BASILIO SMUCZEK

**PEPTÍDEO C16, DERIVADO DA LAMININA, REGULANDO A EXPRESSÃO DE
POTENCIAIS BIOMARCADORES DO CÂNCER DE MAMA**

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

São Paulo
2014

BASILIO SMUCZEK

**PEPTÍDEO C16, DERIVADO DA LAMININA, REGULANDO A EXPRESSÃO DE
POTENCIAIS BIOMARCADORES DO CÂNCER DE MAMA**

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

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. Ruy Gastaldoni Jaeger

Versão original

São Paulo
2014

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

© reprodução total

Smuczek, Basilio.

Peptídeo C16, derivado da laminina, regulando a expressão de potenciais biomarcadores do câncer de mama / Basilio Smuczek. – São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Ruy Gastaldoni Jaeger.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Peptídeos da laminina influenciando no comportamento da biologia tumoral.

Versão do título para o inglês: Peptide C16 derived from laminin, regulate the expression of potential biomarkers of breast cancer.

1. Neoplasias mamárias 2. Peptídeos 3. Laminina 4. Evolução tumoral 5. GPNMB 6. SPOCK I. Jaeger, Prof. Dr. Ruy Gastaldoni II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0118/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Basilio Smuczek.

Título da Dissertação: Peptídeos C16, derivado da laminina, regulando a expressão de potenciais biomarcadores do câncer de mama.

Orientador(a): Prof. Dr. Ruy Gastaldoni Jaeger.

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° 524/12 referente ao projeto intitulado: "*Análise in vitro e in vivo da expressão das proteínas GPNMB, MMP14, SPOCK1 e MYO5B em câncer de mama*" sob a responsabilidade de **Basilio Smuczek**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 13 de junho de 2012.

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

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

*Dedico a todas as pessoas que seguem ao
meu lado de coração e acreditem a presença
e atenção vinda de vocês fazem com que
cada dia da minha vida, seja mais iluminada.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

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

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

A todo o pessoal do Laboratório de Biologia Tumoral: Edilberto e Fabio. Trabalhar com vocês foi uma ótima experiência. Vocês, sempre prestativos, se mostraram prontos a ajudar. **Adriane** e **Lívia**, acima de tudo agradeço pelo laço de amizade formado e sei que independente dos rumos que cada um siga, este laço da minha parte jamais será rompido, vocês deixaram eternas saudades.

A todos os membros da minha família: Ao meu pai Gabriel e a minha mãe Sofia. Aos meus irmãos, Sônia, Luci Mara (em memória), Rosangela, Paulo e Elizangela. Agradeço pelo amor, carinho e atenção que todos proporcionaram em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro. A concessão de bolsa de Mestrado e Reserva Técnica foram de extrema importância não só para a realização deste trabalho, mas também para a minha formação profissional.

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

Às Prof. Dra. Nathalie Cella, Profa. Dra. Patrícia Gama e Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara e Prof. Dra. Alison Colquhoun, pelas relevantes observações e sugestões feitas durante meu Exame de Qualificação.

Aos meus antigos colegas de Laboratório, que foram sempre muito prestativos e companheiros. Emerson, Monique e Micael obrigado pela amizade e carinho sou grato por cada uma das vezes que vocês me ajudaram com experimentos e tarefas do laboratório. Mais do que colegas de trabalho, vocês foram e serão sempre grandes amigos.

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

Aos meus amigos de longa data, que de alguma maneira fizeram ou fazem parte desta história. Juliano, Decio, Roberto, Reonardo, Tiago, Lucas, Nilton, Antonio Carlos, Juarez (em memória) e Luzia obrigado pela companhia, torcida e, acima de tudo, pelo amor de uma amizade verdadeira.

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

RESUMO

SMUCZEK, B. **Peptídeo C16, derivado da laminina, regulando a expressão de potenciais biomarcadores do câncer de mama**. 2014. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O câncer de mama é um importante problema de saúde pública. O microambiente onde as células cancerígenas se encontram possui um importante papel no processo de tumorigenesis e progressão tumoral. Nosso laboratório estuda a laminina e seus peptídeos bioativos na biologia tumoral. Em estudo anterior, nós demonstramos que o peptídeo C16, derivado da laminina, regula a expressão gênica das células MDA-MB-231 derivadas de câncer de mama. C16 estimulou a expressão gênica de GPNMB e SPOCK1. Neste trabalho, avaliamos o efeito do peptídeo C16 nos níveis moleculares de GPNMB e SPOCK em células derivadas de câncer de mama MDA-MB-231, MCF-7 e células de mama normal MCF-10A. As linhagens foram tratadas com C16 e os níveis de GPNMB e SPOCK avaliados através de “*immunoblot*”. C16 aumentou os níveis moleculares de GPNMB e SPOCK nas células MDA-MB-231 e MCF-7 comparado com as células controle MCF-10A. Para correlacionar a expressão molecular com função, avaliamos se C16 regularia a invasão nas três linhagens celulares. Ensaio em Câmara de Boyden com Matrigel indicou que C16 aumenta significativamente a invasão de células MDA-MB-231. Além disso, o silenciamento de GPNMB por RNAi diminuiu a invasão celular desencadeada por C16. Contextualizando os resultados obtidos *in vitro* com resultados *in vivo*, estudamos o potencial papel de GPNMB e SPOCK como biomarcadores tumorais através da imunodeteção destas moléculas em lâminas de “*tissue microarrays*”. Quantificação imunohistoquímica da região marcada para GPNMB e SPOCK foram significativamente maiores em câncer de mama comparado com o tecido normal. Nós concluímos que o peptídeo C16 derivado da laminina regula os níveis moleculares de GPNMB e SPOCK em células derivadas de câncer de mama. C16 e GPNMB podem cooperar regulando a invasão das células MDA-MB-231. GPNMB e SPOCK apresentaram aumento nos níveis moleculares em câncer de mama comparado a mama normal.

Palavras-chave: Câncer de mama, matriz extracelular, laminina, peptídeo C16. GPNMB, SPOCK.

ABSTRACT

SMUCZEK, B. **The laminin-derived peptide C16 regulates expression of potential biomarkers of breast cancer.** 2014. 86 p. Masters Thesis (Cell and Tissue Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Breast cancer is an important public health problem. The microenvironment in which cancer cells are found plays an important role in tumorigenesis and tumor progression. Our laboratory studies the role of laminin and its bioactive peptides in tumor biology. We have previously found that the laminin-derived peptide C16 regulates differential gene expression in MDA-MB-231 cells derived from breast cancer. C16 stimulated gene expression of GPNMB and SPOCK1. In this study, we evaluated the effect of peptide C16 in molecular levels of GPNMB and SPOCK in breast cancer cell lines, such as MDA-MB-231, MCF-7 and normal breast cells MCF-10A. Cell lines were treated with C16, and the expression of GPNMB and SPOCK analyzed by immunoblot. C16 increased expression of GPNMB and SPOCK in both MDA-MB-231 and MCF-7 cells compared to MCF-10A control cells. To correlate molecular expression with function, we analyzed whether C16 would regulate invasion in all cell lines. Assays in Boyden chambers coated with Matrigel indicated that C16 significantly increased MDA-MB-231 cell invasion. In addition, depletion of GPNMB by siRNA decreased C16-induced cell invasion. In order to contextualize *in vivo* our results *in vitro*, we studied the potential role of GPNMB and SPOCK as tumor biomarkers through immunostaining of these molecules in tissue microarrays. Quantitative immunohistochemistry showed that GPNMB and SPOCK staining were significantly higher in breast cancer compared to normal tissue. We concluded that laminin-derived peptide C16 regulates molecular expression of GPNMB and SPOCK in breast cancer cells. C16 and GPNMB may cooperate to regulate invasion of MDA-MB-231 cells. GPNMB and SPOCK presented increased expression in breast cancer *in vivo* compared to normal breast tissue

Keywords: Breast Cancer, extracellular matrix, laminin, C16 peptide, GPNMB, SPOCK.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação morfológica dos diversos tipos de câncer de mama:	29
Tabela 2 - Classificação de Tumores malignos de câncer de mama por estádios. ..	31
Tabela 3 - Isoformas da laminina e suas respectivas cadeias.	38

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama 1 - Laminina-111 e seus peptídeos bioativos.....	42
Diagrama 2 - Glicoproteína Transmembrana não-metastática B/GPNMB.	44
Diagrama 3 - Testicam-1/SPOCK.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O peptídeo C16 estimula os níveis de GPNMB e SPOCK em células derivadas de câncer de mama.	58
Figura 2 - C16 estimula a invasão celular das células MDA-MB-231.	60
Figura 3 - GPNMB e o peptídeo C16 cooperam na invasão celular da linhagem MDA-MB-231.	62
Figura 4 - Imunodeteção de GPNMB em câncer de mama.	64
Figura 5 - Níveis de SPOCK são detectados em câncer de mama e mama normal.	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	porcentagem
µg	micrograma
µm	micromolar
AG73	seqüência dos aminoácidos RKRLQVQLSIRT (arginina-lisina-arginina-leucina-glicina-valina-glicina-leucina-serina-isoleucina-arginina-treonina)
BCA	do inglês " <i>bicinchoninic acid</i> ", traduzido como ácido bicinconínico
BLAST	do inglês, " <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> ", traduzido como Ferramenta Básica para Busca de Alinhamentos Locais
BSA	do inglês " <i>bovine serum albumine</i> ", traduzido como albumina sérica bovina
BRCA1	do inglês, " <i>breast cancer 1, early onset</i> ", traduzido como câncer de mama 1, início precoce
BRCA2	do inglês, " <i>breast cancer 2, early onset</i> ", traduzido como câncer de mama 2, início precoce
C16	sequência dos aminoácidos KAFDITYVRLKF (lisina-asparagina-fenilalanina-ác.aspártico-isoleucina-treonina-tirosina-valina-arginina-leucina-lisina- fenilalanina)
C16SX	sequência dos aminoácidos FKLRVYTIDFAK (fenilalanina - lisina - leucina - arginina - valina - tirosina - treonina - isoleucina - ácido aspártico - fenilalanina - asparagina - lisina)
Ca²⁺	íon cálcio
cm²	centímetros quadrados
CO₂	gás carbônico
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	do inglês " <i>deoxyribonucleic acid</i> ", traduzido como ácido desoxirribonucleico
ECL	do inglês " <i>enhanced chemiluminescence</i> "
EDTA	do inglês " <i>ethylenediamine-tetra acetic acid</i> ", traduzido como ácido etilenodiamino tetra acético
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm

EUA	Estados Unidos da América
G	gravidade
GAG	glicosaminoglicano
GPNMB	do inglês “ <i>glycoprotein nonmetastatic B</i> ”, traduzido como glicoproteína não metastática B
H	horas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kDa	kilodalton
LB	lâmina basal
M	molar
MEC	matriz extracelular
MEM	do inglês “ <i>minimum essential medium</i> ”, traduzido como meio mínimo essencial
Mg	miligrama
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MMP-3	do inglês “ <i>matrix metalloproteinase 3</i> ”, traduzido como metaloproteinase de matriz 3
MMP-9	do inglês “ <i>matrix metalloproteinase 9</i> ”, traduzido como metaloproteinase de matriz 9
MMPs	do inglês “ <i>matrix metalloproteinases</i> ”, traduzido como metaloproteinases de matriz
NCBI	do inglês, “ <i>National Center for Biotechnology Information</i> ”, traduzido como Centro Nacional de Informação Biotecnológica
Ng	nanograma
Nm	nanômetro
°C	graus celsius
PBS	do inglês “ <i>phosphate-buffered saline</i> ”, traduzido como tampão fosfato-salina
pH	potencial hidrogeniônico
PKD	do inglês “ <i>Polycystic Kidney Disease</i> ”, traduzido como doença renal policística

RNA	do inglês “ <i>ribonucleic acid</i> ”, traduzido como ácido ribonucleico
RP-HPLC	do inglês “ <i>reversed-phase high-pressure liquid chromatography</i> ”, traduzido como cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa
SBF	soro fetal bovino
SDS-PAGE	do inglês “ <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> ”, traduzido como eletroforese de gel de poliacrilamida, tendo como agente denaturante sulfato dodecil sódico
SPOCK1	do inglês “ <i>SPARC/osteonectin, cwcx and kazal-like domains proteoglycan</i> ”, traduzido como proteoglicano com domínios SPARC/osteonectina, cwcx e domínio semelhante a kazal
TBS	do inglês “ <i>tris-buffered saline</i> ”, traduzido como tampão tris-salina
TMA	Do Inglês “ <i>Tissue Microarray</i> ” traduzido como microarranjo de tecido
YIGSR	sequência de aminoácidos YIGSR (tirosina-isoleucina-glicina-serina-arginina)

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	O câncer de mama.....	23
2.1.1	<i>Epidemiologia e fatores de risco associados ao câncer de mama</i>	<i>23</i>
2.1.2	<i>Glândula mamária normal, origem e progressão do câncer de mama</i>	<i>25</i>
2.2	Matriz extracelular e a lâmina basal.....	31
2.2.1	<i>Matriz extracelular</i>	<i>31</i>
2.3	Lâmina basal, laminina e seus peptídeos bioativos.....	34
2.3.1	<i>A lâmina basal</i>	<i>34</i>
2.3.2	<i>Laminina</i>	<i>36</i>
2.3.3	<i>Peptídeos bioativos da laminina</i>	<i>40</i>
2.4	Peptídeo C16.....	42
2.5	GPNMB e SPOCK.....	43
2.5.1	<i>Glicoproteína Transmembrana não-metastática B/GPNMB</i>	<i>43</i>
2.5.2	<i>Testicam-1/SPOCK</i>	<i>45</i>
3	PROPOSIÇÃO	47
3.1	Objetivo Geral	47
3.1.1	<i>Objetivo específicos.....</i>	<i>47</i>
4	MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1	Peptídeos	48
4.2	Linhagens celulares	48
4.3	Immunoblot	49
4.4	Ensaio de Invasão	50
4.5	Ensaio de Invasão com RNA de interferência.....	51
4.6	Imunohistoquímica.....	52
4.7	Análise estatística	53
5	RESULTADOS	54
5.1	O peptídeo C16 estimula os níveis de GPNMB e SPOCK.	54
5.2	C16 estimula a invasão celular.....	54
5.3	GPNMB e o peptídeo C16 cooperam para a invasão celular	55
5.4	Imunodeteção de GPNMB e SPOCK em câncer de mama.	55

6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

Os tumores de mama são o segundo tipo de câncer mais frequente na população mundial, apresentando alta taxa de mortalidade, sendo que o gênero feminino é o mais acometido por esta neoplasia (BATISTON, 2011). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou que no ano de 2014, 57.120 casos novos de tumores de mama serão diagnosticados, representando o tipo de câncer não cutâneo mais frequentemente diagnosticado. Observou-se também um aumento de 7,2 % em relação à estimativa do ano de 2012 (INCA, 2014).

A etiologia do câncer de mama ainda não foi revelada. Sabemos que alguns fatores, como incidência de radiações nocivas, produtos químicos teratogênicos, idade, peso e taxas hormonais, têm relevante influência na ocorrência de tumores de mama (BATISTON, 2011; RONCO; DE STEFANI; DENEOPELLEGRINI, 2012). Variações nos níveis hormonais causadas pela menarca precoce em meninas com idade de 11 anos ou inferior também contribuem para o aumento da incidência desses tumores (FRAZIER; ROSENBERG, 2013).

Um conjunto complexo de alterações moleculares está envolvido no processo de tumorigênese e desenvolvimento tumoral. Tais alterações podem conferir às células tumorais maior potencial proliferativo, evasão à apoptose, angiogênese sustentada e capacidade de invadir e formar metástases (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Sua progressão ocorre por estágios clínico-patológicos definidos, onde há início da hiperplasia epitelial atípica, seguida por carcinoma *in situ* e posteriormente por carcinoma invasivo, levando à doença metastática (BECKMANN et al., 1997). Além das alterações adquiridas pelas células neoplásicas, o microambiente onde elas se encontram também desempenha importante papel no processo de tumorigênese.

Dentre os componentes que fazem parte deste microambiente, a matriz extracelular (MEC) tem relevante importância. Esta é formada por uma complexa rede de moléculas que compõem os espaços extracelulares, sendo basicamente composta de colágenos, proteoglicanos e glicoproteínas (KIM; TURNBULL; GUIMOND, 2011).

A MEC influencia na progressão tumoral por conter enzimas proteolíticas, citocinas e moléculas regulatórias que podem estimular a progressão tumoral (LUKASHEV; WERB, 1998). Entre o epitélio e o tecido conjuntivo, a MEC forma a lâmina basal, estrutura delgada constituída por laminina, colágeno tipo IV, nidogênio e perlecan (AUMAILLEY et al., 2005).

Na lâmina basal, um dos principais componentes são as moléculas de laminina, compostas por três cadeias polipeptídicas α , β e γ . Até o momento, já foram identificadas 16 isoformas de laminina, que são originadas da combinação das 5 cadeias α , 3 cadeias β e 3 cadeias γ (AUMAILLEY, 2013). A laminina-111 é um heterodímero composto pelas cadeias $\alpha 1$, $\beta 1$ e $\gamma 1$, que já foi associado com adesão celular, secreção de proteases e metástases em células tumorais (GAMA-DE-SOUZA et al., 2008; KURATOMI et al., 2002).

As lamininas podem regular diversos processos biológicos associados ao câncer. Dentre esses processos, destacam-se proliferação celular, apoptose, diferenciação, (DALEY; PETERS; LARSEN, 2008) angiogênese, migração celular, invasão e metástase (ECCLES; WELCH, 2007). Parte desta regulação se dá através da modulação da expressão gênica (BLUM; ZEIGLER; WICHA, 1989), resultado da sinalização celular dependente da interação de proteínas da MEC com receptores celulares, principalmente integrinas (JONES; COHEN; CHAMBERS, 2002).

A laminina, assim como outras moléculas da matriz, possui sítios funcionais escondidos em sua estrutura íntegra e que não são expostos a menos que a molécula sofra mudança conformacional ou clivagem por proteases. Tais processos promovem a liberação de fragmentos e/ou peptídeos biologicamente ativos (FREITAS et al., 2004; SCHENK; QUARANTA, 2003).

Entre os peptídeos derivados da laminina que possuem atividade biológica está o peptídeo C16 (KAFDITYVRLKF). O peptídeo C16 (cadeia $\gamma 1$, laminina-111) auxilia na adesão celular (NOMIZU et al., 1997), promove angiogênese (PONCE; NOMIZU; KLEINMAN, 2001) e também induz a secreção de metaloproteinases (KURATOMI et al., 2002; SIQUEIRA, 2014; NASCIMENTO, 2011).

Estudo realizado em nosso Laboratório verificou que o peptídeo C16, localizado no braço curto da cadeia gama1 da laminina-111, influencia a expressão gênica de células derivadas de carcinoma ductal invasivo de mama (MDA-MB-231). Esse peptídeo estimulou, entre outros, a expressão dos genes GPNMB e SPOCK1 (DE SOUZA SANTOS, 2011).

O gene GPNMB codifica a proteína transmembrana GPNMB (osteoactivina), a qual está associada à maior migração celular, invasão, angiogênese e metástase de células de câncer de mama para tecido ósseo (ROSE et al., 2007). A expressão de

GPNMB confere às células tumorais características osteomiméticas, permitindo seu crescimento no tecido ósseo (ROSE et al., 2007).

SPOCK1 codifica um proteoglicano secretado denominado SPOCK ou testicam-1 (BERGER et al., 2011), cujo core proteico é semelhante à proteína SPARC (osteonectina). Acredita-se que a expressão do gene SPOCK1 esteja associada à adesão e migração celular (CHARBONNIER et al., 1998; GIUSTI et al., 2006). O aumento da expressão de SPOCK1 já foi associado à maior potencial metastático em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (ROEPMAN et al., 2005) e ao câncer gástrico (MARIMUTHU et al., 2011).

C16 induz aumento na expressão dos genes GPNMB e SPOCK1 em linhagens tumorais de mamárias (DE SOUZA SANTOS, 2011). No entanto o efeito desse peptídeo nos níveis das moléculas codificadas por GPNMB e SPOCK1 ainda não foram estudadas. Também acreditamos ser interessante avaliar os efeitos funcionais de C16 em linhagens mamárias, em especial no que diz respeito à invasividade tumoral. Por último, investigaremos o papel de GPNMB e SPOCK como biomarcadores em câncer de mama.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Na revisão de literatura, serão abordados os seguintes temas relacionados a esta dissertação: O câncer de mama, matriz extracelular e lâmina basal, laminina e seus peptídeos bioativos, peptídeo C16, GPNMB e SPOCK.

2.1 O câncer de mama

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

O câncer de mama é o tipo de câncer mais frequentemente diagnosticado e é conhecido por liderar o número de mortes entre as mulheres, chegando a 23% das mortes ocasionadas por todos os tipos de câncer (JEMAL et al., 2011). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2014, são esperados 57.120 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres. As taxas de incidência do câncer de mama variam entre as diferentes regiões do mundo, as maiores em 2012 foram na Europa Ocidental (96/ 100 mil) e as menores taxas foram na África Central e na Ásia Oriental (27/ 100 mil) (INCA, 2014).

A sobrevida vem aumentando nos últimos 40 anos nos países desenvolvidos e hoje a taxa de sobrevida ultrapassa 80% dos casos nos primeiros cinco anos. Nos países em desenvolvimento os valores são entre 50% e 60% (INCA, 2014). Há um aumento constante dos casos de incidência do câncer de mama, entretanto, também foi verificado que nos últimos anos houve uma diminuição da mortalidade causada pela neoplasia. Este fato deve-se as técnicas de rastreamento, como a mamografia, detecção precoce, assim como o aumento do conhecimento na biologia tumoral (SCHMITT, 2006).

Ainda é desconhecida a etiologia específica do câncer de mama, mas sabemos que alguns fatores têm relevante influência como, gênero, idade, taxas hormonais (menarca precoce e menopausa tardia), histórico familiar, incidência de radiações nocivas, produtos químicos teratogênicos e peso (BATISTON, 2011; RONCO; DE STEFANI; DENEIO-PELLEGRINI, 2012).

O gênero é o primeiro fator de risco de desenvolvimento do câncer de mama, segundo o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (*“National Cancer*

Institute” - NCI) somente 1% dos casos ocorrem no gênero masculino (<http://www.cancer.gov/>).

No câncer de mama a idade influencia a incidência. Estudos têm demonstrado que a incidência do câncer de mama em idade jovem é menor, porém, quando a neoplasia ocorre nessa faixa etária o prognóstico é pior (BEADLE; WOODWARD; BUCHHOLZ, 2011). Nas mulheres idosas a frequência do câncer de mama é maior, mas geralmente não são tão agressivos quanto em jovens (BATISTON, 2011). Os elevados níveis hormonais que ocorrem em situações de menstruação por longo período estão ligados ao aumento da incidência desta neoplasia (MSOLLY; GHARBI; BEN AHMED, 2013; RONCO; DE STEFANI; DENEOP-PELLEGRINI, 2012). Nessas situações de menstruação por longo período destacam-se menarca precoce, nuliparidade e menopausa tardia (WIDSCHWENDTER et al., 2013). Os hormônios esteróides são importantes no câncer de mama porque apresentam efeito mitogênico, induzindo nas células tumorais a expressão de genes envolvidos com o ciclo celular (KNUTSON; LANGE, 2014).

Aproximadamente 20% a 25 % dos pacientes com câncer de mama possuem um histórico familiar positivo. Contudo, mutações genéticas são responsáveis por apenas 5% a 10% dos casos de câncer de mama (SHAH; ROSSO; NATHANSON, 2014). Deleção em alelos de predisposição de alto risco, conferem elevado risco no desenvolvimento do câncer de mama, como as mutações estão nos genes *BRCA 1* e *BRCA 2* (GREEN, 2013). Mulheres com mutações nos genes *BRCA 1* ou *BRCA 2* têm um risco significativamente maior de desenvolver câncer de mama. (SHAH; ROSSO; NATHANSON, 2014; BATISON, 2011). Genes como *BRCA 1* e *BRCA 2* codificam proteínas supressoras de tumor que, quando mutados, deixam de exercer as suas devidas funções, sendo responsáveis por uma taxa de 60% de carcinoma de mama hereditário (GREEN, 2013).

Radiações ionizantes afetam diretamente ou indiretamente o genoma da célula irradiada causando assim uma ou mais mutações (GREEN, 2013). Estas mutações levam a ativação de genes de crescimento celular, evasão a apoptose, podendo iniciar a ativação de células pré-cancerígenas. As mudanças essenciais necessárias para a malignidade incluem a ativação de oncogene, perda de ambas as cópias de genes supressores de tumor (entre eles *BRCA 1* e *BRCA 2*) e aquisição de mutações necessárias para a invasão e metástase celular (DALEY; PETERS; LARSEN, 2008;

GREEN, 2013). Efeitos da radiação no desenvolvimento do câncer de mama foram observados no Japão após o ataque nuclear em Hiroshima e Nagasaki onde positivamente ocorreu o desenvolvimento da neoplasia em menores de 35 anos após exposição à radiação (SHAH; ROSSO; NATHANSON, 2014).

Evidências sugerem também uma relação entre o uso da terapia de reposição hormonal e o aumento do risco do câncer de mama. (SHAH; ROSSO; NATHANSON, 2014). Estudos recentes demonstram que há um aumento do número de pacientes com câncer de mama após terapia de reposição hormonal. Nesses casos, o risco de aumento desta neoplasia chega a 2,3% a cada ano de uso da reposição hormonal (HENDERSON; FEIGELSON, 2000).

Mudança do peso corporal afeta a incidência do câncer de mama. Dados clínicos e epidemiológicos demonstram que quando há um aumento de peso no indivíduo há um aumento do risco no surgimento de câncer de mama (BATISTON, 2011). Por outro lado, quando há uma diminuição do peso do indivíduo há uma diminuição do risco de câncer de mama (PLAYDON; MATTHEWS; THOMPSON, 2013). Hiperinsulinemia tem se mostrado como um fator de risco independente para o câncer de mama em mulheres pós-menopausa não diabéticas obesas, uma vez que a insulina promove a proliferação celular do câncer de mama o que poderia explicar a relação entre a obesidade e o câncer de mama (SHAH; ROSSO; NATHANSON, 2014).

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

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

Localizada sob o músculo superior na parede torácica superior a mama é composta de epitélio especializado e estroma. Este epitélio forma ductos ramificados a partir do mamilo, os quais se estendem por um estroma formado por tecido adiposo e tecido conjuntivo fibroso (COTRAN, 2005).

Na mama o epitélio estratificado queratinizado da pele sobrejacente segue dentro dos ductos e então muda abruptamente para um epitélio cuboide estratificado. Um tampão de queratina geralmente é encontrado no orifício do ducto. A parte da pele areolar que circunda é pigmentada e sua sustentação se dá pela presença de

musculatura lisa. A sucessiva ramificações dos ductos grandes leva à unidade ductolobular terminal (UDLT). A UDLT, também conhecida como lóbulo mamário, representa a porção secretória da glândula e, por isto, é considerada a unidade anátomo-funcional da mama. Na mulher adulta, as ramificações do ducto se diferenciam em aglomerados de pequenos ácinos, formando lóbulos. Um lóbulo consiste em vários ductos intralobulares que se unem em um ducto interlobular terminal. Cada lóbulo é imerso em tecido conjuntivo intralobular frouxo e muito celularizado, sendo que o tecido conjuntivo interlobular que separa os lóbulos é mais denso e menos celularizado. Cada sistema ductal ocupa tipicamente um quarto da mama e sobrepõem-se extensivamente sobre outros (COTRAN, 2005; JUNQUEIRA, 2013).

Em mama normal, lóbulos e ductos são formados por dois tipos diferentes de células. Primeiro é uma camada inferior, plana e descontínua de células contrateis contendo miofilamentos (células mioepiteliais) que ficam sobre a membrana basal. Essas células ajudam na liberação do leite durante a lactação e têm importante papel na manutenção da estrutura e função normais do lóbulo e da membrana basal. Os lóbulos são formados por células epiteliais arredondadas que durante o processo de amamentação tornam-se células cuboides devido a ação dos hormônios. Os lóbulos estão confinados por estroma mamário específico hormonalmente responsivo (COTRAN, 2005; JUNQUEIRA, 2013).

A mama não está completamente formada após nascimento. Alterações cíclicas durante a vida reprodutiva da mulher levam a evolução da mama. Por outro lado, na menopausa ocorre involução da glândula. As glândulas mamárias sofrem intenso crescimento durante a gravidez por ação sinérgica de vários hormônios, principalmente estrógenos, progesterona, prolactina e lactogênio placentário humano (COTRAN, 2005; JUNQUEIRA, 2013).

Como em outras células glandulares epiteliais, assim como a glândula mamária, têm inúmeras e distintas características histológicas incluindo morfologia polarizada, adesão célula-célula e célula-lâmina basal. O desenvolvimento e manutenção desta polarização celular é crítica para a funcionalidade das células epiteliais. Entretanto, nos carcinomas ocorre quebra desta estrutura organizada (DEBNATH; MUTHUSWAMY; BRUGGE, 2003).

Os carcinomas de mama têm sua origem em uma célula do epitélio glandular mamário que adquire uma ou mais mutações em genes que controlam programas essenciais, como proliferação, morte e diferenciação celular. Por apresentar vantagem seletiva, a célula transformada é selecionada e passa por uma expansão clonal, sendo que cada uma de suas células-filha tem o potencial de adquirir novas alterações moleculares. Os sucessivos eventos de alteração molecular, seleção e expansão clonal levam a um acúmulo de modificações genéticas e epigenéticas, induzindo a progressão tumoral (AXELROD; AXELROD; PIENTA, 2006). Ao final do processo de evolução tumoral, as células tumorais podem apresentar as seguintes características, como, potencial replicativo ilimitado, autossuficiência em fatores de crescimento, insensibilidade a fatores antiproliferativos, evasão à apoptose, angiogênese sustentada e invasão tecidual e metástase (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

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

Hiperplasia atípica de mama é caracterizada pela proliferação de células epiteliais divididas em hiperplasia ductal atípica e hiperplasia lobular atípica, onde seu diagnóstico se dá geralmente através de biópsias. A hiperplasia atípica é uma proliferação celular sem aspectos qualitativos e quantitativos onde forma uma lesão considerada pré-maligna associada com um alto risco de surgimento do câncer de mama, incluindo carcinoma *in situ* (COTRAN, 2005; SANTISTEBAN et al., 2010).

O carcinoma ductal *in situ* é composto de uma população de células malignas seja células provenientes do ducto ou células provenientes do lóbulo que estão limitadas pela lâmina basal. O carcinoma ductal *in situ* é uma proliferação clonal e envolve em geral, somente um único sistema ductal. Entretanto as células podem se propagar através dos ductos e formar uma nova lesão envolvendo todo o setor da mama (COTRAN, 2005).

Quando não diagnosticado anteriormente com a triagem mamográfica, o carcinoma invasivo apresenta-se como uma massa palpável de consistência firme. Nos casos de grandes tumores, os carcinomas invasivos podem instalar-se na parede torácica ou formar uma depressão na pele. Morfologicamente a lesão é bem

visualizada à mamografia e manifesta-se por densidade irregular e microcalcificações frequentes (COTRAN, 2005; DE SOUZA SANTOS, 2011).

Os carcinomas de mama disseminam-se por invasão local, linfática ou hematogênica. Apesar dos recentes avanços no diagnóstico precoce e estratégias de tratamento, o câncer de mama ainda é a principal causa de morte entre as mulheres, relacionando aproximadamente 40% de reincidência da doença através da metástase. Os locais favoráveis à disseminação são pulmões, ossos, fígado, adrenais, cérebro e meninges (CABINAKOVA; TESAROVA, 2012; COTRAN, 2005; DE SOUZA SANTOS, 2011).

A tabela a seguir mostra os diferentes tipos de neoplasias de mama, de acordo com a classificação proposta pela OMS, em 2012.

Tabela 1 - classificação morfológica dos diversos tipos de câncer de mama:

Tipos de tumores epiteliais	Tipos tumorais epiteliais raros	Proliferações epiteliais benignas
Carcinoma microinvasivo	Carcinoma com elementos neuroendócrinos	Adenose esclerosante
Carcinoma mamário invasivo	Tumor neuroendócrino bem diferenciado	Adenose apócrina
Carcinoma ductal invasivo, SOE	Carcinoma neuroendócrino pouco diferenciado	Adenose microglandular
Carcinoma tipo misto	Carcinoma com diferenciação neuroendócrina	
Carcinoma pleomórfico	Carcinoma secretor	
Carcinoma com células gigantes tipo osteoclasto	Carcinoma papilar invasivo	
Carcinoma com elementos coriocarcinomatosos	Carcinoma de células acinares	Cicatriz radial/lesão esclerosante complexa
Carcinoma com elementos melanóticos	Carcinoma mucoepidermoide	Adenomas
Carcinoma lobular invasivo	Carcinoma oncótico	Adenoma tubular
Carcinoma lobular clássico	Carcinoma rico em lipídeos	Adenoma lactante
Carcinoma lobular sólido	Carcinoma de células claras rico em glicogênio	Adenoma apócrino
Carcinoma lobular alveolar	Carcinoma sebáceo	Adenoma ductal
Carcinoma lobular pleomórfico		
Carcinoma túbulo-lobular	Tumores tipo glândula salivar/anexos cutâneos	Tumores mesenquimais
Carcinoma lobular misto	Cilindroma	Fasciite nodular
Carcinoma tubular	Hidroadenoma de células claras	Miofibroblastoma
Carcinoma cribriforme invasivo	Lesões precursoras	Fibromatose tipo desmoide
Carcinoma com elementos medulares	Carcinoma ductal <i>in situ</i>	Tumor miofibroblástico inflamatório
Carcinoma medular	Neoplasia lobular	Lesões vasculares benignas
Carcinoma medular atípico	Carcinoma lobular <i>in situ</i>	Hemangioma
Carcinoma invasivo SOE com elementos medulares	Carcinoma lobular <i>in situ</i> clássico	Angiomatose
	Carcinoma lobular <i>in situ</i> pleomórfico	Lesões vasculares atípicas
Carcinoma mucinoso	Hiperplasia lobular atípica	Hiperplasia pseudoangiomatosa do estroma
	Lesões proliferativas intraductais	Tumor de células granulares
	Hiperplasia ductal usual	Tumores benignos da bainha de nervo periférico
	Lesões de células colunares	Neurofibroma
	Atipia epitelial plana	Schwanoma
	Hiperplasia ductal atípica	Lipoma
Carcinoma com diferenciação em células em anel de sinete	Carcinoma ductal <i>in situ</i>	Angiolipoma
	Tumores epiteliais/mioepiteliais	Lipossarcoma
	Adenoma pleomórfico	Angiossarcoma
	Adenomioepitelioma	Rabdomiossarcoma
	Adenomioepitelioma com carcinoma	Osteossarcoma
	Carcinoma adenoide cístico	Leiomioma
		Leiomiiossarcoma
	Lesões papilares	
Carcinoma micropapilar invasivo	Papiloma intraductal	
Carcinoma com diferenciação apócrina	Papiloma intraductal com hiperplasia atípica	
Carcinoma metaplásico sem tipo especial	Papiloma intraductal com carcinoma ductal <i>in situ</i>	
Carcinoma adenoescamoso de baixo grau	Papiloma intraductal com carcinoma lobular <i>in situ</i>	
Carcinoma metaplásico fibromatose-símile	Carcinoma papilífero intraductal	
Carcinoma de células escamosas	Carcinoma papilífero encapsulado	
Carcinoma de células fusiformes	Carcinoma papilífero encapsulado com invasão	
Carcinoma metaplásico com diferenciação mesenquimal	Carcinoma papilífero sólido	
Diferenciação condroide	<i>In situ</i>	
Diferenciação óssea	Invasivo	
Diferenciação em outros tipos mesenquimais		
Carcinoma metaplásico misto		
Carcinoma mioepitelial		

FONTE: Classificação dos tumores de mama segundo a OMS. (Adaptado por LAKHANI, 2012 e GIOBBI, 2012).

Além da classificação morfológica o câncer de mama também possui uma classificação molecular. Clinicamente os níveis proteicos dos receptores de estrogênio alfa (ER α), receptor de progesterona (PR) e receptor de fator de crescimento HER2 (“*human epidermal growth factor receptor 2*”) são utilizados como os primeiros biomarcadores para tratamento no câncer de mama. (KNUTSON; LANGE, 2014).

Sendo assim, o câncer de mama é caracterizado em quatro grupos principais: luminal A, luminal B, HER2 e “*basal-like*” (RIVENBARK; O'CONNOR; COLEMAN, 2013).

Tumores do tipo luminal A, são característicos pelos altos níveis de receptores para ER e PR e ausência de HER2. Neoplasias do tipo luminal B usualmente possuem altos níveis de receptores para ER, entretanto os níveis de PR são reduzidos; e presença de HER2 (RIVENBARK; O'CONNOR; COLEMAN, 2013). O subtipo molecular HER2 exibe um alto nível desse receptor, e níveis baixos ou ausentes de ER e PR. Tumores de mama tipo “*basal-like*” raramente apresentam receptores para ER, PR ou HER2 (KNUTSON; LANGE, 2014), sendo chamados também de câncer triplo-negativo.

Aproximadamente 75% de todos os tumores de mama são identificados como luminal A ou luminal B. Câncer de mama do tipo “*basal-like*” representa aproximadamente 15% de todos os tipos de cânceres de mama. Esse subtipo molecular possui alta taxa de proliferação celular e prognóstico extremamente pobre (RIVENBARK; O'CONNOR; COLEMAN, 2013).

Além da classificação morfológica e molecular, os tumores de mama também possuem a classificação baseada no sistema clínico universal TNM. Onde a letra *T* representa o tamanho do tumor medido em centímetros, a variação crescente do tumor é representada por números de 0 a 4. A letra *N* é utilizada para demonstrar a presença ou ausência de metástase nos linfonodos, podendo estar presente em linfonodos locais ou distante da lesão primária, a variação do tamanho e expansão desta metástase nos linfonodos é dada pela numeração que segue de 0 a 3. Por fim a letra *M* é utilizada para identificar se há presença de metástase a distância (designada como M1) ou ausência (designada como M0) (INCA, 2014). A tabela a seguir mostra essa a classificação por estadiamento:

Tabela 2 - Classificação de Tumores malignos de câncer de mama por estádios.

Grupamento por Estádios			
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1*	N0	M0
Estádio IIA	T0	N1	M0
	T1*	N1	M0
	T2	N0	M0
Estádio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estádio IIIA	T0	N2	M0
	T1*	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Estádio IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Estádio IIIC	Qualquer T	N3	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Nota: * T1 inclui o T1mic.

FONTE: TNM Classificação de Tumores Malignos (INCA, 2014).

2.2 Matriz extracelular e a lâmina basal.

2.2.1 Matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) presente nos tecidos possui componentes que tem relevante importância na biologia dos tecidos assim como no câncer de mama. Este microambiente é formado por uma complexa rede macromolecular tridimensional presente nos espaços extracelulares (LIU; XU, 1996).

A matriz extracelular pode ser dividida em matriz intersticial e lâmina basal. Aqui, abordaremos aspectos gerais da matriz extracelular, já a lâmina basal, uma especialização da MEC, será discutida no tópico a seguir.

A função da MEC não é somente estrutural mas também têm função de comunicação e instrução aos tecidos e as células. A matriz extracelular transmite

sinais das células para a MEC e vice e versa. Tais sinais regulam adesão celular, migração, proliferação, diferenciação e sobrevivência (LU; WEAVER; WERB, 2012; SCHENK; QUARANTA, 2003). Cada tecido possui uma MEC específica e importante, sendo secretada localmente por células como fibroblastos, células epiteliais, adipócitos e células endoteliais (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010). A MEC exerce relevantes funções biofísicas e bioquímicas nas células e tecidos (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010).

A MEC é uma rede tridimensional formada por moléculas como, colágeno, elastina, fibronectina, laminina, proteoglicanos, fatores de crescimento, glicosaminoglicanos (GAGs) e polissacarídeos com diferentes propriedades físicas e bioquímicas (HYNES; NABA, 2012). Devido ao grande tamanho e a presença de vários sítios de ligação das moléculas presentes na MEC, uma única molécula pode exercer mais de uma função ao mesmo tempo (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010; SCHENK; QUARANTA, 2003).

O colágeno é a proteína mais abundante nos mamíferos, até o momento são conhecidas 28 isoformas de colágeno codificadas por 45 genes em humanos. Formado por pelo menos um domínio triplo-helicoidal, sua principal característica é conter o aminoácido glicina repetido a cada terceira posição da sequência em sua estrutura molecular (RICARD-BLUM, 2011). Colágenos em humanos são agrupados em isoformas e numerados, levando a uma classificação molecular dependendo da sua estrutura e função podendo ser dividido em, colágenos formadores de longas fibras, colágenos associados a fibrilas, colágenos que formam redes e colágeno de ancoragem. O colágeno tem papel estrutural e contribui com propriedades mecânicas, organização e forma dos tecidos além de interagir com as células através de receptores levando a adesão celular, angiogênese e desenvolvimento (BLUM; ZEIGLER; WICHA, 1989; HYNES; NABA, 2012; SINGH et al., 2012).

Associado com as fibras de colágeno presente na MEC podemos encontrar as fibras de elastina, que fornecem elasticidade aos tecidos incluindo artérias, pulmão, tendão, pele e cartilagem elástica (WISE; WEISS, 2009). A elastina é secretada como tropoelastina (precursor da elastina) pelas células presentes na MEC. Essa secreção ocorre sobre molde fibrilina presente no tecido. Em seguida são formadas redes de elastina, dependentes de ligações cruzadas por pontes de desmosina e a isodesmosina. Nessas pontes são formadas ligações covalentes entre resíduos de

lisina, que são responsáveis pela consistência elástica da molécula (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010; WISE; WEISS, 2009).

Os proteoglicanos consistem de um core proteico linear, onde estão covalentemente ligados a cadeias carregadas negativamente de polissacarídeos conhecidos como glicosaminoglicanos (GAGs), (IOZZO; BOLENDER; WIGHT, 1982). Os proteoglicanos são compostos por cadeias repetidas de dissacarídeos e entre os subtipos de GAGs, podendo ser associado com um ou mais tipos das seguintes cadeias de GAGs; sulfato de dermatam, sulfato de condroitim, sulfato de queratam e sulfato de heparam (IOZZO, 1984). Por serem carregados negativamente, os GAGs atraem cátions, principalmente Na⁺, além de grande quantidade de moléculas de água. Além de atuar como componentes estruturais da matriz extracelular e de ancorar células a matriz, tanto os proteoglicanos de superfície quanto aqueles presentes na matriz extracelular ligam-se a fatores de crescimento, tal como TGF- β ("*transforming growth factor beta*" – TGF- β) (ELFENBEIN; SIMONS, 2010; IOZZO, 1984; IOZZO; BOLENDER; WIGHT, 1982).

A fibronectina é uma glicoproteína adesiva sintetizada pelos fibroblastos e algumas células epiteliais. Pode estar presente nas células e também no plasma. Essa molécula tem massa molecular de 222 a 240 kDa, sendo caracterizada por dímeros unidos por ponte dissulfeto. Cada dímero contém os módulos FN1, FN2 e FN3. Apresenta sítios de ligação para células (RGD), colágeno e glicosaminoglicanos. Interações nestes sítios auxiliam na organização da MEC intersticial, além de regular adesão e migração celular (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010; HYNES; ZHAO, 2000; RUOSLAHTI; ENGVALL, 1978).

As células respondem a mudanças bioquímicas e mecânicas na MEC através de proteínas que interagem com a MEC e o citoesqueleto. Essas proteínas são denominadas integrinas (HYNES, 1987). Composto por duas subunidades, α e β , as integrinas funcionam como um elo transmembrânico que se liga, por meio de seu domínio extracelular as moléculas da MEC, e pelo seu domínio citoplasmático, a filamentos de actina. Com isto regulam adesão celular e geram sinalização celular de forma a integrar a célula a seu microambiente (HYNES, 2004; LU; WEAVER; WERB, 2012). Há uma grande variedade de subtipos de integrinas, os quais apresentam preferências por ligantes distintos. As células de carcinoma podem modificar a

expressão destes subtipos, favorecendo a expressão daqueles que estimulam a evolução tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Embora conhecido como uma estrutura estável que tem um papel crucial na morfologia e manutenção do tecido, a MEC possui um papel versátil e dinâmico que é fundamental em vários aspectos da biologia celular. Através de meios diretos e indiretos, a MEC regula quase todo o comportamento celular e seu papel para o desenvolvimento é indispensável (LU; WEAVER; WERB, 2012). A adesão celular a MEC modula a expressão e o estado de funcionamento de inúmeros reguladores de ciclo celular, incluindo ciclinas dependentes de quinases como CDK2 e CDC2, ciclinas A, B, D e E, ciclinas dependentes de inibidores de kinases p21 e p27 e Rb (LUKASHEV; WERB, 1998). A MEC pode também é considerada um reservatório de fatores de crescimento e outros fatores que estão envolvidos no ciclo celular. Estes fatores, ao serem liberados, podem interagir com seus receptores celulares (DE SOUZA SANTOS, 2011; KIM; TURNBULL; GUIMOND, 2011).

A formação e funcionamento normal dos tecidos multicelulares, necessita a correta expressão e função dos genes assim como as moléculas codificadas por estes genes uma vez que estes controlam as interações das células com a matriz extracelular. Mutações nos genes que codificam as proteínas da MEC e receptores podem levar ao desenvolvimento do câncer (LUKASHEV; WERB, 1998).

2.3 Lâmina basal, laminina e seus peptídeos bioativos.

2.3.1 A lâmina basal

A lâmina basal é uma especialização da matriz extracelular que mede 20 a 100nm de espessura e encontra-se entre as células epiteliais e o tecido conjuntivo subjacente. Presentes em vários tecidos como, células epiteliais, musculares, adiposas e Schwann (YURCHENCO, 2011).

A lâmina basal é feita de diversas moléculas dependendo do tecido em qual está localizado. Devido à descoberta de novos componentes moleculares assim como as suas respectivas isoformas a complexidade na composição da lâmina basal tem aumentado consideravelmente, fornecendo um número impressionante de tecidos com lâminas basais específicas (KRUEGEL; MIOSGE, 2010). A secreção dos

componentes da lâmina basal é realizada pelas células epiteliais, musculares, adiposas e de Schwann em alguns casos, fibras reticulares que são produzidas por células do tecido conjuntivo estão intimamente associados à lâmina basal, constituindo a lâmina reticular. O termo membrana basal é utilizado para descrever a estrutura composta pela lâmina basal e fibrilas de ancoragem (BREITKREUTZ et al., 2013; HASHMI; MARINKOVICH, 2011).

A lâmina basal é definida morfolologicamente por sua característica elétron-densa nas eletromicrografias e por sua composição bioquímica. Entre os principais componentes inclui o colágeno tipo IV, a laminina, o nidogênio (entactina) e o perlecan, um proteoglicano de heparan sulfato. A função da lâmina basal no desenvolvimento embrionário, homeostase dos tecidos e em doenças tem sido observado em vários estudos (HOHENESTER; YURCHENCO, 2013; KIM; TURNBULL; GUIMOND, 2011; KRUEGEL; MIOSGE, 2010).

Estas moléculas possuem diferentes isoformas em sua estrutura, que permite a elas formar uma rede, permitindo variações na sua estabilidade e estrutura final (YURCHENCO, 2011). O colágeno do tipo IV é a uma das moléculas mais abundante na lâmina basal. As moléculas de colágeno tipo IV se polimerizam e dão origem a uma rede de colágeno (KRUEGEL; MIOSGE, 2010). A laminina possui 16 isoformas e é o maior componente na lâmina basal, esta glicoproteína associa-se entre si e interage com a o colágeno do tipo IV na lâmina basal através do nidogênio e perlecan. A laminina tem um papel fundamental na formação da lâmina basal. Ausência de laminina impede a formação e desenvolvimento da lâmina basal como um todo (KIM; TURNBULL; GUIMOND, 2011; SIMON-ASSMANN, 2013; YURCHENCO, 2011).

As lâminas basais possuem várias funções; uma das principais é promover a adesão das células epiteliais ao tecido conjuntivo subjacente, filtrar moléculas, influenciar na polaridade das células, regular a proliferação celular e diferenciação. Além disso, há o fato de se ligarem a fatores de crescimento influenciando o metabolismo celular (KLEINMAN et al., 1986; YURCHENCO; AMENTA; PATTON, 2004).

Durante o desenvolvimento normal células especializadas atravessam a lâmina basal em um processo conhecido como invasão celular da lâmina basal. Exemplos incluem a gastrulação, implantação do trofoblasto, migração dos mioblastos e células da crista neural entre outros. A invasão celular é também um passo chave na patologia

em muitas doenças, incluindo asma, artrite reumatóide e câncer (HAGEDORN; SHERWOOD, 2011). A invasão celular envolve interações entre as células, o tecido que é invadido e a lâmina basal que separa este tecido. Desta forma, durante o processo de invasão tumoral, a lâmina basal é o primeiro obstáculo que a célula neoplásica epitelial deve romper para atingir o tecido conjuntivo (SCHENK; QUARANTA, 2003). Com a clivagem proteolítica realizada pelas metaloproteinases de matriz entre elas as MMPs, ocorre uma fragmentação da lâmina basal no local de invasão facilitando assim o processo (DE SOUZA SANTOS, 2011; KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010). Entre as moléculas da lâmina basal que sofrem clivagem proteolítica durante a invasão do tumor estão as lamininas, discutidas no tópico a seguir.

2.3.2 *Laminina*

A laminina foi identificada em 1979 por *Timpl* e colaboradores, depois de ser isolada e purificada a partir de uma neoplasia de camundongo dotada de grande quantidade de membrana basal, o tumor Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) (TIMPL et al., 1979).

As lamininas são glicoproteínas com alto peso molecular (400 a 900 kDa) heterotriméricas, ou seja, compostas por três cadeias polipeptídicas diferentes, (α , β e γ) que se organizam formando uma estrutura cruciforme (KRUEGEL; MIOGGE, 2010). Observação de moléculas purificadas da laminina através de microscopia eletrônica, mostra três cadeias entrelaçadas, uma com um braço longo contendo um grande domínio globular na sua porção final mais três braços curtos cada um contendo um domínio globular na sua porção final. Entre o centro da cruz e o final dos braços curtos há de um a dois domínios globulares adicionais (AUMAILLEY, 2013; MARTIN; TIMPL, 1987; MINER; YURCHENCO, 2004).

A laminina está dentro de uma família onde possui isoformas provenientes da combinação de três cadeias diferentes, sendo elas α , β e γ . A função da cadeia α está relacionada a interação com receptores e adesão celular. As subunidades β e γ possuem papel de estruturação, podendo também fazer ligações ao nidogênio e auxiliar na polimerização da laminina (YURCHENCO, 2011). A distribuição das cadeias da laminina é tecido específica, podendo ocorrer alterações destas cadeias

durante processos de desenvolvimento e também processos patológicos (AUMAILLEY, 2013). Até o presente momento são conhecidos cinco genes distintos para a cadeia α quatro para a cadeia β e três para a cadeia γ (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003; COLOGNATO; YURCHENCO, 2000; DURBEEJ, 2010; MINER; YURCHENCO, 2004). As combinações destas cadeias teoricamente permitiriam 45 formações heterotriméricas, descartando a variantes de *splicing*. Contudo, o número de combinações conhecidas até o presente momento é bem menor, devido as especificidades de ligações entre estas cadeias (COLOGNATO; YURCHENCO, 2000; MACDONALD et al., 2010).

São conhecidas atualmente 16 isoformas de lamininas. Sua organização e interação com diversos receptores são especificidades que permitem uma variação na sua estrutura final que por sua vez, sinaliza e permite a estabilidade da lâmina basal YURCHENCO, 2011). Para a classificação destas isoformas utiliza-se numerações compostas que representam as cadeias pelas quais são formadas (α , β e γ). Por exemplo, a laminina-111 (antiga laminina-1), é assim chamada por ser composta pelas cadeias $\alpha 1$, $\beta 1$ e $\gamma 1$. Já a laminina-332 (antiga laminina-5), recebe este nome por ser formada pelas cadeias $\alpha 3$, $\beta 3$ e $\gamma 2$ (AUMAILLEY et al., 2005).

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

Tabela 3 - Isoformas da laminina e suas respectivas cadeias.

Antiga Nomenclatura	Nova Nomenclatura	Cadeias
<i>Laminina-1</i>	Laminina-111	$\alpha 1\beta 1\gamma 1$
<i>Laminina-2</i>	Laminina-211	$\alpha 2\beta 1\gamma 1$
<i>Laminina-3</i>	Laminina-121	$\alpha 1\beta 2\gamma 1$
<i>Laminina-4</i>	Laminina-221	$\alpha 2\beta 2\gamma 1$
<i>Laminina-5</i>	Laminina-332	$\alpha 3\beta 3\gamma 2$
<i>Laminina-6</i>	Laminina-311	$\alpha 3\beta 1\gamma 1$
<i>Laminina-7</i>	Laminina-321	$\alpha 3\beta 2\gamma 1$
<i>Laminina-8</i>	Laminina-411	$\alpha 4\beta 1\gamma 1$
<i>Laminina-9</i>	Laminina-421	$\alpha 4\beta 2\gamma 1$
<i>Laminina-10</i>	Laminina-511	$\alpha 5\beta 1\gamma 1$
<i>Laminina-11</i>	Laminina-521	$\alpha 5\beta 2\gamma 1$
<i>Laminina-12</i>	Laminina-213	$\alpha 2\beta 1\gamma 3$
<i>Laminina-13</i>	Laminina-323	$\alpha 3\beta 2\gamma 3$
<i>Laminina-14</i>	Laminina-423	$\alpha 4\beta 2\gamma 3$
<i>Laminina-15</i>	Laminina-523	$\alpha 5\beta 2\gamma 3$

FONTE: (AUMAILLEY et al., 2005; COLOGNATO; YURCHENCO, 2000; DURBEEJ, 2010).

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

Adesão de células epiteliais malignas à laminina foi a primeira atividade biológica demonstrada para essa proteína na progressão tumoral (MALINDA; KLEINMAN, 1996). A laminina também mostrou atividade quimiotática, o que poderia explicar sua habilidade em estimular os movimentos celulares necessários aos processos de invasão e metástase (MALINDA; KLEINMAN, 1996; MARTIN; TIMPL, 1987). Além disto, células tumorais co-injetadas com laminina em ratos atímicos

promoveram aumento da formação de colônias metastáticas no pulmão (IWAMOTO et al., 1987).

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

Ao contrário de muitos tecidos adultos normais que perdem a expressão da laminina-111 por deixarem de expressar a cadeia $\alpha 1$, a glândula mamária normal expressa esta isoforma de laminina. Acredita-se que isto seja devido ao fato de a mama humana permanecer em constantes mudanças durante ciclos menstruais, puberdade, gravidez e menopausa, sendo assim, um órgão em constante desenvolvimento (GUDJONSSON et al., 2005). Na glândula mamária, a laminina-111 exerce papel chave na determinação da polaridade das células epiteliais lumbais. Ela é sintetizada principalmente pelas células mioepiteliais. A cadeia $\alpha 1$ da laminina-111 é a principal responsável pela determinação da polaridade das células epiteliais (GUDJONSSON et al., 2005; KLEIN et al., 1988). Além da laminina-111, a lâmina basal da glândula mamária também apresenta a laminina-332, laminina-511 e laminina-521. Entretanto, ao contrário da laminina-111, as outras isoformas não são capazes de induzir polaridade das células lumbais (BISSELL; BILDER, 2003).

Dissecção bioquímica revelou que algumas das funções da laminina estão relacionadas a domínios específicos, demonstrando que diferentes partes desta molécula podem exercer efeitos diferentes nas células (FAISAL KHAN et al., 2002). Adicionalmente, estudos evidenciaram que pequenas sequências de aminoácidos derivadas da laminina são capazes de estimular funções biológicas. Essas sequências são conhecidas como peptídeos bioativos e algumas das funções que exercem não são iguais as da laminina em sua forma intacta (DAVIS et al., 2000; HANDSLEY; EDWARDS, 2005; SCHENK; QUARANTA, 2003).

2.3.3 *Peptídeos bioativos da laminina*

A laminina possui atividade biológica que pode estimular tanto as células normais quanto as células tumorais. Devido esta característica da laminina, desperta o interesse em estudar e conhecer melhor os seus diferentes sítios ativos presente nesta molécula. Com isto, diversos fragmentos proteolíticos e peptídeos sintéticos que correspondem a vários domínios da laminina vem sendo utilizados para analisar os seus efeitos biológicos e assim demonstrar o efeito biológico multifuncional desta proteína (KIKKAWA et al., 2011).

Alguns dos sítios bioativos da laminina não estão expostos na superfície da molécula íntegra. Neste caso, são denominados de sítios matricrípticos ou matricriptinas. A ativação das funções biológicas exercidas pelos sítios crípticos requer mudança conformacional da molécula íntegra ou processamento proteolítico por proteases presentes na MEC, incluindo as MMPs. Ambos os processos expõem os sítios crípticos, que então se tornam disponíveis para reconhecimento por receptores celulares e, assim, podem exercer suas funções biológicas. Mudanças conformacionais na molécula íntegra podem ocorrer através de forças mecânicas geradas por células e ligação a outras moléculas, incluindo receptores celulares (SCHENK; QUARANTA, 2003).

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

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

caracterizados como moduladores da progressão de tumores malignos (KIKKAWA et al., 2013).

Entre os primeiros peptídeos derivados da laminina com efeito biológico está o YIGSR. Presente na cadeia $\beta 1$ este peptídeo possui atividade de inibição e progressão tumoral (GRAF et al., 1987; IWAMOTO et al., 1987). Experimentos *in vivo*, demonstraram que o peptídeo bloqueia a formação metástases nos ossos e nos pulmões, assim como inibe angiogênese (FRIDMAN et al., 1990; GRANT et al., 1989; NAKAI et al., 1992). Conjugação de YIGSR com lipossomos tem sido utilizado para administração direcional de drogas quimioterápicas (DUBEY; SINGODIA; VYAS, 2010), e também como radiofármaco para a localização de tumores (HU et al., 2005).

O peptídeo AG73, localizado no quarto domínio globular (LG4) da cadeia $\alpha 1$ da laminina foi identificado por Nomizu et al. (2000) como sendo um peptídeo altamente adesivo (NOMIZU et al., 2000). Posteriormente, os efeitos de AG73 foram testados em várias células e sistemas, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (ENGBRING et al., 2002; HOFFMAN et al., 1998; IKEMOTO et al., 2006). Estudos mostraram que AG73 tem grande relevância em biologia tumoral (ENGBRING et al., 2002; MOCHIZUKI et al., 2007; SONG et al., 1997; SUZUKI et al., 2003). Por exemplo, quando co-injetado com células de melanoma B16-F10 em camundongos, esse peptídeo promoveu maior número de metástases em pulmões, fígado e tecido ósseo (ENGBRING et al., 2008; KIM et al., 1998; SONG et al., 1997). Adicionalmente, esse peptídeo também está relacionado à angiogênese (MOCHIZUKI et al., 2007). Nosso laboratório também demonstrou que AG73 é capaz de regular a morfologia de células derivadas de neoplasias de glândula salivar (GAMA-DE-SOUZA et al., 2008), promover migração, invasão e secreção de proteases em carcinoma epidermoide oral através da interação com os receptores sindecana-1 e integrina $\beta 1$ (SIQUEIRA et al., 2010) e promover atividade de adesão e secreção de proteases através da interação com os receptores supracitados em linhagens celulares derivadas de carcinoma adenoide cístico e mioepitelioma humanos (GAMA-DE-SOUZA et al., 2008).

No braço longo da subunidade $\alpha 1$ da laminina está o peptídeo SIKVAV. Este peptídeo encontra-se acima do domínio globular (TASHIRO et al., 1989). Funções como adesão, migração, crescimento tumoral, secreção de MMPs, angiogênese e indução de metástase experimental já foram associadas ao peptídeo em modelos experimentais (KANEMOTO et al., 1990; NOMIZU et al., 1992; SWEENEY et al., 1991;

TASHIRO et al., 1989). Trabalhos realizados pelo nosso grupo demonstrou que o peptídeo SIKVAV induz secreção de MMPs em células derivadas de carcinoma adenóide cístico (FREITAS et al., 2004; FREITAS et al., 2007). Trabalhos que envolvem engenharia de biomateriais para regeneração tecidual no sistema nervoso central empregam a utilização deste peptídeo (ITOH et al., 2003).

2.4 Peptídeo C16

O peptídeo C16 (KAFDITYVRLKF) está presente no primeiro domínio globular da cadeia $\gamma 1$ da laminina (NOMIZU et al., 1997). A localização dos peptídeos principais da laminina assim como o peptídeo C16 pode ser visto no diagrama abaixo:

Diagrama 1 - Laminina-11 e seus peptídeos bioativos.

FONTE: (AUMAILLEY, 2013; DURBEEJ, 2010; GRAF et al., 1987; NOMIZU et al., 1998).

Até o momento, não está claro se este peptídeo representa um sítio matricríptico ou se está exposto na molécula íntegra da laminina. No caso de ser um sítio matricríptico, C16 poderia ser liberado para exercer suas funções durante a

degradação da lâmina basal (PONCE; NOMIZU; KLEINMAN, 2001), que é uma das primeiras etapas do processo de invasão tumoral, cicatrização e remodelamento tecidual (GHOSH; STACK, 2000; SCHENK; QUARANTA, 2003).

Já foi demonstrado que C16 estimula o crescimento de neuritos, diferenciação de hepatócitos, diminuição na formação e diferenciação de ácinos, secreção de MMPs e formação de metástases pulmonares de células de melanoma (KIKKAWA et al., 2011; KURATOMI et al., 2002; PONCE; NOMIZU; KLEINMAN, 2001). Além do mais, C16 é capaz de prevenir infiltração leucocitária e inflamação em modelos de encefalomielite alérgica (FANG et al., 2013), induzir migração extravascular de células de melanoma (LUGASSY et al., 2007), bem como estimular a hiperpolarização de membranas em linhagem celular híbrida de neuroblastoma e glioblastoma (KOWTHA et al., 1998). Sua notável atividade pró-angiogênica (PONCE et al., 2003; PONCE; NOMIZU; KLEINMAN, 2001) estimulou a conjugação deste peptídeo a implantes poliméricos utilizados em regeneração tecidual, com resultados satisfatórios (OTAGIRI et al., 2013).

2.5 GPNMB e SPOCK

2.5.1 Glicoproteína Transmembrana não-metastática B/GPNMB

Estudo realizado em nosso Laboratório verificou que o peptídeo C16, localizado no braço curto da cadeia $\gamma 1$ da laminina-111, regula a expressão de genes diferenciada em células derivadas de câncer de mama MDA-MB-231 entre os genes estavam o gene GPNMB (configura a proteína osteoactivina ou GPNMB) e o gene SPOCK1 (que configura o proteoglicano testicam-1 ou SPOCK) (DE SOUZA SANTOS, 2011).

O gene GPNMB codifica uma glicoproteína transmembrana não-metastática B também conhecida como GPNMB ou Osteoactivina (AO). GPNMB consiste ao menos em três diferentes domínios: um domínio N-terminal com peptídeo sinal, um domínio de doença renal policística PKD (*“polycystic kidney disease domain”* – PKD) e um domínio transmembrana TRD (*“transmembrane domain”* – TRD). A proteína também

contém um domínio de ligação de célula RGD (“*Arg-Gly-Asp*” – RGD) (ZHOU et al., 2012).

Diagrama 2 - Glicoproteína Transmembrana não-metastática B/GPNMB.

FONTE: Adaptado de MARIC et al., 2013.

Inúmeros estudos têm demonstrado que GPNMB está presente em uma ampla variedade de tecidos normais incluindo ossos, sistema hematopoiético e pele. Nos ossos, GPNMB promove a diferenciação de osteoclastos e osteoblastos. No sistema imunológico GPNMB estão presentes células como macrófagos e células dendríticas. Na pele GPNMB é expresso em melanócitos, mas alguns autores também relatam a presença de GPNMB em queratinócitos e células de Langerhans (MARIC et al., 2013; ROSE et al., 2010a; ROSE et al., 2010b).

Além disso, expressão ectópica de GPNMB também está ligado com inúmeros cânceres agressivos, incluindo melanoma cutâneo, carcinoma hepatocelular, glioma e câncer de mama (ROSE et al., 2010b). A expressão de GPNMB nos tumores está associada à maior migração celular, invasão, angiogênese e metástase de células de câncer de mama para tecido ósseo (ROSE et al., 2007). A expressão de GPNMB

confere às células tumorais características osteomiméticas, permitindo seu crescimento no tecido ósseo (ROSE et al., 2007). De fato o aumento da expressão de GPNMB nas células aumenta o fenótipo invasivo das células tanto *in vivo* quanto *in vitro* (FIORENTINI et al., 2014).

Além disso, tumores “*basal-like*” (antigamente chamado de triplo-negativo devido à ausência de receptores na superfície celular para progesterona, estrogênio e HER2), constituem subtipo de câncer de mama de difícil tratamento devido à ausência de alvos para os quimioterápicos. Assim, há um grande interesse em identificar um marcador molecular para estes tumores agressivos. Dado seu papel como um mediador de metástase e devido a sua presença na superfície da célula, estudos sugerem que devido os altos níveis de GPNMB em tumores do tipo “*basal-like*”, GPNMB poderia ser usado como um marcador molecular como alvo para drogas específicas em futuros tratamentos (FIORENTINI et al., 2014; MARIC et al., 2013; ROSE et al., 2010b).

2.5.2 *Testicam-1/SPOCK*

Além de aumentar a expressão gênica de GPNMB em células derivadas de câncer de mama (MDA-MB-231) o peptídeo C16 também aumentou a expressão gênica de SPOCK1.

O gene SPOCK1 codifica um proteoglicano previamente identificado como SPOCK ou *Testicam-1*. Este proteoglicano contém cadeias de glicosaminoglicanos sulfato de condroitim e sulfato de heparam presente em no domínio do tipo V (CHARBONNIER et al., 1998). SPOCK faz parte de um subgrupo (*testicam-1*, -2 e -3) que contém um core proteico semelhante a proteína SPARC (“*acidic and rich in cysteine*” – SPARC) que tem função de ligação com cálcio (BERGER et al., 2011; CHARBONNIER et al., 2000). Na sua estrutura molecular além do domínio ligante de cálcio (EC) e as cadeias de GAGs, podemos observar a sequência de peptídeo sinal, presença de um domínio único, um domínio do tipo folistatina (FS) onde também está presente o domínio do tipo Kazal, rico em cisteína e domínio do tipo tireoglobulina (TY) (NAKADA et al., 2001; ROLL et al., 2006).

Diagrama 3 - Testicam-1/SPOCK

FONTE: Baseado no Banco de Dados ExPasy (<http://www.expasy.org/>) e adaptado de CHARBONNIER et al., 2000; NAKADA et al., 2001.

Muitos estudos tem demonstrado que SPOCK regula o desenvolvimento do cérebro e o bloqueio do proteoglicano impede o crescimento de células neuronais. Também é conhecido, que SPOCK fora o testículo, está limitado ao cérebro e o sistema nervoso, principalmente nas células piramidais do hipocampo (MARR; EDGELL, 2003; ROLL et al., 2006). Entretanto outros estudos demonstram a presença de SPOCK em células endoteliais e condrócitos (BONNET et al., 1996). A expressão gênica de SPOCK1 no sistema nervoso periférico está ligada com processo de migração e diferenciação de neurônios (CHARBONNIER et al., 1998).

Dentro do câncer o papel de SPOCK não está estabelecido, entretanto observou-se que o aumento da expressão do gene SPOCK1 esteja associada à adesão e migração celular (CHARBONNIER et al., 2000; GIUSTI et al., 2006). O aumento da expressão de SPOCK1 já foi associado à maior potencial metastático em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (ROEPMAN et al., 2005) e ao câncer gástrico (MARIMUTHU et al., 2011). Além disso, SPOCK junto com pro-MMP2 interfere na ativação de MT1-MMP e MT3-MMP (NAKADA et al., 2001).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo Geral

Investigar o papel do peptídeo C16, derivado da laminina-111, regulando a expressão de potenciais biomarcadores do câncer de mama.

3.1.1 Objetivo específicos

- 1) Avaliar, através de “*immunoblot*”, os níveis de GPNMB e SPOCK em linhagens mamárias tratadas com o peptídeo C16. Essas linhagens são derivadas de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 (“*basal-like*”); e adenocarcinoma de mama MCF-7 (luminal B, HER2 positivo). Comparativamente, utilizaremos também a linhagem normal de mama MCF-10A.
- 2) Correlacionar os níveis moleculares e função celular, investigando se o peptídeo C16 induz invasividade das linhagens tumorais MDA-MB-231 e MCF-7 e MCF-10A. Adicionalmente, através do silenciamento de função por RNAi, analisamos se GPNMB e SPOCK estão relacionadas à invasão porventura desencadeada pelo peptídeo.
- 3) Finalizando, visando contextualizar *in vivo* nossos resultados *in vitro*, estudar o potencial papel de GPNMB e SPOCK como biomarcadores tumorais, por meio da imunodeteção das mesmas em tecido mamário normal e tumoral, valendo-se de lâminas de Tissue Microarrays, (TMAs).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho não envolveu manipulação direta de seres humanos e animais e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP-ICB) em 13 de junho de 2012, parecer número 524/12.

4.1 Peptídeos

O peptídeo C16 pertence à cadeia γ -1 da laminina e apresenta a seguinte sequência de aminoácidos: KAFDITYVRLKF. Utilizamos como controle, um peptídeo contendo os mesmos aminoácidos que o C16, porém com sequência embaralhada. Este peptídeo não possui função biológica e sua sequência de aminoácidos não está presente em nenhuma proteína humana, de acordo com a ferramenta de bioinformática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Os peptídeos C16 e C16SX foram sintetizados pela empresa EZ Biolab (Westfield, IN, EUA), possuindo grau de pureza de 98% (determinado por RP-HPLC) e massa molecular confirmada por espectrometria de massas.

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

4.2 Linhagens celulares

Células derivadas de carcinoma ductal invasivo de mama humana (linhagem MDA-MB-231 classificada como “*basal-like*” (triplo negativo para receptores de estrógeno, progesterona e HER2), células derivadas de adenocarcinoma de mama (células MCF-7 classificada como luminal B, HER2 – ou seja, esta célula possui receptores para progesterona, estrógeno e HER2) foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA)

suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e mantidas em frascos de 75 cm² em atmosfera de 5% CO₂ a 37 °C. As células normais de glândula mamária (MCF-10A) foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco com mistura de nutrientes HAM F-12 (DMEM/F12, Sigma) suplementado com 5% de soro bovino adulto, 20 ng/ml de EGF (fator de crescimento epidérmico), 10 µg/ml de insulina, 0,5 µg/ml de hidrocortisona e 100 ng/ml de toxina colérica (Sigma) e foram mantidas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C.

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

A caracterização das linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-10A foram descritas anteriormente por (LACROIX; LECLERCQ, 2004).

As linhagens MCF-7 e MCF10A foram gentilmente cedidas pela Prof. Nathalie Cella (Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil).

4.3 Immunoblot

“*Immunoblot*” foi empregado para verificar se o peptídeo C16 induz aumento nos níveis de GPNMB e SPOCK em células MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-10A. Para estes experimentos, células MDA-MB-231 e MCF-7 foram cultivadas em placas de 6 poços em meio contendo 10% SBF. Já as células MCF-10A foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco com mistura de nutrientes HAM F-12 suplementado com 5% de soro bovino adulto, 20 ng/ml de EGF, 10 µg/ml de insulina, 0,5 µg/ml de hidrocortisona e 100 ng/ml de toxina colérica. No dia seguinte, meio completo foi substituído por meio sem soro. A seguir, as células foram incubadas na presença de C16 ou C16SX (100 µg/ml) diluídos em meio sem soro e sem suplementos por um período de 24 horas. Adicionalmente utilizamos controles não peptídicos, como

crescimento de células em meio com 10% de soro fetal bovino ou em meio livre de soro.

Amostras foram então lisadas em tampão RIPA contendo 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 2 mM de EDTA, 1% de deoxicolato de sódio, e coquetel de inibidor de protease (Sigma). Amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C, e o sobrenadante recolhido. Quantificação de proteínas foi feita utilizando-se o método BCA (Pierce-Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

Eletroforese foi realizada seguindo protocolo para SDS-PAGE. Amostras foram ressuspendidas em tampão de amostra, (3% dodecil sulfato de sódio, 150 mM Tris pH 6,8, 15% mercaptoetanol, 30% glicerol, 0,01% azul de bromofenol) fervidas por 5 minutos a 100°C e carregadas em gel de 10% de poliacrilamida (1.5 M Tris-HCl, 10% SDS, 30% bis-acrilamida, 10% persulfato de amônia e TEMED). Após eletroforese, proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham-GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), que posteriormente foram bloqueadas com 5% de leite desnatado diluído em 0.05% Tween-20 em TBS (TTBS). As membranas foram então incubadas com os anticorpos primários contra GPNMB (diluição 1:250, sc-271415, Santa Cruz biotechnology, CA, EUA) e SPOCK (diluição 1:250, ab83768, Abcam, Bristol, UK). Esses anticorpos primários foram detectados por anticorpos secundários conjugado com peroxidase (Amersham-GE Healthcare). Protocolo de quimioluminescência (ECL kit, Amersham-GE Healthcare) foi empregado para revelar a reação utilizando o sistema de aquisição MF-Chemibis 3.2 (DNR Bio-Image Systems, Jerusalém, ISR), ou filmes radiográficos. Posteriormente, as membranas foram “stripped” com “Restore Western Blot Stripping Buffer” (Pierce-Thermo Scientific) e submetidas a novas marcações. Para garantir que a mesma quantidade de proteína foi carregada para todas as amostras, as membranas foram “stripped” e remarcadas com anticorpo contra β -actina (Sigma - diluição 1:5000). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4 Ensaio de Invasão

Para avaliar se C16 induz fenótipo invasivo em células MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-10A, foi utilizado um sistema de câmaras bipartites de 10 poços (Neuro Probe

Inc. Gaithersburg, MD, USA), separadas por membrana porosa de polycarbonato (diâmetro dos poros = 8 μ m). Neste ensaio, a membrana de polycarbonato foi coberta com 5 μ l de membrana basal reconstituída (Matrigel - Trevigen Inc, Gaithersburg, MD, USA - 14 μ g/ml). Os poços da câmara inferior foram preenchidos com peptídeo C16 (100 μ g/ml) diluído em meio sem soro ou sem suplementos. Células ressuspendidas em meio com 0,5% de SBF (15×10^4 /poço) foram cultivadas na porção superior da câmara sobre membrana coberta por Matrigel. Como controles, utilizamos peptídeo controle “scrambled” C16SX (100 μ g/ml) diluído em meio sem soro e sem suplementos.

Como controles não peptídicos, poços da câmara inferior foram preenchidos com meio contendo meio sem soro e sem suplementos (controle negativo) ou 10% de SBF para as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7. Para a linhagem celular MCF-10A utilizamos os suplementos para cultivo dessa linhagem, a saber: 5% SBF, 20 ng/ml de EGF, 10 μ g/ml de insulina, 0,5 μ g/ml de hidrocortisona e 100 ng/ml de toxina colérica (controle positivo).

A câmara foi incubada por 48 horas a 37 °C em estufa de CO₂ para que ocorresse digestão do Matrigel e invasão das células da câmara superior para a inferior. A membrana foi então removida da câmara e sua porção superior, sobre a qual as células foram plaqueadas, foi delicadamente raspada para remoção de restos de Matrigel e de células que não invadiram. Assim, restaram somente células da face inferior da membrana, que foram as células que invadiram. Essas células foram fixadas em paraformaldeído 4% e coradas com violeta cristal. O número de células em cada poço foi observado através da aquisição de imagens utilizando câmera digital acoplada ao microscópio, e quantificado em pelo menos sete campos para cada grupo experimental. Os ensaios de invasão foram realizados em triplicata.

4.5 Ensaio de Invasão com RNA de interferência

Com objetivo de avaliar o envolvimento das moléculas GPNMB e SPOCK no processo de invasão possivelmente desencadeado pelo peptídeo C16, as células MDA-MB-231 foram transfectadas com RNA de interferência (RNAi) obtidos comercialmente. Um dia antes da transfecção, células MDA-MB-231 subconfluentes na placa foram cultivadas em DMEM, suplementadas com 10% de SFB com ausência

de antibióticos e antimicóticos. A seguir, meio de transfecção (Optimen, Invitrogen), reagente de transfecção (Lipofectamina 2000, Invitrogen) e RNAi para GPNMB (Santa Cruz Biotechnology, sc-60721) e SPOCK (Santa Cruz Biotechnology, sc-61669), na concentração de 80 nM/ml, foram misturados e incubados a temperatura ambiente por 30 minutos, de acordo com instruções do fabricante. Esta solução foi adicionada às células MDA-MB-231, que foram assim mantidas por um período de 48 horas a 37 °C. Como controle, outro grupo de células MDA-MB-231 foram transfectadas com 80 nM/ml de RNAi como controle negativo (RNAi *scrambled*, Santa Cruz Biotechnology, sc-37007), que não induz degradação de qualquer mensagem celular. Após o período de incubação, células com depleção de GPNMB e SPOCK foram submetidas a ensaio de invasão em câmaras bipartites na presença do peptídeo C16 e C16SX, conforme descrito anteriormente. Os ensaios de invasão foram realizados em triplicata. Immunoblot avaliou a eficiência de transfecção do RNAi.

4.6 Imunohistoquímica

Para contextualizar os nossos resultados *in vitro* com resultados *in vivo*, nós estudamos o potencial de GPNMB e SPOCK como biomarcadores tumorais através da imunodeteção em tumores de mama e mama normal usando lâminas de “Tissue Microarray” (TMAs) (IMGENEX, San Diego, CA, USA). As lâminas de TMAs utilizadas, contém 35 amostras de carcinoma ductal invasivo, 9 amostras de mama normal, 1 amostra de carcinoma papilífero atípico, 1 amostra de carcinoma metaplásico, 1 amostra de carcinoma sarcomatoide e 10 amostras de carcinoma metastático de linfonodo. Os cortes foram desparafinizados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 90% e 80%). Atividade da peroxidase endógena foi inibida por incubação dos cortes com 3% H₂O₂ em metanol (1:1) por 20 minutos. Em seguida, foi realizada recuperação antigênica por 30 minutos em banho-maria, utilizando tampão citrato (10 µM ácido cítrico, 0.05% Tween 20, pH 6). Os cortes foram então bloqueados com solução de 1% BSA (Sigma) em PBS por 1 hora. Para detecção de GPNMB, (sc-271415, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) em uma diluição de 1:75 e SPOCK (ab-83768, Abcam, Bristol, UK) em uma diluição de 1:100. Os anticorpos primários foram diluídos em PBS, e aplicados sobre os cortes “overnight” a 4°C. Após lavagem com PBS, lâminas foram submetidas ao sistema de

detecção EnVision Plus (Dako) conjugado com polímero de peroxidase anti-coelho (para SPOCK) ou anti-camundongo (para GPNMB) em câmara úmida por 20 minutos. Diaminobenzidina (Dako) foi usada como cromogênio e cortes foram contra-corados com hematoxilina de Mayer (Sigma). Foram feitas 5 fotos de cada amostra utilizando uma câmera acoplada ao microscópio óptico com aumento de 400x. Quantificação da fração da área epitelial corada pelos anticorpos foi realizada utilizando o “software” ImageJ (plug in Color deconvolution, <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>).

4.7 Análise estatística

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

5 RESULTADOS

5.1 O peptídeo C16 estimula os níveis de GPNMB e SPOCK.

Nós demonstramos em um trabalho anterior que o peptídeo C16 derivado da laminina regula a expressão de genes diferenciada em células derivadas de câncer de mama MDA-MB-231 entre os genes estavam o gene GPNMB (configura a proteína osteoactivina ou GPNMB) e o gene SPOCK1 (que configura o proteoglicano testicam-1 ou SPOCK) (DE SOUZA SANTOS, 2011). Aqui analisamos por “*immunoblot*” se o peptídeo C16 estimularia os níveis moleculares de GPNMB e SPOCK em células derivadas de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) usando células não tumorigênicas (MCF-10A) como controle.

As células MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-10A foram tratadas com o peptídeo C16 e o peptídeo controle C16SX por 24 horas posteriormente sendo submetido a técnica de “*immunoblot*”.

Os resultados demonstram que C16 aumentou os níveis moleculares de GPNMB e SPOCK nas células MDA-MB-231 (figura 1A) e MCF-7 (figura 1B) em comparação ao peptídeo controle C16SX. Os níveis de GPNMB também aumentaram na linhagem celular controle MCF-10A (figura 1C).

Com relação aos grupos controles não peptídicos, células MDA-MB-231 apresentaram baixos níveis de GPNMB e SPOCK na presença de soro e na ausência do mesmo (figura 1D). As células MCF-7 apresentaram níveis constantes de GPNMB nos grupos tratados com soro e sem soro respectivamente, sendo baixos os níveis de SPOCK nos dois grupos controles (figura 1E). Células controle MCF-10A tratadas com soro não estimularam a formação dos níveis de GPNMB, observando o mesmo na ausência de soro. Baixos níveis de SPOCK foram detectados para o grupo com soro e sem soro (figura 1F).

5.2 C16 estimula a invasão celular

Ensaio de invasão com células MDA-MB-231 realizados em câmaras de Boyden recobertas com Matrigel mostraram que o peptídeo C16 aumentou o número

de células invasivas quando comparado ao peptídeo controle C16SX (figura 2A). O tratamento com C16 também induziu um aumento na invasão de células MDA-MB-231 quando comparado aos controles não peptídicos negativos (células crescidas em meio livre de soro).

O peptídeo C16 não estimulou a invasão celular em células MCF-7 (figura 2B). Células mamária normais MCF-10A foram submetidas ao ensaio de invasão. Assim como a células MCF-7, as células MCF-10A não responderam ao peptídeo durante o ensaio de invasão (figura 2C). Curiosamente o grupo tratado com SFB apresentou um aumento significativo na invasão celular. Esse comportamento já foi reportado anteriormente (ESPINOSA NEIRA; SALAZAR, 2012).

5.3 GPNMB e o peptídeo C16 cooperam para a invasão celular

Após observar a invasão celular desencadeada pelo peptídeo C16 nas células MDA-MB-231 e para correlacionar níveis proteicos e função celular, também investigamos se GPNMB e SPOCK estariam relacionados ao processo de invasão em células MDA-MB-231 desencadeado pelo peptídeo C16.

Para tanto, células MDA-MB-231 tiveram GPNMB ou SPOCK depletadas por RNAi, seguida de tratamento por C16 e posterior ensaio de invasão conforme anteriormente descrito. Silenciamento de GPNMB diminuiu significativamente a invasão celular dependente de C16 (figura 3A). Depleção de SPOCK não inibiu a invasão celular relacionada ao peptídeo (figura 3A). Ao contrário parece existir tendência de aumento dessa atividade biológica. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos tratados com o peptídeo C16SX. “*Immunoblot*” confirmou a eficácia de transfecção (figura 3B).

5.4 Imunodeteção de GPNMB e SPOCK em câncer de mama.

Para comparar resultados obtidos *in vitro* com resultados *in vivo*, nós estudamos o potencial para de GPNMB e SPOCK como biomarcadores de câncer de mama utilizando a técnica de imunohistoquímica em tecidos de mama normal e tecidos de câncer de mama presentes em lâminas de TMAs.

Aumento da marcação imunohistoquímica para GPNMB no epitélio tumoral de carcinoma ductal invasivo e suas respectivas metástases presentes nos linfonodos foram observados, comparado ao tecido de mama normal (figura 4A). Quantificação da imunodeteção da área epitelial demarcada para GPNMB demonstrou um aumento significativo para a metástase de linfonodo em relação a mama normal (figura 4B).

Seguindo a classificação molecular proposta por (ESPINOSA NEIRA; SALAZAR, 2012) aumento dos níveis de GPNMB na área epitelial foi observado em câncer de mama do tipo “*basal-like*” e câncer de mama do tipo “HER2” comparado com amostras de mama normal (figura 4C). GPNMB no epitélio tumoral foi significativamente aumentado nos estádios IIA, IIIA e IIIC comparado com mama normal (figura 4D).

SPOCK foi detectado no epitélio e no estroma do carcinoma ductal invasivo, carcinoma metastático e na mama normal (figura 5A). Quantificação da marcação da região epitelial demonstrou que há aumento dos níveis de SPOCK em carcinoma metastático de linfonodo (CML) comparado com a mama normal (figura 5B). Presença de SPOCK foi significativamente mais detectada nos subtipos moleculares HER2 comparada aos tumores do tipo “*basal-like*”. No estadiamento do câncer de mama, SPOCK foi significativamente mais detectado no estágio IIIA comparado ao IIB (figura 5D).

Figura 1 - “Immunoblot”: O peptídeo C16 aumenta os níveis moleculares de GPNMB e SPOCK em linhagens celulares derivadas de câncer de mama MDA-MB-231 (A) e MCF-7 (B) em comparação com o peptídeo controle. Por outro lado, baixos níveis de GPNMB na linhagem celular controle MCF-10A são detectados e níveis de SPOCK não são observados (C). Entre os grupos controles não peptídicos (presença ou ausência de soro fetal bovino) nenhuma diferença é observada nos níveis moleculares de GPNMB e SPOCK (D-F).

Figura 1 - O peptídeo C16 estimula os níveis de GPNMB e SPOCK em células derivadas de câncer de mama.

Figura 2 – Ensaio de invasão: Ensaaios em Câmara de Boyden com Matrigel indicam que C16 aumenta significativamente a invasão celular de MDA-MB-231 quando comparado com o peptídeo controle C16SX (A). Células MCF-7 tratadas com o peptídeo não demonstram aumento da atividade invasiva (B). Resultado similar foi observado nas células MCF-10A (C). Curiosamente houve aumento na invasão celular no grupo controle contendo 5% SFB. Resultados são apresentados como média $\pm$ erro da média das células que invadiram, em três experimentos independentes. Asteriscos representam significância estatística ($p < 0.05$).

Figura 2 - C16 estimula a invasão celular das células MDA-MB-231.

Figura 3 – Ensaio de Invasão com RNAi: O peptídeo C16 e GPNMB promovem a diminuição da invasão das células MDA-MB-231. Células tiveram GPNMB ou SPOCK depletadas por RNAi, seguida de tratamento por C16 e posterior ao ensaio de invasão. Silenciamento de GPNMB diminui significativamente a invasão celular dependente de C16 (A). Depleção de SPOCK não inibe a invasão celular relacionada ao peptídeo (A). Ao contrário parece existir tendência de aumento dessa atividade biológica. “*Immunoblot*” confirma eficácia de transfecção do RNAi (B). Resultados são apresentados com média $\pm$ erro da média de três experimentos independentes. Asteriscos representam significância estatística ($p < 0.05$). *ns* resultado não significativo.

Figura 3 - GPNMB e o peptídeo C16 cooperam na invasão celular da linhagem MDA-MB-231.

Figura 4 – Imunohistoquímica: Níveis de GPNMB em carcinoma ductal invasivo (CDI) e suas respectivas metástases (CML) são maiores em relação a mama normal (A). Quantificação imunohistoquímica demonstra que os níveis de GPNMB em carcinoma metastático (CML) de mama é significativamente maior em comparação com o controle (B). Os tumores de mama foram classificados molecularmente em luminal A, luminal B, HER2 e “*basal-like*”. Imunodeteção demonstra aumento dos níveis de GPNMB para HER2 e “*basal-like*” comparado com a mama normal (C). Observamos que há um aumento crescente da detecção de GPNMB em tumores nos estádios IIA, IIIA e IIIC comparado com a mama normal (D). Resultados representam média $\pm$ erro da média das amostras. Asteriscos representam significância estatística ($p < 0.05$).

Figura 4 - Imunodeteção de GPNMB em câncer de mama.

Figura 5 – Imunohistoquímica: Imunodeteção de SPOCK é observado no epitélio e estroma do câncer de mama e mama normal (A). Quantificação imunohistoquímica mostra aumento significativo em carcinoma metastático (CML) em comparação com o controle (B). Os tumores de mama foram classificados molecularmente em luminal A, luminal B, HER2 e “*basal-like*”. Imunodeteção demonstra um aumento dos níveis de SPOCK em HER2 em relação ao “*basal-like*” (C). Na classificação morfológica, observamos que um aumento dos níveis de SPOCK em tumor do tipo IIIA em relação ao tumor IIA (D). Resultados representam média $\pm$ erro da média das amostras. Asteriscos (*) representam significância estatística ($p < 0.05$).

Figura 5 - Níveis de SPOCK são detectados em câncer de mama e mama normal.

6 DISCUSSÃO

Nós demonstramos que o peptídeo C16 derivado da cadeia γ -1 da laminina, aumenta os níveis de GPNMB e SPOCK em células derivadas de câncer de mama. Este peptídeo também estimulou a invasão celular das células MDA-MB-231. Correlacionando os níveis moleculares e função celular, nós observamos que o silenciamento de GPNMB diminui significativamente o fenótipo invasivo de células MDA-MB-231 desencadeado pelo peptídeo C16. Usando lâminas de TMAs com amostras de câncer de mama e mama normal, observamos um aumento significativo dos níveis moleculares de GPNMB e SPOCK em carcinoma metastático de mama em relação a mama normal. Para o nosso conhecimento, o estudo presente é o primeiro a investigar a invasão celular desencadeada pelo peptídeo C16 em células de câncer de mama e correlacionar o efeito do peptídeo C16 com as moléculas GPNMB e SPOCK.

Desenvolvimento tumoral envolve uma relação direta entre as células do câncer e a matriz extracelular. Neste contexto, moléculas da matriz extracelular pode influenciar o comportamento das células tumorais em diversos modos e a proteólise da lâmina basal e o estroma que envolve as células tumorais tem um importante papel neste processo (COMOGLIO; TRUSOLINO, 2005). A laminina é uma proteína expressa na lâmina basal, e possui sítios críticos na sua estrutura, os quais não estão totalmente expostos até a molécula ser clivada por proteases. Uma vez que a proteólise da laminina ocorra, há a liberação de fragmentos e peptídeos biologicamente ativos (FREITAS et al., 2007; SCHENK; QUARANTA, 2003).

O peptídeo C16 (KAFDITYVRLKF, presente na cadeia γ -1 da laminina-111) é um dos peptídeos derivados da laminina. Ele tem sido associado com adesão celular (NOMIZU et al., 1997), angiogênese (PONCE; NOMIZU; KLEINMAN, 2001) e secreção de metaloproteinases (KURATOMI et al., 2002). Nosso grupo tem demonstrado que o peptídeo C16 aumenta a invasão celular e a ativação da atividade de invadopódios e células derivadas de carcinoma adenoide cístico (NASCIMENTO et al., 2011; SIQUEIRA, 2014). Neste trabalho demonstramos que o peptídeo C16 aumenta a invasão celular da linhagem celular MDA-MB231, mas não tem ação sobre a linhagem celular MCF-7. As células MDA-MB-231 é uma linhagem conhecida por

seu alto poder de migração e invasão celular já as células MCF-7 não possuem um fenótipo invasivo (LACROIX; LECLERCQ, 2004).

C16 também promove a expressão genética diferenciada na linhagem celular MDA-MB-231, estimulando a expressão de GPNMB e SPOCK (DE SOUZA SANTOS, 2011).

O gene GPNMB codifica uma glicoproteína transmembrana não-metastática B também conhecida como GPNMB (*"Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B"*) ou Osteoactivina. GPNMB consiste ao menos em três diferentes domínios: um domínio N-terminal com peptídeo sinal, um domínio de doença renal policística PKD (*"polycystic kidney disease domain"* – PKD) e um domínio transmembrana TRD (*"transmembrane domain"* – TRD). A proteína também contém um domínio de ligação de célula RGD (*"Arg-Gly-Asp"* – RGD) (ZHOU et al., 2012).

Presença de GPNMB está associado com metástases derivadas de carcinoma de mama para os ossos. Osteomimetismo é um termo usado para descrever o fato de alguns tipos de câncer preferencialmente formam metástase em tecido ósseo por expressar genes normalmente associados a osteoblastos (ROSE et al., 2007). A metástase óssea de tumores mamários em geral significa sobrevida pobre para o paciente (ROSE et al., 2010b; ROSE et al., 2007).

Além do tecido ósseo, também foi observado que elevados níveis de GPNMB está relacionado com câncer de mama agressivo do tipo *"basal-like"* (ROSE et al., 2010b). O aumento dos níveis de GPNMB é correlacionado ao aumento da expressão de metaloproteinases de matriz como MMP-3 e MMP-9, fundamentais no processo metastático (ZHOU et al., 2012). Nós observamos que o peptídeo C16 estimulou os níveis de GPNMB em células derivadas de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7 comparadas à linhagem normal MCF-10A. Além disto o silenciamento de GPNMB usando RNAi reduziu a invasão celular desencadeada pelo peptídeo C16 em células MDA-MB-231, mostrando que esta molécula e o peptídeo podem cooperar para a invasão celular do câncer de mama.

SPOCK é um proteoglicano secretado, com papel importante no processo de interação célula-célula e célula-matriz (CHARBONNIER et al., 1998). Essa molécula está presente no sistema nervoso, provavelmente participando do desenvolvimento neuronal e neuropatológico (CHARBONNIER et al., 1998; LEJA et al., 2009). Ensaios *in vivo* e *in vitro* demonstraram que SPOCK tem forte papel tumorigênico devido à sua

propriedade anti-apoptótica. Além disso, SPOCK tem sido relacionado à invasão e metástases (LI et al., 2013; SENO et al., 2009). Observamos anteriormente que o peptídeo C16 aumenta a expressão do gene SPOCK1 em células MDA-MB-231 (DE SOUZA SANTOS, 2011). Aqui demonstramos que os níveis moleculares de SPOCK estão elevados em células MDA-MB-231 e MCF-7, comparado com células MCF-10A. Entretanto, o silenciamento de SPOCK utilizando RNAi não inibiu a invasão dependente do peptídeo C16. Ao contrário, a depleção de SPOCK mostrou tendência de aumento da atividade invasiva na linhagem celular MDA-MB-231.

Tentando interpretar esse fenômeno, verificamos que SPOCK possui domínio próximo ao terminal amino que é provavelmente responsável pela inibição de MMPs do tipo 1 e 2 (NAKADA et al., 2001). MMPs são fundamentais para o processo migração e invasão celular (CHIANG et al., 2014; HANDSLEY; EDWARDS, 2005; KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010). Dessa forma poderíamos especular que o silenciamento de SPOCK induziria aumento de MMPs e, conseqüentemente, maior taxa de invasão celular. Essa hipótese deve ser confirmada por experimentos futuros.

Estudos mostram que a heterogeneidade da marcação de GPNMB em tumores de mama é observado por vários compartimentos, tanto no estroma quanto no tumor (ROSE et al., 2010b). Correlacionando os nossos resultados *in vitro* com resultados *in vivo*, observamos um aumento dos níveis de GPNMB em carcinoma de mama comparado com mama normal usando lâminas de TMAs. Quantificação dos dados mostraram que os níveis de GPNMB são significativamente maiores em carcinoma metastático de mama em comparação com mama normal.

A classificação molecular do câncer de mama mostra a diversidade desta neoplasia. O mau prognóstico associado com câncer de mama “*basal-like*” (triplo negativo para receptores de estrógeno, progesterona e HER), juntamente com a falta de alvos terapêuticos, criou interesse clínico intenso nestes tumores (RAKHA; REIS-FILHO; ELLIS, 2008). Estudos tem demonstrado que tumores com classificação molecular do tipo “*basal-like*” estão associados com piores resultados clínicos (REIS-FILHO; TUTT, 2008). Quando separamos os tumores de mama por classificação molecular, verificamos que GPNMB é mais expresso em carcinomas de mama com pior prognóstico, como HER2 e “*basal-like*”. Na classificação morfológica por estágios ocorre um aumento progressivo dos níveis de GPNMB.

O proteoglicano SPOCK tem sido observado em glioblastomas, carcinoma de próstata e carcinomas neuroendócrinos gastrointestinais. Devido a sua presença a sua presença de em fluidos do corpo como sangue e fluído cérebro-espinhal, SPOCK é um candidato como um biomarcador primário (COLIN et al., 2006; LEJA et al., 2009; WLAZLINSKI et al., 2007). Marcação imunohistoquímica para SPOCK em carcinoma gástrico demonstrou 80% de marcação do proteoglicano nos tumores derivados de câncer gástrico comparado com mucosa gástrica normal (MARIMUTHU et al., 2011). Marcação imunohistoquímica em TMA de mama demonstrou marcação citoplasmática e no estroma em todos os casos testados. Entretanto há uma relevante marcação para SPOCK em câncer de mama, mais precisamente em carcinoma metastático de mama.

O conhecimento sobre os efeitos biológicos dos peptídeos derivados de laminina, tal como o peptídeo C16, é fragmentado, sem fluxo claro de informações. Nossos resultados têm tentado fornecer um quadro inicial para o efeito de C16 na biologia tumoral. Baseado em nossas descobertas experimentais, nós propomos que o peptídeo C16 aumenta os níveis de GPNMB e SPOCK em células derivadas de câncer de mama. Além disso, C16 e GPNMB podem cooperar para a regulação da invasão de células de câncer de mama. Adicionalmente resultados com TMAs mostram que SPOCK e GPNMB possuem distribuição relevante nas formas mais agressivas do câncer de mama.

7 CONCLUSÕES

Baseados nos resultados dos experimentos realizados, concluímos que:

- 1) O peptídeo C16, derivado da laminina, promove aumento dos níveis moleculares de GPNMB e SPOCK.
- 2) C16 auxilia no processo de invasão tumoral.
- 3) GPNMB mostrou desempenhar um forte papel no processo de invasão tumoral desencadeado por C16.
- 4) Imunodeteção de GPNMB e SPOCK em amostras de câncer de mama foram significativamente maiores que as observadas em tecido mamário normal.

REFERÊNCIAS*

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

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

AXELROD, R.; AXELROD, D. E.; PIENTA, K. J. Evolution of cooperation among tumor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 36, p. 13474-13479, 2006.

BATISTON, A. P. T., E. M.; SOUZA, L. A.; SANTOS, M. L. M. Conhecimento e prática sobre os fatores de risco para o câncer de mama entre mulheres de 40 a 69 anos. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, v. 11, n. 2, p. 163-171, 2011.

BEADLE, B. M.; WOODWARD, W. A.; BUCHHOLZ, T. A. The impact of age on outcome in early-stage breast cancer. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 21, n. 1, p. 26-34, 2011.

BECKMANN, M. W.; NIEDERACHER, D.; SCHNURCH, H. G.; GUSTERSON, B. A.; BENDER, H. G. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. **Journal of Molecular Medicine**, v. 75, n. 6, p. 429-439, 1997.

BERGER, E. A.; MCCLELLAN, S. A.; BARRETT, R. P.; HAZLETT, L. D. Testican-1 promotes resistance against *Pseudomonas aeruginosa*-induced keratitis through regulation of MMP-2 expression and activation. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 52, n. 8, p. 5339-5346, 2011.

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

* De acordo com:

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

BLUM, J. L.; ZEIGLER, M. E.; WICHA, M. S. Regulation of mammary differentiation by the extracellular matrix. **Environmental Health Perspectives**, v. 80, n1, p. 71-83, 1989.

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

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

BREITKREUTZ, D.; KOXHOLT, I.; THIEMANN, K.; NISCHT, R. Skin basement membrane: the foundation of epidermal integrity--BM functions and diverse roles of bridging molecules nidogen and perlecan. **Biomed Research International**, v. 2013, n.3, p. 179784, 2013.

CABINAKOVA, M.; TESAROVA, P. Disseminated and circulating tumour cells and their role in breast cancer. **Folia Biologica**, v. 58, n. 3, p. 87-97, 2012.

CHARBONNIER, F.; CHANOINE, C.; CIFUENTES-DIAZ, C.; GALLIEN, C. L.; RIEGER, F.; ALLIEL, P. M.; PERIN, J. P. Expression of the proteoglycan SPOCK during mouse embryo development. **Mechanisms of Development**, v. 90, n. 2, p. 317-321, 2000.

CHARBONNIER, F.; PERIN, J. P.; MATTEI, M. G.; CAMUZAT, A.; BONNET, F.; GRESSIN, L.; ALLIEL, P. M. Genomic organization of the human SPOCK gene and its chromosomal localization to 5q31. **Genomics**, v. 48, n. 3, p. 377-380, 1998.

CHIANG, T. Y.; TSAO, S. M.; YEH, C. B.; YANG, S. F. Matrix metalloproteinases in pneumonia. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 433C, p. 272-277, 2014.

COLIN, C.; BAEZA, N.; BARTOLI, C.; FINA, F.; EUDES, N.; NANNI, I.; MARTIN, P. M.; OUAFIK, L.; FIGARELLA-BRANGER, D. Identification of genes differentially expressed in glioblastoma versus pilocytic astrocytoma using Suppression Subtractive Hybridization. **Oncogene**, v. 25, n. 19, p. 2818-2826, 2006.

COLOGNATO, H.; YURCHENCO, P. D. Form and function: the laminin family of heterotrimers. **Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists**, v. 218, n. 2, p. 213-234, 2000.

COMOGLIO, P. M.; TRUSOLINO, L. Cancer: the matrix is now in control. **Nature Medicine**, v. 11, n. 11, p. 1156-1159, 2005.

COTRAN, R. S.; & COLLINS, P.; **Robbins e Cotran: fundamentos de patologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

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

DAVIS, G. E.; BAYLESS, K. J.; DAVIS, M. J.; MEININGER, G. A. Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. **The American Journal of Pathology**, v. 156, n. 5, p. 1489-1498, 2000.

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

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

DUBEY, P. K.; SINGODIA, D.; VYAS, S. P. Liposomes modified with YIGSR peptide for tumor targeting. **Journal of Drug Targeting**, v. 18, n. 5, p. 373-380, 2010.

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

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

EKBLOM, P. Receptors for laminins during epithelial morphogenesis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 8, n. 5, p. 700-706, 1996.

ELFENBEIN, A.; SIMONS, M. Auxiliary and autonomous proteoglycan signaling networks. **Methods in Enzymology**, v. 480, p. 3-31, 2010.

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

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

ESPINOSA NEIRA, R.; SALAZAR, E. P. Native type IV collagen induces an epithelial to mesenchymal transition-like process in mammary epithelial cells MCF10A. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, n. 12, p. 2194-2203, 2012.

FAISAL KHAN, K. M.; LAURIE, G. W.; MCCAFFREY, T. A.; FALCONE, D. J. Exposure of cryptic domains in the alpha 1-chain of laminin-1 by elastase stimulates macrophages urokinase and matrix metalloproteinase-9 expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 16, p. 13778-13786, 2002.

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

FIORENTINI, C.; BODEI, S.; BEDUSSI, F.; FRAGNI, M.; BONINI, S. A.; SIMEONE, C.; ZANI, D.; BERRUTI, A.; MISSALE, C.; MEMO, M.; SPANO, P.; SIGALA, S. GPNMB/OA protein increases the invasiveness of human metastatic prostate cancer cell lines DU145 and PC3 through MMP-2 and MMP-9 activity. **Experimental Cell Research**, v. 323, n. 1, p. 100-111, 2014.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 123, p. 4195-4200, 2010.

FRAZIER, A. L.; ROSENBERG, S. M. Preadolescent and adolescent risk factors for benign breast disease. **The Journal of Adolescent Health : Official Publication of the Society for Adolescent Medicine**, v. 52, p. 36-40, 2013.

FREITAS, V. M.; SCHEREMETA, B.; HOFFMAN, M. P.; JAEGER, R. G. Laminin-1 and SIKVAV a laminin-1-derived peptide, regulate the morphology and protease activity of a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line. **Oral Oncology**, v. 40, n. 5, p. 483-489, 2004.

FREITAS, V. M.; VILAS-BOAS, V. F.; PIMENTA, D. C.; LOUREIRO, V.; JULIANO, M. A.; CARVALHO, M. R.; PINHEIRO, J. J.; CAMARGO, A. C.; MORISCOT, A. S.; HOFFMAN, M. P.; JAEGER, R. G. SIKVAV, a laminin alpha1-derived peptide, interacts with integrins and increases protease activity of a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line through the ERK 1/2 signaling pathway. **The American Journal of Pathology**, v. 171, n. 1, p. 124-138, 2007.

FRIDMAN, R.; GIACCONE, G.; KANEMOTO, T.; MARTIN, G. R.; GAZDAR, A. F.; MULSHINE, J. L. Reconstituted basement membrane (matrigel) and laminin can enhance the tumorigenicity and the drug resistance of small cell lung cancer cell lines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 17, p. 6698-6702, 1990.

GAMA-DE-SOUZA, L. N.; CYRENO-OLIVEIRA, E.; FREITAS, V. M.; MELO, E. S.; VILAS-BOAS, V. F.; MORISCOT, A. S.; JAEGER, R. G. Adhesion and protease activity in cell lines from human salivary gland tumors are regulated by the laminin-derived peptide AG73, syndecan-1 and beta1 integrin. **Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 27, n. 5, p. 402-419, 2008.

GHOSH, S.; STACK, M. S. Proteolytic modification of laminins: functional consequences. **Microscopy Research and Technique**, v. 51, n. 3, p. 238-246, 2000.

GIUSTI, B.; FIBBI, G.; MARGHERI, F.; SERRATI, S.; ROSSI, L.; POGGI, F.; LAPINI, I.; MAGI, A.; DEL ROSSO, A.; CINELLI, M.; GUIDUCCI, S.; KAHALEH, B.; BAZZICHI, L.; BOMBARDIERI, S.; MATUCCI-CERINIC, M.; GENSINI, G. F.; DEL ROSSO, M.; ABBATE, R. A model of anti-angiogenesis: differential transcriptome profiling of microvascular endothelial cells from diffuse systemic sclerosis patients. **Arthritis Research & Therapy**, v. 8, n. 4, p. R115, 2006.

GIOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **J Bras Patol Med Lab** v. 48 • n. 6 • p. 463-474, 2012.

GRAF, J.; OGLE, R. C.; ROBEY, F. A.; SASAKI, M.; MARTIN, G. R.; YAMADA, Y.; KLEINMAN, H. K. A pentapeptide from the laminin B1 chain mediates cell adhesion and binds the 67,000 laminin receptor. **Biochemistry**, v. 26, n. 22, p. 6896-6900, 1987.

GRANT, D. S.; TASHIRO, K.; SEGUI-REAL, B.; YAMADA, Y.; MARTIN, G. R.; KLEINMAN, H. K. Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. **Cell**, v. 58, n. 5, p. 933-943, 1989.

GREEN, V. L. Breast cancer risk assessment, prevention, and the future. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 40, n. 3, p. 525-549, 2013.

GUDJONSSON, T.; ADRIANCE, M. C.; STERNLICHT, M. D.; PETERSEN, O. W.; BISSELL, M. J. Myoepithelial cells: their origin and function in breast morphogenesis and neoplasia. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 10, n. 3, p. 261-272, 2005.

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

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

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

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

HASHMI, S.; MARINKOVICH, M. P. Molecular organization of the basement membrane zone. **Clinics in Dermatology**, v. 29, n. 4, p. 398-411, 2011.

HEGERFELDT, Y.; TUSCH, M.; BROCKER, E. B.; FRIEDL, P. Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. **Cancer Research**, v. 62, n. 7, p. 2125-2130, 2002.

HENDERSON, B. E.; FEIGELSON, H. S. Hormonal carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 427-433, 2000.

HOFFMAN, M. P.; NOMIZU, M.; ROQUE, E.; LEE, S.; JUNG, D. W.; YAMADA, Y.; KLEINMAN, H. K. Laminin-1 and laminin-2 G-domain synthetic peptides bind syndecan-1 and are involved in acinar formation of a human submandibular gland cell line. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 44, p. 28633-28641, 1998.

HOHENESTER, E.; YURCHENCO, P. D. Laminins in basement membrane assembly. **Cell Adhesion & Migration**, v. 7, n. 1, p. 56-63, 2013.

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

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

HYNES, R. O. The emergence of integrins: a personal and historical perspective. **Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 23, n. 6, p. 333-340, 2004.

HYNES, R. O.; NABA, A. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 1, 2012.

HYNES, R. O.; ZHAO, Q. The evolution of cell adhesion. **The Journal of Cell Biology**, v. 150, n. 2, p. 89-96, 2000.

IKEMOTO, S.; MOCHIZUKI, M.; YAMADA, M.; TAKEDA, A.; UCHINUMA, E.; YAMASHINA, S.; NOMIZU, M.; KADOYA, Y. Laminin peptide-conjugated chitosan membrane: Application for keratinocyte delivery in wounded skin. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 79, n. 3, p. 716-722, 2006.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2014.

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

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

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

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

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.

JOHNSEN, M.; LUND, L. R.; ROMER, J.; ALMHOLT, K.; DANO, K. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 10, n. 5, p. 667-671, 1998.

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

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KANEMOTO, T.; REICH, R.; ROYCE, L.; GREATOREX, D.; ADLER, S. H.; SHIRAISHI, N.; MARTIN, G. R.; YAMADA, Y.; KLEINMAN, H. K. Identification of an amino acid sequence from the laminin A chain that stimulates metastasis and collagenase IV production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 6, p. 2279-2283, 1990.

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

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

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

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

KIM, W. H.; NOMIZU, M.; SONG, S. Y.; TANAKA, K.; KURATOMI, Y.; KLEINMAN, H. K.; YAMADA, Y. Laminin- α 1-chain sequence Leu-Gln-Val-Gln-Leu-Ser-Ile-Arg (LQVQLSIR) enhances murine melanoma cell metastases. **International Journal of Cancer. Journal International du Cancer**, v. 77, n. 4, p. 632-639, 1998.

KLEIN, G.; LANGEGER, M.; TIMPL, R.; EKBLOM, P. Role of laminin A chain in the development of epithelial cell polarity. **Cell**, v. 55, n. 2, p. 331-341, 1988.

KLEINMAN, H. K.; MCGARVEY, M. L.; HASSELL, J. R.; STAR, V. L.; CANNON, F. B.; LAURIE, G. W.; MARTIN, G. R. Basement membrane complexes with biological activity. **Biochemistry**, v. 25, n. 2, p. 312-318, 1986.

KNUTSON, T. P.; LANGE, C. A. Tracking progesterone receptor-mediated actions in breast cancer. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 142, n. 1, p. 114-125, 2014.

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

KRUEGEL, J.; MIOSGE, N. Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. **Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS**, v. 67, n. 17, p. 2879-2895, 2010.

KURATOMI, Y.; NOMIZU, M.; TANAKA, K.; PONCE, M. L.; KOMIYAMA, S.; KLEINMAN, H. K.; YAMADA, Y. Laminin gamma 1 chain peptide, C-16 (KAFDITYVRLKF), promotes migration, MMP-9 secretion, and pulmonary metastasis of B16-F10 mouse melanoma cells. **British Journal of Cancer**, v. 86, n. 7, p. 1169-1173, 2002.

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

LAKANI, SR.; ELLIS, IO.; SCHNITT, SJ.; TAN, PH.; VAN DE VIJVER, MJ. **WHO classification of tumours of the breast** 4th Ed. IARC, Lyon, 2012.

LEJA, J.; ESSAGHIR, A.; ESSAND, M.; WESTER, K.; OBERG, K.; TOTTERMAN, T. H.; LLOYD, R.; VASMATZIS, G.; DEMOULIN, J. B.; GIANDOMENICO, V. Novel markers for enterochromaffin cells and gastrointestinal neuroendocrine carcinomas. **Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 22, n. 2, p. 261-272, 2009.

LI, Y.; CHEN, L.; CHAN, T. H.; LIU, M.; KONG, K. L.; QIU, J. L.; LI, Y.; YUAN, Y. F.; GUAN, X. Y. SPOCK1 is regulated by CHD1L and blocks apoptosis and promotes HCC cell invasiveness and metastasis in mice. **Gastroenterology**, v. 144, n. 1, p. 179-191, 2013.

LIU, B. C.; XU, Z. L. [Extracellular matrix]. **Progress in Physiology**, v. 27, n. 3, p. 221-226, 1996.

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

LUGASSY, C.; KLEINMAN, H. K.; VERNON, S. E.; WELCH, D. R.; BARNHILL, R. L. C16 laminin peptide increases angiogenic extravascular migration of human melanoma cells in a shell-less chick chorioallantoic membrane assay. **The British Journal of Dermatology**, v. 157, n. 4, p. 780-782, 2007.

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

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

MALINDA, K. M.; KLEINMAN, H. K. The laminins. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 28, n. 9, p. 957-959, 1996.

MARIC, G.; ROSE, A. A.; ANNIS, M. G.; SIEGEL, P. M. Glycoprotein non-metastatic b (GPNMB): A metastatic mediator and emerging therapeutic target in cancer. **Oncotargets and Therapy**, v. 6, p. 839-852, 2013.

MARIMUTHU, A.; O'MEALLY, R. N.; CHAERKADY, R.; SUBBANNAYYA, Y.; NANJAPPA, V.; KUMAR, P.; KELKAR, D. S.; PINTO, S. M.; SHARMA, R.; RENUSE, S.; GOEL, R.; CHRISTOPHER, R.; DELANGHE, B.; COLE, R. N.; HARSHA, H. C.; PANDEY, A. A comprehensive map of the human urinary proteome. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 6, p. 2734-2743, 2011.

MARR, H. S.; EDGEELL, C. J. Testican-1 inhibits attachment of Neuro-2a cells. **Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 22, n. 3, p. 259-266, 2003.

MARTIN, G. R.; TIMPL, R. Laminin and other basement membrane components. **Annual Review of Cell Biology**, v. 3, n., p. 57-85, 1987.

MINER, J. H.; YURCHENCO, P. D. Laminin functions in tissue morphogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 20, n., p. 255-284, 2004.

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

MSOLLY, A.; GHARBI, O.; BEN AHMED, S. Impact of menstrual and reproductive factors on breast cancer risk in Tunisia: a case-control study. **Medical Oncology**, v. 30, n. 1, p. 480, 2013.

NAKADA, M.; YAMADA, A.; TAKINO, T.; MIYAMORI, H.; TAKAHASHI, T.; YAMASHITA, J.; SATO, H. Suppression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MMP)-mediated MMP-2 activation and tumor invasion by testican 3 and its splicing variant gene product, N-Tes. **Cancer Research**, v. 61, n. 24, p. 8896-8902, 2001.

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

NASCIMENTO, C. F. **Papel de peptídeos bioativos da laminina na atividade dos invadopódios em linhagem celular derivada de carcinoma adenóide cístico**. 2011. 116 f. Dissertação. (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, 2011.

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

NOMIZU, M.; KURATOMI, Y.; MALINDA, K. M.; SONG, S. Y.; MIYOSHI, K.; OTAKA, A.; POWELL, S. K.; HOFFMAN, M. P.; KLEINMAN, H. K.; YAMADA, Y. Cell binding sequences in mouse laminin alpha1 chain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 49, p. 32491-32499, 1998.

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

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

NOMIZU, M.; UTANI, A.; SHIRAISHI, N.; KIBBEY, M. C.; YAMADA, Y.; ROLLER, P. P. The all-D-configuration segment containing the IKVAV sequence of laminin A chain has similar activities to the all-L-peptide in vitro and in vivo. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 20, p. 14118-14121, 1992.

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

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

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

PLAYDON, M. C.; MATTHEWS, S. B.; THOMPSON, H. J. Weight change patterns and breast cancer risk: a brief review and analysis. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 23, n. 2, p. 159-169, 2013.

PONCE, M. L.; HIBINO, S.; LEBIODA, A. M.; MOCHIZUKI, M.; NOMIZU, M.; KLEINMAN, H. K. Identification of a potent peptide antagonist to an active laminin-1 sequence that blocks angiogenesis and tumor growth. **Cancer Research**, v. 63, n. 16, p. 5060-5064, 2003.

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

RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; ELLIS, I. O. Basal-like breast cancer: a critical review. **Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 26, n. 15, p. 2568-2581, 2008.

RANGANATH, R. M.; NAGASHREE, N. R. Role of programmed cell death in development. **International Review of Cytology**, v. 202, n., p. 159-242, 2001.

REIS-FILHO, J. S.; TUTT, A. N. Triple negative tumours: a critical review. **Histopathology**, v. 52, n. 1, p. 108-118, 2008.

RICARD-BLUM, S. The collagen family. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 1, 2011.

RIVENBARK, A. G.; O'CONNOR, S. M.; COLEMAN, W. B. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. **The American journal of pathology**, v. 183, n. 4, p. 1113-1124, 2013.

ROEPMAN, P.; WESSELS, L. F.; KETTELARIJ, N.; KEMMEREN, P.; MILES, A. J.; LIJNZAAD, P.; TILANUS, M. G.; KOOLE, R.; HORDIJK, G. J.; VAN DER VLIET, P. C.;

REINDERS, M. J.; SLOOTWEG, P. J.; HOLSTEGE, F. C. An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. **Nature Genetics**, v. 37, n. 2, p. 182-186, 2005.

ROLL, S.; SEUL, J.; PAULSSON, M.; HARTMANN, U. Testican-1 is dispensable for mouse development. **Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 25, n. 6, p. 373-381, 2006.

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

ROSE, A. A.; ANNIS, M. G.; DONG, Z.; PEPIN, F.; HALLETT, M.; PARK, M.; SIEGEL, P. M. ADAM10 releases a soluble form of the GPNMB/Osteoactivin extracellular domain with angiogenic properties. **Plos One**, v. 5, n. 8, 2010a.

ROSE, A. A.; GROSSET, A. A.; DONG, Z.; RUSSO, C.; MACDONALD, P. A.; BERTOS, N. R.; ST-PIERRE, Y.; SIMANTOV, R.; HALLETT, M.; PARK, M.; GABOURY, L.; SIEGEL, P. M. Glycoprotein nonmetastatic B is an independent prognostic indicator of recurrence and a novel therapeutic target in breast cancer. **Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 16, n. 7, p. 2147-2156, 2010b.

ROSE, A. A.; PEPIN, F.; RUSSO, C.; ABOU KHALIL, J. E.; HALLETT, M.; SIEGEL, P. M. Osteoactivin promotes breast cancer metastasis to bone. **Molecular Cancer Research : MCR**, v. 5, n. 10, p. 1001-1014, 2007.

RUOSLAHTI, E.; ENGVALL, E. Immunochemical and collagen-binding properties of fibronectin. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 312, p. 178-191, 1978.

SANTISTEBAN, M.; REYNOLDS, C.; BARR FRITCHER, E. G.; FROST, M. H.; VIERKANT, R. A.; ANDERSON, S. S.; DEGNIM, A. C.; VISSCHER, D. W.; PANKRATZ, V. S.; HARTMANN, L. C. Ki67: a time-varying biomarker of risk of breast cancer in atypical hyperplasia. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 121, n. 2, p. 431-437, 2010.

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

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

SENO, T.; HARADA, H.; KOHNO, S.; TERAOKA, M.; INOUE, A.; OHNISHI, T. Downregulation of SPARC expression inhibits cell migration and invasion in malignant gliomas. **International Journal of Oncology**, v. 34, n. 3, p. 707-715, 2009.

SIMON-ASSMANN, P. The laminin family: founding members of the basement membrane. **Cell Adhesion & Migration**, v. 7, n. 1, p. 44-47, 2013.

SINGH, B.; FLEURY, C.; JALALVAND, F.; RIESBECK, K. Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 6, p. 1122-1180, 2012.

SIQUEIRA, A. S. **Peptídeo C16, derivado da laminina, regula invasão, dinâmica de formação e atividade de invadopódios em linhagens celulares de carcinoma epidermóide e fibrossarcoma**. 2014. 123 f. Tese. (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, 2014.

SIQUEIRA, A. S.; GAMA-DE-SOUZA, L. N.; ARNAUD, M. V.; PINHEIRO, J. J.; JAEGER, R. G. Laminin-derived peptide AG73 regulates migration, invasion, and protease activity of human oral squamous cell carcinoma cells through syndecan-1 and beta1 integrin. **Tumour Biology : the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 31, n. 1, p. 46-58, 2010.

SHAH, R.; ROSSO, K.; NATHANSON, S. D. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer

. **World journal of clinical oncology**, v. 5, n. 3, p. 283-298, 2014.

SONG, S. Y.; NOMIZU, M.; YAMADA, Y.; KLEINMAN, H. K. Liver metastasis formation by laminin-1 peptide (LQVQLSIR)-adhesion selected B16-F10 melanoma cells. **International Journal of Cancer. Journal International du Cancer**, v. 71, n. 3, p. 436-441, 1997.

SUZUKI, N.; NAKATSUKA, H.; MOCHIZUKI, M.; NISHI, N.; KADOYA, Y.; UTANI, A.; OISHI, S.; FUJII, N.; KLEINMAN, H. K.; NOMIZU, M. Biological activities of homologous loop regions in the laminin alpha chain G domains. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 46, p. 45697-45705, 2003.

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

TASHIRO, K.; SEPHEL, G. C.; WEEKS, B.; SASAKI, M.; MARTIN, G. R.; KLEINMAN, H. K.; YAMADA, Y. A synthetic peptide containing the IKVAV sequence from the A

chain of laminin mediates cell attachment, migration, and neurite outgrowth. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 27, p. 16174-16182, 1989.

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

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

VIRTANEN, I.; GULLBERG, D.; RISSANEN, J.; KIVILAAKSO, E.; KIVILUOTO, T.; LAITINEN, L. A.; LEHTO, V. P.; EKBLOM, P. Laminin alpha1-chain shows a restricted distribution in epithelial basement membranes of fetal and adult human tissues. **Experimental Cell Research**, v. 257, n. 2, p. 298-309, 2000.

WIDSCHWENDTER, M.; ROSENTHAL, A. N.; PHILPOTT, S.; RIZZUTO, I.; FRASER, L.; HAYWARD, J.; INTERMAGGIO, M. P.; EDLUND, C. K.; RAMUS, S. J.; GAYTHER, S. A.; DUBEAU, L.; FOURKALA, E. O.; ZAIKIN, A.; MENON, U.; JACOBS, I. J. The sex hormone system in carriers of BRCA1/2 mutations: a case-control study. **The Lancet Oncology**, v. 14, n. 12, p. 1226-1232, 2013.

WISE, S. G.; WEISS, A. S. Tropoelastin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 3, p. 494-497, 2009.

WLAZLINSKI, A.; ENGERS, R.; HOFFMANN, M. J.; HADER, C.; JUNG, V.; MULLER, M.; SCHULZ, W. A. Downregulation of several fibulin genes in prostate cancer. **The Prostate**, v. 67, n. 16, p. 1770-1780, 2007.

YURCHENCO, P. D. Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 2, 2011.

YURCHENCO, P. D.; AMENTA, P. S.; PATTON, B. L. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. **Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 22, n. 7, p. 521-538, 2004.

ZHOU, L. T.; LIU, F. Y.; LI, Y.; PENG, Y. M.; LIU, Y. H.; LI, J. Gpnmb/osteoactivin, an attractive target in cancer immunotherapy. **Neoplasma**, v. 59, n. 1, p. 1-5, 2012.