally, the treatment by estrogen led to a marked ADAMTS-1 secretion in MCF-7 cells. In MDA-MB-231 cells, the treatment by hormones showed a tendency to decreased intracellular ADAMTS-1 protein levels. Immunofluorescence and Western Blot analyzed cytoplasmic and nuclear fractions, we observed ADAMTS-1 predominant at the nuclear compartment. Results suggest that 1) sex hormones regulate the ADAMTS-1 expression in normal and tumoral breast cells, and this effect was related with hormone receptors, and 2) ADAMTS-1 is predominant in the cellular nucleus of breast cell lines.

Keywords: Breast cancer. Extracellular matrix. Matrix metalloproteinases. ADAMTS-1. Hormones. Nucleus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Capacidades adquiridas pelas células tumorais	21
Figura 2: Estrutura esquemática das MMPs.....	27
Figura 3: Comparação dos domínios estruturais das Metaloproteinases ADAM, ADAMTS e MMP.	29
Figura 4: Estrutura das proteinases ADAM e ADAMTS.	30
Figura 5: Domínios estruturais dos membros da família ADAMTS	32
Figura 6: Síntese e função da protease ADAMTS-1	36
Figura 7: Visão esquemática da glândula mamária normal.....	37
Figura 8: Flutuação dos níveis hormonais durante os ciclos fisiológicos femininos.	39
Figura 9: Arquitetura da glândula mamária	40
Figura 10: Indução da proliferação celular mediada por estrógeno.....	41
Figura 11: Ação da progesterona no epitélio mamário normal e tumoral	42
Figura 12: Papel divergente da testosterona no câncer de mama	45
Figura 13: Estratégias experimentais utilizados no estudo.....	51
Figura 14: Morfologia das linhagens celulares utilizadas nos experimentos	53
Figura 15: PCR quantitativo da linhagem MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231	61
Figura 16: Western Blot do lisado total e meio condicionado da linhagem de células MCF-10A.....	63

Figura 17: Western Blot do lisado total e meio condicionado da linhagem de células MCF-7	65
Figura 18: Western Blot do lisado total e meio condicionado da linhagem de células MDA-MB-231.....	66
Figura 19: Imunolocalização de ADAMTS-1 na linhagem celular MCF-10A	69
Figura 20: Imunolocalização de ADAMTS-1 na linhagem celular MCF-10A, mostrando co-localização de ADAMTS-1 com Nucleofosmina	70
Figura 21: Imunolocalização de ADAMTS-1 na linhagem celular MCF-7.....	71
Figura 22: Imunolocalização de ADAMTS-1 na linhagem celular MCF-7, mostrando co-localização em amarelo de ADAMTS-1 com Nucleofosmina	72
Figura 23: Imunolocalização de ADAMTS-1 na linhagem celular MDA-MB-231	73
Figura 24: Imunolocalização de ADAMTS-1 na linhagem celular MDA-MB-231, mostrando co-localização de ADAMTS-1 com Nucleofosmina	74
Figura 25: Western Blot da fração citoplasmática e fração nuclear da linhagem de células MCF-10A.....	75
Figura 26: Western Blot da fração citoplasmática e fração nuclear da linhagem de células MCF-7	76
Figura 27: Western Blot da fração citoplasmática e fração nuclear da linhagem de células MDA-MB-231	77
Figura 28: Imunolocalização de AGRECAM na linhagem celular MCF-10A	78
Figura 29: Avaliação da clivagem do agrecam feita pela atividade proteolítica de ADAMTS-1.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Substratos das ADAMTSs.....	33
---------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAM	do inglês “a disintegrin and metalloproteinase”, traduzido como uma desintegrina e metaloproteinase
ADAMTS	do inglês “a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif”, traduzido como uma desintegrina e metaloproteinase com domínio trombospondina
ARE	elemento responsivo ao andrógeno
cDNA	do inglês “complementary deoxyribonucleic acid”, traduzido como ácido desoxirribonucleico complementar
Ct	do inglês “cycle threshold”, ciclo no qual a fluorescência atinge o limiar de detecção
DHT	di hidrotosterona
DMEM	do inglês “Dulbecco’s Modified Eagles Medium”, traduzido como meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	di-metilsulfóxido
DNA	do inglês “deoxyribonucleic acid”, traduzido como ácido desoxirribonucleico
E2	estrógeno
EDS	Síndrome de Ehlers-Danlos
EDTA	do inglês “ethylenediamine-tetra acetic acid”, traduzido como ácido etilenodiamino tetra acético
EGF	fator de crescimento epidermal
EGFR	receptor de fator de crescimento epidermal
ER	receptor de estrógeno
ERE	elemento responsivo ao estrógeno
FGF	do inglês “fibroblast growth factor 2”, traduzido como fator de crescimento de fibroblasto 2

FGF2	do inglês “fibroblast growth fator”, traduzido como fator de crescimento de fibroblasto
FSH	hormônio folículo-estimulante
GAPDH	do inglês “glyceraldehyde-3-phosphato dehydrogenase”, traduzido como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HA	do inglês “hyaluronic acid”, traduzido como ácido hialurônico
HER2	receptor de fator de crescimento epidermal 2
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IgG	imunoglobulina G
LH	hormônio luteinizante
MEC	matriz extracelular
MMP	do inglês “matrix metalloproteinases”, traduzido como metaloproteinases da matriz
MP	metaloproteinase
mRNA	RNA mensageiro
P4	progesterona
PBS	do inglês “phosphate-buffered saline”, traduzido como tampão fosfato salina
PCR	do inglês “Polymerase Chain Reaction”, traduzido como Reação em Cadeia da Polimerase
PR	receptor de progesterona
qPCR	do inglês “quantitative Polymerase Chain Reaction”, traduzido com reação em cadeia da polimerase quantitativa
AR	do inglês “androgen receptor”, traduzido como receptor de andrógeno
RNA	do inglês “ribonucleic acid”, traduzido como ácido ribonucleico
SFB	soro fetal bovino

TGF- β	fator de transformação do crescimento beta
TIMP	do inglês “tissue inhibitors of metalloproteinases”, traduzido como inibidor tecidual de metaloproteinases
VEGF	do inglês “vascular endothelial growth fator”, traduzido como fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
Δ	delta
Ca	Cálcio
cm ²	centímetros quadrados
CO ₂	gás carbônico
g	força centrífuga relativa
HCl	ácido clorídrico
kDa	kilodalton
ml	mililitro
mM	milimolar
nM	nanomolar
pH	potencial hidrogeniônico
Zn	Zinco
α	alfa
β	beta
μ g	microgramas
μ g / ml	microgramas por mililitros
ml	mililitro
μ l	microlitro
μ M	micromolar
CaCl ₂	cloreto de cálcio
M	molar, medida de concentração de soluções

mg	miligramas
mg/ml	miligramas por mililitro
NaCl	cloreto de sódio
ng	nanogramas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Câncer	20
1.2	Incidência de câncer	20
1.3	Progressão tumoral	20
1.4	Microambiente tumoral	23
1.5	Matriz Extracelular (MEC)	24
1.6	Metaloproteinases de Matriz (MMPs)	25
1.7	Adamalisinas	28
1.8	ADAMTS-1	33
1.9	Arquitetura tecidual mamária	37
1.10	Hormônios	38
1.10.1	<i>Estrógeno</i>	40
1.10.2	<i>Progesterona</i>	41
1.10.3	<i>Testosterona</i>	43
1.11	Modelo Utilizado	45
2	OBJETIVOS	48
2.1	Justificativa	49
2.2	Objetivos Gerais	49
2.3	Objetivos específicos	49
3	ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS	50
4	MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1	Linhagens celulares	53

4.2 Tratamentos das linhagens celulares com hormônios	53
4.3 PCR quantitativo	54
4.4 Immunoblot.....	55
4.5 Digestão e deglicosilação de Agrecan e outras proteínas.....	56
4.6 Imunofluorescência indireta.....	57
4.7 Análises estatísticas	58
5 RESULTADOS	59
5.1 Efeito dos hormônios nos níveis de mRNA de ADAMTS-1	60
5.2 Efeito dos hormônios nos níveis proteicos de ADAMTS-1	62
5.3 Efeito dos hormônios na localização e distribuição de ADAMTS-1	67
5.4 Localização da protease.....	75
5.5 Papel de ADAMTS-1 no núcleo celular	77
6 DISCUSSÃO	80
7 CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS.....	90

1.1 Câncer

O câncer é uma doença que se caracteriza por alterações dinâmicas no genoma das células. Células normais evoluem progressivamente para um estado neoplásico, devido à capacidade que essas células possuem de adquirirem algumas características que lhes permitam adotar um comportamento tumorigênico e tornarem-se malignas (FOULDS, 1954).

1.2 Incidência de câncer

De acordo com estimativas mundiais, houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012. Essa incidência de câncer continuará aumentando nos países em desenvolvimento, e crescerá ainda mais em países desenvolvidos se medidas preventivas não forem amplamente aplicadas. No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, que será válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. O câncer de pele do tipo não melanoma será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata, mama feminina, cólon e reto, pulmão, estômago e colo do útero (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2014).

O câncer de mama é tido como o segundo tipo de neoplasia mais frequente no mundo, e o de maior incidência entre as mulheres, respondendo por 22% dos casos novos a cada ano, responsável também pelo maior índice de mortalidade. No Brasil, o câncer de mama é a maior causa de morte entre as mulheres, exceto na região norte, onde a prevalência é o câncer de colo uterino, e os estados mais desenvolvidos e industrializados como São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, apresentam maior incidência desta doença (INCA, 2014).

1.3 Progressão tumoral

O termo progressão tumoral inclui todas as alterações que levam as células normais transformarem-se em células cancerosas. Células normais evoluem progressivamente para um estado neoplásico, ao adquirirem uma sucessão de

capacidades que lhes permitam evoluir para um fenótipo maligno. Porém, a biologia dos tumores não se define simplesmente pelas diversas características que as células cancerosas adquirem, mas também abrange contribuições do microambiente tumoral para o processo de tumorigênese (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

O processo tumoral acontece a partir de uma sucessão de alterações genéticas, cada uma conferindo um ou outro tipo de vantagem de crescimento, levando a uma progressiva conversão de células normais em células neoplásicas (Figura 1) (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000, 2011).

Figura 1: Capacidades adquiridas pelas células tumorais. Através de diversos mecanismos, a maioria dos cânceres adquire o mesmo conjunto de capacidades funcionais durante o seu desenvolvimento. Adaptado de (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

A célula tumoral adquire uma característica fundamental que envolve sua capacidade de sustentar a proliferação. Os tecidos normais controlam cuidadosamente a produção e liberação de sinais para a promoção do crescimento, controlando o número de células e, assim, promovendo a manutenção da arquitetura e função do tecido normal. Já as células cancerosas, através da desregulação destes sinais, tornam-se independentes, produzindo muitos de seus fatores de crescimento (BHOWMICK; NEILSON; MOSES, 2004; CHENG et al., 2008), ou super expressando os receptores dessas moléculas (LEMMON; SCHLESSINGER, 2010).

Outra habilidade adquirida pelas células malignas é a insensibilidade que elas apresentam aos sinais das moléculas inibidoras de crescimento. Em um tecido

normal, múltiplos sinais anti-proliferativos atuam de forma a manter a quiescência celular e a homeostasia tecidual (BURKHART; SAGE, 2008; SHERR; MCCORMICK, 2002). De forma a sobreviver e a proliferar, as células neoplásicas têm que “escapar” destes sinais (GHEBRANIOUS; DONEHOWER, 1998; LIPINSKI; JACKS, 1999).

As células tumorais são capazes de aumentar seu potencial replicativo, pois para que as células malignas consigam completar a progressão, é necessário que uma população de células pré-malignas ultrapasse a barreira da mortalidade e adquira um potencial replicativo ilimitado (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000, 2011; HAYFLICK, 1997). Portanto, a capacidade de uma população de células neoplásicas expandirem em número, não depende só da taxa de proliferação celular, mas também do percentual de morte celular (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). A resistência à apoptose pelas células neoplásicas pode ser adquirida por vários mecanismos, e os mais comuns consistem em mutações genéticas em genes supressores de tumor, como o supressor tumoral p53, que é um gene chave na manutenção da integridade do DNA e na indução da cascata apoptótica, sendo observado mutações nesse gene em mais de 50% dos tumores humanos (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000, 2011; HARRIS, 1996).

Para que uma população de células consiga se estabelecer e sobreviva no tecido, elas necessitam fundamentalmente do oxigênio e de nutrientes fornecidos pelos vasos sanguíneos (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000, 2011). Para isso, a neovascularização é um pré-requisito para a rápida expansão clonal, característica da formação de tumores macroscópicos (BOUCK; STELLMACH; HSU, 1996). As neoplasias parecem ativar a angiogênese pela alteração do balanço entre indutores e inibidores da angiogênese (HANAHAHAN; FOLKMAN, 1996).

A capacidade de invadir e metastatizar tecidos permite às células neoplásicas escaparem do tumor primário e colonizarem novos locais do organismo, onde pelo menos inicialmente, os nutrientes e o espaço não são limitados (BERX, VAN ROY, 2009). Estes dois processos estão intimamente interligados e utilizam estratégias operacionais semelhantes, que envolvem alterações na ligação física das células ao seu microambiente (CAVALLARO; CHRISTOFORI, 2004), e a ativação de proteases extracelulares específicas (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

A metástase é um processo complexo, que inclui uma sucessiva e dinâmica série de eventos, juntamente com alterações da morfologia celular e função

biológica. O câncer adquire a capacidade de submeter-se a transição epitélio-mesenquimal, e depois que essa transição ocorre, os cânceres são propensos a desencadear metástases e estabelecer tumores secundários em locais distantes. Durante a transição epitélio-mesenquimal, as células epiteliais adquirem propriedades mesenquimais, o que acarreta no aumento da motilidade celular, e perdem algumas propriedades epiteliais, que faz com que haja a diminuição na adesão intercelular (GUO et al., 2011).

1.4 Microambiente tumoral

Estudos genéticos e de biologia celular indicam que o crescimento tumoral não é apenas determinado pelo crescimento das células malignas, mas também pelo estroma tumoral (KALLURI, 2003). O microambiente tumoral é reconhecido por ser produto da interação entre diferentes tipos celulares. Elementos estromais, incluindo fibroblastos associados ao câncer (MUELLER; FUSENIG, 2004) propiciam uma rede de comunicação essencial, via secreção de fatores de crescimento e quimiocinas, induzindo alterações na matriz extracelular (MEC), proporcionando assim sinais oncogênicos adicionais que aumentam a proliferação de células e invasão tumoral (KALLURI; ZEISBERG, 2006). A progressão do tumor é claramente dependente de angiogênese e de células inflamatórias que também contribuem para o seu crescimento (COUSSENS; WERB, 2002; DE VISSER; KORETS; COUSSENS, 2005; RØNNØV-JESSEN; PETERSEN; BISSEL, 1996;).

As células cancerígenas formam uma lesão neoplásica que é incorporada no microambiente de um tecido, quase sempre em um tecido epitelial, mas estão separadas dos tecidos vizinhos, limitadas pela contenção feita pela membrana basal (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

O estroma tumoral sofre constante e significativo remodelamento, o que leva a elaboração de um ambiente favorável para a vascularização, crescimento e invasão de células tumorais (ROCKS; PAULISSEN; QUEADA-CALVO; et al., 2008). 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 a degradar a matriz e moléculas de adesão. A degradação da matriz acontece em uma região próxima à superfície das células tumorais, onde há um desequilíbrio natural entre a quantidade de enzimas

ativas, e a disponibilidade natural de inibidores dessas proteinases presentes na matriz ou secretados pelas células normais (HANDSLEY; EDWARDS, 2005). Proteínas secretadas pelas células tumorais no microambiente da MEC estão, portanto envolvidas na adesão celular, motilidade, comunicação intercelular e invasão (MBEUNKUI; JOHANN, 2009).

O microambiente de um tumor é uma parte integral da sua fisiologia, estrutura e função. É um aspecto essencial e conveniente para o tumor, uma vez que fornece um ambiente propício para os processos malignos (MBEUNKUI; JOHANN, 2009).

Embora algumas pesquisas sejam relacionadas com a contribuição do desenvolvimento do câncer feito por diferentes tipos celulares presentes no microambiente tumoral, a identificação das proteínas secretadas pelas células tumorais dentro do microambiente tumoral permanece relativamente inexplorado (MBEUNKUI; JOHANN, 2009).

No câncer de mama, por exemplo, ocorrem modificações quantitativas e qualitativas nos componentes da MEC e seu consequente remodelamento (FATA; HO; et al., 2000; HANSEN; BISSELL, 2000), causadas pela ação proteolítica das proteases secretadas pelas células mamárias. Estas proteases contribuem para a invasão tumoral, aumentando o potencial maligno das células epiteliais (RØNNOV-JESSEN; PETERSEN; BISSELL, 1996). Na glândula mamária neoplásica, há uma imensa atividade proteolítica, com a fragmentação da MEC induzida pelas metaloproteinases de matriz (MMPs), e essa fragmentação tem severas consequências. Isto gera uma via migratória para as células tumorais, que podem livremente ligarem-se a fatores de crescimento e fragmentos de moléculas da MEC que são liberados durante a degradação dessa matriz e ficam disponíveis para os receptores das células tumorais (FREITAS et al., 2007). MMPs são as proteases mais abundantes encontradas durante o remodelamento tecidual e no câncer (OSKARSSON, 2013).

As metaloproteinases presentes nesse estroma, que degradam a matriz extracelular, são portanto, essenciais para a progressão tumoral e processo metastático (ROCKS; PAULISSEN; QUESADA-CALVO et al., 2008).

1.5 Matriz Extracelular (MEC)

A matriz extracelular (MEC) é um componente essencial dos tecidos, que constitui os organismos multicelulares. É definida por um conjunto de diversos elementos que dão origem a porção fibrilar e à substância fundamental da matriz. A MEC circunda as células em todos os tecidos, propiciando suporte estrutural e definindo as características de forma e função dos tecidos. A porção fibrilar da MEC é composta principalmente por uma robusta malha de fibras colágenas e elásticas. Já a substância fundamental é formada por glicoproteínas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e água (COX; ERLER, 2011).

A interação com a MEC fornece para as células além do suporte, informações necessárias para regular o destino celular e sua morfologia (WERB, 1997). Assim sendo, as interações célula-MEC são importantes para mediar várias alterações fisiológicas, tais como as decisões de linhagem durante o desenvolvimento, diferenciação, migração celular, e de morte celular programada. Durante o crescimento e desenvolvimento, ocorre um largo espectro de remodelação da MEC (PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007), bem como em estados patológicos como o câncer, onde a superfície celular e as proteases da MEC, desempenham papéis fundamentais nestes processos (COUSSENS; FINGLETON; MATRISIAN, 2002). Na glândula mamária, a MEC é remodelada durante o ciclo de diferenciação, gravidez, lactação e involução (COUSSENS; WERB, 1996).

A proteólise regula a montagem e o remodelamento de estruturas da MEC, através do controle do excesso de componentes, liberando fragmentos bioativos e fatores de crescimento durante o crescimento, morfogênese, reparo tecidual e processos patológicos. Durante as respostas celulares ao desenvolvimento e em condições patológicas, as proteínas de superfície e receptores, são ativados ou removidos pela proteólise (WERB, 1997).

1.6 Metaloproteinases de Matriz (MMPs)

MMPs são endopeptidases, que pertencem a uma família de proteases zinco-dependentes, capazes de degradar diversos componentes presentes na MEC (KESSENBROCK et al., 2010; PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007).

As metaloenzimas compreendem uma vasta família de proteínas que desenvolvem importantes funções em vários processos fisiológicos, incluindo o

remodelamento tecidual e desenvolvimento dos órgãos, na regulação de processos inflamatórios e em doenças como o câncer (GRASSO; BONNET, 2014).

As metzincinas constituem uma grande família heterogênea de proteínas proteolíticas presentes na MEC. Estas proteínas podem ser classificadas levando em consideração critérios como os mecanismos que desencadeiam uma reação catalítica, substrato de preferência, produtos resultantes e homologia estrutural (PRZEMYSŁAW et al., 2013).

O diagrama estrutural das MMPs mostra 3 domínios que são comuns para quase todas as MMPs (Figura 2), que são: o pró-domínio (ou domínio auto inibitório); o domínio catalítico; e o domínio hemopexina-*like*, que é acoplado ao domínio catalítico através de uma alça flexível (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010). O domínio hemopexina contribui para o reconhecimento adequado do substrato, ativação, localização, internalização e degradação da enzima (OVERALL, 2002).

As MMPs são sintetizadas na forma de pró-enzima, inicialmente expressas no meio extracelular em um estado enzimaticamente inativo (zimogênio), devido à interação que ocorre entre um resíduo cisteína presente no pró-domínio com o íon zinco do sítio catalítico. Somente após a quebra desta interação, usualmente mediada por remoção proteolítica do pró-domínio ou modificações químicas do resíduo cisteína, o sítio ativo torna-se disponível para que ocorra a interação e a clivagem de substratos (OVERALL, 2002; PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007). O pró-domínio requer uma clivagem proteolítica realizada por convertases, e essa clivagem pode ocorrer intracelularmente por furina ou extracelularmente por outras MMPs ou proteinases serina, como a plasmina (DERYUGINA et al., 2004; REMACLE; MURPHY; ROGHI, 2003; ROZANOV et al., 2004; STERNLICHT; WERB, 2001).

Figura 2: Estrutura esquemática das MMPs. Adaptado de (PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007).

Os substratos das MMPs são moléculas presentes na MEC, e incluem também fatores de crescimento, receptores tirosino-quinase, moléculas de adesão celular, citocinas e quimiocinas, assim como outras MMPs e proteases não relacionadas (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010; STERNLICHT et al., 2005). Baseado na estrutura e substratos específicos, as MMPs podem ser classificadas como matrilisinas, collagenases, gelatinases, estromelisinases e MMPs de matriz tipo membrana (HUA et al., 2011).

As matrilisinas são MMPs com um domínio mínimo, que exibe atividade proteolítica contra os componentes da MEC. Desempenha importante papel não somente na degradação das proteínas presentes na MEC, mas também na regulação de vários processos bioquímicos como ativação e degradação de proteínas que não são da MEC (LI et al., 2006). As collagenases degradam colágenos tipo I, II, III (colágenos intersticiais) e outras isoformas dessa proteína (MADSEN et al., 2007). As estromelisinases possuem domínios estruturais semelhantes aos das collagenases, porém apresentam como substratos várias

proteínas da MEC, como proteoglicanos, fibronectina e lamininas (RUNDHAUG, 2005). As gelatinases interagem com o colágeno tipo IV (presente na membrana basal), V, VII e X, além de fibronectina, elastina e laminina (KURZEPA et al., 2014; RUNDHAUG, 2005). As MMPs tipo membrana (MT-MMPs) estão ligadas à superfície celular através de um domínio transmembrânico, e degradam gelatina, fibronectina e agregam, além de outros substratos da MEC (CHEN et al., 2013).

As MMPs estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, como desenvolvimento embrionário, remodelamento ósseo, cicatrização, angiogênese e apoptose. As MMPs são capazes de promover a proteólise, favorecendo a migração celular ou produzindo fragmentos que podem estimular atividades biológicas, além de regular a arquitetura celular através de modificações na MEC e junções celulares, assim como podem afetar as funções celulares, controlando proteínas de MEC com as quais elas interagem (HUA et al., 2011; PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007). A maioria das MMPs são proteínas secretadas. Entretanto há 4 MMPs que possuem domínios transmembrânicos e curtas caudas citoplasmáticas (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP), e 2 que tem a ligação *glycosylphosphatidylinositol* (GPI) (CHEN et al., 2014; MARADNI et al., 2013; PORLAN et al., 2014; TATTI et al., 2011).

As proteinases extracelulares, MMPs, regulam uma variedade de processos fisiológicos e eventos de sinalização, e elas desempenham importante função na comunicação molecular entre o tumor e o estroma (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010). Portanto, é necessário que haja um controle rígido das atividades das proteases, para evitar danos teciduais indesejáveis. Existem os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), que são inibidores endógenos das MMPs que promovem o controle da atividade da MMP *in vivo* em circunstâncias fisiológicas. O balanço entre as MMPs e TIMPs é um determinante crítico na progressão do câncer e metástase (DEVY et al., 2002; HUA et al., 2011).

1.7 Adamalisinas

As adamalisinas compreendem uma vasta família de enzimas MMP-relacionadas, que são dependentes de zinco (PORTER et al., 2005). Dois grupos de metaloproteinases são distinguidos na família das adamalisinas: as ADAMs (Figura

3) que são proteases ancoradas à membrana plasmática, e as ADAMTS (Figura 3) que são secretadas na MEC (ROCKS et al., 2008).

Figura 3: Comparação dos domínios estruturais das Metaloproteinases ADAM, ADAMTS e MMP. Adaptado de (EDWARDS; HANDSLEY; PENNINGTON, 2008).

As ADAMs (uma desintegrina e metaloproteinase) são uma família formada por proteínas transmembrânicas e por proteínas secretadas, com funções na adesão celular e processamento proteolítico de diversos receptores de superfície celular e moléculas de sinalização. Participam de processos biológicos, como interações na espermatogênese, determinação do tecido adiposo no sistema nervoso, migração celular, desenvolvimento muscular, em diversos aspectos imunitários, proliferação e angiogênese. Os substratos conhecidos das ADAMs, são principalmente outras proteínas transmembrânicas (EDWARDS; HANDSLEY; PENNINGTON, 2008).

As ADAMs são caracterizadas por seus domínios estruturais conservados (Figura 4), consistindo de um sinal de sequência N-terminal, seguido por um pró-domínio, um domínio metaloproteinase, um domínio desintegrina com a região rica em cisteína, um domínio EGF (fator de crescimento epidermal), um domínio transmembrânico e uma cauda citoplasmática. A modulação da atividade das ADAMs ocorre, assim como nas MMPs, pela remoção do pró-domínio, e mudança da sua distribuição intracelular (REISS; SAFTIG, 2009). São capazes de mediar a adesão celular, via domínios desintegrina e rico em cisteína, assim como a liberação

de moléculas de superfície celular, e também agem na liberação de fatores solúveis, como os fatores de crescimento, hormônios e quimiocinas. A clivagem ativa a pró-forma ligada à membrana, através da liberação de peptídeos extracelulares que contém atividade biológica (por exemplo, fator de necrose tumoral α ou EGFR (receptor do fator de crescimento epidermal) ligantes). Esses peptídeos liberados podem ligar-se a seus receptores, e desencadear alguns sinais em eventos autócrinos ou parácrinos (FLUHRER; HAASS, 2007).

A natureza fundamental dos processos biológicos controlados pelas ADAMs, indicam que a desregulação dessas enzimas podem contribuir para mecanismos patogênicos de doenças humanas. Elas têm sido relacionadas com o câncer, doenças neurológicas e cardiovasculares, infecção e inflamação (CHRISTIAN, 2012; EDWARDS; HANDSLEY; PENNINGTON, 2008). Como metaloproteínases ativas, as ADAMs podem ter influência na promoção da invasão tumoral e metástase, via clivagem de proteínas presentes na MEC. As ADAMs podem diretamente modular a adesão celular em tumores, por interações com integrinas e proteoglicanos (ARRIBAS; SERRA; JOSEFAT, 2006).

Figura 4: Estrutura das proteinases ADAM e ADAMTS. Adaptado de (ROCKS et al., 2008).

As ADAMTSs (uma desintegrina e metaloproteinase com domínios trombospondina) formam uma família de aproximadamente 19 membros de

proteases que são enzimas secretadas pelas células, e pelo menos 7 proteínas ADAMTS-*like*, que não possuem atividade enzimática (APTE, 2004; LE GOFF; CORMIER-DAIRE, 2011; KUNO et al., 1997). Muitos estudos realizados na década de 90 deixaram claro a ideia de que as proteínas ADAMTS, representam uma importante classe de proteases que são intimamente relacionadas com as ADAMs (TANG; HONG, 1999).

As ADAMTSs pertencem à superfamília de metaloproteinases (enzimas dependentes de zinco) com funções no processamento da MEC, organogênese e hemostasia. São proteases solúveis, que tem como substratos outras proteínas presentes na MEC (PORTER et al., 2004). Atuam em muitos processos bioquímicos e biológicos (fisiológicos ou patológicos), incluindo a degradação específica dos proteoglicanos agregam e versicam, ativação de receptores de superfície celular e fatores de crescimento (LE GOFF; CORMIER-DAIRE, 2011), processamento de colágeno (FERNANDES et al., 2001; LE GOFF et al., 2006; WANG et al., 2003), migração celular (KELLER; BRADLEY; ACOTT, 2009), estrutura do tecido conjuntivo, câncer, coagulação, artrite e angiogênese (LE GOFF; CORMIER-DAIRE, 2011).

Embora mais de 20 membros da família ADAMTS tenham sido relatados com características próprias, distintos subtipos têm sido descritos de acordo com a estrutura. Sua estrutura possui multidomínios (Figura 4 e 5) que os permitem diferentes e várias funções, dependendo de qual a combinação de domínios é formada, e se a molécula formada está inteira ou fragmentada (LIU; XU; YU, 2006).

Todas as enzimas ADAMTS compartilham domínios estruturais comuns (Figura 5), que compreendem a partir da região N-terminal, um peptídeo sinal, um pró-domínio, um domínio catalítico, um domínio desintegrina-*like*, um domínio trombospondina central, um domínio rico em cisteína, e uma região espaçadora. O que diferencia os membros dessa família é a quantidade de domínios trombospondinas que cada uma delas apresenta (KUNO et al., 1997; STANTON et al., 2011; TANG; HONG, 1999).

Figura 5: Domínios estruturais dos membros da família ADAMTS. Adaptado de (KUMAR; RAO; GE, 2012).

O pró-domínio é geralmente considerado como sendo um domínio essencial para o correto dobramento das metzincinas, responsável por manter a enzima em estado latente (domínio metaloproteinase inativo), por ficar próximo ao sítio catalítico e dificultar o reconhecimento do substrato e hidrólise (LUM; REID; BLOBEL, 1998; STANTON et al., 2011).

As ADAMTSs são sintetizadas como zimogênios inativos, e para que a protease seja ativada, é necessário que haja a excisão do pró-domínio. Essa ativação pode ser mediada por diversos processos, como por pró-proteínas convertases (enzimas furina e furina-like), e é provável que o processamento por convertases seja comum entre todas as ADAMTSs (ROCKS et al., 2008; LE GOFF; CORMIER-DAIRE, 2011; STANTON et al., 2011). É no domínio metaloproteinase, que segue imediatamente o pró-domínio, que é o ponto da organização estrutural onde se iniciam as diferenças entre as famílias de metaloproteinases (Niewiarowski et al., 1994). O domínio catalítico possui um elevado grau de homologia entre as diferentes ADAMTSs, e contém a sequência de ligação ao zinco HEXXHXXGXXH, na qual o zinco catalítico é coordenado pelos três resíduos de histidina (GOMIS-

RÜTH, 2009; TALLANT; MARRERO; GOMIS-RÜTH, 2010). O domínio desintegrina-*like* localiza-se em estreita proximidade com o sítio ativo, e funciona provavelmente regulando a atividade da enzima, fornecendo substrato auxiliar de ligação à superfície (GERHARDT et al., 2007; MOSYAK et al., 2008). O domínio rico em cisteína e a região espaçadora, determinam o reconhecimento e a ligação da protease aos substratos, assim como a sua localização na MEC (FUSHIMI et al., 2008; GENDRON et al., 2007). O domínio trombospondina (TSP) central é altamente conservado entre todas as ADAMTSs. Os domínios TSP adicionais (que variam em quantidade entre os membros da família ADAMTS) presentes na região C-terminal da protease, atuam juntamente com o domínio desintegrina, para manter a protease em uma localização apropriada na MEC e para o correto reconhecimento dos substratos (STANTON et al., 2011).

Substratos das ADAMTSs	Proteases
Agregam	ADAMTS -1, -4, -5, -9, -15
Versicam	ADAMTS -1, -4, -9
Brevicam	ADAMTS -4
Pró- colágeno	ADAMTS -2, -3, -14
Fator de Von Willebrand	ADAMTS -13

Tabela 1: Substratos das ADAMTSs.

A família ADAMTS, é geralmente subdividida em quatro classes, baseada nas similaridades estruturais e/ou funcionais: proteoglicanases (ADAMTS -1, -4, -5, -8, - e -15), pró-colagenases-n-peptidases (ADAMTS -2, -3 e -14), clivagem do fator de Von Willebrand (ADAMTS-13), e aquelas proteases que as funções permanecem indefinidas (APTE, 2009; PORTER et al., 2005) .

1.8 ADAMTS-1

ADAMTS-1 foi a primeira protease da família ADAMTS a ser identificada. Shindo e seus colaboradores observaram que o *knockout* para ADAMTS-1 apresenta redução do crescimento, anormalidades nos ureteres, na adrenal e no tecido adiposo, e causa infertilidade em camundongos fêmea (SHINDO et al., 2000). Foi inicialmente descrita associada à inflamação em um modelo experimental de carcinoma de cólon (KUNO et al., 1997), mas sua atividade tem sido associada na organogênese (GÜNTHER et al., 2005; THAI; IRUELA-ARISPE, 2002), formação de vasos sanguíneos e linfáticos (BROWN et al., 2006; LUQUE et al., 2003), foliculogênese ovariana (BROWN et al., 2006) e ovulação (BROWN et al., 2010).

ADAMTS-1 remodela a MEC através da degradação proteolítica de substratos chave (presentes na MEC) como os proteoglicanos agregam, versicam, brevicam, condroitim sulfato (NAKAMURA et al., 2005) e colágeno (HU et al., 2012). Também atua como fator anti-angiogênico, por sequestrar fatores de crescimento VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), impedindo a interação do fator de crescimento com seu respectivo receptor (KUNO et al., 2000; RUSSELL et al., 2003; SANDY et al., 2001). ADAMTS-1 é conhecida como uma das enzimas que degradam versicam, por exemplo, na aorta humana (SANDY et al., 2001). Estudos relatam que a expressão de ADAMTS-1 é induzida em células endoteliais devido a uma variedade de diferentes condições, por exemplo, por tensão de cisalhamento (BONGRAZIO et al., 2000) e hipóxia (HATIPOGLU et al., 2009).

ADAMTS-1 possui na sua região C-terminal, três domínios TSP tipo 1 (TSP1), separados por um domínio rico em cisteína e a região espaçadora, que a diferencia dos outros membros da família de ADAMTSs (KUNO et al., 1997). É sintetizada como um pró-zimogênio e sofre glicosilação logo após a tradução da proteína. A secreção de ADAMTS-1 para a MEC requer a excisão desse pró-domínio da proteína madura de 87 kDa, por endopeptidases furina relacionadas. ADAMTS-1 pode ser processada, e ser detectada como uma proteína de 65k Da. A região C-terminal da protease madura liga-se diretamente na MEC, e se associa com outras proteínas tais como fibulina-1, TGF- β (fator de transformação do crescimento beta) latente e com proteoglicanos sulfatados. A protease catalisa a degradação do colágeno tipo I (REHN et al., 2007), proteoglicanos do estroma de tecidos específicos como o versicam (RICCIARDELLI et al., 2011; RUSSELL et al., 2003), agregam (RODRÍGUEZ-MANZANEQUE et al., 2002), sindecam-4 (RODRÍGUEZ-MANZANEQUE et al., 2009) e proteínas da membrana basal (nidogênio 1 e 2)

(CANALS et al., 2006; TAN; RICCIARDELLI; RUSSEL, 2013). Assim, a estrutura complexa de ADAMTS-1 pode, portanto, influenciar o ambiente tumoral por uma série de vias (TAN; RICCIARDELLI; RUSSEL, 2013).

ADAMTS-1 é uma molécula secretada que não possui domínio transmembrânico, e que portanto, faz parte da MEC. A interação dessa molécula com proteínas da MEC e receptores celulares tumorais, a torna candidata a modular o microambiente tumoral, influenciando a progressão do tumor (PORTER et al., 2005). Proteases de matriz extracelular estão envolvidas em várias etapas do desenvolvimento e progressão dos cânceres, incluindo a angiogênese e metástase. Por clivagem de componentes da MEC, as proteases regulam a migração de células endoteliais e modulam seletivamente a liberação de fatores pró e anti-angiogênicos (GUSTAVSSON et al., 2010). Dessa forma, ADAMTS-1 poderia ser uma molécula regulatória do câncer de mama. ADAMTS-1 possui atividade anti-angiogênica, e suprime o crescimento tumoral e potencial metastático (SHOZU et al., 2005).

ADAMTS-1 é uma metaloproteinase multifuncional, e sua expressão pode ser detectada em uma variedade de neoplasias (ROCKS et al., 2008) e em eventos de remodelação da MEC (PORTER et al., 2005). A desregulação de ADAMTS-1 está associada a vários tipos de cânceres, mas existem estudos conflitantes sobre a sua expressão, onde tanto sua alta expressão quanto sua baixa expressão é vista em tumores primários quando comparados com tecidos saudáveis. Embora a diminuição da expressão de ADAMTS-1 ocorra frequentemente com o início de muitos cânceres primários, a progressão e metástase estão associadas com o aumento de ADAMTS-1. Os níveis reduzidos de ADAMTS-1 durante o desenvolvimento do tumor, e o aumento desses níveis durante a progressão metastática, indicam que ADAMTS-1 possua um papel relevante no câncer. Em cânceres pancreáticos, níveis elevados de mRNA de ADAMTS-1 tem sido correlacionados com metástase severa dos linfonodos ou invasão retroperitoneal e pior prognóstico (LIU; XU; YU, 2006; MASUI et al., 2001). Estes dados sugerem que ADAMTS-1 pode promover a invasão tumoral e metástase.

Elevados níveis de ADAMTS-1 conferem mudanças no comportamento das células cancerosas, que auxiliam o processo de metástase. No câncer de mama, o aumento da expressão de ADAMTS-1 que ocorre durante a tumorigênese, ocorre também na progressão metastática (MINN et al., 2005; TAN; RICCIARDELLI; RUSSELL, 2013). Em contraste, há um estudo feito por Porter e seus colaboradores

em 2004, que mostra que os níveis de mRNA de ADAMTS-1 estão diminuídos nas amostras de câncer de mama, quando comparados ao tecido mamário não neoplásico. Este estudo porém, não foi capaz de encontrar uma forte relação entre os níveis de mRNA de ADAMTS-1 e as características clínicas patológicas dessas neoplasias (PORTER et al., 2004). Estudo publicado pelo nosso grupo mostrou que neoplasias de mama que não possuem receptores de estrógeno, progesterona e HERBB2 (tumores *triple negative*), possuem quantidades menores de ADAMTS-1 no estroma quando comparadas com o tecido mamário normal e neoplasias mais diferenciadas (FREITAS et al., 2013).

O mecanismo de ação de ADAMTS-1 na progressão do câncer ainda não está claramente definido. Embora a molécula inteira de ADAMTS-1 promova a metástase, fragmentos da molécula NH₂ ou COOH, que não possuem atividade catalítica mostraram um efeito inibitório contra a metástase (LIU; XU; YU, 2006). Essa informação sugere que ADAMTS-1 poderia ser uma molécula com atividade tanto tumoral como antitumoral (PORTER et al., 2005).

Figura 6: Síntese e função da protease ADAMTS-1. Adaptado de (TAN; RICCIARDELLI; RUSSELL, 2013).

1.9 Arquitetura tecidual mamária

A glândula mamária é composta por uma combinação de múltiplos tipos celulares, que juntos formam um complexo de interações necessárias para promover o desenvolvimento e funcionamento do órgão (POLYAK; KALLURI, 2010). Os ductos mamários maduros consistem de uma camada exterior de células mioepiteliais, e uma camada interna de células epiteliais luminais, que revestem a cavidade (Figura 7). A secreção de leite através dos ductos ocorre após a contração do mioepitélio que acontece devido à ação de hormônios (GJOREVSKI; NELSON, 2011).

Figura 7: Visão esquemática da glândula mamária normal. Adaptado de (POLYAK; KALLURI, 2010).

Os ductos mamários são circundados por um microambiente composto de MEC e vários tipos de células estromais (células endoteliais, fibroblastos, miofibroblastos e leucócitos). Existem dados que indicam que as interações que ocorrem entre célula-célula e célula-microambiente, modificam a proliferação, sobrevivência, polaridade, diferenciação e capacidade invasiva das células epiteliais mamárias. Porém, os mecanismos moleculares que desencadeiam estes efeitos são poucos entendidos (POLYAK; KALLURI, 2010). A manutenção da arquitetura

tecidual mamária, depende das interações célula-célula e célula-MEC, envolvendo uma troca recíproca de informações bioquímicas e mecânicas para a manutenção da homeostase (BISSELL; HALL; PARRY, 1982; GROBSTEIN, 1967). A interrupção desse delicado balanço de interações pode resultar na perda da estrutura tecidual, com consequências para o tecido e também para o organismo (HANSEN; BISSELL, 2000).

Durante a vida adulta do organismo, a glândula mamária é submetida a diversos ciclos reprodutivos de diferenciação funcional durante a gestação, e quando a gravidez não acontece as células estimuladas entram em processo de apoptose (WATSON; KHALED, 2008). A glândula mamária é responsiva aos estímulos hormonais, durante toda a vida da mulher. Essas alterações cíclicas envolvem expressivas mudanças na estrutura e função tecidual, e tais alterações são reguladas através de um complexo multi-hormonal, de vias de sinalização e de fatores de crescimento. Em cada estágio de desenvolvimento, seja na puberdade, nos ciclos mensais adultos ou no momento da gravidez, ocorrem diferentes estímulos gerados por esses hormônios, que promovem o remodelamento constante do epitélio mamário (JOSHI; DI GRAPPA; KHOKHA, 2012).

A glândula mamária é responsiva às alterações hormonais, e estes hormônios influenciam a expressão de componentes de MEC, como TIMPs e MMPs específicos (FATA; CHAUDHARY; KHOKHA, 2001).

1.10 Hormônios

A mulher adulta é exposta continuamente às flutuações hormonais ao longo da vida até a menopausa, como um resultado dos ciclos reprodutivos, conhecidos também como ciclos hormonais. Os ciclos são controlados pelo eixo hipotálamo-pituitária-ovário, onde o hipotálamo secreta gonadotropinas, que agem na liberação de hormônios que estimulam o hormônio folículo-estimulante (FSH), que produz o hormônio luteinizante (LH). Esses hormônios por sua vez, induzem a síntese de estrógeno e progesterona realizada pelos ovários (HAWKINS; MATZUK, 2008). Junto com o endométrio, a glândula mamária adulta é um órgão terminal, que é responsivo às flutuações hormonais no ciclo reprodutivo, e são remodeladas na expectativa de uma possível gravidez (FATA et al., 2000).

Figura 8: Flutuação dos níveis hormonais durante os ciclos fisiológicos femininos.

Na puberdade, os altos níveis de estrógeno atuam nas células hormônio-responsivas estimulando a proliferação. Na fase lútea do ciclo reprodutivo, ocorre um aumento de progesterona estimulando as células hormônio-responsivas à proliferação. No início da gravidez, a progesterona juntamente com a prolactina, atua estimulando a lóbulo-alvéologênese. Adaptado de (JOSHI; DI GRAPPA; KHOKHA, 2012).

Estrógeno e progesterona são hormônios femininos, relacionados a reprodução. Os tecidos de todo o organismo, incluindo as células de mama normais e tumorais podem responder a esses hormônios, através da sua ligação com os receptores (JOSHI; DI GRAPPA; KHOKHA, 2012). O tecido mamário possui diversos estágios discretos, que envolvem interações entre o epitélio e o estroma, que são dependentes dos hormônios e de fatores de crescimento presentes no ambiente da MEC, e sofre remodelamento cíclico em resposta às mudanças que ocorrem nos níveis de estrógeno e progesterona (FATA et al., 2000). Portanto, o desenvolvimento da glândula mamária é dependente da presença dos hormônios esteroides, estrógeno e progesterona. Além disso, a maioria dos cânceres de mama são positivos para receptores de estrógeno (ER) e responsivos à terapia hormonal (ALLRED; BROWN; MEDINA, 2004).

Na glândula mamária adulta, ER e receptor de progesterona (PR) são encontrados em uma minoria de células epiteliais luminais, em células que não proliferam e que estão adjacentes às células que encontram-se no processo proliferativo (LANGE; YEE, 2008).

Figura 9: Arquitetura da glândula mamária. Adaptado de (LANGE; YEE, 2008).

Estas células que possuem receptores esteroides positivos (ER⁺/PR⁺) representam aproximadamente 7 a 10% da população de células epiteliais. As células ER⁺/PR⁺ são hábeis para a proliferação, mas são mantidas em um estado não proliferativo ou de crescimento inibido, devido à presença de moléculas inibitórias, como por exemplo o TGF- β (LANGE; YEE, 2008). Estudos sugerem que células ER⁺/PR⁺ podem agir como “alimentadoras”, fornecendo substâncias promotoras do crescimento para populações de células tronco progenitoras vizinhas (LI; ROSEN, 2005). Estudos sobre a influência dos hormônios estrógeno e progesterona sobre os parâmetros cinéticos celulares em tumores de mama induzidos *in vitro*, mostram que o estrógeno e em menor grau a progesterona, podem estimular a replicação celular tanto em tumores que expressam ER e PR, quanto naqueles que não os expressam (DOBRESKU et al., 2011).

1.10.1 Estrógeno

O estrógeno induz a proliferação celular em diferentes locais do organismo. Exerce efeitos importantes na fisiologia de diversas células, em tecidos reprodutivos e mamários, e estes efeitos parecem ser mediados por dois subtipos de ER, o ER alfa e o ER beta (KATZENELLENBOGEN et al., 2000). ER alfa e ER beta estão presentes no núcleo celular e funcionam como ligantes para transcrição de fatores

hormônio- dependentes (RONGHE et al., 2014). São lançados a partir de complexos inativos contendo proteínas e imunofilinas (ZHANG; TRUDEAU, 2006).

O estrógeno controla múltiplas funções em células do câncer de mama que são hormônio-sensíveis, e em especial desencadeiam um evento proliferativo nessas células (BRISKEN; O'MALLEY, 2010; COUSE; KORACH, 1999). ER alfa desempenha um papel importante na etiologia da doença, servindo como um importante marcador de prognóstico, e alvo terapêutico no tratamento do câncer da mama (SHEN et al., 2011).

Figura 10: Indução da proliferação celular mediada por estrógeno. O estrógeno induz a proliferação das células mamárias normais, e possíveis células com danos no DNA também respondem a esse estímulo proliferativo. Adaptado de (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013).

1.10.2 Progesterona

A progesterona está principalmente relacionada com a preparação do útero para a aceitação do embrião e com a preparação das mamas para a secreção láctea. Este hormônio pode aumentar o grau da atividade secretória das glândulas mamárias e, também, das células que revestem a parede uterina, acentuando o

espessamento do endométrio e fazendo com que ele seja intensamente invadido por vasos sanguíneos (KARIAGINA, 2010).

No tecido mamário normal, a progesterona é importante para a diferenciação e proliferação celular. Não tem um papel bem definido no crescimento tumoral da mama, porém em células de mama em cultura, ela claramente exerce papel mitogênico. Alguns estudos ainda indicam que a progesterona medeia a expansão da população de células estaminais (COCHRANE et al., 2012).

Figura 11: Ação da progesterona no epitélio mamário normal e tumoral. Adaptado de (KIM; KURITA; BULUN, 2013).

No tecido mamário normal e tumoral, o alvo primário da ação da progesterona são as glândulas ou as células epiteliais. Somente uma pequena população de células epiteliais expressam PR. Nas células epiteliais do tecido mamário sadio, a resposta proliferativa que ocorre na presença de progesterona, acontece nas células que são negativas para PR, através da ação parácrina exercida pelas células vizinhas que expressam o PR (BELEUT et al., 2010; KIM; KURITA; BULUN, 2013). RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) é uma citocina secretada pelas células, que medeia efeitos biológicos através da interação com o seu receptor RANK (Receptor activator of nuclear factor kappa-B), e que embora inicialmente tenha sido definido como um fator essencial para a diferenciação e sobrevivência de osteoclastos (FATA et al., 2000), é também exclusivamente expresso em células epiteliais luminiais PR positivas (MULAC-JERICEVIC et al., 2003). RANKL é, portanto, um mediador parácrino responsável pela proliferação das

células PR negativas, induzida por progesterona (BRISKEN; O'MALLEY, 2010; MULAC-JERICEVIC et al., 2003). No tecido normal, as células que possuem receptores de PR não proliferam. Já no câncer, a progesterona atua diretamente nas células PR positivas, promovendo a proliferação e expansão de células que expressam PR (KIM; KURITA; BULUN, 2013).

O papel da progesterona no câncer de mama ainda não foi totalmente esclarecido. É difícil de estudar o papel da progesterona isolada de outros hormônios, como por exemplo fatores de crescimento e prolactina, que também contribuem para a biologia do câncer de mama (LANGE; YEE, 2008). As isoformas dos receptores de progesterona são primariamente expressas em resposta ao receptor de estrógeno, devido a eventos transcricionais, mas também podem ocorrer independentemente dos ER (HEWITT; KORACH, 2000). Muitas células epiteliais mamárias que expressam ambos PR-A e PR-B, também expressam ERs, e o estrógeno é usualmente necessário para induzir a expressão de PR nestas células ER⁺. Por essa razão, há a dificuldade de separar os efeitos da progesterona isoladamente, sem a participação do estrógeno. De fato, as isoformas de PR são poucos entedidas tanto nas células normais, quanto nas células tumorais de mama (LANGE; YEE, 2008).

1.10.3 Testosterona

O mecanismo de ação que a testosterona exerce no epitélio mamário, ainda é bastante desconhecido e controverso, pois não há *in vitro*, evidências pertinentes para os efeitos dos andrógenos nas células de mama normais (HICKEY et al., 2012). Embora alguns estudos epidemiológicos demonstrem uma associação entre o aumento dos níveis séricos de andrógenos com uma alta incidência de câncer, existem vários outros dados clínicos e biológicos que suportam a ideia de que os andrógenos possuam um papel protetor no tecido mamário (GLASER; DIMITRAKAKIS, 2013; SOMBOONPORN; DAVIS; COUNCIL, 2004), com ação anti-proliferativa e pró-apoptótica, agindo diretamente via receptores de andrógenos, inibindo o crescimento de células cancerígenas (GLASER; DIMITRAKAKIS, 2013; HICKEY et al., 2012).

A maioria dos cânceres de mama, são dependentes de ER, enquanto o receptor de andrógeno (AR), é classicamente visto como um fator desencadeador do

desenvolvimento e progressão do câncer de próstata (CUNHA et al., 1987; WILDING, 1992). Entretanto, a maioria dos cânceres de mama, seja ER⁺ ou ER⁻, também expressam AR (COLLINS et al., 2011; HU et al., 2011; ISOLA, 1993; PETERS et al., 2009).

O AR é o mais prevalente receptor de esteroide sexual, expresso em cânceres de mama *in situ*, invasivos e metastáticos, ocorrendo em 90% dos tumores primários e 75% de metástases (HICKEY et al., 2012), podendo variar de acordo com o subtipo do câncer de mama e outros parâmetros clínicos e patológicos (GARAY et al., 2012; MCNAMARA et al., 2013).

Neste mesmo estudo, foi observado que a testosterona é capaz de estimular o crescimento tumoral em células de mama triplo negativas através da interação com elementos responsivos ao estrógeno (ERE). Outro possível mecanismo de ação ainda não definido deste hormônio, é que ele atue inibindo a proliferação destas células (MCNAMARA et al., 2013).

Estudos de comparação de ligação ao DNA, em escala genômica, revelaram uma importante distinção entre ERE e ARE (elemento responsivo ao andrógeno). Sabe-se que um ARE é muito menos restrito na sua sequência homóloga quando comparado a um ERE (CARROLL et al., 2005; WANG et al., 2007), o que faz com que o AR seja capaz de se ligar a uma maior diversidade de elementos responsivos do que ER, podendo por exemplo, desencadear a transcrição de genes pelos dois meios de interação (tanto pela interação com o ARE quanto com ERE), enquanto que o ER só é capaz de desencadear a transcrição através da interação com um ERE. A origem evolucionária comum de AR e ER α , fornecem vários caminhos através dos quais suas funções podem ser recíprocas, incluindo o recrutamento de vários co-reguladores transcricionais comuns na modulação da estrutura da cromatina e transcrição gênica. A ligação de AR ao ERE, interfere no recrutamento cíclico de ER α e seus co-reguladores ao sítio de ligação, impedindo a transativação de genes, e inibindo a função do estrógeno. Essas informações sugerem que a ligação de AR ao ERE, seja um mecanismo pelo qual AR possa regular a função de ER nos cânceres de mama (PETERS et al., 2009).

Em cânceres de mama ER positivos, AR age de maneira inibitória no crescimento, pela associação com os EREs, impedindo a transcrição mediada por ER (PETERS et al., 2009). Isto sugere que AR possa ter um efeito inibitório na transcrição de ER por ocupar um elemento regulatório cis, dentro do genoma. Esta

hipótese é suportada por dados que demonstram que tumores de mama ER positivos com altos níveis de AR, possuem um melhor prognóstico clínico (PARK et al., 2010; PETERS et al., 2009) .

O papel de AR no câncer de mama ER negativo, é pouco entendido. Há especulações de que nestes tumores ER negativos, a ligação de AR ao genoma ocorra em um padrão similar ao da ligação de ER. Na ausência de ER, parece que AR é capaz de mimetizar a ação de ER, no que diz respeito a habilidade de ligar-se ao DNA, no elemento regulatório-cis específico de maneira transcricional ativa, direcionando a transcrição de genes que influenciam no crescimento celular, de maneira independente de ER (ROBINSON et al., 2011). AR pode ligar-se à região regulatório-cis similar como ER, e impedir fisicamente a atividade transcricional (PETERS et al., 2009).

Figura 12: Papel divergente da testosterona no câncer de mama. Adaptado de (MCNAMARA et al., 2013).

1.11 Modelo Utilizado

Linhagens celulares derivadas de tumores são os modelos mais utilizados em pesquisa sobre o câncer (DOMCKE et al., 2013), pois essas amostras patológicas mimetizam o estado real do tumor *in vivo*, e muitas vezes fornecem resultados

reprodutíveis, que fornecem informações para a compreensão da biologia dos tumores, e aplicação na clínica médica (VAN STAVEREN et al., 2009).

No presente estudo, utilizamos linhagens de mama comerciais, com diferentes graus de malignidade, para uma comparação entre o tecido normal e o tumoral *in vitro*. Visto que tanto células normais quanto células tumorais de mama são responsivas às alterações hormonais que ocorrem durante toda a vida reprodutiva da mulher, gostaríamos de ter uma base de comparação fiel, comparando células normais com células malignas que permanecem com algumas características de epitélio normal, e células já transformadas com fenótipo e potencial metastático.

MCF-10A é uma linhagem de células epiteliais mamárias humanas, imortalizadas e não transformadas, provenientes de um tecido mamário de uma paciente com doença fibrocística e com 36 anos de idade. São definidas como células epiteliais de mama normais, com modestas modificações genéticas típicas de células epiteliais de mama adaptadas para a cultura. Estas células são utilizadas para caracterizar eventos associados com morfogênese *in vitro* (DEBNATH; MUTHUSWAMY; BRUGGE, 2003). Exibem numerosas características de epitélio mamário normal, incluindo a positividade para ER, PR e AR (LOIBL et al., 2011; RIZZA et al., 2014), falta de tumorigenicidade, crescimento dependente de ancoragem, dependência de fatores de crescimento e hormônios para sobrevivência e proliferação. Essas células são dependentes de fatores exógenos de crescimento para proliferação. As células MCF-10A são um modelo excelente para a compreensão da biologia celular epitelial. Quando colocadas em uma mistura de colágeno e laminina, formam estruturas 3D que se assemelham a estruturas de ácinos da mama humano (DEBNATH; MUTHUSWAMY; BRUGGE, 2003).

A linhagem MCF-7 é amplamente utilizada em estudos de câncer de mama *in vitro*, pois essas células apesar de tumorais, têm conservadas características particulares do epitélio mamário (MOHAMMADI et al., 2013). Estas características incluem a habilidade das células formarem junções aderentes e junções oclusivas no contanto célula-célula com as células vizinhas (González-Mariscal; Tapia; Chamorro, 2008), e através destas conexões, as células vizinhas contribuem em vários processos fisiológicos e patológicos (OKOSHI et al., 2013). Essas células também são capazes de processar o estrógeno, na forma de estradiol, via ER presentes no

citoplasma celular, além de expressarem PR (FAZZARI et al., 2001) e AR (GARAY; PARK, 2012).

A linhagem celular MDA-MB-231 foi derivada de um tumor de mama humana, caracterizado como triplo negativo. Esta modalidade de tumor representa um grupo heterogêneo de doenças, caracterizadas por uma significativa variabilidade no aspecto morfológico e patológico. Estes tumores são desprovidos do ER alfa, do PR, e do receptor de fator de crescimento epidermal 2 (HER2), e por isso são chamados de triplo negativos (DAWOOD et al., 2009). Porém, recentes estudos evidenciam que as linhagens de mama triplo negativas, possuem AR (MCNAMARA et al., 2013; RIZZA et al., 2014).

O subtipo de câncer de mama considerado triplo negativo, exibe um comportamento clínico mais agressivo, com alto potencial metastático e prognóstico desfavorável, comparados a outros subtipos de tumores (DENT et al., 2007; SØRLIE et al., 2001). Porém, apesar desse comportamento clínico agressivo, alguns estudos mostram que o envolvimento dos linfonodos pode ser pouco frequente no subtipo de câncer de mama triplo negativo (ARVOLD et al., 2011; FREEDMAN et al., 2009).

Os tumores triplo negativos representam cerca de 15 a 20% de todos os cânceres de mama, e eles são considerados particularmente como agressivos, associados com uma alta mortalidade dos pacientes acometidos (GANGI et al., 2014).

2.1 Justificativa

Considerando-se que a presença de ADAMTS-1 na matriz extracelular desencadeia o remodelamento dos componentes da matriz e consequentes alterações na arquitetura da glândula mamária, assim como os hormônios sexuais exercem um importante papel no desenvolvimento e manutenção do tecido mamário, o objetivo do presente estudo foi:

2.2 Objetivos Gerais

- i.) Avaliar se os níveis de mRNA e proteínas de ADAMTS-1 são alterados na presença dos hormônios sexuais estrógeno, progesterona e testosterona em linhagens celulares humanas com diferentes graus de malignidade, e em células normais de mama;
- ii.) Identificar a localização da protease nos diferentes compartimentos celulares, das três linhagens de células estudadas;
- iii.) Avaliar se com a exposição aos mesmos hormônios, ocorre alguma alteração na localização subcelular de ADAMTS-1 das linhagens celulares estudadas.

2.3 Objetivos específicos

- i.) Determinar *in vitro*, os efeitos dos hormônios estrógeno, progesterona e testosterona, sobre as células tratadas por 24 horas, em relação aos seguintes parâmetros: níveis de mRNA; níveis proteicos e localização de ADAMTS-1, pelos métodos de qPCR e Western Blot.
- ii.) Identificar e localizar, por imunofluorescência, a presença e a distribuição de ADAMTS-1 nos diferentes compartimentos celulares.

A estratégia experimental consistiu em avaliar o papel dos hormônios sexuais estrógeno, progesterona e testosterona, na expressão e distribuição de ADAMTS-1 nos diferentes compartimentos celulares das linhagens utilizadas, que possuem diferentes graus de malignidade, comparadas à linhagem celular epitelial normal.

Para isso, as células foram plaqueadas com meio de cultura descrito em materiais e métodos, e após 24 horas esse meio foi trocado por meio de cultura suplementado com SFB livre de esteroides (ver materiais e métodos). Passadas 24 horas, as células foram lavadas com PBS, e carenciadas com meio de cultura sem suplementação de SFB por 2 horas, e em seguida foram submetidas ao tratamento hormonal por 24 h. No final desses períodos, as amostras foram analisadas por qPCR; o meio condicionado das células foi recolhido e a extração das proteínas (proteínas totais e frações celular) realizada, e a análise da expressão de ADAMTS-1 feita por Western Blot. As células também foram plaqueadas sobre lamínulas, e submetidas ao mesmo cultivo e tratamento hormonal, e então, submetidas à análise de Imunofluorescência para vermos a localização da protease nas células.

Figura 13: Estratégias experimentais utilizados no estudo.

4.1 Linhagens celulares

Linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 derivadas de adenocarcinoma de mama foram cultivadas em DMEM/Ham's F-12 (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) na proporção de 1:1, suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil). A linhagem MCF-10A, derivada de epitélio mamário normal, foi cultivada em DMEM/Ham's F-12, suplementado com 5 % de soro de cavalo, 20 ng/ml de EGF, 0,5 mg/ml de hidrocortisona, 10 mg/ml de insulina e 100 ng/ml de toxina colérica. As células foram mantidas em frascos de 75 cm² a 37 °C, em atmosfera contendo 5 % de CO₂.

Figura 14: Morfologia em cultura, das três linhagens celulares utilizadas nos experimentos. MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231, respectivamente.

O crescimento das células foi monitorado diariamente em microscópio invertido de contraste fase, e o meio de cultura trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular. Após atingirem a subconfluência, as células foram subcultivadas. Amostras representativas da cultura foram posteriormente congeladas e mantidas em nitrogênio líquido, crio-protegidas com 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma).

4.2 Tratamentos das linhagens celulares com hormônios

As células MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 60 mm² (Corning, New York, USA) em uma densidade de 1×10^6 de células, em DMEM/F12 sem vermelho de fenol, suplementado com 10 % de soro fetal bovino, e

mantidas na estufa de CO₂ por 24 horas. No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS, e foi adicionado DMEM/F12 sem vermelho de fenol, suplementado com 10 % de soro fetal bovino reduzido de esteróides tratado previamente com carvão Dextrana (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As células foram incubadas novamente em estufa de CO₂ por 24 horas. Após esse período, as células foram lavadas com PBS, e foi colocado DMEM/F12 sem soro fetal bovino, onde ficaram por 2 horas. Passadas 2 horas foi feito o tratamento com os hormônios estrógeno (E2), progesterona (P4) e testosterona (DHT), diluídos em DMEM/F12 sem vermelho de fenol na concentração de 30 nM, 1 µM e 100 nM respectivamente.

4.3 PCR quantitativo

O isolamento do RNA total das células foi realizado com o kit *Magna Bead RNA total* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Após a verificação da integridade do RNA, foram realizadas transcrições reversas (RT) utilizando termociclador.

Segundo a reação de transcrição reversa, verificamos a integridade do cDNA. Diferentes frações de cDNAs foram utilizadas na amplificação em cadeia por polimerase (PCR) em um equipamento que monitora a amplificação em tempo real (Corbett Rotor-Gene 3000, Qiagen, Hilden, Alemanha).

As amplificações foram executadas com produto da reação de transcrição reversa, *SYBR Green PCR* e *primers* (senso e anti-senso). A sequência dos iniciadores (*primers*) para detecção de ADAMTS-1 foram as seguintes: *primer* senso 5' GGACAGGTGCAAGCTCATCTG 3' e *primer* anti-senso 5' TCTACAACCTTGGGCTGCAAA 3'. O gene de expressão constitutiva GAPDH (Gliceralceído-3-fosfato desidrogenase) foi utilizado como normalizador das reações de PCR. A sequência dos iniciadores (*primers*) para a detecção de GAPDH foram as seguintes: *primer* senso 5' ACCCACTCCTCCACCTTTGA 3' e *primer* anti-senso 5' CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT3'. As condições de ciclagem foram padronizadas previamente de acordo com as características de cada *primer*.

A expressão relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde Ct é o ciclo de início de quantificação do transcrito, ΔCt é o Ct do gene de interesse menos o Ct do gene de referência (GAPDH) e $\Delta\Delta Ct$ é o ΔCt da amostra tratada com hormônio menos o ΔCt da amostra controle (Livak; Schmittgen, 2001). Os experimentos foram

realizados em triplicata. Todas as reações foram normalizadas de acordo com a expressão do gene GAPDH.

4.4 Immunoblot

Verificamos a expressão de proteínas de ADAMTS-1, nas três linhagens celulares de mama, com diferentes graus de malignidade. Observamos em resultados preliminares de imunofluorescência a presença de ADAMTS-1 no nucléolo. Visto que essa protease é secretada, temos interesse em saber se o tratamento com hormônios sexuais alteraria a distribuição subcelular dessa protease.

Dessa forma, analisamos:

Meio condicionado (representando o material secretado), lisado total, fração nuclear e fração citosólica.

As células foram tratadas conforme descrito anteriormente, no tópico *tratamento das linhagens celulares com hormônios*.

Para a precipitação do meio condicionado, após 24 horas de tratamento com os hormônios estrógeno, progesterona e testosterona, o meio condicionado, representando o que foi secretado pelas células, foi recolhido em tubos contendo inibidor de protease (1 mg/ml pepstatina A, 100 mM PMSF e 1 mg/ml), a amostra foi centrifugada por 10 minutos na rotação de 1000 g na temperatura de 4 °C para remoção de células mortas e debris. O “pellet” de células formado no fundo do tubo foi descartado, e em seguida adicionamos 800 µl de álcool etílico absoluto em cada amostra de meio condicionado. As amostras foram incubadas em gelo seco, por 15 minutos, e centrifugadas por 10 minutos na rotação de 13400 g na temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi descartado, adicionamos 500 µl de álcool etílico absoluto em cada amostra, e centrifugamos por 10 minutos na rotação de 13400 g na temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi novamente descartado, e o tubo contendo a amostra ficou em temperatura ambiente por 45 minutos para a secagem antes de serem ressuspensas em tampão de amostra. As frações celulares foram obtidas com o kit NE-PER Reagente de extração de proteínas nucleares e citoplasmáticas de acordo com as instruções do fabricante (Pierce, Rockford, IL), e a proteína total foi extraída das células pela lise em tampão RIPA contendo inibidores de protease.

Os lisados foram sonificados e, em seguida, centrifugados a 10000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante contendo proteínas solúveis foram quantificados através do método de BCA (Pierce Inc Rockford, IL, USA). Em seguida, foram ressuspensas em tampão de amostra (*sample buffer*), contendo 3 % de dodecil sulfato de sódio (SDS), 150 mM Tris pH 6.8, 15 % de mercaptoetanol, 30 % de glicerol 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 bis-acrilamida, 10 % de persulfato de amônia e TEMED). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham, GE Healthcare Life Science, Pittsburgh, USA). As membranas foram bloqueadas com 5 % de leite em TBS-*tween* (TTBS) e incubadas com anticorpos que reconheçam os diferentes termos da proteína e que possam identificar a forma total e os fragmentos de ADAMTS-1 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Esses anticorpos primários foram detectados por anticorpos secundários conjugados com peroxidase. A reação então foi revelada no 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 submetidas a novas marcações.

Como controle positivo, utilizamos o anticorpo primário β -actina para o lisado total, para a fração nuclear utilizamos o anticorpo primário HDAC1 ou HDAC2 e para a fração citoplasmática o GAPDH.

4.5 Digestão e deglicosilação de Agrecan e outras proteínas

Os ensaios de digestão de todas as proteínas foram realizados em 100 µl de tampão contendo 50 mM de Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM de NaCl e 10 mM de CaCl₂. 500 nM de agrecan (proveniente da cartilagem articular de bovino; A1960, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) foi incubado com 30 µg de proteínas da fração nuclear da linhagem MCF-7. Todas os grupos examinados (agrecan, agrecan + fração nuclear ou fração nuclear), foram mantidos na temperatura de 37°C *overnight*.

A reação de digestão foi encerrada com a adição de 10 µl de EDTA 0,5M nas amostras.

As amostras foram enzimaticamente deglicosiladas com condroitinase ABC (0,01 unidade /10 µg de agrecam), por 1 hora a 37 °C, em 100 µl de tampão contendo 50 mM de acetato de sódio e 100 mM de Tris-HCl (pH 6.5).

Após a digestão e a deglicosilação, as amostras foram analisadas por Western Blot em um gel de gradiente de 5 a 15 %, com o anticorpo primário Anti-agrecam (SAB 4500662, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) na concentração 1:500 em TBS 1X.

4.6 Imunofluorescência indireta

Concomitante à análise proteica por *immunoblot*, analisamos também a imunolocalização da proteína ADAMTS-1 nas linhagens celulares tratadas com hormônios sexuais.

As linhagens celulares MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231, foram depositadas sobre lamínulas de vidro, na concentração de 2×10^5 de células, com 1 ml de DMEM/F12 e mantidas em estufa de CO² por 24 horas. Todas as linhagens foram cultivadas em duplicata, e receberam o mesmo tratamento com os hormônios estrógeno, progesterona e testosterona, conforme protocolo já descrito acima. Passadas 24 horas do tratamento hormonal, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído em PBS 1X.

Para avaliar a imunolocalização da molécula de ADAMTS-1, as lamínulas foram lavadas 3 vezes de 5 minutos com o PBS, permeabilizadas com 0,5 % de Triton X-100 em PBS por 10 minutos, incubadas com 100 µl de 10 % *Normal Goat Serum* (KPL, Gaithersburg, USA) por 1 hora. Logo após o bloqueio dos sítios inespecíficos as amostras foram incubadas com 100 µl de anticorpo primário ADAMTS-1, na concentração de 1:50, por 1 hora. As lamínulas foram lavadas novamente por 3 vezes de 5 minutos com PBS e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho IgG produzido em cabra, conjugado com o fluoróforo Alexa Flúor 568 (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), na concentração de 1:200, diluído em 10 % *Normal Goat Serum* (KPL, Gaithersburg, USA), por 1 hora no escuro. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS, e incubadas com Faloidina-Alexa

488 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), na concentração de 1:100, diluída em PBS, por 15 minutos no escuro. As lâminas foram então montadas em lâminas de vidro com *Prolong Gold antifade reagent with DAPI* (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA).

O mesmo protocolo foi utilizado para avaliar a imunolocalização da nucleofosmina, e o anticorpo utilizado foi anti-agrecam monoclonal (B0556, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA), na concentração de 1:300 por 1 hora.

A substituição do anticorpo primário por PBS foi utilizado como controle negativo. Os resultados foram analisados em microscópio de fluorescência Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), utilizando objetiva PlanApo de 100x (abertura numérica = 1.4). As imagens das células foram adquiridas com o auxílio de câmera monocromática CCD digital de alta sensibilidade, específica para amostras fluorescentes (CoolSNAP HQ2, Photometrics Inc, Tucson, AZ, USA). O microscópio e demais equipamentos foram controlados pelo software *Metamorph Premier 7.6* (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

4.7 Análises estatísticas

Os dados estão expressos como média e desvio padrão. A análise da diferença entre os grupos foram estimadas através da análise de variância (ANOVA), seguida do post-hoc de comparações múltiplas Bonferroni, utilizando *GraphPad Prism 5 computador software* (GraphPad, San Diego, CA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$.

As linhagens celulares de mama estudadas no projeto são MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231. São linhagens que apresentam diferentes graus de malignidade, e com isto, vamos avaliar as diferenças que possam ocorrer nos níveis de mRNA e proteínas de ADAMTS-1, nos diferentes compartimentos celulares.

5.1 Efeito dos hormônios nos níveis de mRNA de ADAMTS-1

De forma a avaliar a expressão dos níveis de mRNA de ADAMTS-1 na linhagem de mama normal e nas tumorais, realizamos o experimento de PCR em tempo real. Conforme já descrito no material e métodos, todas as linhagens foram tratadas com os hormônios estrógeno (30 nM), progesterona (1 μ M) e testosterona (100 nM), e em todos os experimentos era mantido um grupo sem tratamento hormonal, para utilizarmos como comparativo.

Observamos que na linhagem com características normais do epitélio mamário, MCF-10A, os níveis de mRNA apresentaram aumento significativo quando as células eram tratadas com progesterona, conforme ilustrado na figura 15 (Figura 15, A). Na linhagem MCF-7, com grau intermediário de malignidade, não foram observadas alterações nos níveis de mRNA de ADAMTS-1, quando comparadas à amostra controle (Figura 15, B). Na linhagem tumoral mais agressiva MDA-MB-231, os hormônios estrógeno e progesterona induziram uma significativa diminuição nos níveis de mRNA de ADAMTS-1 (Figura 15, C), comparadas as amostras sem tratamento hormonal (controle). O tratamento com testosterona não foi capaz de alterar os níveis de mRNA em nenhuma das linhagens celulares abordadas.

Figura 15: Análise feita por PCR quantitativo da linhagem MCF-10A (A), MCF-7 (B) e MDA-MB-231 (C), tratadas por 24 horas com 30 nM estrógeno (E2), 1 μ M progesterona (P4) e 100 nM testosterona (DHT) comparadas à amostra controle (C). Os Valores dos níveis de mRNA de ADAMTS-1 presentes em cada amostra foram normalizados com os níveis de mRNA de GAPDH. (* $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,005$).

5.2 Efeito dos hormônios nos níveis proteicos de ADAMTS-1

Para avaliarmos se ocorrem alterações nos níveis proteicos de ADAMTS-1 quando as células eram submetidas ao tratamento hormonal, ou se tais hormônios induziriam a secreção da protease para o meio extracelular, realizamos o experimento Western Blot.

Através dessa técnica, fomos capazes de observar que a linhagem celular MCF-10A, apresentou no lisado total (Figura 16, A) um aumento discreto na intensidade de proteínas em todas as amostras tratadas com os hormônios. Nas amostras tratadas com testosterona, nós observamos um aumento mais expressivo dos níveis da protease. Nas amostras do meio condicionado, observamos um aumento discreto nos níveis proteicos de ADAMTS-1 nas células que foram tratadas com os hormônios, quando comparamos com a amostra controle sem tratamento (Figura 16, B).

MCF-10A

Figura 16: Western Blot representativo do lisado total (A) e do meio condicionado (B) da linhagem de células MCF-10A. As amostras foram tratadas com hormônios estrógeno (E2), progesterona (P4) e testosterona (DHT), e a amostra controle (C) não recebeu tratamento com hormônio. No lisado, observa-se um aumento acentuado dos níveis de ADAMTS-1 no grupo tratado com testosterona, e no meio condicionado observa-se um discreto aumento nos grupos tratados, em relação à amostra controle.

Em relação à linhagem celular MCF-7, nas amostras do lisado celular, a amostra tratada com estrógeno não apresentou aumento de expressão da protease. Conseguimos observar um aumento mais acentuado nas amostras tratadas com progesterona e testosterona (Figura 17, A).

Nas amostras do meio condicionado de MCF-7, observamos nos grupos tratados com estrógeno e progesterona um aumento acentuado da intensidade de ADAMTS-1, comparando-os com o grupo controle. Observamos que o tratamento feito com estrógeno é capaz de estimular a secreção de ADAMTS-1 para o meio extracelular, uma vez que no lisado celular não há aumento nos níveis da protease, que se encontra altamente expressa no meio condicionado (Figura 17, B).

Em relação à linhagem mais agressiva, MDA-MB-231, observamos que no lisado total ocorre uma diminuição na intensidade de ADAMTS-1 quando as células foram submetidas ao tratamento com os hormônios, quando comparamos todos os grupos com a amostra controle (Figura 18, A).

As amostras do meio condicionado da linhagem celular MDA-MB-231, apresentaram tendência ao aumento na expressão dos níveis de ADAMTS-1 quando as células foram submetidas ao tratamento com estrógeno, e um aumento acentuado quando foram tratadas com testosterona, comparando esses grupos com a amostra controle. O tratamento realizado com progesterona induziu uma diminuição nos níveis proteicos da protease, quando comparamos com os outros grupos tratados e com o grupo controle (Figura 18, B).

MCF-7

A**LISADO TOTAL** **B****MEIO CONDICIONADO**

Figura 17: Western Blot representativo do lisado total (A) e meio condicionado (B) da linhagem de células MCF-7. As amostras foram tratadas com hormônios estrógeno (E2), progesterona (P4) e testosterona (DHT), e a amostra controle (C) não recebeu tratamento com hormônio. No lisado total, observa-se um aumento acentuado dos níveis de ADAMTS-1 dos grupos tratados com progesterona e testosterona. Quanto ao meio condicionado, podemos observar um aumento expressivo de ADAMTS-1 quando as células eram tratadas com estrógeno e progesterona.

Figura 18: Western Blot representativo do lisado total (A) e meio condicionado (B) da linhagem de células MDA-MB-231. As amostras foram tratadas com hormônios estrógeno (E2), progesterona (P4) e testosterona (DHT), e a amostra controle (C) não recebeu tratamento com hormônio. No lisado total, observa-se uma diminuição dos níveis de ADAMTS-1, em todos os grupos tratados com os hormônios. Em relação ao meio condicionado, observamos a mesma diminuição de ADAMTS-1 no grupo tratado com progesterona, porém nos grupos tratados com estrógeno e testosterona, houve uma tendência ao aumento da expressão de ADAMTS-1, quando as células foram comparadas à amostra controle.

5.3 Efeito dos hormônios na localização e distribuição de ADAMTS-1

Com o objetivo de avaliarmos se os tratamentos hormonais induziriam alterações na localização da protease nas linhagens estudadas, aplicamos o método de imunomarcação.

Vimos na imunofluorescência para ADAMTS-1, que nas três linhagens a protease se apresenta localizada no núcleo. Notamos que a marcação de ADAMTS-1 foi nuclear e apareceu na forma de estruturas arredondadas, e que há uma distribuição difusa de ADAMTS-1 no compartimento citoplasmático, com maior concentração da protease na região perinuclear (Figuras 19, 21 e 23).

Na linhagem MCF-10A, quando submetida ao tratamento com a progesterona, ocorre uma distribuição difusa da protease no compartimento citoplasmático (seta branca), que não se restringe à delimitação das células, assim como uma maior expressão de ADAMTS-1 no meio extracelular, sendo um indicativo de que a protease é secretada na presença deste hormônio.

Essa marcação pontual de ADAMTS-1 no núcleo de todas as linhagens (Figuras 19, 21 e 23), nos levou a fazer um experimento de imunolocalização de uma proteína nucleolar, a Nucleofosmina, a fim de avaliarmos se ADAMTS-1 está localizado no nucléolo dessas células. Vimos que ADAMTS-1 está presente no núcleo (Figuras 19, 21 e 23), e através da co-localização de ADAMTS-1 com a nucleofosmina, fomos capazes de observar que ADAMTS-1 além de localizar-se no núcleo, está presente no nucléolo em todas as linhagens (Figuras 20, 22 e 24).

Ao avaliarmos a localização celular de ADAMTS-1 nas células MCF-7, vimos que o padrão de localização da protease, assim como observado na linhagem MCF-10A, é predominantemente nuclear (Figura 21).

É interessante observar, que há a ausência de ADAMTS-1 no núcleo da célula que está em mitose, no grupo tratado com testosterona (Figura 21, seta branca).

Novamente fizemos a co-localização de ADAMTS-1 com nucleofosmina, e nossos resultados permanecem consistentes ao notarmos que ADAMTS-1 está presente no nucléolo da linhagem MCF-7 (Figura 22), assim como observado na linhagem de mama normal MCF-10A (Figura 20).

Através da marcação de ADAMTS-1 na linhagem MDA-MB-231, conseguimos visualizar novamente o padrão de localização no núcleo, onde ocorre uma difusão de ADAMTS-1 na região perinuclear das células tratadas com progesterona (Figura 23, seta branca), porém menos acentuada do que a vista na MCF-10A (Figura 19).

O resultado se repetiu como nas outras linhagens, e ADAMTS-1 além de estar localizada no núcleo, ela se co-localiza com a proteína nucleolar nas células MDA-MB-231 (Figura 24).

MCF10-A

Figura 19: Imunolocalização de ADAMTS-1 na linhagem celular MCF-10A. A amostra controle não recebeu tratamento com os hormônios, e as amostras tratadas com os hormônios estrógeno, progesterona e testosterona por 24 horas. Verde- faloidina, Vermelho-ADAMTS-1 e Azul-Núcleo. Barra de escala: 5μm.

MCF-10A

Figura 20: Imunolocalização de ADAMTS-1 na linhagem celular MCF-10A, mostrando co-localização de ADAMTS-1 (vermelho) com Nucleofosmina (Verde). A amostra controle não recebeu tratamento com os hormônios, e as amostras tratadas com os hormônios estrógeno, progesterona e testosterona por 24 horas. Verde- Nucleofosmina, Vermelho- ADAMTS-1 e Azul- Núcleo. Barra de escala: 5 µm.

MCF-7

Figura 21: Imunolocalização de ADAMTS-1 na linhagem celular MCF-7. A amostra controle não recebeu tratamento com os hormônios, e as amostras tratadas com os hormônios estrógeno, progesterona e testosterona por 24 horas. Verde- faloidina, Vermelho ADAMTS-1 e Azul- Núcleo. Barra de escala: 5µm.

MCF-7

Figura 22: Imunolocalização de ADAMTS-1 na linhagem celular MCF-7, mostrando co-localização em amarelo de ADAMTS-1 (vermelho) com Nucleofosmina (Verde). A amostra controle não recebeu tratamento com os hormônios, e as amostras tratadas com os hormônios estrógeno, progesterona e testosterona por 24 horas. Verde- Nucleofosmina, Vermelho- ADAMTS-1 e Azul- Núcleo. Barra de escala: 5µm.

MDA-MB-231

Figura 23: Imunolocalização de ADAMTS-1 na linhagem celular MDA-MB-231. A amostra controle não recebeu tratamento com os hormônios, e as amostras tratadas com os hormônios estrógeno, progesterona e testosterona por 24 horas. Verde- faloidina, Vermelho ADAMTS-1 e Azul- Núcleo. Barra de escala: 5μm.

MDA-MB-231

Figura 24: Imunolocalização de ADAMTS-1 na linhagem celular MDA-MB-231, mostrando co-localização de ADAMTS-1 (vermelho) com Nucleofosmina (Verde). A amostra controle não recebeu tratamento com os hormônios, e as amostras tratadas com os hormônios estrógeno, progesterona e testosterona por 24 horas. Verde- Nucleofosmina, Vermelho- ADAMTS-1 e Azul- Núcleo. Barra de escala: 5 μm .

5.4 Localização da protease

Ao avaliarmos as frações celulares da linhagem MCF-10A (Figura 25), vimos também que esse padrão de marcação nuclear da protease se mantém predominante no compartimento nuclear, e que no compartimento citoplasmático não há a expressão de ADAMTS-1. No lisado nuclear, vimos que nas amostras tratadas com os hormônios, ocorre uma diminuição nos níveis de ADAMTS-1, e que tal diminuição se mostra mais acentuada no grupo tratado com testosterona (Figura 25).

Figura 25: Western Blot da fração citoplasmática e fração nuclear da linhagem de células MCF-10A. **As amostras foram tratadas com hormônios estrógeno (E2), progesterona (P4) e testosterona (DHT), e a amostra controle (C) não recebeu tratamento com hormônio.**

Através da análise das frações celulares de MCF-7, observamos novamente que ADAMTS-1 encontra-se predominantemente no núcleo das células, com ausência de expressão no compartimento citoplasmático (Figura 26). Nas amostras do lisado nuclear, observamos que há um discreto aumento na expressão de ADAMTS-1, quando as células foram submetidas ao tratamento hormonal, comparando-as à amostra controle.

Figura 26: Western Blot da fração citoplasmática e fração nuclear da linhagem de células MCF-7. As amostras foram tratadas com hormônios estrógeno (E2), progesterona (P4) e testosterona (DHT), e a amostra controle (C) não recebeu tratamento com hormônio.

Na análise das amostras das frações celulares de MDA-MB-231, confirmamos mais uma vez, a predominância da protease no compartimento nuclear (Figura 27) .

Figura 27: Western Blot da fração citoplasmática e fração nuclear da linhagem de células MDA-MB-231. As amostras foram tratadas com hormônios estrógeno (E2), progesterona (P4) e testosterona (DHT), e a amostra controle (C) não recebeu tratamento com hormônio.

Na fração nuclear, observamos que ocorre uma tendência ao aumento da expressão da protease nas amostras tratadas com estrógeno e testosterona, e que a amostra tratada com progesterona, apresenta menor expressão da protease, quando as comparamos com a amostra controle (Figura 27).

5.5 Papel de ADAMTS-1 no núcleo celular

A fim de sabermos quais são os parceiros de interação de ADAMTS-1 no núcleo celular, fizemos uma imunolocalização de agrecan na linhagem MCF-10A (Figura 28).

Figura 28: Imunolocalização de agrecam na linhagem celular MCF-10A, mostrando a localização de Agrecam (vermelho) no núcleo das células. Vermelho- Agrecam e Azul- Núcleo.

Consistente com todos os nossos resultados de imunolocalização e expressão proteica, agrecam está localizado predominantemente no núcleo celular, e possivelmente interagindo com ADAMTS-1.

Sabe-se que o agrecam é uma glicoproteína de aproximadamente 250 kDa, e é um dos componentes da MEC (VERMA; DALAL, 2011). Está bem estabelecido que a associação da ADAMTS-1 à matriz ocorre através da sua ligação a glicosaminoglicanos sulfatados, e que esses proteoglicanos podem ser moléculas alvo da proteólise mediada por ADAMTS-1 (KUNO et al., 2000). Então, para investigar a atividade proteolítica de ADAMTS-1 clivando o agrecam no núcleo das células MCF-7, fizemos o ensaio de digestão do agrecam (proveniente da cartilagem articular bovina, comercial), seguido do ensaio de deglicosilação (TORTORELLA et al., 2002). Como visto na figura 29, a incubação da fração nuclear contendo ADAMTS-1 endógena juntamente com o agrecam comercial, mostrou que a ADAMTS-1 presente no núcleo parece possuir atividade proteolítica, uma vez que a fração nuclear foi capaz de clivar o agrecam em fragmentos, onde observamos bandas entre 35 e 20 kDa aproximadamente (Figura 29, linha 2, setas vermelhas), e tais bandas não foram vistas na amostra de agrecam controle (Figura 29, linha 1), nem na fração nuclear (Figura 29, linha 3,). Com esses resultados, fica cada vez mais evidente que a presença de ADAMTS-1 no núcleo das células provavelmente possua atividade proteolítica, e que mesmo no núcleo a protease é capaz de reconhecer seus substratos específicos (que são encontrados e reconhecidos pela ADAMTS-1 na MEC).

Figura 29: Avaliação da clivagem do agrecam feita pela atividade proteolítica de ADAMTS-1. Linha 1) O Agrecam (30 μ g) foi submetido ao processo de digestão e deglicosilação; Linha 2) A fração nuclear das células MCF-7 (30 μ g) foi incubada com 500 nM de Agrecam, e foram submetidas ao processo de digestão e deglicosilação; Linha 3) A fração nuclear das células MCF-7 (30 μ g) foi submetida ao processo de digestão e deglicosilação.

ADAMTS-1 é uma metaloproteinase multifuncional, e sua expressão pode ser detectada em uma variedade de neoplasias. A desregulação de ADAMTS-1 está associada a vários tipos de cânceres, mas existem estudos conflitantes sobre a sua expressão, onde tanto sua alta expressão quanto sua baixa expressão é vista em tumores primários quando comparados com tecidos saudáveis (FREITAS et al., 2013; ROCKS et al., 2008).

A partir das observações feitas sobre nossos resultados obtidos, temos que os níveis de ADAMTS-1 são diferentemente expressos entre as três linhagens celulares estudadas. Onde notamos que na linhagem celular mais agressiva MDA-MB-231, os níveis de mRNA de ADAMTS-1 estão diminuídos, e no meio condicionado ADAMTS-1 está menos expressa, em relação às outras duas linhagens propostas.

Os resultados obtidos pelo nosso grupo, demonstraram que tumores triplo negativos apresentam reduzida expressão de ADAMTS-1, comparados aos tecidos normais, e esses resultados corroboram com os achados desse projeto (FREITAS et al., 2013). A baixa expressão das ADAMTSs no câncer, comparada com o tecido normal, sugere que estas proteases possam regular negativamente o crescimento tumoral, consistente com as propriedades anti-angiogênicas de ADAMTS-1 (PORTER et al., 2005).

Nossos resultados demonstram que os hormônios sexuais regulam a expressão de ADAMTS-1, nas linhagens celulares estudadas, bem como sua secreção para a matriz extracelular. As células respondem ao tratamento hormonal, de acordo com a presença ou ausência de receptores dos hormônios estudados.

A célula com fenótipo normal (MCF-10A) e que apresentam receptores para todos os hormônios estudados (ER, PR e AR) (RIZZA et al., 2014), apresentou níveis acentuados da protease no meio extracelular e no lisado celular, em todos os grupos examinados, e aumento estatisticamente significativo dos níveis de expressão de mRNA de ADAMTS-1, quando as células foram tratadas com progesterona. O tratamento com progesterona parece estimular a secreção da protease para o meio extracelular, e também favorecer a difusão de ADAMTS-1 no citoplasma celular das células MCF-10A, alterando a localização da protease entre os compartimentos celulares. Sabe-se que em um epitélio mamário normal, além de células que possuem receptores de progesterona (PR positivas), existem algumas células que não possuem tais receptores (PR negativas), porém, tais células são

capazes de responder ao estímulo proliferativo do hormônio, através da ação parácrina exercida pelas células PR positivas adjacentes presentes neste epitélio (KIM; KURITA; BULUN, 2013; VARES et al., 2013). A progesterona exerce um papel crucial no controle da tumorigênese dos tecidos mamários (LANGE; RICHER; HORWITZ, 1999; RIVAS et al., 2012), porém os mecanismos moleculares pelos quais o hormônio controla o crescimento dos tumores ainda não são totalmente compreendidos. Vários achados da literatura mostram que a progesterona dá apoio e suporte para o crescimento das células de câncer de mama *in vitro* (BIRRELL et al., 2007; CARNEVALE et al., 2007).

A linhagem MCF-7 apresentou tendência a aumentar os níveis da protease, no lisado total e no meio condicionado quando as células foram tratadas com todos os hormônios. Observou-se uma tendência de aumento da protease no meio extracelular quando as células eram submetidas ao tratamento com progesterona e isso ficou mais evidente com o tratamento com estrógeno, podendo ser explicado pelo fato dela apresentar, assim como a MCF-10A, receptores de estrógeno, progesterona e testosterona (GARAY; PARK, 2012). O estrógeno tem sido implicado no desenvolvimento do câncer de mama, e estudos tem demonstrado que a exposição prolongada ao estrógeno pode causar a tumorigênese nos tecidos mamários (MENSE et al., 2008; SINGH; BHAT, 2012), através da interação com seus receptores cognatos, e essa ligação estimula a proliferação das células de maneira autócrina, levando assim a progressão do câncer (LE ROMANCER et al., 2011; LIAO et al., 2014; SINGH; BHAT; BHAT, 2011). Estudos realizados, demonstram que a expressão de mRNA e proteínas de ADAMTS-1 em células endometriais estromais é controlada pelos hormônios sexuais (NG et al., 2006; WEN et al., 2006; WEN et al., 2013).

Nas células MDA-MB-231, o estrógeno e a progesterona foram capazes de induzir significantes diminuições nos níveis de expressão de mRNA de ADAMTS-1, no lisado total também observamos uma tendência na diminuição da intensidade de proteínas de ADAMTS-1, em todos os grupos. Vimos que no tratamento realizado com testosterona nas células MDA-MB-231, ocorre uma tendência no aumento de ADAMTS-1 no meio condicionado e diminuição da protease intracelular. Os andrógenos podem induzir alterações proliferativas e promover a tumorigênese em linhagens de câncer de mama (MCNAMARA et al., 2013; NICOLÁS DÍAZ-CHICO et al., 2007). Em contrapartida, AR pode desencadear uma ação anti-proliferativa em

cânceres de mama ER+, por antagonizar o ER (SHAH et al., 2013), enquanto facilita o crescimento tumoral de maneira andrógeno-dependente em linhagens celulares de mama ER-, AR+ (NI et al., 2011). Vários estudos epidemiológicos demonstram risco aumentado de desenvolvimento de câncer de mama em mulheres na pós-menopausa com níveis elevados de estrógeno e também de testosterona (GUCALP; TRAINA, 2010).

Com relação aos dados obtidos nesse trabalho e considerando os dados obtidos no trabalho publicado anteriormente pelo nosso grupo, podemos especular que como há menos ADAMTS-1 em tumores de mama triplo negativos (FREITAS et al., 2013), isso pode ter sido causado pela diminuição da secreção dessa protease pelas células tumorais menos diferenciadas, como estamos vendo *in vitro* nesse momento.

HA (ácido hialurônico) é um glicosaminoglicano com uma estrutura relativamente simples, que é um importante componente da matrix extracelular. Estudos realizados em células epiteliais vaginais demonstram que a regulação de HA dependente de estrógeno envolvem mudanças na secreção do HA, porém não afetam a sua síntese (KITCHEL; TEAT; WOODARD-GRICE, 2013). Esses dados nos dão um indício de como o E2 pode regular os níveis de expressão de ADAMTS-1. E2 pode estar envolvido com a secreção de ADAMTS-1 para a matriz extracelular, e não necessariamente com a síntese da protease no interior das células, uma vez que no lisado total há diminuição da expressão da protease nas células MDA-MB-231, enquanto que no meio condicionado observamos um aumento da secreção da protease.

Os níveis de expressão de mRNA e proteínas de ADAMTS-1 é menor na linhagem mais invasiva (MDA-MB-231). A baixa expressão de ADAMTSs no câncer, comparada com o tecido normal, sugere que estas proteases possam regular negativamente o crescimento tumoral, consistente com as propriedades anti-angiogênicas de ADAMTS-1 (PORTER et al., 2005). ADAMTS-1 inibe a proliferação celular *in vitro*, suprimindo a vascularização induzida por FGF-2, e a angiogênese induzida por VEGF (XU; YU; DUH, 2006). VEGF é um dos mais específicos mediadores de angiogênese tumoral (MIZIA-MALARZ; SOBOL; WOŚ, 2008; PRZYBYLSKI, 2009; HANAWA et al., 2014). ADAMTS-1 bloqueia a fosforilação de VEGFR2, por ligar-se diretamente ao receptor e sequestrar VEGF₁₆₅, inibindo a proliferação celular endotelial (XU; YU; DUH, 2006). ADAMTS-1 se liga ao fator de

crescimento VEGF₁₆₅, e modula negativamente a função de VEGF nas células endoteliais (INOKI et al., 2002; LUQUE; CARPIZO; ARISPE, 2003).

Estudos demonstram que 11 membros da família ADAMTS estão desregulados no câncer de mama, onde há o aumento de ADAMTS-8 e diminuição de ADAMTS-15 comparado ao tecido normal (PORTER et al., 2006).

Demonstramos pela primeira vez que ADAMTS-1 está presente no núcleo das três linhagens celulares estudadas tanto por imunolocalização, quanto por Western Blot. A localização nuclear de ADAMTS-1 não foi descrita na literatura até esse momento. De fato, é a primeira vez que um membro da família ADAMTS é detectado no núcleo celular. Existe na literatura, um estudo que demonstrou que MMP-2 está presente no núcleo de células do coração e fígado, e foi localizada dentro do núcleo de miócitos cardíacos, e que MMP-3 e TIMP-1 são também presentes no núcleo (SI-YAYEB et al., 2003). Em outro estudo, viu-se que a metaloproteinase de matriz-3 (MMP 3) está localizada no núcleo, e está intimamente relacionada com o processo apoptótico das células.

Fragmentos de MMP-3 estão presentes no núcleo de várias linhagens celulares tumorais (SI-TAYEB et al., 2006). Observa-se também, TIMP-1 acumulado no núcleo de fibroblastos gengivais humanos, e MMP-2 localizada no núcleo de miócitos cardíacos (KWAN et al., 2004). Algumas proteases têm sido encontradas no núcleo, incluindo membros das famílias da protease cisteína e catepsina. A função delas no núcleo não é bem entendida, mas pode incluir funções como remodelamento da cromatina, manutenção da estrutura da matriz nuclear, apoptose, e regulação da proliferação celular (SINHA et al., 2014). Um fato importante a ser observado, é que conforme o grau de malignidade da célula aumenta, ocorre uma diminuição de β -actina nuclear. Existem evidências que relatam a presença de actina nuclear, implicada em diversas funções, incluindo transcrição, transporte núcleo-citoplasma e exportação de mRNA (BETTINGER; GILBERT; AMBERG, 2004). A matriz nuclear é semelhante à matriz extracelular, com função de suporte de muitas moléculas, da mesma forma que a matriz extracelular ancora as células. Desta maneira, tal semelhança sugere os possíveis papéis biológicos para as metaloproteinases presentes no núcleo das células (KWAN et al., 2004).

Por tratar-se de uma molécula conhecida secretada e presente na matriz extracelular, a presença de ADAMTS-1 no núcleo e nucléolo nos despertou interesse em estudar qual é a função de ADAMTS-1 neste compartimento celular, e

com quais moléculas a protease interage no núcleo das células. Vimos em nossos resultados de imunolocalização que há acúmulo de ADAMTS-1 no núcleo das células.

As MMPs desempenham sua função tipicamente remodelando a matriz extracelular, para permitir remodelamento através da interação com diversos componentes da MEC, e em condições patológicas contribui para destruição tecidual e invasão de células tumorais (MORRISON et al., 2009; UGALDE et al., 2010). A identificação de substratos de MMPs específicos de matriz ou não, e a elucidação das consequências biológicas da clivagem destes substratos, indicam que muitas MMPs não são somente de matriz, mas também demonstram sua nova e inesperada localização nuclear (MANNELLO; MEDDA, 2012).

Vimos que ADAMTS-1 no núcleo das células MCF-7 desempenha função proteolítica, uma vez que a sua presença foi capaz de gerar fragmentos de agregam não vistos na amostra sem a presença da protease. Portanto, essas observações demonstram que a ADAMTS-1 tem a habilidade de clivar o agregam presente no núcleo celular.

A atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 mostrou-se aumentada significativamente no núcleo de células cerebrais de ratos submetidos à oclusão da artéria cerebral, comparando com a atividade observada no compartimento citoplasmático das mesmas células, sugerindo que a atividade das MMPs que ocorre no núcleo neuronal poder ser relacionada com a morte celular dependente de MMPs (AMANTEA et al., 2007; AMANTEA et al., 2008). MMP-13 foi encontrada na forma ativa dentro do núcleo de células neuronais após isquemia cerebral (CUADRADO et al., 2009). Uma pesquisa demonstrou que no cérebro logo após a ocorrência de uma injúria, algumas MMPs na fração nuclear do tecido isquêmico, são hábeis a clivar proteínas nucleares que facilitam o acúmulo de DNA oxidado, em uma fase inicial após um insulto isquêmico (YANG et al., 2010). Um estudo feito por Zhao e seus colaboradores, caracterizou a presença de TIMP-1 acumulado no núcleo de células Gin-1 na fase S do ciclo celular. A demonstração da localização de TIMP-1 nuclear, em maior concentração do que a encontrada no compartimento citoplasmático, sugere a possibilidade de um mecanismo de transporte ativo para a passagem de TIMP-1 citoplasmático para o núcleo contra um gradiente de concentração. Outros dados do mesmo grupo, porém não publicados, demonstram que a ausência de TIMP-2 e TIMP-3 sugerem que TIMP-1 possa participar na regulação do ciclo celular

pela inibição de MMPs nucleares não reconhecidas (como MMP-3) (ZHAO et al., 1998).

Um estudo molecular e imunocitoquímico realizado para avaliar a expressão de MMPs no tecido mamário saudável e no câncer de mama, descreveu que a MMP-1 está predominantemente marcada no núcleo das células tumorais, com uma leve marcação citoplasmática (KÖHRMANN et al., 2009), enquanto não observou marcação de MMP-1 no tecido mamário normal (MANNELLO, 2011).

Um estudo feito por Marchant e seus colaboradores, somaram às funções já estabelecidas da MMP-12 novos mecanismos de ação da protease, como regulação da defesa antiviral, e fator ativador da transcrição gênica (DANDACHI; SHAPIRO, 2014). Observaram que a MMP-12 estava localizada no núcleo de células cardíacas em pacientes com miocardites virais e cardiomiopatias. No mesmo estudo, investigaram a localização de MMP-12 em fibroblastos de camundongos e em células HeLa, e demonstraram que há a presença de ambos pró-enzima e o domínio catalítico de MMP-12, inseridos no núcleo dessas células. Fizeram a caracterização da função nuclear da MMP-12, e encontraram que o domínio catalítico de MMP-12 liga-se diretamente a sequência poly(A) no gene promotor que codifica I κ B α (um regulador do fator de transcrição NF κ B, que induz a expressão de vários genes envolvidos nas respostas imune e inflamatória, proliferação celular e apoptose), induzindo a transcrição do gene (MARCHANT et al., 2014). Neste estudo, ficou claro como uma protease que antes conhecidamente de matriz extracelular, com função intracelular, pode estar no núcleo celular, envolvida com a regulação da transcrição de genes. Outro estudo, MMP-3 se localiza no núcleo, e promove a transcrição de genes em uma linhagem de células de condrócitos (EGUCHI et al., 2008).

O entendimento da presença de MMPs no núcleo e seus substratos, continua a ser uma área em expansão na biologia celular e molecular (TONTI et al., 2009). A identificação da localização nuclear de algumas MMPs sugere que esta localização alternativa representa um importante aspecto da função das MMPs. De fato, existem fortes evidências de que essa compartimentalização nuclear das MMPs possa participar em muitos processos celulares fisiológicos e patológicos, e que elas podem atuar de forma constitutiva, regulatória e como proteinases induzíveis. O controle transcricional e traducional da expressão das MMPs, a nuclear localização durante condições patológicas e fisiológicas, os substratos nucleares, o transporte e tráfico de MMPs (incluindo passos de ativação local e inibição) são novas

referências para identificar e entender as funções especializadas de MMPs nucleares (MANNELLO; MEDDA, 2012), e são uma aposta para próximos estudos.

Mais pesquisas precisam ser feitas para aumentar o entendimento da localização das metaloproteinases, seus parceiros de interação, processamento dos substratos, e a regulação da atividade enzimática que ocorre quando acontece a ligação das proteases presentes no núcleo aos seus parceiros de interação.

Baseados nos resultados dos experimentos realizados, concluímos que:

1. Os hormônios sexuais alteram os níveis de expressão de mRNA de ADAMTS-1 na linhagem de mama normal, e na linhagem tumoral mais agressiva.
2. Os hormônios alteram a presença da protease no lisado e na matriz extracelular nas três linhagens.
3. ADAMTS-1 está menos expressa nas células derivadas de tumor de mama triplo – negativo, demonstrando que a falta da protease no estroma mamário pode favorecer a progressão tumoral.
4. A localização da ADAMTS-1 é predominantemente nuclear.
5. As células normais expostas ao hormônio progesterona, mostraram maior distribuição perinuclear e citoplasmática da protease, na linhagem celular com fenótipo normal.

REFERÊNCIAS*

- ALLRED, D. C.; BROWN, P.; MEDINA, D. The origins of estrogen receptor alpha-positive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer. **Breast Cancer Res.**, v. 6, n. 6, p. 240-245, 2004.
- AMANTEA, D. et al. Brain regional and cellular localization of gelatinase activity in rat that have undergone transient middle cerebral artery occlusion. **Neuroscience**, v. 152, n. 1, p. 8-17, Mar 2008.
- _____. Early upregulation of matrix metalloproteinases following reperfusion triggers neuroinflammatory mediators in brain ischemia in rat. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 82, p. 149-169, 2007.
- 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.
- ARVOLD, N. D. et al. Age, breast cancer subtype approximation, and local recurrence after breast-conserving therapy. **J. Clin. Oncol.**, v. 29, n. 29, p. 3885-3891, Oct 2011.
- BELEUT, M. et al. Two distinct mechanisms underlie progesterone-induced proliferation in the mammary gland. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 107, n. 7, p. 2989-2994, Feb 2010.
- BERX, G.; VAN ROY, F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 1, n. 6, p. a003129, Dec 2009.
- BETTINGER, B. T.; GILBERT, D. M.; AMBERG, D. C. Actin up in the nucleus. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 5, n. 5, p. 410-415, May 2004.
- 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.
- BIRRELL, S. N. et al. Disruption of androgen receptor signaling by synthetic progestins may increase risk of developing breast cancer. **FASEB J.**, v. 21, n. 10, p. 2285-2293, Aug 2007.
- BISSELL, M. J.; HALL, H. G.; PARRY, G. How does the extracellular matrix direct gene expression? **J. Theor. Biol.**, v. 99, n. 1, p. 31-68, Nov 1982.
- BOUCK, N.; STELLMACH, V.; HSU, S. C. How tumors become angiogenic. **Adv. Cancer Res.**, v. 69, p. 135-174, 1996.
- BRISKEN, C.; O'MALLEY, B. Hormone action in the mammary gland. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 2, n. 12, p. a003178, Dec 2010.

* De acordo com:

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

BROWN, H. M. et al. ADAMTS1 cleavage of versican mediates essential structural remodeling of the ovarian follicle and cumulus-oocyte matrix during ovulation in mice. **Biol. Reprod.**, v. 83, n. 4, p. 549-557, Oct 2010.

_____. Requirement for ADAMTS-1 in extracellular matrix remodeling during ovarian folliculogenesis and lymphangiogenesis. **Dev. Biol.**, v. 300, n. 2, p. 699-709, Dec 2006.

BURKHART, D. L.; SAGE, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. **Nat. Rev. Cancer**, v. 8, n. 9, p. 671-682, Sep 2008.

CANALS, F. et al. Identification of substrates of the extracellular protease ADAMTS1 by DIGE proteomic analysis. **Proteomics**, v. 6 Suppl 1, p. 28-35, Apr 2006.

CARNEVALE, R. P. et al. Progestin effects on breast cancer cell proliferation, proteases activation, and in vivo development of metastatic phenotype all depend on progesterone receptor capacity to activate cytoplasmic signaling pathways. **Mol. Endocrinol.**, v. 21, n. 6, p. 1335-1358, Jun 2007.

CARROLL, J. S. et al. Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. **Cell**, v. 122, n. 1, p. 33-43, Jul 2005.

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.

CHEN, L. et al. MT2-MMP expression associates with tumor progression and angiogenesis in human lung cancer. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 7, n. 6, p. 3469-3477, 2014.

CHEN, Q. et al. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. **Mediators Inflamm.**, v. 2013, p. 928315, 2013.

CHENG, N. et al. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. **Mol. Cancer Res.**, v. 6, n. 10, p. 1521-1533, Oct 2008.

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

COLLINS, L. C. et al. Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. **Mod. Pathol.**, v. 24, n. 7, p. 924-931, Jul 2011.

COUSE, J. F.; KORACH, K. S. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? **Endocr. Rev.**, v. 20, n. 3, p. 358-417, Jun 1999.

COUSSENS, L. M.; FINGLETON, B.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. **Science**, v. 295, n. 5564, p. 2387-2392, Mar 2002.

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

_____. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002 Dec 19-26 2002.

COX, T. R.; ERLER, J. T. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. **Dis. Model Mech.**, v. 4, n. 2, p. 165-178, Mar 2011.

CUADRADO, E. et al. Matrix metalloproteinase-13 is activated and is found in the nucleus of neural cells after cerebral ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 29, n. 2, p. 398-410, Feb 2009.

CUNHA, G. R. et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate. **Endocr. Rev.**, v. 8, n. 3, p. 338-362, Aug 1987.

DANDACHI, N. G.; SHAPIRO, S. D. A protean protease: MMP-12 fights viruses as a protease and a transcription factor. **Nat. Med.**, v. 20, n. 5, p. 470-472, May 2014.

DAWOOD, S. et al. Triple receptor-negative breast cancer: the effect of race on response to primary systemic treatment and survival outcomes. **J. Clin. Oncol.**, v. 27, n. 2, p. 220-226, Jan 2009.

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.

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

DENT, R. et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. **Clin. Cancer Res.**, v. 13, n. 15 Pt 1, p. 4429-4434, Aug 2007.

DERYUGINA, E. I. et al. 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. et al. The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. **FASEB J.**, v. 16, n. 2, p. 147-154, Feb 2002.

DOMCKE, S. et al. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. **Nat. Commun.**, v. 4, p. 2126, 2013.

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

EGUCHI, T. et al. Novel transcription-factor-like function of human matrix metalloproteinase 3 regulating the CTGF/CCN2 gene. **Mol. Cell Biol.**, v. 28, n. 7, p. 2391-2413, Apr 2008.

FATA, J. E.; CHAUDHARY, V.; KHOKHA, R. Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17 β -estradiol during the estrous cycle. **Biol. Reprod.**, v. 65, n. 3, p. 680-688, Sep 2001.

FATA, J. E. et al. Cellular turnover and extracellular matrix remodeling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 57, n. 1, p. 77-95, Jan 2000.

_____. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. **Cell**, v. 103, n. 1, p. 41-50, Sep 2000.

FAZZARI, A. et al. The control of progesterone receptor expression in MCF-7 breast cancer cells: effects of estradiol and sex hormone-binding globulin (SHBG). **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 172, n. 1-2, p. 31-36, Feb 2001.

FERNANDES, R. J. et al. Procollagen II amino propeptide processing by ADAMTS-3. Insights on dermatosparaxis. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 34, p. 31502-31519, Aug 2001.

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.

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

FREEDMAN, G. M. et al. Locoregional recurrence of triple-negative breast cancer after breast-conserving surgery and radiation. **Cancer**, v. 115, n. 5, p. 946-951, Mar 2009.

FREITAS, V. M. et al. Decreased expression of ADAMTS-1 in human breast tumors stimulates migration and invasion. **Mol. Cancer**, v. 12, p. 2, 2013.

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

FUSHIMI, K. et al. 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.

GANGI, A. et al. Triple-Negative Breast Cancer is Not Associated with Increased Likelihood of Nodal Metastases. **Ann. Surg. Oncol.**, Aug 2014.

GARAY, J. P. et al. The growth response to androgen receptor signaling in ER α -negative human breast cells is dependent on p21 and mediated by MAPK activation. **Breast Cancer Res.**, v. 14, n. 1, p. R27, 2012.

GARAY, J. P.; PARK, B. H. Androgen receptor as a targeted therapy for breast cancer. **Am. J. Cancer Res.**, v. 2, n. 4, p. 434-445, 2012.

GENDRON, C. et al. Proteolytic activities of human ADAMTS-5: comparative studies with ADAMTS-4. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 25, p. 18294-18306, Jun 2007.

GERHARDT, S. et al. 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. ISSN 0950-9232.

GJOREVSKI, N.; NELSON, C. M. Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. **Nat. Rev. Mol Cell Biol.**, v. 12, n. 9, p. 581-593, Sep 2011.

GLASER, R. L.; DIMITRAKAKIS, C. Reduced breast cancer incidence in women treated with subcutaneous testosterone, or testosterone with anastrozole: a prospective, observational study. **Maturitas**, v. 76, n. 4, p. 342-349, Dec 2013.

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

GONZÁLEZ-MARISCAL, L.; TAPIA, R.; CHAMORRO, D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. **Biochim. Biophys Acta**, v. 1778, n. 3, p. 729-756, Mar 2008.

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

GROBSTEIN, C. Mechanisms of organogenetic tissue interaction. **Natl. Cancer Inst. Monogr.**, v. 26, p. 279-299, Sep 1967.

GUCALP, A.; TRAINA, T. A. Triple-negative breast cancer: role of the androgen receptor. **Cancer J.**, v. 16, n. 1, p. 62-65, 2010 Jan-Feb 2010.

GUO, B. H. et al. 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, 2011.

GUSTAVSSON, H. et al. ADAMTS1 alters blood vessel morphology and TSP1 levels in LNCaP and LNCaP-19 prostate tumors. **BMC Cancer**, v. 10, p. 288, 2010.

GÜNTHER, W. et al. Distribution patterns of the anti-angiogenic protein ADAMTS-1 during rat development. **Acta Histochem.**, v. 107, n. 2, p. 121-131, 2005.

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. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 2000.

_____. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, Mar 2011.

HANAWA, K. et al. Low-intensity pulsed ultrasound induces angiogenesis and ameliorates left ventricular dysfunction in a porcine model of chronic myocardial ischemia. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104863, 2014.

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.

HANSEN, R. K.; BISSELL, M. J. Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 7, n. 2, p. 95-113, Jun 2000.

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.

HAWKINS, S. M.; MATZUK, M. M. The menstrual cycle: basic biology. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 1135, p. 10-18, 2008.

HAYFLICK, L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. **Biochemistry (Mosc)**, v. 62, n. 11, p. 1180-1190, Nov 1997.

HEWITT, S. C.; KORACH, K. S. Progesterone action and responses in the alphaERKO mouse. **Steroids**, v. 65, n. 10-11, p. 551-557, 2000 Oct-Nov 2000.

HICKEY, T. E. et al. Minireview: The androgen receptor in breast tissues: growth inhibitor, tumor suppressor, oncogene? **Mol. Endocrinol.**, v. 26, n. 8, p. 1252-1267, Aug 2012.

HU, L. et al. Over-expression of Adamts1 in mice alters bone mineral density. **J. Bone Miner. Metab.**, v. 30, n. 3, p. 304-311, May 2012.

HU, R. et al. Androgen receptor expression and breast cancer survival in postmenopausal women. **Clin. Cancer Res.**, v. 17, n. 7, p. 1867-1874, Apr 2011.

HUA, H. et al. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 68, n. 23, p. 3853-3868, Dec 2011.

II, M. et al. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**, v. 231, n. 1, p. 20-27, Jan 2006.

INCA. Incidência de Câncer no Brasil 2014.

INOKI, I. et al. 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.

ISOLA, J. J. Immunohistochemical demonstration of androgen receptor in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. **J. Pathol.**, v. 170, n. 1, p. 31-35, May 1993.

JOSHI, P. A.; DI GRAPPA, M. A.; KHOKHA, R. Active allies: hormones, stem cells and the niche in adult mammapoiesis. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 23, n. 6, p. 299-309, Jun 2012.

KALLURI, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, n. 6, p. 422-433, Jun 2003..

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

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.

KIM, J. J.; KURITA, T.; BULUN, S. E. Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. **Endocr. Rev.**, v. 34, n. 1, p. 130-162, Feb 2013.

KITCHEL, A.; TEAT, S.; WOODARD-GRICE, A. Estradiol Enhances Hyaluronic Acid Secretion from Vaginal Epithelial Cells. **FASEB Journal**, 2013.

KUMAR, S.; RAO, N.; GE, R. Emerging Roles of ADAMTSs in Angiogenesis and Cancer. **Cancers (Basel)**, v. 4, n. 4, p. 1252-1299, 2012.

KUNO, K. et al. 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.

_____. ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan. **FEBS Lett.**, v. 478, n. 3, p. 241-245, Aug 2000.

KURZEPA, J. et al. The significance of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in the ischemic stroke. **Int. J. Neurosci.**, v. 124, n. 10, p. 707-716, Oct 2014.

KWAN, J. A. et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. **FASEB J.**, v. 18, n. 6, p. 690-692, Apr 2004.

KÖHRMANN, A. et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. **BMC Cancer**, v. 9, p. 188, 2009.

LANGE, C. A.; RICHER, J. K.; HORWITZ, K. B. Hypothesis: Progesterone primes breast cancer cells for cross-talk with proliferative or antiproliferative signals. **Mol. Endocrinol.**, v. 13, n. 6, p. 829-836, Jun 1999.

LANGE, C. A.; YEE, D. Progesterone and breast cancer. **Womens Health (Lond Engl)**, v. 4, n. 2, p. 151-162, Mar 2008.

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.

LE GOFF, C. et al. Regulation of procollagen amino-propeptide processing during mouse embryogenesis by specialization of homologous ADAMTS proteases: insights on collagen biosynthesis and dermatosparaxis. **Development**, v. 133, n. 8, p. 1587-1596, Apr 2006.

LE ROMANCER, M. et al. Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. **Endocr. Rev.**, v. 32, n. 5, p. 597-622, Oct 2011.

LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 141, n. 7, p. 1117-1134, Jun 2010.

LI, Y.; ROSEN, J. M. Stem/progenitor cells in mouse mammary gland development and breast cancer. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia**, v. 10, n. 1, p. 17-24, Jan 2005.

LIAO, X. H. et al. Estrogen receptor α mediates proliferation of breast cancer MCF-7 cells via a p21/PCNA/E2F1-dependent pathway. **FEBS J.**, v. 281, n. 3, p. 927-942, Feb 2014.

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

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

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.

LOIBL, S. et al. Androgen receptor expression in primary breast cancer and its predictive and prognostic value in patients treated with neoadjuvant chemotherapy. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 130, n. 2, p. 477-487, Nov 2011.

LUM, L.; REID, M. S.; BLOBEL, C. P. Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 40, p. 26236-26247, Oct 1998.

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.

MADSEN, D. H. et al. Extracellular collagenases and the endocytic receptor, urokinase plasminogen activator receptor-associated protein/Endo180, cooperate in fibroblast-mediated collagen degradation. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 37, p. 27037-27045, Sep 2007.

MANNELLO, F. What does matrix metalloproteinase-1 expression in patients with breast cancer really tell us? **BMC Med.**, v. 9, p. 95, 2011.

MANNELLO, F.; MEDDA, V. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. **Prog. Histochem. Cytochem.**, v. 47, n. 1, p. 27-58, Mar 2012.

MARADNI, A. et al. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) and MMP inhibitors on intracranial aneurysms: a review article. **Med. J. Islam Repub. Iran.**, v. 27, n. 4, p. 249-254, Nov 2013.

MARCHANT, D. J. et al. A new transcriptional role for matrix metalloproteinase-12 in antiviral immunity. **Nat. Med.**, v. 20, n. 5, p. 493-502, May 2014.

MASUI, T. et al. Expression of METH-1 and METH-2 in pancreatic cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, n. 11, p. 3437-3443, Nov 2001.

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.

MCNAMARA, K. M. et al. Androgen receptor in triple negative breast cancer. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 133, p. 66-76, Jan 2013.

MENSE, S. M. et al. Estrogen-induced breast cancer: alterations in breast morphology and oxidative stress as a function of estrogen exposure. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 232, n. 1, p. 78-85, Oct 2008.

MINN, A. J. et al. 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.

MIZIA-MALARZ, A.; SOBOL, G.; WOŚ, H. [Proangiogenic factors: vascular-endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor--the characteristics and function]. **Przegl. Lek.**, v. 65, n. 7-8, p. 353-357, 2008.

MOHAMMADI, H. et al. **Evaluation of synthesized platinum nanoparticles on the MCF-7 and HepG-2 cancer cell lines** International Nano Letters. 2013.

MORRISON, C. J. et al. Matrix metalloproteinase proteomics: substrates, targets, and therapy. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 21, n. 5, p. 645-653, Oct 2009.

MOSYAK, L. et al. Crystal structures of the two major aggrecan degrading enzymes, ADAMTS4 and ADAMTS5. **Protein Sci.**, v. 17, n. 1, p. 16-21, Jan 2008.

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.

MULAC-JERICEVIC, B. et al. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 100, n. 17, p. 9744-9749, Aug 2003.

NAKAMURA, M. et al. 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.

NG, Y. H. et al. Differential effects of interleukin-1 β and transforming growth factor- β 1 on the expression of the inflammation-associated protein, ADAMTS-1, in human decidual stromal cells in vitro. **Hum. Reprod.**, v. 21, n. 8, p. 1990-1999, Aug 2006.

NI, M. et al. Targeting androgen receptor in estrogen receptor-negative breast cancer. **Cancer Cell**, v. 20, n. 1, p. 119-131, Jul 2011.

NICOLÁS DÍAZ-CHICO, B. et al. Androgens and androgen receptors in breast cancer. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 105, n. 1-5, p. 1-15, 2007 Jun-Jul 2007.

NIEWIAROWSKI, S. et al. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Semin. Hematol.**, v. 31, n. 4, p. 289-300, Oct 1994.

OKOSHI, R. et al. Scattering of MCF7 cells by heregulin β -1 depends on the MEK and p38 MAP kinase pathway. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53298, 2013.

OSKARSSON, T. Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. **Breast**, v. 22 Suppl 2, p. S66-72, Aug 2013.

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.

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.

PARK, S. et al. Expression of androgen receptors in primary breast cancer. **Ann. Oncol.**, v. 21, n. 3, p. 488-492, Mar 2010.

PETERS, A. A. et al. Androgen receptor inhibits estrogen receptor- α activity and is prognostic in breast cancer. **Cancer Res.**, v. 69, n. 15, p. 6131-6140, Aug 2009.

POLYAK, K.; KALLURI, R. The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 2, n. 11, p. a003244, Nov 2010.

PORLAN, E. et al. MT5-MMP regulates adult neural stem cell functional quiescence through the cleavage of N-cadherin. **Nat. Cell Biol.**, v. 16, n. 7, p. 629-638, Jul 2014.

PORTER, S. et al. The ADAMTS metalloproteinases. **Biochem. J.**, v. 386, n. Pt 1, p. 15-27, Feb 2005.
_____. Dysregulated expression of adamalysin-thrombospondin genes in human breast carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 10, n. 7, p. 2429-2440, Apr 2004.

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

PRZEMYSŁAW, L. et al. ADAM and ADAMTS family proteins and their role in the colorectal cancer etiopathogenesis. **BMB Rep.**, v. 46, n. 3, p. 139-150, Mar 2013.

PRZYBYLSKI, M. A review of the current research on the role of bFGF and VEGF in angiogenesis. **J. Wound Care**, v. 18, n. 12, p. 516-519, Dec 2009.

REHN, A. P. et al. 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. et al. The ADAMTS1 protease gene is required for mammary tumor growth and metastasis. **Am. J. Pathol.**, v. 179, n. 6, p. 3075-3085, Dec 2011.

RIVAS, M. A. et al. Downregulation of the tumor-suppressor miR-16 via progestin-mediated oncogenic signaling contributes to breast cancer development. **Breast Cancer Res.**, v. 14, n. 3, p. R77, 2012.

RIZZA, P. et al. Estrogen receptor beta as a novel target of androgen receptor action in breast cancer cell lines. **Breast Cancer Res.**, v. 16, n. 1, p. R21, 2014.

ROBINSON, J. L. et al. Androgen receptor driven transcription in molecular apocrine breast cancer is mediated by FoxA1. **EMBO J.**, v. 30, n. 15, p. 3019-3027, Aug 2011.

ROCKS, N. et al. Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer. **Biochimie**, v. 90, n. 2, p. 369-379, Feb 2008.

_____. ADAMTS-1 metalloproteinase promotes tumor development through the induction of a stromal reaction in vivo. **Cancer Res.**, v. 68, n. 22, p. 9541-9550, Nov 2008.

RODRÍGUEZ-MANZANEQUE, J. C. et al. Cleavage of syndecan-4 by ADAMTS1 provokes defects in adhesion. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 41, n. 4, p. 800-810, Apr 2009.

_____. ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 293, n. 1, p. 501-508, Apr 2002.

RONGHE, A. et al. Differential regulation of estrogen receptors α and β by 4-(E)-{(4-hydroxyphenylimino)-methylbenzene, 1,2-diol}, a novel resveratrol analog. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, Sep 2014.

ROZANOV, D. V. et al. 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.

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

RUSSELL, D. L. et al. 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.

RØNNOV-JESSEN, L.; PETERSEN, O. W.; BISSELL, M. J. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. **Physiol. Rev.**, v. 76, n. 1, p. 69-125, Jan 1996.

SANDY, J. D. et al. 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.

SHAH, P. D.; GUCALP, A.; TRAINA, T. A. The role of the androgen receptor in triple-negative breast cancer. **Womens Health (Lond Engl)**, v. 9, n. 4, p. 351-360, Jul 2013.

SHERR, C. J.; MCCORMICK, F. The RB and p53 pathways in cancer. **Cancer Cell**, v. 2, n. 2, p. 103-112, Aug 2002.

SHINDO, T. et al. ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 10, p. 1345-1352, May 2000.

SHOZU, M. et al. ADAMTS-1 is involved in normal follicular development, ovulatory process and organization of the medullary vascular network in the ovary. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 35, n. 2, p. 343-355, Oct 2005.

SI-TAYEB, K. et al. Matrix metalloproteinase 3 is present in the cell nucleus and is involved in apoptosis. **Am. J. Pathol.**, v. 169, n. 4, p. 1390-1401, Oct 2006.

SI-YAYEB, K. et al. **Unexpected localization of the matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) within the cell nucleus in liver cancer cells. Mechanisms and consequences:** Journal of Hepatology 2003.

SINGH, B.; BHAT, H. K. Superoxide dismutase 3 is induced by antioxidants, inhibits oxidative DNA damage and is associated with inhibition of estrogen-induced breast cancer. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 12, p. 2601-2610, Dec 2012.

SINGH, B.; BHAT, N. K.; BHAT, H. K. Partial inhibition of estrogen-induced mammary carcinogenesis in rats by tamoxifen: balance between oxidant stress and estrogen responsiveness. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e25125, 2011.

SINHA, S. K. et al. Nuclear localization of catalytically active MMP-2 in endothelial cells and neurons. **Am. J. Transl. Res.**, v. 6, n. 2, p. 155-162, 2014.

SOCIETY, A. C. **Statistics about breast cancer.** 2013.

SOMBOONPORN, W.; DAVIS, S. R.; COUNCIL, N. H. A. M. R. Testosterone effects on the breast: implications for testosterone therapy for women. **Endocr. Rev.**, v. 25, n. 3, p. 374-388, Jun 2004.

STANTON, H. et al. Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1812, n. 12, p. 1616-1629, Dec 2011.

STERNLICHT, M. D. et al. 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.

SØRLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 98, n. 19, p. 10869-10874, Sep 2001.

TALLANT, C.; MARRERO, A.; GOMIS-RÜTH, F. X. Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1803, n. 1, p. 20-28, Jan 2010.

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. 133: 2263-2276 p. 2013.

TANG, B. L.; HONG, W. ADAMTS: a novel family of proteases with an ADAM protease domain and thrombospondin 1 repeats. **FEBS Lett.**, v. 445, n. 2-3, p. 223-225, Feb 1999.

TATTI, O. et al. Membrane-type-3 matrix metalloproteinase (MT3-MMP) functions as a matrix composition-dependent effector of melanoma cell invasion. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28325, 2011.

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.

TONTI, G. A. et al. Neural stem cells at the crossroads: MMPs may tell the way. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 53, n. 1, p. 1-17, 2009.

TORTORELLA, M. D. et al. Characterization of human aggrecanase 2 (ADAM-TS5): substrate specificity studies and comparison with aggrecanase 1 (ADAM-TS4). **Matrix Biol.**, v. 21, n. 6, p. 499-511, Oct 2002.

UGALDE, A. P. et al. Metalloproteases and the degradome. **Methods Mol. Biol.**, v. 622, p. 3-29, 2010.

VAN STAVEREN, W. C. et al. Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1795, n. 2, p. 92-103, Apr 2009.

VARES, G. et al. Generation of breast cancer stem cells by steroid hormones in irradiated human mammary cell lines. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77124, 2013.

VERMA, P.; DALAL, K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: key enzymes in osteoarthritis. **J. Cell. Biochem.**, v. 112, n. 12, p. 3507-3514, Dec 2011.

WANG, Q. et al. A hierarchical network of transcription factors governs androgen receptor-dependent prostate cancer growth. **Mol. Cell**, v. 27, n. 3, p. 380-392, Aug 2007.

WANG, W. M. et al. Transforming growth factor-beta induces secretion of activated ADAMTS-2. A procollagen III N-proteinase. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 21, p. 19549-19557, May 2003.

WATSON, C. J.; KHALED, W. T. Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. **Development**, v. 135, n. 6, p. 995-1003, Mar 2008.

WEN, J.; ZHU, H.; LEUNG, P. C. Gonadal steroids regulate the expression of aggrecanases in human endometrial stromal cells in vitro. **J. Cell Mol. Med.**, v. 17, n. 10, p. 1325-1334, Oct 2013.

WEN, J. et al. Regulation of A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin repeats-1 expression in human endometrial stromal cells by gonadal steroids involves progestins, androgens, and estrogens. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 91, n. 12, p. 4825-4835, Dec 2006.

WERB, Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 439-42, Nov 1997. WILDING, G. The importance of steroid hormones in prostate cancer. **Cancer Surv.**, v. 14, p. 113-130, 1992.

XU, Z.; YU, Y.; DUH, E. J. Vascular endothelial growth factor upregulates expression of ADAMTS1 in endothelial cells through protein kinase C signaling. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 47, n. 9, p. 4059-4066, Sep 2006.

YANG, Y. et al. Increased intranuclear matrix metalloproteinase activity in neurons interferes with oxidative DNA repair in focal cerebral ischemia. **J. Neurochem.**, v. 112, n. 1, p. 134-149, Jan 2010.

ZHAO, W. Q. et al. Cell cycle-associated accumulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in the nuclei of human gingival fibroblasts. **J. Cell. Sci.**, v. 111, pt 9, p. 1147-1153, May 1998.