ADRIANE SOUSA DE SIQUEIRA

PEPTÍDEO C16, DERIVADO DA LAMININA, REGULA INVASÃO, DINÂMICA DE FORMAÇÃO E ATIVIDADE DE INVADOPÓDIOS EM LINHAGENS CELULARES DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE E FIBROSSARCOMA

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

São Paulo 2014

ADRIANE SOUSA DE SIQUEIRA

PEPTÍDEO C16, DERIVADO DA LAMININA, REGULA INVASÃO, DINÂMICA DE FORMAÇÃO E ATIVIDADE DE INVADOPÓDIOS EM LINHAGENS CELULARES DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE E FIBROSSARCOMA

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

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. Ruy Gastaldoni Jaeger

Versão original

São Paulo 2014 DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Siqueira, Adriane Sousa de.

Peptídeo C16, derivado da laminina, regula invasão, dinâmica de formação e atividade de invadopódios em linhagens celulares de carcinoma epidermóide e fibrossarcoma / Adriane Sousa de Siqueira. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Ruy Gastaldoni Jaeger.

Tese (Doutorado) – 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: O papel da laminina e seus peptídeos bioativos em biologia tumoral.

Versão do título para o inglês: Laminin-derived peptide C16 regulates invasion and invadopodia activity/dynamics in squamous cell carcinoma and fibrosarcoma cell lines.

1. Carcinoma epidermóide 2. Fibrossarcoma 3. Processos Neoplásicos 4. Matriz extracelular 5. Peptídeos 6. Integrinas 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/SBIB051/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Adriane Sousa de Siqueira.					
Título da Tese:	Peptídeo C16, derivado da laminina, regula invasão, dinâmica de formação e atividade de invadopódios em linhagens celulares de carcinoma epidermóide e fibrossarcoma.					
Orientador(a):	Prof. Dr. Ruy Gastaldoni Jaeger.					
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessã pública realizada a///, considerou () Aprovado(a) () Reprovado(a)						
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:					
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituicão:					

Assinatura: Nome: Instituição:

Assinatura: Nome: Instituição:

Assinatura: Nome: Instituição:

Examinador(a):

Examinador(a):

Presidente:



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 Nº 366/10 referente ao projeto intitulado: "Peptídeos bioativos da laminina induzindo derivada de carcinoma linhagem celular invadopódios em 4D" dinâmico microscopia sob epidermóide. Estudo por а responsabilidade de Adriane Sousa de Siqueira, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH-COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

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

São Paulo, 30 de março de 2010.

PROF. D.K. PAOLO M.A ZANOTTO Vice-Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Ao meu pai Raimundo, por seus sábios conselhos e palavras de afeto e consolo, que sempre chegam na hora certa. À minha mãe Antônia, por ser meu maior exemplo de dedicação e perseverança. À Gisele, pela generosidade e apoio. Você fez por mim o que irmã nenhuma faria. E à tia Luci, por seu carinho incondicional. Obrigada por, mesmo à distância, fazerem-se tão presentes em minha vida.

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. Obrigada ainda pela amizade e por todos os seus ensinamentos, que foram fundamentais para minha formação acadêmica.

À Profa. Dra. Vanessa Morais Freitas, que é uma das pessoas mais especiais e talentosas que já conheci. Obrigada 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. Mas acima de tudo, gostaria de agradecer seu companheirismo e generosidade, dentro e fora da USP. Sua amizade foi um dos melhores presentes que recebi nesses últimos anos.

Ao Prof. João de Jesus Viana Pinheiro, cujos ensinamentos, desde a Iniciação Científica, incentivaram-me a buscar ser sempre melhor, não só como profissional, mas também como ser humano. Você é o professor e o amigo que todos gostariam de ter, mas que poucos têm a chance de conhecer e conviver. Obrigada por todo apoio, parceria e amizade; sem você, minha caminhada até aqui teria sido muito mais difícil. Agradeço também pelas valiosas sugestões durante a execução e elaboração deste trabalho.

Ao Thyago, que foi e sempre será a pessoa mais extraordinária que já conheci. Você é o meu incansável companheiro, que cuida de mim com muito carinho, compartilha das minhas decepções e vibra com minhas vitórias. Esta conquista é também resultado do seu apoio e compreensão. Obrigada por fazer parte da minha vida, e me deixar fazer parte da sua.

AGRADECIMENTOS

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

À Profa. Dra. Telma Zorn e sua equipe, por toda atenção e disponibilidade dispensadas ao nosso grupo. Obrigada pelo espaço cedido em seu laboratório para a realização de experimentos de cultura celular, e por permitir o uso de alguns de seus equipamentos. Sua ajuda foi fundamental para a execução desse projeto.

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

À Profa. Dra. Elizabeth F. Martinez (Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic, SP), por ter cedido a linhagem celular CAL27 utilizada neste estudo.

Ao Prof. Dr. Hernandes Faustino (Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, UNICAMP, SP), pela contribuição com equipamentos e reagentes utilizados neste projeto.

Ao Mário Cruz, funcionário do setor de microscopia confocal do CEFAP-ICB, por sua inestimável ajuda com os experimentos de "time-lapse" apresentados neste trabalho.

À Kelly Saito, funcionária do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, pelo auxílio com a preparação e amplificação de plasmídeos utilizados neste projeto.

Às Prof. Dra. Marinilce Fagundes Santos, Profa. Dra. Patrícia Gama e Profa. Dra. Nathalie Cella, pelas relevantes observações e sugestões feitas durante meu Exame de Qualificação. À Profa. Dra. Patrícia Gama, pela oportunidade de participar da elaboração de aulas para o curso de Difusão "Redescobrindo a Biologia Celular". Suas sugestões sobre como preparar e ministrar boas aulas contribuíram de maneira definitiva para minha formação.

Aos meus antigos colegas de Laboratório, que foram sempre muito prestativos e companheiros. Letícia e Karen, obrigada pela amizade e carinho. Camila e Emerson, não tenho palavras para expressar o quanto sou grata 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. E Monique, obrigada por me mostrar o quanto pode ser prazeroso ensinar alguém a fazer ciência, e também por sua ajuda com alguns dos experimentos deste trabalho.

Aos meus atuais companheiros de Laboratório. Edilberto, obrigada pelo apoio técnico. Basilio e Lívia, conhecê-los foi a mais grata surpresa que tive nos últimos anos. Cada um de vocês, à sua maneira, fez os meus dias aqui serem melhores (e bem mais divertidos!). Obrigada por toda ajuda com experimentos e organização do laboratório, e por me ensinarem o real valor de uma grande amizade.

Às amigas Heydi, Maíra, Suély e Thaiomara, do Laboratório da Profa. Dra. Vanessa Freitas, muito obrigada pela ajuda e pelo carinho. Vocês são pessoas maravilhosas e muito prestativas, que sempre me socorreram nas horas em que mais precisei.

Aos meus colegas de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, em especial à Kelly, Maíra, Cilene, Rodolfo, Juliane, Renata, Felipe, Adam, Alexandre e Carla, obrigada pela torcida e por terem me ajudado das mais diferentes maneiras.

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, obrigada 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. À Profa. Dra. Alissa Weaver (Department of Cancer Biology, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN, EUA), pela oportunidade de realizar estágio em seu laboratório, pelo empréstimo de reagentes e pelas inúmeras contribuições para este trabalho. Agradeço ainda a todos os membros de sua equipe, em especial a Daisuke, Seema, Nan Hyung, Christi, Anthony e Rachel, que foram muito receptivos e prestativos durante minha estada em Nashville.

Aos meus amigos de longa data, que de alguma maneira fizeram parte dessa história. Paula, Cibelle, George, Carlos, Bruno, Renata Belich, Mena e Janaíta, obrigada pelas visitas, pela companhia, pela torcida e, acima de tudo, pela amizade de todos vocês.

RESUMO

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, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A laminina, glicoproteína encontrada na lâmina basal, contém peptídeos bioativos que podem ser liberados por proteólise induzida por neoplasias malignas e que são capazes de regular a progressão tumoral. Células neoplásicas que invadem tecidos circunjacentes dependem de invadopódios (protrusões ricas em actina que possuem atividade de proteólise pericelular) para degradar a matriz extracelular. Em nosso laboratório, estudamos os efeitos de peptídeos bioativos da laminina em biologia tumoral. Neste trabalho, verificamos se o peptídeo C16 (KAFDITYVRLKF, cadeia γ 1) seria capaz de estimular invasão e atividade de invadopódios em linhagens celulares de carcinoma epidermóide (CAL27) e fibrossarcoma (HT1080). Ensaios de invasão demonstraram que C16 promoveu aumento na taxa de invasão em ambas às linhagens celulares, comparado ao peptídeo controle "scrambled" C16SX. Esse peptídeo também estimulou atividade de invadopódios em células CAL27 e HT1080, como mostrado em ensaios de degradação de substrato fluorescente. Utilizando microscopia confocal em "time-lapse", exploramos a dinâmica de formação de invadopódios induzida por C16. Observamos que o peptídeo promoveu aumento na digestão de substrato associada à invadopódios em função do tempo. C16 também estimulou fosforilação de cortactina e aumento dos níveis de MT1-MMP, moléculas reconhecidas como marcadores de invadopódios. A seguir, buscamos por vias de sinalização relacionadas aos efeitos de C16 em células tumorais, e demonstramos que o peptídeo estimula a fosforilação de Src e ERK 1/2. Além disso, inibição da via de sinalização ERK promove redução nos processos de invasão e atividade de invadopódios relacionados a C16. Adicionalmente, tentamos elucidar como o peptídeo C16 poderia interagir com células tumorais. Células CAL27 foram tratadas com peptídeos conjugados com rodamina, seguido de análise em microscópio confocal. O peptídeo fluorescente foi encontrando decorando a membrana celular, o que sugere uma possível interação com receptores. Por tal motivo, analisamos possíveis receptores e observamos que diminuição dos níveis de integrina β1 reduz a atividade de invadopódios em células CAL27 tratadas com C16. Nossos dados demonstraram que peptídeo C16, derivado da laminina, regula invasão e atividade de invadopódios em células de carcinoma epidermóide e fibrossarcoma, provavelmente por meio das vias de sinalização Src e ERK e do receptor integrina β**1**.

Palavras-chave: Carcinoma epidermóide. Fibrossarcoma. Processos Neoplásicos. Matriz extracelular. Peptídeos. Integrinas.

ABSTRACT

SIQUEIRA, A.S. Laminin-derived peptide C16 regulates invasion and invadopodia activity/dynamics in squamous cell carcinoma and fibrosarcoma cell lines. 2014. 123 p. PhD Thesis (Cell and Tissue Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Laminin, a basement membrane glycoprotein, harbors bioactive peptides that may be released upon tumor-induced proteolysis, thus influencing tumor invasiveness. Neoplastic cells that invade surrounding tissues rely on invadopodia (actin-rich protrusions associated with pericellular proteolysis) to degrade extracellular matrix. Our Laboratory has been studying laminin-derived peptides effects in tumor biology. Here we addressed whether peptide C16 (KAFDITYVRLKF, gamma 1 chain) would stimulate invasion and invadopodia activity/dynamics in cell lines from squamous cell carcinoma (CAL27) and fibrosarcoma (HT1080). Invasion assays demonstrated that C16 increased invasion rate in both cell lines compared to scrambled control peptide (C16SX). This peptide also stimulated CAL27 and HT1080 invadopodia activity, as shown by fluorescent substrate degradation assay. Through time-lapse confocal microscopy, we explored C16-induced invadopodia dynamics, and observed that the peptide promoted an increase in invadopodia-related substrate digestion overtime. C16 also stimulated cortactin phosphorylation and MT1-MMP levels in our tumor cell lines. Next, we addressed signaling pathways related to C16 effects in tumor cells, and observed that the peptide stimulated phosphorylation of Src and ERK 1/2. Furthermore, ERK 1/2 signaling cascade inhibition also decreased peptide-induced invasion and invadopodia activity/dynamics. We then addressed how C16 would interact with tumor cells. CAL27 cells were treated with rhodamine-conjugated peptides, followed by confocal microscopy analysis. Fluorescent C16 was found decorating cell membrane, suggesting a possible interaction with receptors. Therefore, we looked into putative receptors and observed that knockdown of $\beta 1$ integrin reduced invadopodia activity/dynamics of C16-treated CAL27 cells. We propose that C16 regulates invasion and invadopodia activity/dynamics of squamous carcinoma and fibrosarcoma cells, probably through Src and ERK 1/2 signaling pathways and $\beta 1$ integrin.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Fibrosarcoma. Neoplastic Processes. Extracellular matrix. Peptides. Integrins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 5.1 - C16 estimula invasão e atividade de invadopódios em células de
carcinoma epidermóide (CAL27)71
Figura 5.2 - C16 estimula invasão e atividade de invadopódios em células de
fibrossarcoma (HT1080)73
Figura 5.3 - C16 regula atividade e dinâmica de invadopódios em células de
carcinoma epidermóide (CAL27)75
Figura 5.4 - C16 regula atividade e dinâmica de invadopódios em células de
fibrossarcoma (HT1080)77
Figura 5.5 - C16 estimula fosforilação de cortactina e aumento dos níveis de MT1-
MMP em células de carcinoma epidermóide (CAL27)
Figura 5.6 - C16 estimula fosforilação de cortactina e aumento dos níveis de MT1-
MMP em células de fibrossarcoma (HT1080)81
Figura 5.7 - Vias de sinalização Src e ERK 1/2 podem estar relacionadas aos efeitos
induzidos por C16 em células de carcinoma epidermóide (CAL27)83
Figura 5.8 - Vias de sinalização Src e ERK 1/2 podem estar relacionadas aos efeitos
induzidos por C16 em células de fibrossarcoma (HT1080)85
Figura 5.9 - Integrina β 1 regula a dinâmica de invadopódios em células de
carcinoma epidermóide (CAL27)87
Figura 6.1 – Diagrama esquemático dos eventos celulares relacionados à formação
de invadopódios estimulada pelo peptídeo C1698

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAMs	do inglês "a disintegrin and metalloproteases", traduzido com uma desintegrina e metaloproteinase
AG73	seqüência dos aminoácidos RKRLQVQLSIRT (arginina-lisina- arginina-leucina-glicina-valina-glicina-leucina-serina-isoleucina- arginina-treonina)
AP-1	do inglês "Activator protein 1", traduzido como proteína ativadora 1
BCA	do inglês "Bicinchoninic Acid", traduzido como ácido bicinconínico
BSA	do inglês "Bovine Serum Albumine", traduzido como albumina sérica bovina
C16	sequência dos aminoácidos KAFDITYVRLKF (lisina-asparagina- fenilalanina-ác.aspártico-isoleucina-treonina-tirosina-valina-arginina- leucina-lisina- fenilalanina)
CAC2	linhagem celular derivada de carcinoma adenoide cístico humano
Ca ²⁺	íon cálcio
CAL27	linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide oral humano
CCD	do inglês "charge-coupled device", traduzido como dispositivo de carga acoplada
cDNA	DNA complementar
CEFAP-ICB	Centro de Facilidades para Pesquisa – Instituto de Ciências Biomédicas
cm ²	centímetros quadrados
CO ₂	gás carbônico
DMEM	do inglês "Dulbecco's Modified Eagles' Medium", traduzido como meio de Eagle modificado por Dulbecco
ECL	do inglês "enhanced chemiluminescence"
EDTA	do inglês "ethylenediamine-tetra acetic acid", traduzido como ácido etilenodiamino tetra acético
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
ERK	do inglês "Extracellular signal-regulated kinase", traduzido como quinase regulada por sinais extracelulares
FAK	do inglês "focal adhesion kinase", traduzido como quinase de adesão focal

FITC	do inglês "Fluorescein isothiocyanate", traduzido como isotiocianato de fluoresceína
g	gravidade
GFP	do inglês "green fluorescent protein", traduzido como proteína fluorescente verde
h	horas
HPV	do inglês "Human papillomavirus", traduzido como vírus do papiloma humano
HT1080	linhagem celular derivada de fibrossarcoma humano
kDa	kilodalton
Μ	molar
MEC	matriz extracelular
MEK	do inglês "MAPK/ERK kinase", traduzido como quinase de MAPK/ERK
MEM	do inglês "Minimum Essential Medium", traduzido como meio mínimo essencial
mg	miligrama
Mg ² +	íon magnésio
miRNA	micro RNA
ml	mililitro
mm	milímetro
mМ	milimolar
MAPK	do inglês "Mitogen-activated protein kinase", traduzido como proteína quinase ativada por mitógenos
MMPs	do inglês "matrix metalloproteinases", traduzido como metaloproteinases de matriz
MT1-MMP	do inglês "membrane-type 1 matrix metalloproteinase", traduzido como metaloproteinases de matriz ancorada a membrana 1
ng	nanograma
nm	nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	do inglês "phosphate-buffered saline", traduzido como tampão fosfato-salina
рН	potencial hidrogeniônico

PI(3,4)P2	fosfatidilinositol-3-4-bifosfato
PTP1B	do ingles "Protein-tyrosine phosphatase 1B", traduzido como proteína tirosina fosfatase 1B
RP-HPLC	do inglês "reversed-phase high-pressure liquid chromatography", traduzido como cromatrografia líquida de alta resolução em fase reversa
RSV	do inglês "Rous sarcoma virus", traduzido como vírus do sarcoma de Rous
SBF	Soro fetal bovino
SDS-PAGE	do inglês "sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis", traduzido como eletroforese de gel de poliacrilamida, tendo como agente denaturante sulfato dodecil sódico
SH2	do inglês "Src homology 2 domain", traduzido como domínio Src 2 homólogo
SH2P	do ingles "Src homology 2 domain tyrosine phosphatase", traduzido como tirosina fosfatase do domínio Src 2 homólogo
SH3	do inglês "Src homology 3 domain", traduzido como domínio Src 3 homólogo
TBS	do inglês "Tris-buffered saline", traduzido como tampão tris-salina
Tks	do inglês "Tyrosine kinase substrate", traduzido como substrato de tirosina quinase
U0126	inibidor da via de sinalização das MAP quinases
uPAR	do inglês "urokinase plasminogen activator receptor", traduzido como receptor de ativador de plasminogênio tipo uroquinase
UV	ultravioleta
WASp	do inglês "Wiskott–Aldrich Syndrome protein", traduzido como proteína da síndrome de Wiskott–Aldrich
YIGSR	sequência de aminoácidos YIGSR (tirosina-isoleucina-glicina-serina- arginina)
٥C	graus Celsius
μg	micrograma
μΙ	microlitro
μm^2	micrômetro quadrado
μΜ	micromolar

LISTA DE SÍMBOLOS

- α alfa
- β beta
- γ gama

SUMÁRIO

1 INT	ſRODUÇÃO	.19
2 RE	VISÃO DE LITERATURA	.22
2.1	Matriz Extracelular e Lâmina Basal	.22
2.2	Laminina	.29
2.2.1	Peptídeos Bioativos da Laminina	.32
2.3	Carcinoma Epidermóide	.34
2.4	Fibrossarcoma	.39
2.5	Invadopódios	.42
3 PR	OPOSIÇÃO	.49
4 MA	ATERIAL E MÉTODOS	.50
4.1	Peptídeos	.50
4.2	Linhagens celulares	.50
4.3	Ensaio de Invasão	.51
4.4	Caracterização de invadopódios em células CAL27 e HT1080 tratadas p	oor
peptí	deos da laminina	.52
4.4.1	Preparação de substratos de gelatina fluorescente	.52
4.4.2	Ensaio de degradação de substrato fluorescente	.53
4.4.3	Microscopia e Análise das Imagens	.53
4.5	Estudo por microscopia confocal 4D da dinâmica de formação	de
invad	lopódios estimulada pelo peptídeo C16	.54
4.6	Estudo de proteínas relacionadas à formação de invadopódios em célu	las
CAL2	27 e HT1080 tratadas pelo peptídeo C16	.55
4.6.1	Imunofluorescência	.55
4.6.2	"Immunoblot"	.56
4.7	Vias de sinalização celular relacionadas aos efeitos do peptídeo C16 e	em
célula	as CAL27 e HT1080	.57
4.7.1	"Immunoblot"	.57
4.7.2	Inibição da via de sinalização de ERK 1/2	.58
4.7.3	Ensaio de invasão com células tratadas com inibidor U0126	.58
4.7.4	Ensaio de degradação de substrato fluorescente com células tratadas c	от
inibid	or U0126	.59

4.7.5	5 Estudo	o por	microsc	opia	confocal	4D	da	dinâmica	n de	formação	de
inva	dopódios	s utiliza	ndo célul	as trat	tadas com	inibi	dor U	0126			59
4.8	Determ	inação	da loca	lizaçã	o celular	do p	eptíd	eo C16			60
4.9	Co-part	icipaç	ão entre	e rece	ptores d	e pro	oteína	as da m	atriz	extracelula	ır e
pept	ídeo C1	6									60
4.9.1	Estudo	o por	microsc	opia	confocal	4D	da	dinâmica	n de	formação	de
inva	dopódios	s utiliza.	ndo célul	las cor	n express	ão re	duzid	la de inte	grina į	81	61
4.10	Análise	Estati	stica								61
5 R	ESULTA	DOS									62
5.1	Peptíde	eo C16	6 influer	ncia a	atividade	inva	isiva	de célu	ulas	de carcino	oma
epid	ermóide	e fibr	ossarcor	na							62
5.2	Peptíde	eo C1	6 estim	ula a	atividade	de	inva	dopódio	s en	n células	de
carc	inoma e	pidern	nóide e fi	ibross	sarcoma		•••••				62
5.3	Peptíde	eo C16	regula a	ı dinâ	mica de f	orma	ição	de invad	opódi	ios em célu	ılas
de c	arcinom	a epid	ermóide	e fibr	ossarcon	na	•••••				63
5.4	Peptide	eo C16	estimula	a fosfe	orilação o	de co	rtacti	ina e aur	nento	dos níveis	s de
MT1	-MMP er	n célu	as tumo	rais							64
5.5	Vias de	e sinali	zação S	rc e E	ERK 1/2 p	oder	n est	tar relaci	onad	as aos efe	itos
indu	induzidos por C16 em células tumorais66										
5.6	Peptide	eo C16	decora a	a supe	erfície de	célul	as C/	AL27			68
5.7	Integrin	na β1 (está rela	iciona	da à ativ	vidad	e de	invadop	ódios	induzida	por
C16	em célu	las CA	L27								68
6 D	SCUSS	ÃO					•••••				88
7 CONCLUSÕES											
REFERÊNCIAS											
APÊ	NDICE -	Legen	das – Fi	lmes o	em "time [.]	-laps	e"				122

1 INTRODUÇÃO

Durante a progressão tumoral e metástase, células tumorais separam-se do tumor primário e migram através do tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (CHAMBERS; GROOM; MACDONALD, 2002; CHIANG; MASSAGUE, 2008; SIBONY-BENYAMINI; GIL-HENN, 2012). Esses eventos envolvem interações de células neoplásicas com a matriz extracelular (MEC), uma complexa rede tridimensional de macromoléculas que constituem arcabouço sólido e funcionam como fonte de instrução para as células (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010; HYNES, 2009; LU; WEAVER; WERB, 2012; TANZER, 2006). Nos epitélios, as células formam uma camada fina e flexível de MEC altamente especializada, a lâmina basal. Esta estrutura é composta principalmente por lamininas, colágeno tipo IV, nidogênio, e proteoglicanas do tipo heparan sulfato (YURCHENCO, 2011; YURCHENCO; AMENTA; PATTON, 2004).

Proteólise da MEC e da lâmina basal está relacionada à capacidade invasiva de neoplasias malignas como o carcinoma epidermóide, que representa cerca de 90% dos tumores que afetam a cavidade oral e está associado a metástases precoces para linfonodos regionais (DE CAMARGO CANCELA et al., 2010; JEMAL et al., 2011; JOHNSON et al., 2005). A incidência de carcinoma epidermóide é particularmente alta em países em desenvolvimento, onde a falta de políticas de prevenção e acesso a profissionais de saúde levam a um diagnóstico tardio e, dessa forma, a uma diminuição da taxa de sobrevida dos pacientes (DE CAMARGO CANCELA et al., 2010; JADHAV; GUPTA, 2013; LUBEK; CLAYMAN, 2012).

Enzimas proteolíticas como as metaloproteinases de matriz (MMPs) possuem papel fundamental na disseminação de células neoplásicas e promovem a ruptura barreira mecânica representada pela MEC e lâmina basal, favorecendo disseminação de células tumorais para tecidos circunjacentes (BJORKLUND; KOIVUNEN, 2005; KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010; OVERALL; BLOBEL, 2007; ROWE; WEISS, 2008, 2009). As MMPs podem ainda promover a exposição e liberação de domínios proteicos capazes de estimular atividades biológicas distintas da proteína intacta (FAISAL KHAN et al., 2002; HYNES, 2009). Esses domínios, conhecidos como fragmentos e peptídeos bioativos, podem ser encontrados na maioria das molécula que compõem a matriz extracelular (MAQUART et al., 2004; MOTT; WERB, 2004; SCHENK; QUARANTA, 2003).

A laminina, glicoproteína heterotrimérica da lâmina basal associada à adesão celular, diferenciação е proliferação (AUMAILLEY, 2013; COLOGNATO; YURCHENCO, 2000; DURBEEJ, 2010; GIVANT-HORWITZ; DAVIDSON; REICH, 2005), possui diferentes peptídeos bioativos que podem influenciar o comportamento tumoral (FREITAS; JAEGER, 2002; FREITAS et al., 2004; FREITAS et al., 2007; GAMA-DE-SOUZA et al., 2008; KIKKAWA et al., 2013; KURATOMI et al., 2002; NAKAI et al., 1992; NASCIMENTO et al., 2011; PATTARAMALAI; SKUBITZ, 1994; SIQUEIRA et al., 2010; SKUBITZ et al., 1990; SONG et al., 1997; SWEENEY et al., 1991; YAMAMURA et al., 1993). Entre estes peptídeos, C16 (localizado no braço curto da cadeia γ 1) está envolvido em migração, angiogênese, atividade de protease e metástase em diversos sistemas (KURATOMI et al., 2002; NOMIZU et al., 1997; PONCE; NOMIZU; KLEINMAN, 2001). Essas evidências sugerem que C16 pode possuir um importante papel na invasão tumoral e metástase.

Umas das primeiras etapas do processo de invasão de células tumorais é a extensão de invadopódios, protrusões "finger-like" da membrana celular ricas em actina. Essas protrusões possuem atividade proteolítica intrínseca, e projetam-se verticalmente da porção ventral da membrana de células neoplásicas em direção ao substrato (BUCCIONE; ORTH; MCNIVEN, 2004; LINDER, 2007; MURPHY; COURTNEIDGE, 2011; WEAVER, 2006, 2008b). Os invadopódios são dotados de numerosos núcleos de actina e exibem ainda moléculas adesivas, proteolíticas e envolvidas com sinalização celular. Dentre essas moléculas, cortactina e MT1-MMP parecem ter papel fundamental na formação e atividade dos invadopódios (ARTYM et al., 2006; BUCCIONE; ORTH; MCNIVEN, 2004; CLARK; WEAVER, 2008; CLARK et al., 2007; MURPHY; COURTNEIDGE, 2011; WEAVER, 2013; MERPHY; COURTNEIDGE, 2011; WEAVER, 2008a). A cortactina regula a polimerização e reorganização do citoesqueleto de actina, enquanto MT1-MMP promove degradação da MEC (ARTYM et al., 2006; BARBOLINA; STACK, 2008; MURPHY; COURTNEIDGE, 2011; OSER et al., 2009; WEAVER, 2008a).

Em trabalho prévio realizado em nosso laboratório, já demonstramos que peptídeos derivados da laminina são capazes de influenciar a atividade de invadopódios em linhagem celular derivada de carcinoma adenóide cístico (CAC2) (NASCIMENTO et al., 2011). No entanto, os efeitos de peptídeos da laminina na dinâmica de formação de invadopódios em células de carcinoma epidermóide ainda não foram analisados.

Neste trabalho, buscamos elucidar o papel do peptídeo C16, derivado da cadeia γ1 da laminina, nos processos de invasão e atividade de invadopódios em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide oral humano (células CAL27). A atividade de invadopódios foi analisada utilizando-se ensaio onde células são cultivadas sobre substrato de gelatina fluorescente e tratadas pelos peptídeos de interesse. Dinâmica de formação dos invadopódios relacionada a C16 foi analisada por meio de microscopia confocal em "time-lapse", em células transfectadas com cortactina-GFP. Por razões comparativas, também investigamos os efeitos de C16 em linhagem celular derivada de fibrossarcoma humano (células HT1080). O fibrossarcoma é caracterizado pela proliferação de fibroblastos imaturos e bastante conhecido por seu fenótipo agressivo e secreção elevada de proteases (BAHRAMI; FOLPE, 2010; BIFULCO et al., 2008; COLLINI et al., 2009; GOROVETZ et al., 2008).

Além disso, investigamos ainda alguns mecanismos relacionados aos efeitos de C16 em células de carcinoma epidermóide e fibrossarcoma, estudando a coparticipação entre receptores de matriz extracelular e vias sinalização nos processos biológicos mediados por este peptídeo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Na revisão de literatura, abordaremos os seguintes temas relacionados a esta tese: 1) Conceitos sobre matriz extracelular e lâmina basal, destacando a laminina e suas atividades biológicas; 2) Peptídeos bioativos derivados da laminina, com enfoque ao peptídeo C16; 3) Carcinoma epidermóide e fibrossarcoma, neoplasias malignas que deram origem às linhagens celulares utilizadas neste estudo; e 4) Invadopódios, estruturas relacionadas à invasão celular.

2.1 Matriz Extracelular e Lâmina Basal

O microambiente tumoral representa um nicho complexo onde células neoplásicas e não neoplásicas, fatores solúveis, moléculas de sinalização e componentes da matriz extracelular (MEC) cooperativamente interagem e modulam eventos celulares relacionados à progressão tumoral (CATALANO et al., 2013; ROWE; WEISS, 2009).

Durante o processo de invasão, as células neoplásicas entram em íntimo contato com a matriz extracelular, uma rede tridimensional de macromoléculas formada por polímeros fibrosos bem organizados, representados por várias isoformas de colágeno e por elastina. Estes polímeros estão embebidos em uma mistura amorfa e altamente hidratada de proteoglicanos e glicosaminoglicanos, chamada de substância fundamental (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010; LI; FAN; HOUGHTON, 2007; LU; WEAVER; WERB, 2012; MILES; SIKES, 2014; TANZER, 2006). As proporções entre componentes fibrosos e não fibrosos, diâmetro das fibras e organização de elementos não fibrosos ditam as propriedades bioquímicas e biomecânicas da matriz extracelular de determinado tecido. As proteínas da MEC são grandes e multifuncionais, e possuem domínios que conferem várias funções a uma mesma macromolécula (LU; WEAVER; WERB, 2012; OZBEK et al., 2010).

A MEC não funciona meramente como suporte estrutural para as células, e pode influenciar o comportamento celular afetando crescimento, diferenciação, motilidade e viabilidade (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010; HYNES, 2009; LU; WEAVER; WERB, 2012; TANZER, 2006). Moléculas da MEC podem atuar como

reservatório de substâncias secretadas pelas células, incluindo fatores de crescimento, citocinas e metaloproteinases da matriz (MMPs). A disponibilidade dessas substâncias para as células pode ser regulada por meio de rearranjos da matriz, como os que ocorrem, por exemplo, durante os processos de cicatrização e de invasão de tumores malignos (MILES; SIKES, 2014). Além do mais, existem vias de comunicação bem desenvolvidas entre as superfícies celulares e a MEC, o que permite às células perceber o ambiente no qual estão inseridas (TANZER, 2006). Nesse processo, as células dependem principalmente de integrinas, um grupo de receptores que modulam sua adesão a substratos (BERRIER; YAMADA, 2007; HARBURGER; CALDERWOOD, 2009; MISSAN; DIPERSIO, 2013; XIONG; BALCIOGLU; DANEN, 2013).

As integrinas fazem parte de uma família de receptores transmembrana envolvidos em interações célula-célula e célula-matriz, tanto em processos fisiológicos quanto patológicos (HYNES, 1987, 1992; WOLFENSON; LAVELIN; GEIGER, 2013). São glicoproteínas heterodiméricas formadas por duas subunidades, $\alpha \in \beta$, que dependem de cátions bivalentes (como Ca²⁺ e Mg²⁺) para estabelecer ligações com outras moléculas (HARBURGER; CALDERWOOD, 2009; HYNES, 1987; MISSAN; DIPERSIO, 2013). Existem oito diferentes subunidades β de integrina, que podem se combinar de maneira limitada a dezoito subunidades α , dando origem a 24 heterodímeros que se ligam a várias moléculas da MEC com diferentes afinidades (HYNES et al., 2002; LUO; CARMAN; SPRINGER, 2007).

As integrinas possuem um extenso domínio extracelular, um segmento transmembrana hidrofóbico, e um domínio citoplasmático formado por cerca de 50 aminoácidos (HYNES et al., 2002; MISSAN; DIPERSIO, 2013). Os domínios citoplasmáticos (em especial da subunidade β) ligam-se a proteínas estruturais do citoesqueleto (como talina, vinculina e paxilina), e também interagem com moléculas relacionadas a vias de sinalização. Consequentemente, as integrinas conseguem estabelecer uma conexão transmembrana física entre a MEC e o citoesqueleto e, mesmo sem apresentar atividade enzimática intrínseca, são capazes de transmitir sinais através da membrana plasmática (DELON; BROWN, 2007). Neste contexto, a tirosina quinase FAK é uma importante efetora da sinalização mediada por integrinas, e sua ativação representa o processo enzimático inicial em diversas vias de sinalização relacionadas a estes receptores (MISSAN; DIPERSIO, 2013).

Adicionalmente, as integrinas podem informar às células a respeito das propriedades químicas e mecânicas da MEC, modulando processos celulares por meio da chamada sinalização "de fora para dentro" ("outside-in signaling"). Pode ocorrer também transdução de sinais "de dentro para fora" ("inside-out signaling"), na qual eventos intracelulares levam a mudanças conformacionais que modificam a afinidade da integrina a seus ligantes extracelulares (AVIZIENYTE; FRAME, 2005; HARBURGER; CALDERWOOD, 2009; WOLFENSON; LAVELIN; GEIGER, 2013).

As integrinas interagem com baixa afinidade a seus ligantes, o que favorece a formação de ligações simultâneas, porém fracas, a várias moléculas da MEC. Isto permite que as células explorem o ambiente sem perder sua ligação à matriz (HYNES *et al.*, 2002). Ao interagir com macromoléculas da MEC, integrinas podem formar agrupamentos ("clusters") que concentram componentes intracelulares envolvidos em processos de sinalização celular, podendo afetar expressão gênica, polaridade e forma celulares, bem como motilidade, proliferação, diferenciação e sobrevivência (BERRIER; YAMADA, 2007; HYNES et al., 2002; KRAMER; SHEN; ZHOU, 2005; MISSAN; DIPERSIO, 2013; SCANLON et al., 2013; WOLFENSON; LAVELIN; GEIGER, 2013). Pelo fato de as integrinas estabelecerem ligações das células com a MEC e estruturas vasculares, elas são imperativas na invasão e disseminação de células tumorais e em seu extravasamento para vasos sanguíneos (MILES; SIKES, 2014).

Estruturalmente, a matriz extracelular pode ser dividida em lâmina basal e matriz intersticial. A matriz intersticial é sintetizada principalmente por fibroblastos, e é rica em colágeno fibrilar, proteoglicanos e glicoproteínas (como tenascina C e fibronectina). Por tal motivo, é altamente hidratada e carregada, e confere aos tecidos a propriedade de resistência à tração. A lâmina basal, por sua vez, representa uma camada fina, flexível e altamente especializada de MEC, mais compacta e menos porosa, com composição macromolecular distinta (CANDIELLO et al., 2007; FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010; LU; WEAVER; WERB, 2012; TANZER, 2006; YURCHENCO, 2011).

A lâmina basal possui cerca de 100-300 nm de espessura e atua como uma espécie de arcabouço adesivo, contribuindo para ancoragem de camadas celulares e manutenção da arquitetura tecidual (HALFTER et al., 2013; YURCHENCO, 2011; YURCHENCO; AMENTA; PATTON, 2004). Além de situar-se na interface entre células epiteliais e tecido conjuntivo, a lâmina basal também pode ser observada

recobrindo células endoteliais e mesoteliais, células musculares, células de Schwann e adipócitos (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003; CANDIELLO et al., 2007; KALLURI, 2003; ROWE; WEISS, 2008; YURCHENCO, 2011).

A lâmina basal está relacionada às funções de suporte, ancoragem de células e compartimentalização de tecidos, bem como determina a polaridade celular. Nos glomérulos renais e alvéolos pulmonares, esta estrutura atua como uma espécie de filtro altamente seletivo para sais e pequenas moléculas. Participa ainda de processos de adesão, migração, crescimento e diferenciação celulares, sendo essencial para a formação e manutenção de tecidos tanto nos estágios iniciais de desenvolvimento quanto na fase adulta (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003; CANDIELLO et al., 2007; COLOGNATO; YURCHENCO, 2000; HALFTER et al., 2013; SUZUKI; YOKOYAMA; NOMIZU, 2005). Além disso, a lâmina basal representa uma extensão da membrana plasmática, funcionando como interface interativa entre as células e o microambiente no qual estão inseridas (YURCHENCO, 2011).

A lâmina basal pode conter mais de 50 componentes distintos, sendo formada predominantemente por: 1) colágeno tipo IV, um polímero não fibrilar; 2) laminina, uma glicoproteína adesiva; 3) um ou dois tipos de nidogênio (entactina); e 4) perlecan e/ou agrina, proteoglicanos do tipo heparan sulfato. Pequenas quantidades de outros proteoglicanos e glicoproteínas também podem ser encontradas (CANDIELLO et al., 2007; COLOGNATO; YURCHENCO, 2000; HALFTER et al., 2013; ROWE; WEISS, 2008; SASAKI; FASSLER; HOHENESTER, 2004; YURCHENCO, 2011). Estudos de reconstrução demonstram que a organização da lâmina basal inicia-se a partir da ligação da laminina a superfícies celulares competentes, por meio de glicolipídeos sulfatados, distroglican, integrinas e heparan sulfato. A ancoragem de laminina à superfície celular permite então o acúmulo de nidogênio, colágeno IV, perlecan e agrina (LI et al., 2005; MCKEE; CAPIZZI; YURCHENCO, 2009).

Por meio de microscopia eletrônica convencional, observou-se que a lâmina basal consiste em uma lâmina elétron-densa (lamina densa) separada da membrana plasmática por uma lâmina elétron-lúcida (lamina lúcida). No entanto, estudos utilizando técnicas de congelamento rápido demonstraram que a lâmina basal na verdade pode apresentar-se como uma estrutura homogênea (MIOSGE, 2001; YURCHENCO, 2011). Não existem diferenças de arquitetura significativas entre lâminas basais de vários órgãos e tecidos. No entanto, sua composição pode apresentar variações, já que diferentes isoformas de colágeno IV e de laminina são sintetizadas em diferentes tecidos (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003; COLOGNATO; YURCHENCO, 2000; DURBEEJ, 2010).

Devido ao fato de a lâmina basal apresentar poros de aproximadamente 50 nm, somente pequenas moléculas conseguem se difundir passivamente através desta estrutura (ROWE; WEISS, 2008). Assim sendo, a lâmina basal serve como barreira para grandes solutos e é impenetrável para a maioria das células no tecido adulto normal, exceto durante processos inflamatórios (TANZER, 2006). Por isso, ela representa o primeiro obstáculo a ser atravessado por células neoplásicas durante a invasão tumoral (KIKKAWA et al., 2013; ROWE; WEISS, 2008, 2009). Para que possam ultrapassar a lâmina basal e migrar para o estroma circundante, células neoplásicas sofrem mudanças em sua morfologia, comportamento, e relação com a MEC (MILES; SIKES, 2014; TANZER, 2006). Neste sentido, são capazes não só de promover a ruptura da lâmina basal e abrir caminho para sua migração, mas também de modificar a composição da matriz, alterando o nível de expressão ou promovendo a degradação de diferentes moléculas. Estes eventos são em grande parte mediados por enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases de matriz (MMPs) (MOTT; WERB, 2004; ROWE; WEISS, 2009; SCHENK; QUARANTA, 2003; STERNLICHT; WERB, 2001).

As MMPs fazem parte de uma família que contém mais de 25 endopeptidases dependentes de zinco, capazes de degradar macromoléculas presentes não só na MEC, mas também na superfície celular. Em relação à sua estrutura geral, as MMPs possuem três domínios: o pró-peptídeo, o domínio catalítico, e o domínio C-terminal hemopexina (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010; OVERALL; BLOBEL, 2007). As MMPs são inicialmente expressas em estado enzimaticamente inativo, devido à interação de um resíduo de cisteína do pró-domínio com íon zinco do domínio catalítico. Estas enzimas tornam-se ativas quando ocorre remoção proteolítica do pró-domínio ou modificação química do resíduo de cisteína (PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007; STERNLICHT; WERB, 2001). Simplificadamente, as MMPs podem ser dividas em duas subclasses: MMPs solúveis, e MMPs ancoradas à membrana (MT-MMP, do inglês "membrane-type matrix metalloproteases") (PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007; ROWE; WEISS, 2009).

As MMPs estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo remodelação tecidual e desenvolvimento embrionário, regulação de eventos inflamatórios, e progressão do câncer (EGEBLAD; WERB, 2002; KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010; PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007). Já que estão relacionadas a proteólise, estas enzimas podem criar espaços para migração, regular a arquitetura celular (por meio de efeitos na matriz e nas junções intercelulares), bem como ativar, desativar ou modificar moléculas de sinalização (PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007; SHARMA et al., 2013).

A superexpressão de diversas MMPs parece estar fortemente relacionada à invasividade tumoral (EGEBLAD; WERB, 2002; KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010). Tentativas iniciais de identificar quais MMPs seriam responsáveis por intermediar a invasão de células neoplásicas revelaram que as enzimas secretadas, como as MMPs -2 e -9, eram as principais envolvidas neste processo (ROWE; WEISS, 2008; STERNLICHT; WERB, 2001). No entanto, este conceito tem se modificado nos últimos anos, já que as MMPs -2 e -9 parecem não conferir às células tumorais a habilidade direta de degradar ou migrar através da lâmina basal (HOTARY et al., 2006; ROWE; WEISS, 2008).

Atualmente, acredita-se que as MT-MMPs (em especial a MT1-MMP) assumem um importante papel nos processos de transmigração da lâmina basal e tráfego da célula tumoral através dos tecidos circunjacentes. Um aspecto chave na invasão mediada por MT-MMPs é a habilidade de concentrar atividade proteolítica na região da superfície celular. Já foi demonstrado que formas solúveis (não ancoradas à membrana) de MT-MMPs, mesmo quando ativadas, não estão relacionadas à transmigração da lâmina basal e invasão da matriz intersticial (HOTARY et al., 2006; LARSEN et al., 2006; ROWE; WEISS, 2008). A MT1-MMP está envolvida principalmente na degradação de moléculas de colágeno e na ativação de pró-MMP-2 (BARBOLINA; STACK, 2008; D'ORTHO et al., 1997; LARSEN et al., 2006; OHUCHI et al., 1997), mas alguns trabalhos já demonstraram que esta enzima pode também clivar glicoproteínas adesivas, como a laminina (BAIR et al., 2005; KOSHIKAWA et al., 2004; OHUCHI et al., 1997). Diferentemente das vias de secreção constitutivas que controlam a exportação de moléculas, vesículas secretórias contendo MT1-MMP ativa são levadas até a membrana plasmática nas regiões de contato da célula com a MEC, especialmente em locais onde se formam invadopódios (BRAVO-CORDERO et al., 2007).

Na lâmina basal, a ação de MMPs pode gerar descontinuidades ou a perda de estrutura, favorecendo a formação de "canais" para a migração celular e facilitando assim o processo de invasão (ALEXANDROVA, 2008; SHARMA et al., 2013; ZIOBER; FALLS; ZIOBER, 2006). No entanto, as MMPs possuem um papel muito mais complexo que o de simplesmente abrir caminhos na matriz. Essas enzimas regulam o acesso a fatores de crescimento, e estimulam angiogênese e reorganização do citoesqueleto. As MMPs também podem promover profundas modificações das moléculas da MEC, expondo epítopos crípticos e gerando produtos de degradação bioativos, que agem como ligantes solúveis capazes de modificar o genótipo e o fenótipo celulares (HYNES, 2009; KIKKAWA et al., 2013; OVERALL; BLOBEL, 2007; PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007). Estas modificações, mesmo que restritas a somente algumas moléculas, podem resultar em alterações complexas de vias regulatórias celulares (ALEXANDROVA, 2008).

Mecanismos regulatórios asseguram que a dinâmica da MEC, avaliada a partir da produção, degradação, contração e remodelação de seus componentes, mantenha-se normal durante o desenvolvimento e função de um órgão (LARSEN et al., 2006; PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007). Perturbação desses mecanismos de controle promove a desregulação e desorganização da MEC, podendo levar a um comportamento celular anormal e finalmente à perda da homeostase e função de determinado órgão (LARSEN et al., 2006; LU; WEAVER; WERB, 2012; MILES; SIKES, 2014). Já que controlam a disponibilidade de fatores de crescimento e regulam, juntamente com integrinas e enzimas proteolíticas, diversas vias de sinalização celular, os constituintes da MEC e da lâmina basal desempenham importantes papéis na progressão de tumores malignos e formação de metástase (MILES; SIKES, 2014; PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007; SCHENK; QUARANTA, 2003). Moléculas da matriz implicadas no desenvolvimento do carcinoma epidermóide incluem colágeno, fibronectina, tenascina e laminina (ZIOBER; SILVERMAN; KRAMER, 2001).

Em nosso laboratório, estudamos o papel da laminina no comportamento biológico de tumores (CAPUANO; JAEGER, 2004; FREITAS; JAEGER, 2002; FREITAS et al., 2004; FREITAS et al., 2007; GAMA-DE-SOUZA et al., 2008; MORAIS FREITAS et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2010). Por tal motivo, abordaremos a seguir alguns aspectos relevantes sobre estrutura e funções dessa molécula.

2.2 Laminina

A laminina é a principal glicoproteína adesiva que compõe a lâmina basal, e exerce tanto atividades estruturais quanto biológicas (DURBEEJ, 2010; MARTIN; TIMPL, 1987; SASAKI; FASSLER; HOHENESTER, 2004). Essa molécula foi identificada em 1979, após ser isolada e purificada a partir de uma neoplasia de camundongo dotada de grande quantidade de lâmina basal, o tumor Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) (TIMPL et al., 1979). A laminina é extremamente importante para a organização da lâmina basal. Já foi demonstrado que camundongos que não expressam esta glicoproteína morrem logo após implantação do embrião, enquanto que na ausência de moléculas como perlecan, colágeno IV ou nidogênio, esta etapa ocorre normalmente (SASAKI; FASSLER; HOHENESTER, 2004).

A laminina é uma proteína heterotrimérica composta tipicamente por uma cadeia α de 400 KDa, uma cadeia β e uma cadeia γ , ambas com 200 KDa. A união das cadeias α , β e γ leva à formação de um trímero cruciforme composto por três braços curtos e um braço longo. O braço longo é formado pelo entrelaçamento de porções de cada uma das três cadeias, gerando uma estrutura em α hélice. Os braços curtos, por sua vez, participam da montagem da lâmina basal por meio da interação com outros componentes desta estrutura (AUMAILLEY, 2013; DURBEEJ, 2010). Fotomicrografias eletrônicas revelaram que a laminina possui segmentos semelhantes a espetos e também domínios globulares (AUMAILLEY, 2013; MARTIN; TIMPL, 1987; MINER; YURCHENCO, 2004).

A família das lamininas apresenta isoformas resultantes da combinação de diferentes cadeias α , $\beta \in \gamma$. As subunidades α são responsáveis pela adesão à superfície celular e interação com receptores. Já as subunidades $\beta \in \gamma$ possuem papel principalmente estrutural, mas também podem mediar a ligação da laminina a receptores (YURCHENCO, 2011). As cadeias da laminina apresentam distribuição tecidual específica, suscetível a alterações mediadas por processos de desenvolvimento e patológicos (AUMAILLEY, 2013; DURBEEJ, 2010). Até o momento, foram identificados 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). A união destas diferentes cadeias poderia resultar em 45 possíveis combinações heterotriméricas, sem considerar variantes de *splicing*. Entretanto, o número real de

combinações é bem inferior, devido a restrições de união entre algumas cadeias (COLOGNATO; YURCHENCO, 2000; MACDONALD et al., 2010).

Atualmente, a família das lamininas é constituída por 16 isoformas em vertebrados. Cada uma delas apresenta diferenças em sua organização e interação com receptores, permitindo variações na estrutura final, sinalização e estabilidade da lâmina basal (YURCHENCO, 2011). Essas isoformas são classificadas utilizando-se uma numeração composta que representa as cadeias pelas quais são formadas (α , β , γ). Deste modo, a laminina-111 (antiga laminina-1), por exemplo, é assim chamada por ser composta pelas cadeias α 1, β 1 e γ 1. A laminina-332 (antiga laminina-5), por sua vez, recebe este nome ser formada pelas cadeias α 3, β 3 e γ 2 (AUMAILLEY et al., 2005). As demais isoformas da laminina são as seguintes: 121, 213, 221, 311, 312, 321, 411,421, 422, 423, 511, 521 e 523 (AUMAILLEY et al., 2005; MACDONALD et al., 2010).

As isoformas de laminina são sintetizadas por praticamente todas as células epiteliais, além de células musculares lisas, de tecido ósseo, de músculo cardíaco, nervosas, endoteliais e da medula óssea. Após a síntese, estas moléculas depositam-se principalmente, mas não exclusivamente, na lâmina basal (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003). As lamininas possuem distribuição tecidual distinta. As isoformas 511 e 521, por exemplo, são ubiquamente expressas nos diversos tecidos do organismo. Já as isoforma 421 e 411 são encontradas na lâmina basal que recobre as células endoteliais (DURBEEJ, 2010; YOUSIF; DI RUSSO; SOROKIN, 2013). Devido à sua localização tecidual específica e à sua diversidade estrutural, a laminina é capaz de modular, em grande parte, funções fisiológicas específicas a cada uma das diversas lâminas basais encontradas no organismo (AUMAILLEY, 2013; AUMAILLEY; SMYTH, 1998).

A laminina é reconhecida como uma molécula de adesão celular, e liga-se a diversos componentes da MEC. Uma das suas mais importantes funções é interagir com receptores ancorados na membrana plasmática de células adjacentes à lâmina basal. Estes receptores ligam as matrizes de laminina a vias de sinalização intracelular e modulam os efeitos biológicos dessa molécula. As integrinas são os principais receptores celulares para lamininas, e pelo menos oito isoformas de integrinas (α 1 β 1, α 2 β 2, α 3 β 1, α 6 β 1, α 6 β 4, α 7 β 1, α 9 β 1, α v β 3) podem se ligar a esta glicoproteína (AUMAILLEY, 2013; DURBEEJ, 2010; YURCHENCO, 2011). As

atividades biológicas promovidas pela laminina incluem adesão celular, migração, proliferação, crescimento de neuritos e secreção de protease (AUMAILLEY, 2013; BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003; COLOGNATO; YURCHENCO, 2000; YURCHENCO, 2011). Algumas dessas atividades já foram correlacionadas a importantes eventos da progressão de neoplasias malignas em estudos *in vitro* e *in vivo*.

Adesão de células neoplásicas à laminina foi a primeira atividade biológica demonstrada para essa proteína na progressão tumoral. A laminina também possui efeito quimiotático quando em solução, o que pode explicar sua habilidade em estimular movimentos celulares relacionados aos processos de invasão e metástase (MALINDA; KLEINMAN, 1996; MARTIN; TIMPL, 1987). Esta molécula é ainda capaz de induzir fenótipo maligno. Já foi observado que células cultivadas sobre laminina formam mais tumores *in vivo* do que células não aderentes ou células aderentes à fibronectina (TERRANOVA et al., 1984). Ainda, células tumorais co-injetadas com laminina em ratos atímicos promovem aumento da formação de colônias metastáticas pulmonares nesses animais (IWAMOTO et al., 1987).

A laminina, assim como outras moléculas da matriz extracelular, é capaz de regular atividades biológicas e funcionar como uma constante fonte de instruções para as células. Essas instruções não são estáticas, e aparecem de acordo com a necessidades de determinado tecido (DAVIS et al., 2000; SCHENK; QUARANTA, 2003; TRAN; LAMB; DENG, 2005). 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).

Deste modo, os efeitos da laminina não podem ser relacionados apenas a proteína como um todo, já que ela possui em sua estrutura diversos sítios ativos. Esses sítios podem ser encontrados em vários componentes da MEC, e geralmente não estão expostos na superfície da molécula, permanecendo escondidos dentro de sua estrutura intacta. Por tal motivo, são denominados matricriptinas ou sítios matricrípticos (MAQUART et al., 2004; SCHENK; QUARANTA, 2003; TRAN; LAMB;

DENG, 2005). Mecanismos que controlam a exposição de sítios matricrípticos representam uma etapa relevante na regulação de eventos biológicos pela MEC, e envolvem modificação estrutural ou conformacional de moléculas. Dentre estes mecanismos, podemos citar: 1) degradação enzimática por ação proteolítica; 2) ligação heterotípica a outras moléculas, levando a mudança conformacional; 3) multimerização (organização de moléculas em arranjo); (4) forças mecânicas mediadas por células; e 5) denaturação (DAVIS et al., 2000; MAQUART et al., 2004; SCHENK; QUARANTA, 2003).

A hipótese mais aceita para explicar a existência de sítios matricrípticos é a de que eles fazem parte de uma estratégia evolutiva para controlar diferentes atividades celulares. Dessa forma, determinadas instruções podem permanecer escondidas na molécula intacta até serem requeridas, ou até que uma determinada enzima proteolítica seja ativada. Portanto, não se faz necessário a produção de inibidores ou bloqueio de uma atividade que não tenha sido requisitada em determinado momento (MAQUART et al., 2004; SCHENK; QUARANTA, 2003).

2.2.1 Peptídeos Bioativos da Laminina

As várias atividades biológicas estimuladas pela laminina, tanto em células normais quanto neoplásicas, despertaram o interesse em estudar seus diferentes sítios ativos. Assim sendo, fragmentos proteolíticos e peptídeos sintéticos correspondentes a vários domínios estruturais da laminina têm sido usados para localizar e analisar tais atividades, com o objetivo de demonstrar que a laminina é uma proteína multifuncional dotada de diversos domínios biologicamente relevantes (KIKKAWA et al., 2013; YAMADA; KLEINMAN, 1992).

De maneira geral, para pesquisar domínios ativos em moléculas de laminina, foram realizadas varreduras sistemáticas de sequências, com posterior síntese de peptídeos que possuíam entre 6 e 12 aminoácidos e que estavam sobrepostos às sequencias vizinhas em cerca de 4 aminoácidos. Por meio desta abordagem, aproximadamente 673 peptídeos sintéticos foram produzidos somente para a laminina-111. Levando em consideração que a adesão celular é a principal função relacionada às lamininas, os peptídeos, depois de sintetizados, foram testados quanto à sua capacidade de mediar adesão (NOMIZU et al., 1995; 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).

YIGSR foi um dos primeiros peptídeos descritos para a laminina. Ele é derivado da cadeia β1 e possui diversas atividades relacionadas à inibição da progressão tumoral (GRAF et al., 1987; IWAMOTO et al., 1987; YAMAMURA et al., 1993). *In vivo*, este peptídeo bloqueia a formação de metástases pulmonares e nos ossos, bem como inibe a angiogênese em diversos ensaios (FRIDMAN et al., 1990; GRANT et al., 1989; NAKAI et al., 1992). YIGSR conjugado a 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 SIKVAV, por sua vez, está localizado no braço longo da cadeia α1, logo acima do domínio globular (TASHIRO et al., 1989). Esse peptídeo estimula atividades como adesão, migração, crescimento tumoral, angiogênese, secreção de MMPs e indução de metástase experimental (GRANT et al., 1992; KANEMOTO et al., 1990; NOMIZU et al., 1992; SWEENEY et al., 1991; TASHIRO et al., 1989). Trabalhos de nosso grupo demonstraram que SIKVAV induz secreção de MMPs em células derivadas de carcinoma adenóide cístico (FREITAS et al., 2004; FREITAS et al., 2007). Esse peptídeo também tem sido utilizado em trabalhos que envolvem engenharia de biomateriais para regeneração tecidual no sistema nervoso central (ITOH et al., 2003).

As funções relacionadas à sequência bioativa AG73 (RKRLQVQLSIRT), do domínio LG4 da cadeia α1 da lamina, tem sido estudadas em uma grande variedade de linhagens celulares tumorais. Este peptídeo foi primeiramente identificado devido à sua habilidade em promover adesão celular das linhagens tumorais HT1080 (fibrossarcoma), B16F10 (melanoma) e SW480 (adenocarcinoma de cólon) (NOMIZU et al., 1995). *In vitro*, AG73 estimula a adesão celular, migração, invasão e secreção de MMPs em células de melanoma (ENGBRING et al., 2008), bem como angiogênese (MOCHIZUKI et al., 2007). *In vivo*, este peptídeo promove crescimento tumoral e surgimento de metástases em pulmão e fígado (KIM et al., 1998; SONG et al., 1997). Trabalhos de nosso grupo demonstraram que AG73 estimula atividades biológicas relacionadas à progressão tumoral, como invasão e secreção de

proteases, em linhagens celulares derivadas de neoplasias de glândula salivar (GAMA-DE-SOUZA et al., 2008), e de carcinoma epidermóide oral (SIQUEIRA et al., 2010).

Quando foi identificado como sequência ativa, o peptídeo C16 (KAFDITYVRLKF), presente no primeiro domínio globular da cadeia γ 1, mostrou forte atividade adesiva (NOMIZU et al., 1997). As integrinas $\alpha v\beta$ 3 e $\alpha 5\beta$ 1 já foram identificadas como receptores para este peptídeo, por meio de cromatrografia de afinidade e ensaios de adesão com anticorpos de bloqueio (PONCE; NOMIZU; KLEINMAN, 2001). Pelo fato de não apresentar uma sequência RGD (ligante usual das integrinas citadas acima), acredita-se que C16 possa estimular vias de sinalização distintas das ativadas por fibronectina e outras moléculas contendo este domínio (KIKKAWA et al., 2013).

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; NOMIZU et al., 1997; PONCE; KLEINMAN, 2003; PONCE et al., 1999; 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; KLEINMAN, 2003; PONCE; NOMIZU; KLEINMAN, 2001) estimulou a conjugação deste peptídeo a implantes poliméricos utilizados em regeneração tecidual, com resultados satisfatórios (OTAGIRI et al., 2013).

Outros peptídeos da laminina já foram descritos na literatura, e estão relacionados à migração de neutrófilos (HARVATH et al., 1994), cicatrização (MALINDA et al., 2008), e a outras atividades biológicas em células normais e tumorais.

2.3 Carcinoma Epidermóide

O câncer de cavidade oral é considerado um problema de saúde pública em todo o mundo. Para o ano de 2008, foram estimados cerca de 263.000 novos casos

e 128.000 mortes relacionadas a este tipo de câncer (JEMAL et al., 2011). Os países em desenvolvimento são os que apresentam maior incidência de neoplasias malignas orais (DE CAMARGO CANCELA et al., 2010). No Brasil, a cavidade oral é o sétimo local mais acometido por tumores, com estimativa de 15.290 novos casos para o ano de 2014. As regiões Sudeste e Nordeste concentram o maior número de casos (INCA, 2014).

Cerca de 90% dos tumores malignos da cavidade oral e orofaringe são representados pelo carcinoma epidermóide, também denominado carcinoma de células escamosas. Esse tumor desenvolve-se a partir de alterações malignas do epitélio que reveste as superfícies da cavidade oral e demais vias aerodigestivas superiores (ARGIRIS et al., 2008; JOHNSON et al., 2005; LEEMANS; BRAAKHUIS; BRAKENHOFF, 2011; LUBEK; CLAYMAN, 2012; MAYNE; MORSE; WINN, 2006; WILSON et al., 1999).

Os principais fatores etiológicos relacionados ao carcinoma epidermóide oral incluem o fumo, consumo de bebidas alcoólicas e uso de produtos derivados do tabaco ("tabaco sem fumaça"), sendo que o fumo e álcool possuem efeitos sinérgicos (HASHIBE et al., 2009; JEMAL et al., 2011; LEEMANS; BRAAKHUIS; BRAKENHOFF, 2011; MAYNE; MORSE; WINN, 2006). Hábitos de dieta, infecção por papiloma vírus humano (HPV), fatores genéticos, e saúde oral precária são também considerados fatores de risco para esta neoplasia maligna (DE CAMARGO CANCELA et al., 2010; GUHA et al., 2007; MAYNE; MORSE; WINN, 2006). A idade média relacionada ao diagnóstico do carcinoma epidermóide é de 60 anos (ARGIRIS et al., 2008; MAJCHRZAK et al., 2014; NEVILLE; DAY, 2002). Nos últimos anos, no entanto, surgiram algumas mudanças demográficas em relação à incidência deste tumor, representadas pelo aumento do número de casos entre indivíduos com menos de 45 anos e sem histórico de consumo de álcool ou tabaco (CURADO; BOYLE, 2013; CURADO; HASHIBE, 2009; MAJCHRZAK et al., 2014).

O carcinoma epidermóide invasivo pode ser precedido por lesões prémalignas orais. Essas lesões geralmente se apresentam sob a forma de placas brancas ou vermelhas, conhecidas respectivamente como leucoplasia e eritroplasia (ARGIRIS et al., 2008; LEEMANS; BRAAKHUIS; BRAKENHOFF, 2011; WOOLGAR; TRIANTAFYLLOU, 2011). À medida que o carcinoma desenvolve-se, surgem ulcerações superficiais da mucosa que não cicatrizam. Com o crescimento da lesão, pode haver a formação de uma massa exofítica com superfície papilar elevada, ou
de lesão endofítica com superfície ulcerada e bordas elevadas. Os sítios da cavidade oral acometidos pelo carcinoma epidermóide incluem a língua, assoalho de boca, mucosa jugal, gengiva e palato duro. Tumores podem também ser encontrados no palato mole e orofaringe (JOHNSON et al., 2005; NEVILLE; DAY, 2002).

A propagação local do carcinoma epidermóide está relacionada à anatomia da região acometida, e pode atingir músculos e ossos, bem como vasos sanguíneos e linfáticos (JOHNSON et al., 2005). Metástases para linfonodos cervicais constituem o fator prognóstico mais importante em casos de carcinoma epidermóide da região de cabeça e pescoço (FAN et al., 2011; LUBEK; CLAYMAN, 2012). Metástases à distância, quando ocorrem, costumam atingir os pulmões, linfonodos do mediastino, fígado e ossos (ARGIRIS et al., 2008).

Tumores da cavidade oral e orofaringe em estágios iniciais são tratados com cirurgia ou radioterapia. Já neoplasias em estágios avançados requerem tratamento multimodal, que normalmente incluem quimioterapia (ARGIRIS et al., 2008; LEEMANS; BRAAKHUIS; BRAKENHOFF, 2011; LUBEK; CLAYMAN, 2012). Mesmo com os avanços nos métodos de diagnóstico e tratamento, a taxa de sobrevida de pacientes com carcinoma epidermóide oral em cinco anos é considerada baixa, entre 50 e 60% dos casos (DE CAMARGO CANCELA et al., 2010; JADHAV; GUPTA, 2013; LUBEK; CLAYMAN, 2012). Isto ocorre porque a maioria dos casos só são diagnosticados quando a doença já está em estágio avançado (JOHNSON et al., 2005).

O carcinoma epidermóide resulta de um processo em que o epitélio normal sofre modificações que levam à formação de atipias diversas, caracterizadas por diferenças no tamanho das células, e por modesto aumento no número de queratinócitos. Esta atipia é considerada discreta quando as alterações estão limitadas à camada basal do epitélio, enquanto que atipias moderadas e severas envolvem mudanças crescentes na morfologia celular e aumento de espessura do epitélio (PEREIRA et al., 2007). Quando as alterações celulares envolvem todas as camadas do epitélio sem, no entanto, invadir o tecido conjuntivo, a lesão é classificada como carcinoma *in situ*. O carcinoma epidermóide propriamente dito está relacionado à ruptura da lâmina basal. Este evento define a progressão de carcinoma *in situ* para carcinoma invasivo, e envolve uma série de processos biológicos bem ordenados (KRAMER; SHEN; ZHOU, 2005).

Em seu estágio inicial, o carcinoma epidermóide invasivo é caracterizado pela presença de pequenas coleções de queratinócitos atípicos na lâmina própria (WOOLGAR; TRIANTAFYLLOU, 2009, 2011). Com o passar do tempo, estas células atípicas podem permanecer isoladas ou formar ninhos, cordões ou massas maiores que crescem na lâmina própria, sem ligação com o epitélio de superfície. Essas células apresentam citoplasma eosinofílico abundante, núcleos grandes e hipercromáticos, bem como possuem graus variados de pleomorfismo celular e nuclear. Adicionalmente, o quadro histológico tumoral apresenta diferentes graus de queratinização individual, com formação de pérolas córneas, e ainda mitoses típicas e atípicas. Células neoplásicas invasoras podem ainda estender-se para o tecido adiposo subjacente, músculo ou osso. Intensa resposta inflamatória ao epitélio invasor, assim como áreas focais de necrose também são observadas (FAN et al., 2011; LARSEN et al., 2009; PEREIRA et al., 2007; WOOLGAR; TRIANTAFYLLOU, 2011).

Apesar da forte correlação entre o carcinoma epidermóide e determinados fatores etiológicos, os mecanismos biológicos relacionados à iniciação e progressão desse tumor ainda não foram totalmente esclarecidos (LEEMANS; BRAAKHUIS; BRAKENHOFF, 2011; MEHROTRA; YADAV, 2006). Algumas evidências sugerem que alterações observadas no carcinoma epidermóide estão relacionadas ao acúmulo de modificações genéticas que levam a mudanças na morfologia e comportamento celulares. Estas alterações são mediadas principalmente pela ativação de proto-oncogenes e inativação de genes supressores de tumor (ARGIRIS et al., 2008; NIELSEN et al., 2008).

Nos últimos anos, porém, verificou-se que fatores de crescimento, moléculas de adesão celular, atividade imunológica, e regulação homeostática de células normais também podem influenciar a progressão do carcinoma epidermóide (NIELSEN et al., 2008). Por tal motivo, é cada vez mais aceita a ideia de que o microambiente relacionado a esta neoplasia envolve interações das células neoplásicas com o estroma circundante e tecido normal. Desse modo, o crescimento e a progressão para carcinoma invasivo envolvem interações das células tumorais com células de outros tecidos e com a matriz extracelular (MEHROTRA; YADAV, 2006).

Atualmente, acredita-se que a formação de estroma de suporte e reorganização estrutural da MEC e da lâmina basal são pré-requisitos para os

processos de invasão e metástase em carcinoma epidermóide oral (NIELSEN et al., 2008; SHARMA et al., 2013). Já foi observado que a lâmina basal pode sofrer mudanças quantitativas e qualitativas durante a progressão deste tumor. Estudos que analisaram a expressão de laminina demonstraram que a lâmina basal associada ao carcinoma epidermóide apresenta áreas de espessamento focal, que podem indicar aumento na síntese da laminina. Além disso, a lâmina basal associada a esta neoplasia maligna apresentar descontinuidades em algumas regiões, evento que pode representar a ruptura desta estrutura nas zonas de invasão (KOSMEHL et al., 1999; SOUZA et al., 2007; WILSON et al., 1999). Perda de continuidade da lâmina basal em carcinomas epidermóides pouco diferenciados é mais significativa se comparada a lesões bem diferenciadas, sugerindo maior atividade de degradação proteolítica da lâmina basal (SHRUTHY et al., 2013).

Componentes resultantes da degradação da lâmina basal podem influenciar a atividade invasiva do carcinoma epidermóide (SHARMA et al., 2013), e a laminina parece ter papel fundamental neste processo. Através dos receptores de 32/67 kDa, células de carcinoma epidermóide são capazes de aderir à laminina encontrada na lâmina basal. Esta adesão promove estabilização das células neoplásicas, e é seguida pela secreção localizada de enzimas proteolíticas. Este evento causa então a degradação da própria laminina e de outras moléculas da lâmina basal (SOUZA et al., 2007; WILSON et al., 1999). Uma evidência para a associação entre proteólise da laminina e tumores malignos foi demonstrada por Kuratomi et al. (2008), que relatou a presença de fragmentos da cadeia γ 2 da laminina em exames sorológicos de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

Já foi observado que peptídeos da laminina podem modular o comportamento do carcinoma epidermóide oral. Linhagens celulares derivadas deste tumor são capazes de aderir aos fragmentos E3 e E8 da laminina, bem como ao peptídeo GD-2 (derivado da cadeia α1) (PATTARAMALAI; SKUBITZ, 1994; PATTARAMALAI; SKUBITZ; SKUBITZ, 1996). Mais recentemente, trabalho realizado em nosso laboratório demonstrou que o peptídeo AG73 estimula migração, invasão e secreção de proteases em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide (SIQUEIRA et al., 2010).

A cadeia γ1 da laminina, onde se localiza o peptídeo C16, está expressa na lâmina basal de tecidos adultos normais, bem como na lâmina basal associada à

displasia e ao carcinoma epidermóide. A expressão desta cadeia também foi observada ao redor das ilhas e cordões de queratinócitos modificados em amostras de carcinoma epidermóide invasivo (KOSMEHL et al., 1999).

Células de carcinoma epidermóide possuem algumas integrinas que servem de receptores para a laminina, como $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$ (KRAMER; SHEN; ZHOU, 2005). Dentre estas, a subunidade $\beta 1$ da integrina está relacionada ao aumento da invasão em células de carcinoma epidermóide (KOONTONGKAEW et al., 2011). O padrão de expressão da integrina $\beta 1$ sofre alterações durante a progressão deste tumor. No epitélio oral normal e em casos de atipias epiteliais brandas, apenas células da camada basal são imunopositivas para esta molécula. Já quando se observam atipias moderadas, a integrina $\beta 1$ passa a localizar-se na região da membrana basolateral das células basais, e também em algumas células da camada espinhosa. No carcinoma *in situ*, por sua vez, integrina $\beta 1$ está expressa em toda a espessura do epitélio, e após progressão para carcinoma invasivo passa a localizar-se somente na periferia das frentes de invasão (AHSAN et al., 2011). A expressão localizada de integrinas nestes focos de invasão parece estar relacionada ao perfil agressivo das células neoplásicas e ao prognóstico do carcinoma epidermóide oral (SHARMA et al., 2013).

Análise utilizando bloqueio com anticorpos anti-integrina mostraram que células de carcinoma epidermóide usam integrina $\alpha 6\beta 1$ para aderir e migrar sobre a laminina-111 e que, diferentemente dessas células, queratinócitos normais expressam níveis baixos da subunidade $\beta 1$ de integrina. Esse estudo ainda sugere que migração de células derivadas de carcinoma sobre laminina, mediada pela integrina $\alpha 6\beta 1$, constitui um importante processo durante invasão e metástase (ZHANG et al., 1996).

2.4 Fibrossarcoma

O fibrossarcoma faz parte de um grupo de sarcomas de tecidos moles que contém células fusiformes com diferenciação fibroblástica (COLLINI et al., 2009). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o fibrossarcoma é um tumor maligno composto por fibroblastos e por quantidade variável de colágeno que, em

casos clássicos, apresenta aspecto histopatológico semelhante à espinha de peixe (FICHER; VAN DEN BERG; MOLENAAR, 2002).

No início do século XX, o fibrossarcoma era considerado o tipo mais comum de tumor maligno de tecidos moles em adultos, representando cerca de 66% de todos os sarcomas. No entanto, com o advento e aplicação de técnicas de imunohistoquímica e diagnóstico molecular, e com a identificação de entidades clinicopatológicas distintas, várias das lesões primeiramente classificadas como fibrossarcomas foram reclassificadas como lipossarcomas, rabdomiosarcomas, fibromatose, entre outros (BAHRAMI; FOLPE, 2010; FOLPE, 2014). Deste modo, o fibrossarcoma passou a ser considerado como diagnóstico de exclusão relacionado a outros tumores mesenquimais formados por células fusiformes (DE BREE et al., 2010; FOLPE, 2014; HANSEN et al., 2006). Assim sendo, a incidência de fibrossarcoma caiu drasticamente nos últimos anos, sendo representada por apenas 1 a 5% dos sarcomas provenientes de tecidos moles (BAHRAMI; FOLPE, 2010; FICHER; VAN DEN BERG; MOLENAAR, 2002; WIBMER et al., 2010).

O fibrossarcoma é classificado em tipos adulto e infantil, que representam entidades patológicas distintas (FICHER; VAN DEN BERG; MOLENAAR, 2002; FOLPE, 2014). Como a linhagem celular de fibrossarcoma (HT1080) utilizada neste estudo é derivada de um tumor de adulto, daremos ênfase a este tipo de fibrossarcoma. O fibrossarcoma do adulto surge entre a quarta e a sexta décadas de vida, sendo os tecidos moles profundos das extremidades (principalmente coxas e antebraços), tronco, cabeça e pescoço os sítios mais acometidos (BAHRAMI; FOLPE, 2010; HANSEN et al., 2006; WIBMER et al., 2010). Não existem fatores predisponentes bem estabelecidos para o surgimento do fibrossarcoma, apesar de já ter sido observado que algumas lesões tendem a se formar em sítios previamente irradiados. Clinicamente, o fibrossarcoma adulto apresenta-se como uma massa tumoral que pode ou não estar associada a dor (FICHER; VAN DEN BERG; MOLENAAR, 2002).

Os fibrossarcomas são resistentes à quimioterapia, metastatizam para pulmões e ossos (especialmente para o esqueleto axial), e raramente se propagam para linfonodos. Metástases ocorrem em 9% a 63% dos casos, e a taxa de sobrevida em cinco anos varia de 39% a 54%. Fatores que predispõem a um prognóstico desfavorável em casos de fibrossarcoma incluem presença de grande número de células, associada a altas taxas de mitose e necrose e mínima

quantidade de colágeno (COLLINI et al., 2009; FICHER; VAN DEN BERG; MOLENAAR, 2002; SCOTT et al., 1989).

Histopatologicamente, o fibrossarcoma é composto por células fusiformes com grau moderado de pleomorfismo. As células neoplásicas formam longos fascículos dispostos em padrão que lembra espinha de peixe, e apresentam núcleos cônicos e fortemente corados, bem como nucléolo proeminente e citoplasma escasso. Certa quantidade de colágeno é observada no estroma, variando desde uma rede intercelular delicada a presença de zonas com esclerose semelhante à queloide. Mais de 80% dos fibrossarcomas de adulto apresentam alto grau de malignidade (graus 2 ou 3), e formam lesões bastante agressivas (BAHRAMI; FOLPE, 2010; FOLPE, 2014).

No fibrossarcoma, células neoplásicas podem alterar a composição e organização da MEC para facilitar seu crescimento, sobrevivência e invasão. Já foi observado que células derivadas de fibrossarcoma sintetizam grandes quantidades de componentes da MEC, incluindo hialuronan, proteoglicanos, colágenos, fibronectina e laminina (NIKITOVIC et al., 2013). Além disso, a inibição do receptor de 32/67 kDa da laminina e de integrina α 6 β 1 diminuem as interações das células HT1080 com a laminina, reduzindo também a capacidade invasiva dessa linhagem celular (KIELOSTO et al., 2009; ZUBER et al., 2008).

Células HT1080 representam um modelo celular bastante utilizado para ensaios relacionados à secreção de MMPs, invasão e metástase (BALDASSARRE et al., 2012; HANYU et al., 2009; ZUBER et al., 2008). Por tal motivo, resolvemos também analisar a influência do peptídeo C16 no comportamento invasivo dessa linhagem celular. A adesividade de diversas sequências e peptídeos da laminina foi extensamente testada em células HT1080 (HOZUMI et al., 2010; NOMIZU et al., 2000; NOMIZU et al., 1997; URUSHIBATA et al., 2009; YOSHIDA et al., 1999). Adicionalmente, trabalhos demonstraram que o peptídeo YIGSR é capaz de inibir crescimento tumoral e metástase experimental na linhagem HT1080, provavelmente devido à indução de apoptose nessas células (IWAMOTO; FUJITA; SUGIOKA, 1992; IWAMOTO et al., 1996; KIM et al., 1994).

2.5 Invadopódios

Durante o processo de invasão e metástase, células neoplásicas dissociamse da massa tumoral primária e rompem a lâmina basal para invadir localmente o estroma e tecidos adjacentes. Estas células, a seguir, podem degradar a lâmina basal endotelial, ultrapassar a parede dos vasos e entrar na corrente sanguínea. Acredita-se que células tumorais invasivas consigam penetrar estas barreiras devido à sua capacidade de formar invadopódios (CHIANG; MASSAGUE, 2008; SIBONY-BENYAMINI; GIL-HENN, 2012).

Os invadopódios são protrusões celulares ricas em actina, que exercem proteólise localizada da matriz em pontos de contato da célula com substrato (SIBONY-BENYAMINI; GIL-HENN, 2012; STYLLI; KAYE; LOCK, 2008). Estas estruturas representam sítios para os quais são convergidas diversas atividades celulares, incluindo adesão, modificações do citoesqueleto, atividade proteolítica, tráfego de membrana e ativação de vias de sinalização (SIBONY-BENYAMINI; GIL-HENN, 2012; WEAVER, 2006, 2008b).

Os invadopódios encontrados em células tumorais são bastante semelhantes aos podossomos, protrusões de membrana presentes em células normais dotadas de alta capacidade migratória. Tanto podossomos quanto invadopódios são projeções especializadas ricas em F-actina que se formam na membrana ventral das células e estão em íntimo contato com a MEC (BUCCIONE; CALDIERI; AYALA, 2009; GIMONA et al., 2008; MURPHY; COURTNEIDGE, 2011; STYLLI; KAYE; LOCK, 2008).

Os podossomos inicialmente foram caracterizados como estruturas adesivas, formadas por filamentos de actina e dotadas de habilidade de degradação. Estes elementos foram a princípio observados em fibroblastos transformados com vírus do sarcoma de Rous (RSV) cultivados sobre substrato fluorescente (CHEN et al., 1985; TARONE et al., 1985). No fim da década de 1980, os podossomos foram também visualizados em células não transformadas (ZAMBONIN-ZALLONE et al., 1988). Posteriormente, em linhagens celulares tumorais, estruturas similares com habilidade de degradação da matriz pericelular foram descritas, e então chamadas de invadopódios ("pés invasivos") para enfatizar sua natureza protrusiva (CHEN, 1989).

Podossomos e invadopódios são estruturas puntiformes ricas em F-actina que possuem proteínas reguladoras de actina, proteínas de adesão focal, e moléculas proteínas adaptadoras e integrinas) (BUCCIONE; sinalizadoras (quinases, CALDIERI; AYALA, 2009; BUCCIONE; ORTH; MCNIVEN, 2004; GIMONA et al., 2008; WEAVER, 2006). A proteólise da MEC representa uma atividade intrínseca tanto de podossomos quanto de invadopódios (MURPHY; COURTNEIDGE, 2011; SIBONY-BENYAMINI; GIL-HENN, 2012), mas esta habilidade foi, por certo tempo, considerada como característica exclusiva dos invadopódios, sendo utilizada inclusive como fator de distinção entre essa estrutura e o podossomo (AYALA et al., 2006). Deste modo, tanto podossomos quanto invadopódios permitem à célula coordenar as atividades de degradação da MEC e motilidade celular, com o intuito de facilitar a migração através dos tecidos (MURPHY; COURTNEIDGE, 2011). Alguns autores sugerem que o termo "invadossomo" seja usado para descrever tanto podossomos quanto invadopódios, devido ao fato de ambos possuírem organização estrutural, composição e função semelhantes (DESTAING et al., 2011; LINDER, 2009).

Apesar das diversas similaridades entre podossomos e invadopódios, diferenças morfológicas e moleculares já foram observadas. A primeira e mais importante diferença que define estas duas estruturas é o tipo de célula em que são encontradas: podossomos formam-se em células normais e dotadas de alta motilidade, como monócitos, macrófagos, células dendríticas e osteoclastos, assim como células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos transformados. Já os invadopódios são encontrados primariamente em células tumorais, incluindo células de carcinoma mamário metastático, de melanoma, e carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CHEN et al., 1985; GIMONA et al., 2008; MARCHISIO et al., 1984; WEAVER, 2006, 2008b; ZAMBONIN-ZALLONE et al., 1988).

Uma segunda diferença está relacionada ao tamanho destas estruturas. Podossomos são relativamente pequenos (apresentando 1 µm de diâmetro e 0.4 µm de extensão), enquanto invadopódios são maiores (com até 8 µm diâmetro e 5 µm de extensão). Podossomos e invadopódios diferem ainda em sua dinâmica, sendo que os invadopódios são mais estáveis e persistem por mais tempo. Como consequência, o padrão de degradação dos invadopódios é mais profundo e localizado em comparação ao dos podossomos, que é superficial e difuso (GIMONA et al., 2008; LINDER, 2007; POLISHCHUK et al., 2000; WEAVER, 2008b).

Os invadopódios e podossomos devem ser também diferenciados de outras modificações da membrana plasmática, como as adesões focais (estruturas associadas à adesão à MEC). Estas três estruturas possuem basicamente os mesmos componentes, e acredita-se que exista uma relação recíproca entre adesões focais e invadopódios. Mudança de um fenótipo celular quiescente para migratório é geralmente caracterizada pela dissolução de adesões focais e formação de podossomos ou invadopódios nos sítios de contato com a MEC (BLOCK et al., 2008; CHAN; CORTESIO; HUTTENLOCHER, 2009).

Estudos utilizando microscopia eletrônica demonstraram que as áreas de contato de invadopódios com sítios de degradação da MEC são representadas por grandes projeções da membrana celular (POLISHCHUK et al., 2000). Essas projeções possuem um núcleo rico em actina circundado por proteínas estruturais e de adesão (LINDER, 2007). Um conjunto de proteínas ligantes e nucleadoras de actina, ativadores de polimerização, quinases e pequenas GTPases regulam a maquinaria de actina dos invadopódios (GIMONA et al., 2008). Moléculas chave nesse processo incluem: 1) proteína 2B com domínios SH3 e PX, ou Tks 4 (do inglês "Tyrosine kinase substrate with four SH3 domains"); 2) proteina 2A com dominios SH3 e PX, ou Tks 5 (do inglês "Tyrosine kinase substrate with five SH3 domains"); 3) cortactina e N-WASp (reguladores de actina); 4) Src (tirosina quinase); e 5) MT1-MMP (BUCCIONE; CALDIERI; AYALA, 2009; CLARK et al., 2007; GIMONA et al., 2008; STYLLI; KAYE; LOCK, 2008). Além dessas moléculas, a cooperação entre microtúbulos e citoesqueleto de actina representa um evento importante na formação e função de invadopódios (MURPHY; COURTNEIDGE, 2011). Elongação dessas estruturas em direção à lâmina basal depende de uma rede de microtúbulos que se forma em sua base, sugerindo que os microtúbulos participam da distribuição de proteínas para a região dos invadopódios (SCHOUMACHER et al., 2010).

Estímulos que levam à formação de invadopódios podem ativar vias de sinalização relacionadas à fosforilação e/ou ativação de diversas proteínas. As quinases da família Src possuem papel importante na formação de invadopódios e podossomos. Atividade elevada desta tirosina quinase parece ser essencial para a organização dos invadopódios tanto em células normais quanto transformadas (KELLEY et al., 2010; TARONE et al., 1985). c-Src, um dos componentes da família das Src quinases, regula diferentes eventos relacionados à montagem dos invadopódios, desde sua formação inicial até sua dissociação (DESTAING et al.,

2008). Sabe-se que diversos substratos de Src (como cortactina, N-WASp, dinamina, paxilina, p130Cas e caveolina) participam da formação de invadopódios, embora a contribuição individual de cada molécula para a dinâmica desta estrutura ainda não esteja bem estabelecida (DESTAING et al., 2011; KELLEY et al., 2010). Dados sugerem que a fosforilação de cortactina e N-WASp mediada por Src é um evento importante para a organização dos filamentos de actina durante a montagem do invadopódio (PARK; SUETSUGU; TAKENAWA, 2005; TEHRANI et al., 2006). Dois outros substratos de Src, Tks4 e Tks5, foram identificados como moléculas organizadoras dos invadopódios, e sua fosforilação está relacionada tanto à formação quanto à atividade de degradação destas estruturas (BUSCHMAN et al., 2009; GIANNI et al., 2010; SEALS et al., 2005).

A ativação de Src pode ser controlada pela fosforilação do resíduo de tirosina 416, pela desfosforilação do resíduo de tirosina 527, ou por ligações de moléculas aos seus domínios SH2 ou SH3 (BJORGE; JAKYMIW; FUJITA, 2000; MISSAN; DIPERSIO, 2013). Integrinas podem induzir a ativação de Src diretamente, por meio de interação com seus domínios citoplasmáticos (ARIAS-SALGADO et al., 2003), ou estimulando a ação de fosfatases como PTP1B e SHP2 (CORTESIO et al., 2008). Além disso, a ligação de integrinas a moléculas da MEC pode promover o recrutamento e autofosforilação da tirosina quinase FAK, que possui um domínio com alta afinidade para Src. Subsequente fosforilação de FAK mediada por Src cria sítios de ligação para outras proteínas de sinalização, as quais comunicam o complexo FAK-Src com moléculas efetoras, incluindo os componentes da família das MAP quinases (MAPK) (ASTIER et al., 1997; LARSEN et al., 2006; MITRA; SCHLAEPFER, 2006).

As moléculas ERK 1/2 fazem parte da família das MAP quinases, e são os últimos componentes de um módulo de sinalização formado pela GTPase Ras e pelas quinases Raf e MEK 1/2 (DESCHENES-SIMARD et al., 2014; ROSKOSKI, 2012; YOON; SEGER, 2006). Alguns trabalhos já demonstraram que Src quinases podem mediar a ativação de ERK 1/2 em células derivadas de melanoma e de carcinoma de estômago, sugerindo que a sinalização Src-ERK 1/2 seja importante para a progressão tumoral (MAAT et al., 2009; SHIN et al., 2002). As MAP quinases estão envolvidas especialmente na produção de enzimas proteolíticas que podem degradar a lâmina basal. Em resposta a estímulos extracelulares, a proteína ERK fosforilada pode se translocar do citoplasma para o núcleo e ativar alguns fatores de

transcrição (como AP-1) responsáveis por estimular a síntese de MMPs (KRUEGER et al., 2001; REDDY; NABHA; ATANASKOVA, 2003). A fosforilação de ERK também pode regular a invasividade tumoral pela ativação direta da maquinaria de motilidade celular (LAUFFENBURGER; HORWITZ, 1996), e por meio da inibição de apoptose (ERHARDT; SCHREMSER; COOPER, 1999).

A formação dos invadopódios é dividida em três etapas: iniciação, montagem e maturação (MURPHY; COURTNEIDGE, 2011). Estudos recentes sugerem que a formação de invadopódios é iniciada nas regiões vizinhas às adesões focais, provavelmente em resposta à geração de fosfatidilinositol-3-4-bifosfato (PI(3,4) P2), que recruta a proteína adaptadora Tks5 (ABRAM et al., 2003). Adicionalmente, a agregação de cortactina a sítios de adesão celular à MEC é um evento inicial fundamental para a estruturação dos invadopódios (ARTYM et al., 2006). Tks 5 e cortactina estão colocalizadas em invadopódios, e acredita-se que essa molécula adaptadora possa participar do recrutamento de cortactina para futuros sítios de degradação da MEC (OSER et al., 2009).

Na fase de montagem dos invadopódios, a cortactina modula a ação de várias proteínas reguladoras de actina (YAMAGUCHI et al., 2005). Neste contexto, a cortactina tem papel fundamental na regulação da cofilina, molécula que participa da despolimerização da actina (SIBONY-BENYAMINI; GIL-HENN, 2012). A cortactina liga-se a cofilina por meio de interação eletrostática, inibindo sua atividade. Na presença de estímulos, a cortactina pode ser fosforilada por Src quinases em três diferentes resíduos de tirosina (421, 466 e 482), processo que promove sua dissociação da cofilina (MAGALHAES et al., 2011). Após esta etapa, a cofilina encontra-se livre para participar da despolimerização e reorganização dos filamentos de actina na região precursora dos invadopódios (OSER et al., 2009). Subsequente desfosforilação da cortactina bloqueia a cofilina e permite a estabilização do invadopódio, favorecendo sua atividade de degradação (OSER et al., 2009; YAMAGUCHI et al., 2005). O processo de fosforilação da cortactina regula sua interação não só com a cofilina, mas também com N-WASp e Arp2/3 (OSER et al., 2009; WEAVER, 2008a).

Já foi observado que o carcinoma epidermóide oral apresenta níveis elevados de cortactina em comparação ao epitélio normal, sendo que esta proteína está concentrada na frente de invasão do tumor (SHARMA et al., 2013). Aumento dos níveis de cortactina também está relacionado ao aumento da expressão de MMP-9 e MT1-MMP em células de carcinoma epidermóide da região de cabeça e pescoço, e a inibição dessa molécula reduz o crescimento tumoral (CLARK et al., 2009; CLARK; WEAVER, 2008; CLARK et al., 2007).

Os invadopódios podem degradar a MEC modulando a liberação localizada e ativação de proteases, as quais auxiliam as células a ultrapassar barreiras teciduais (BUCCIONE; CALDIERI; AYALA, 2009; GIMONA et al., 2008; LINDER, 2007; STYLLI; KAYE; LOCK, 2008; WEAVER, 2006). Existem três classes de proteases encontradas em invadopódios: 1) MMPs (como MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP) e proteases da família ADAMs; 2) cisteína proteases (como a catepsina); e 3) serina proteases (como uPAR) (LINDER, 2007; STYLLI; KAYE; LOCK, 2008).Cortactina regula a secreção de MMPs nos invadopódios, exercendo um papel importante na maturação dessas estruturas (BUSCHMAN et al., 2009; CLARK; WEAVER, 2008; CLARK et al., 2007). O recrutamento da cortactina para futuros sítios de degradação da MEC precede o tráfego de proteases para esses locais (ARTYM et al., 2006; CLARK et al., 2007).

MT1-MMP tem papel crucial nos processos de invasão celular fisiológica e patológica (EGEBLAD; WERB, 2002; SEIKI, 2003), sendo considerada importante promotora da atividade colagenolítica de células com fenótipo invasivo (SABEH et al., 2009). O acúmulo de MT1-MMP na região dos invadopódios ocorre por meio de um balanço entre processos de endocitose e exocitose, e envolve reciclagem endocítica mediada por clatrina e cavéolas (MURPHY; COURTNEIDGE, 2011), e mobilização da enzima a partir de depósitos intracelulares (BRAVO-CORDERO et al., 2007). A molécula adaptadora Tks4 estabiliza MT1-MMP nos invadopódios, permitindo localização focal desta molécula e subsequente degradação da MEC (MURPHY; COURTNEIDGE, 2011). Superexpressão de MT1-MMP em células neoplásicas promove tumorigênese, e sua inibição reduz crescimento e invasão tumorais (HOTARY et al., 2003).

As integrinas, devido ao fato de interagirem com a MEC e transmitirem sinais extracelulares para o citoplasma e vice-versa, encontram-se em posição favorável para modular a atividade dos invadopódios (MURPHY; COURTNEIDGE, 2011). A subunidade β1 da integrina é encontrada tanto em podossomos quanto invadopódios (MUELLER; CHEN, 1991), e sua ativação induzida por anticorpos promove aumento da degradação da MEC (NAKAHARA et al., 1998). Estudos utilizando osteoclastos e fibroblastos transformados demonstraram que a ausência

de integrina β1 está relacionada à redução na formação de invadopódios (DESTAING et al., 2010).

Estudos morfológicos de invadopódios em cultura bidimensional geralmente envolvem o cultivo de células em lamínulas cobertas com moléculas ou substratos derivados da MEC, seguidos de marcação das células para actina e/ou com anticorpos contra outras proteínas associadas. Nestas condições, a formação de invadopódios é restrita à superfície ventral das células (MURPHY; COURTNEIDGE, 2011). Estudos de invadopódios em cultura 3D ainda são escassos, mas protrusões contendo núcleos de actina e proteínas associadas à invadopódios já foram observadas em células de melanoma, fibrossarcoma e tumores de mama humanos crescidos em ambiente tridimensional (HOTARY et al., 2000; LI et al., 2010; TOLDE et al., 2010).

Existem poucas evidências para a existência de invadopódios *in vivo*. Estruturas em forma de roseta e ricas em Tks5 e cortactina já foram identificadas em células musculares lisas vasculares (QUINTAVALLE et al., 2010). Ademais, protrusões semelhantes a invadopódios foram observadas em tumores de mama por meio de imagem intravital utilizando microscopia multifóton (CONDEELIS; SEGALL, 2003). Várias proteínas associadas a invadopódios parecem ser extremamente importantes para progressão tumoral em modelos animais, premissa que oferece suporte para a presença dessas estruturas *in vivo* (BLOUW et al., 2008; CLARK et al., 2009; WEAVER, 2008a).

Os invadopódios são capazes de promover a proteólise de constituintes da lâmina basal, como as lamininas (KELLY et al., 1994). Consequentemente, estas estruturas relacionadas às etapas iniciais da invasão poderiam causar a exposição e liberação de peptídeos bioativos da laminina. Dados de nosso laboratório demonstraram que os peptídeos AG73 e C16 estimulam atividade de invadopódios em linhagem celular de carcinoma adenóide cístico, e que este evento é regulado por meio de sinalização mediada por integrina β 1 e pela via de sinalização ERK (NASCIMENTO et al., 2011). No entanto, os efeitos de peptídeos da laminina na dinâmica de formação de invadopódios em células de carcinoma adenóide cístico de peptídeos da laminina na foram observados.

3 PROPOSIÇÃO

Neste trabalho, analisamos o papel do peptídeo bioativo C16 (derivado da cadeia γ1 da laminina) nos processos de invasão, dinâmica de formação e atividade de invadopódios em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide e fibrossarcoma. Adicionalmente, buscamos elucidar vias de sinalização e receptores de matriz extracelular envolvidos na transdução de sinais gerados por este peptídeo. O estudo foi realizado nas seguintes etapas:

- Efeito de C16 na atividade de invasão e na dinâmica de formação de invadopódios em células de carcinoma epidermóide oral (CAL27) e fibrossarcoma (HT1080);
- Análise dos mecanismos relacionados aos efeitos biológicos de C16, envolvendo o estudo de moléculas associadas aos invadopódios, bem como de vias de sinalização e receptores possivelmente ativados por este peptídeo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho não envolveu manipulação direta nem de seres humanos e nem de animais, e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP-ICB), parecer n° 366/10, de 30 de março de 2010.

4.1 Peptídeos

Peptídeo C16, derivado da cadeia γ 1 da laminina, foi sintetizado pela empresa EZ Biolab (Westfield, IN, USA), possuindo grau de pureza de 98% (RP-HPLC) e massa molecular confirmada por espectrometria de massa. Utilizamos também um peptídeo contendo os mesmos aminoácidos de C16 com sequência embaralhada (peptídeo "scrambled" – C16SX), que serviu como controle nos experimentos.

As sequências de aminoácidos dos peptídeos C16 e C16SX "scrambled" estão listados na tabela abaixo:

Tabela 4.1:	Sequência o	le aminoácidos	dos peptídeos	C16 e C16SX.
-------------	-------------	----------------	---------------	--------------

Peptídeo	Sequência	Sequência "scrambled"
C16	KAFDITYVRLKF	FKLRVYTIDFAK

C16 e C16SX conjugados a rodamina (EZ Biolab) também foram utilizados em experimentos para determinar a localização celular dos peptídeos, conforme descrito a seguir.

4.2 Linhagens celulares

Linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de língua (CAL27) foi cultivada em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco - Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Já células derivadas de fibrossarcoma (HT1080) foram cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle (MEM, Sigma) suplementado com 10% de SBF (Gibco). Células foram mantidas em frascos de 25

cm² a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Toda manipulação foi realizada em capela de fluxo laminar. Crescimento das células foi monitorado diariamente em microscópio invertido de contraste de fase, e meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular.

A linhagem CAL27 foi gentilmente cedida pela Profa. Elizabeth F. Martinez (Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic, Campinas, SP). Sua caracterização foi descrita anteriormente (GIOANNI et al., 1988). Já a linhagem HT1080 foi obtida no Banco de Células do Rio de Janeiro, e origina-se de um tumor da região do acetábulo (RASHEED et al., 1974).

4.3 Ensaio de Invasão

Para avaliar se C16 induz fenótipo invasivo em células CAL27 e HT1080, foi utilizado um sistema de câmaras bipartites de 10 poços (Neuro Probe Inc. Gaithersburg, MD, USA), separadas por membrana porosa de policarbonato (diâmetro dos poros = $8 \mu m$). Neste ensaio, a membrana de policarbonato foi coberta com 5 µl de membrana basal reconstituída (Matrigel - Trevigen Inc, Gaithesburg, MD, USA - 14 µg/ml). Os poços da câmara inferior foram preenchidos com peptídeo C16 (100 µg/ml) diluído em meio contendo 0,5% de SBF. Células ressuspendidas em meio com 0,5% de SBF (15x10⁴/poço) foram cultivadas na porção superior da câmara sobre membrana coberta por Matrigel. Como controles, utilizamos peptídeo controle "scrambled" C16SX (100 µg/ml) diluído em meio contendo 0,5% de SBF. Como controles não peptídicos, pocos da câmara inferior foram preenchidos com meio contendo 0,5% de SBF (controle negativo) ou 10% de SBF (controle positivo). A câmara foi incubada por 40 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. 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.

4.4 Caracterização de invadopódios em células CAL27 e HT1080 tratadas por peptídeos da laminina

A utilização de células crescidas sobre substrato fluorescente para estudar a atividade funcional dos invadopódios permite a visualização de áreas de digestão da matriz, que aparecem como espaços escuros em fundo fluorescente (ARTYM et al., 2006; BUCCIONE; ORTH; MCNIVEN, 2004; LINDER, 2007).

4.4.1 Preparação de substratos de gelatina fluorescente

Substratos fluorescentes foram obtidos comercialmente (gelatina-FITC, Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), ou preparados por meio de *kits* para conjugação de reagentes fluorescentes a proteínas (Alexa Fluor Protein Labeling Kit, Invitrogen). Dessa forma, gelatina foi conjugada a fluorocromo no comprimento de onda vermelho (568 nm), seguindo instruções do fabricante. Sucintamente, gelatina (2 mg/ml - Sigma) foi misturada a 1 M de bicarbonato de sódio pH 8.3 e ao fluorocromo de interesse. O conjugado foi incubado por 1 hora à temperatura ambiente, sob vigorosa agitação. Substrato conjugado ao fluorocromo foi separado do corante não reativo em coluna com resina de purificação em gel. Após amostra ter sido carregada na coluna, iluminação por luz UV mostrou duas bandas fluorescentes. A primeira banda, na região inferior, correspondia à gelatina conjugada ao reagente fluorescente. A segunda banda, na região superior, representava o fluorocromo em excesso não reativo. A primeira banda, de gelatina conjugada ao fluorocromo, foi coletada em tubos de 2 ml, utilizando-se o tampão de eluição do "kit" de conjugação.

Lamínulas de vidro (18x18 mm) foram cobertas com gelatina fluorescente, seguindo protocolo de Artym et al. (2006). Resumidamente, lamínulas foram incubadas com solução de poli-l-lisina (Sigma) por 20 minutos à temperatura ambiente, lavadas em PBS e fixadas em glutaraldeído 0,5% por 15 minutos. Em seguida, foram lavadas com PBS e invertidas sobre mistura de 8 partes de gelatina 0,2% (Sigma) e 1 parte de gelatina fluorescente por 10 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem em PBS, lamínulas contendo gelatina fluorescente foram incubadas com borohidreto de sódio (5 mg/ml, Sigma) por 15 minutos, para remoção de grupos reativos residuais presentes nos substratos.

4.4.2 Ensaio de degradação de substrato fluorescente

Para avaliar a capacidade do peptídeo C16 de estimular atividade de invadopódios, células $(2x10^4 - 10^5)$ foram cultivadas sobre substrato de gelatina fluorescente (FITC) em meio de cultivo contendo 0,5% de SBF, e mantidas em estufa de CO₂ a 37 °C. Após período de adesão inicial (1-3 horas), essas células foram tratadas pelo peptídeo C16 (100 µg/ml) diluído em meio com 0,5% de SBF. Células tratadas por peptídeo "scrambled" C16SX (100 µg/ml) diluído em meio com 0,5% de SBF serviram como controle. Controles não peptídicos negativo (meio contendo 0,5% de SBF) e positivo (meio com 10% de SBF), semelhantes aos empregados nos ensaios de invasão, também foram utilizados.

Após 16 horas de incubação, células foram fixadas em paraformaldeído 4% diluído em PBS por 10 minutos, e permeabilizadas com Triton X-100 0,5% (Sigma) em PBS por 5 minutos. Em seguida amostras foram incubadas com faloidina conjugada ao fluorocromo Alexa 568 (Invitrogen - diluição 1:1000) diluído em PBS por 1 hora, para evidenciação dos filamentos de actina (visando delinear o formato das células e seus prolongamentos em direção à gelatina fluorescente). Montagem das lâminas foi realizada com ProLong Gold (Invitrogen).

4.4.3 Microscopia e Análise das Imagens

Amostras de células CAL27 e HT1080 cultivadas sobre substrato de gelatina fluorescente e tratadas por peptídeos da laminina foram examinadas em microscópio de fluorescência Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), utilizando objetiva PlanApo 100x (abertura numérica = 1.4). Imagens das células e do substrato de gelatina foram adquiridas com o auxílio de câmera monocromática CCD digital de alta sensibilidade, específica para amostras fluorescentes (CoolSNAP HQ2, Photometrics Inc, Tucson, AZ, USA). Para observar a extensão de invadopódios em direção ao substrato fluorescente, no mínimo 10 secções no eixo Z por campo da amostra foram obtidas, utilizando um acessório piezoelétrico (PIFOC, Physik Instrumente, Germany) acoplado à objetiva. O microscópio e demais equipamentos foram controlados em estação gráfica com o software Metamorph Premier 7.6 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Para cada amostra, foram adquiridas imagens de 15 células escolhidas aleatoriamente. Os invadopódios foram caracterizados como protrusões de actina sobrepostas a áreas de digestão (espaços escuros) presentes no substrato de gelatina fluorescente. A aquisição das imagens fluorescentes da actina (canal vermelho) e da matriz de gelatina fluorescente (canal verde) foi realizada separadamente, e a superposição dos canais de fluorescência foi feita automaticamente pelo módulo "color combine" do software Metamorph.

Mensurações das áreas de digestão encontradas no substrato fluorescente foram realizadas para verificar se C16 induziu aumento da atividade de invadopódios, comparado aos controles. Para calcular essas áreas, utilizamos o software de domínio público ImageJ (http://rsb.info.nih.gov/ij/). Empregando o recurso de segmentação da imagem ("threshold"), o canal verde (substrato fluorescente) foi processado separadamente, de maneira a ressaltar apenas os espaços escuros na matriz fluorescente. As áreas de degradação foram medidas e expressas em μ m², e os valores obtidos foram comparados graficamente.

Projeções ortogonais, deconvolução tridimensional por algoritmo de restauração, e renderização volumétrica foram realizadas pelo software Volocity (Improvision, Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA).

4.5 Estudo por microscopia confocal 4D da dinâmica de formação de invadopódios estimulada pelo peptídeo C16

Para análise da dinâmica de formação de invadopódios estimulada pelo peptídeo C16, células CAL27 e HT1080 foram cultivadas em placas de cultura de 35 mm até atingirem 50% de confluência. A seguir, meio de transfecção (Opti-MEM, Gibco), reagente de transfecção (Lipofectamina 2000, Invitrogen) e cDNA de cortactina-GFP (300-500 ng), foram misturados e incubados em temperatura ambiente por 30 minutos, de acordo com instruções do fabricante. Esta solução foi adicionada às células tumorais, que foram assim mantidas por um período de 24-48 horas a 37 °C e 5% CO₂. Posteriormente, células viáveis transfectadas com cortactina-GFP foram cultivadas sobre substrato de gelatina conjugada ao fluorocromo Alexa-568 (Invitrogen), e mantidas por 3-6 horas em meio com 10% de SBF, a 37 °C. Em seguida, lamínulas contendo células e gelatina foram montadas sobre lâminas de vidro utilizando adesivo dupla-face de vedação (Bioscience Tools,

San Diego, CA, USA), e mantidas em meio sem vermelho fenol (Sigma) contendo 1% de Nu-Serum (BD Biosciences) mais os peptídeos C16 ou C16SX (100 μg/ml).

Vídeos em "time-lapse" foram realizados em microscópio confocal e multifóton Carl Zeiss LSM 780-NLO (CEFAP-ICB, USP), equipado com câmara de incubação que permitiu controle de temperatura, de pressão de CO₂ e de umidade. O sistema de aquisição das imagens permitiu a observação das amostras em três dimensões espaciais (X, Y, Z) e na dimensão temporal (T). Imagens das células e do substrato de gelatina foram adquiridas em intervalos de 15 minutos, por aproximadamente 12 horas. A extensão de projeções de actina em direção ao substrato fluorescente foi avaliada com a aquisição de pelo menos 10 secções de cada amostra no eixo Z. O microscópio e demais equipamentos foram controlados pelo software ZEN (Carl Zeiss). Montagem dos vídeos de "time-lapse" e projeções ortogonais foram realizadas utilizando o software Volocity (Improvision, Perkin Elmer).

Para cada grupo experimental, foram analisadas 5-10 células escolhidas aleatoriamente. Mensurações das áreas de digestão foram realizadas conforme descrito anteriormente para células fixadas. Os focos de digestão medidos ao longo do tempo foram expressos em relação à área de degradação inicial (arbitrariamente definida como 1), e valores obtidos foram comparados graficamente.

4.6 Estudo de proteínas relacionadas à formação de invadopódios em células CAL27 e HT1080 tratadas pelo peptídeo C16

4.6.1 Imunofluorescência

Células CAL27 e HT1080 foram submetidas a ensaios de degradação de substrato fluorescente e tratadas com os peptídeos C16 e C16SX, conforme descrito anteriormente. Após 16 horas de incubação, células foram fixadas em paraformaldeído 4% em PBS por 10 minutos e permeabilizadas com Triton X-100 0,5% (Sigma) em PBS por 5 minutos. Em seguida, foi realizado bloqueio de sítios inespecíficos com soro de cabra 10% (Kirkegaard & Perry Laboratories - KPL, Gaithersburg, MD, USA) por 1 hora. As amostras foram então incubadas com anticorpos contra MT1-MMP (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA - diluição 1:200), e contra cortactina (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA - diluição 1:1000) ou cortactina – fosfo-Tir 466 (Signalway Antibody, College Park, MD, USA -

diluição 1:200) por 1 hora à temperatura ambiente. Anticorpos primários foram revelados por anticorpos secundários apropriados conjugados a fluorocromos (Alexa Fluor, Invitrogen). Montagem das lâminas foi realizada com ProLong Gold (Invitrogen).

Neste estudo, utilizamos fluorocromos que permitiram clara distinção e contraste entre substrato e proteínas celulares estudadas. Células foram crescidas sobre gelatina-FITC (verde), o anticorpo primário anti-MT1-MMP foi revelado por anticorpo secundário conjugado a Alexa-633 (Invitrogen - "Far Red", "pseudo-corado" em azul), e os anticorpos anti-cortactina/fosfo-cortactina foram revelados por anticorpo secundário conjugado a Alexa-568 (Invitrogen - vermelho).

4.6.2 "Immunoblot"

"Immunoblot" foi empregado para verificar se o peptídeo C16 induz aumento nos níveis de expressão/fosforilação de cortactina e na expressão de MT1-MMP em células HT1080 e CAL27. Para estes experimentos, células foram cultivadas em placas de 6 poços em meio contendo 10% SBF. No dia seguinte, meio completo foi substituído por meio sem soro, e células foram mantidas nestas condições por 24 horas. A seguir, células foram incubadas na presença de C16 ou C16SX (100 µg/ml) diluídos em meio contendo 0,5% SBF em diferentes intervalos de tempo (16 e 40 horas). Amostras foram então lisadas em tampão RIPA contendo 50 mM de Tris-HCI (pH 7,5), 150 mM de NaCI, 1% de Triton X-100, 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 2 mM de EDTA, 1% deoxicolato de sódio, e coquetel de inibidores de protease e fosfatase (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) 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 BSA ou

5% de leite desnatado diluído em 0.05% Tween-20 em TBS (TTBS). As membranas foram então incubadas com os anticorpos primários contra cortactina (Santa Cruz - diluição 1:1000), cortactina – fosfo-Tir 466 (Signalway Antibody - diluição 1:1000) e MT1-MMP (Millipore, diluição 1:1000). 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 1:2000).

4.7 Vias de sinalização celular relacionadas aos efeitos do peptídeo C16 em células CAL27 e HT1080

4.7.1 "Immunoblot"

Para analisar se vias de sinalização Src e ERK 1/2 estariam relacionadas aos efeitos gerados pelo peptídeo C16, células CAL27 e HT1080 (5X10⁴) foram cultivadas em placas de 6 poços em meio contendo 10% SBF. No dia seguinte, meio completo foi substituído por meio sem soro, e células foram mantidas nestas condições por 24 horas. A seguir, amostras foram incubadas na presença de C16 ou C16SX (100 μ g/ml) diluídos em meio com 0,5% SBF em diferentes intervalos de tempo (2-20 minutos), e submetidas a experimentos de "immunoblot", conforme descrito anteriormente. Membranas foram incubadas com anticorpos primários contra Src (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA - diluição 1:1000), Src – fosfo-Tir-416 (Cell Signaling - diluição 1:1000), ERK (Santa Cruz - diluição 1:1000) e ERK – fosfo-Tir 204 (Santa Cruz - diluição 1:1000). A influência de C16 sobre as vias de sinalização foi analisada a partir da observação dos níveis de fosforilação de Src (p-Src, Tir-416) e ERK (p-ERK, Tir-204), comparados à expressão de Src e ERK totais. β-actina foi usada como controle interno.

4.7.2 Inibição da via de sinalização de ERK 1/2

Para confirmar os resultados obtidos nos experimentos de "immunoblot", e reiterar o envolvimento de ERK 1/2 nos processos de invasão e de formação de invadopódios induzidos por C16, tratamos células CAL27 e HT1080 com inibidor específico de MEK, U0126 (Cell Signaling).

Células com atividade de ERK quinases inibida por U0126 foram submetidas a ensaios de invasão e de degradação de substratos de gelatina fluorescente. A especificidade do inibidor foi avaliada por meio de "immunoblot", conforme descrito anteriormente. A eficácia da inibição mediada por U0126 foi analisada pela diminuição na expressão de p-ERK, quando comparado à expressão de ERK total.

4.7.3 Ensaio de invasão com células tratadas com inibidor U0126

Células CAL27 e HT1080 foram tripsinizadas como de costume, e mantidas em suspensão em meio com 0,5% de SBF contendo o inibidor de MEK U0126 (50 μ M) por 30 minutos a 37 °C. A seguir, foi realizado ensaio de invasão em sistema de câmaras bipartites (Neuro Probe). Poços da câmara inferior foram preenchidos com peptídeo C16 (100 μ g/ml) diluído em meio com 0,5% de SBF. Células mantidas em meio contendo 0,5% de SBF e inibidor U0126 (15x10⁴/poço) foram colocadas na porção superior da câmara sobre membrana porosa coberta por Matrigel. A câmara foi então incubada por 40 horas a 37 °C em estufa de CO₂. Os processos de fixação, coloração e contagem das células foram os mesmos utilizados para os ensaios de invasão.

Como controles neste experimento utilizamos: 1) células com atividade de ERK quinases inibida e tratadas por peptídeo controle "scrambled" (C16SX, 100 μg/ml); 2) células com atividade de ERK quinases não inibida (tratadas somente com metanol, veículo onde foi diluído o inibidor), e depois incubadas com C16 ou C16SX; 3) células tratadas com U0126 e incubadas com meio contendo 10% SBF; 4) células tratadas com metanol e incubadas com meio contendo 10% SBF.

4.7.4 Ensaio de degradação de substrato fluorescente com células tratadas com inibidor U0126

Células CAL27 e HT1080 foram tripsinizadas como de costume, e mantidas em suspensão em meio com 0,5% de SBF contendo inibidor de MEK U0126 (50 μ M) por 30 minutos a 37 °C. Após este período, células foram cultivadas sobre substrato de gelatina fluorescente e mantidas em incubadora de CO₂ a 37 °C por 1-3 horas. Posteriormente, foi adicionado meio contendo 0,5% SBF, C16 (100 μ g/ml) e U0126 (50 μ M). Após 16 horas de incubação, células foram fixadas em paraformaldeído 4% e submetidas à marcação para actina. Análise das imagens e mensurações das áreas de degradação do substrato fluorescente foram realizadas conforme descrito previamente.

Como controles neste experimento utilizamos: 1) células com atividade de ERK quinases inibida e tratadas por peptídeo controle "scrambled" (C16SX, 100 μg/ml); 2) células com atividade de ERK quinases não inibida (tratadas somente com metanol) e depois incubadas com C16 ou C16SX; 3) células tratadas com U0126 e incubadas com meio contendo 10% SBF; 4) células tratadas com metanol e incubadas com meio contendo 10% SBF.

4.7.5 Estudo por microscopia confocal 4D da dinâmica de formação de invadopódios utilizando células tratadas com inibidor U0126

Células CAL27 e HT1080 com atividade de ERK inibida por U0126 também foram submetidas a ensaios para análise da dinâmica de formação de invadopódios em função do tempo (microscopia confocal "time-lapse"). Para realizar este experimento, células viáveis previamente transfectadas com cDNA de cortactina-GFP foram tripsinizadas e mantidas em suspensão em meio com 0,5% de SBF contendo inibidor de MEK U0126 (50 μM) por 30 minutos a 37 °C. Como controle, utilizamos células incubadas com metanol. Estas células foram então cultivadas sobre substrato de gelatina conjugada ao fluorocromo Alexa-568 (Invitrogen) por 3-6 horas em meio com 10% de SBF, a 37 °C. Em seguida, lamínulas contendo células e gelatina foram montadas sobre lâminas de vidro utilizando adesivo dupla-face para vedação (Bioscience Tools), e mantidas em meio sem vermelho fenol (Sigma)

contendo 1% de Nu-Serum (BD Biosciences), peptídeo C16 (100 μ g/ml), e U0126 (50 μ M) ou metanol.

Vídeos em "time-lapse" foram realizados em microscópio LSM 780-NLO (Carl Zeiss) conforme relatado anteriormente. Focos de digestão medidos ao longo do tempo foram expressos em relação à área de degradação inicial (arbitrariamente definida como 1).

4.8 Determinação da localização celular do peptídeo C16

Para determinar a localização celular do peptídeo C16, células CAL27 foram cultivadas sobre lamínulas de vidro por 24 horas. A seguir, estas células foram incubadas com peptídeos C16 ou C16SX conjugados a rodamina (100 μg/ml) diluídos em meio contendo 0,5% de SBF por 1 hora. As amostras foram então fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos, e permeabilizadas com Triton X-100 0,5% (Sigma) em PBS por 5 minutos. Para evidenciação de filamentos de actina, células foram incubadas com faloidina conjugada ao fluorocromo Alexa 633 (Invitrogen – diluição 1:500) em PBS por 1 hora. Montagem das lâminas foi realizada com ProLong Gold (Invitrogen).

As amostras foram analisadas em microscópio de fluorescência confocal Carl Zeiss LSM 510 (Department of Cancer Biology, Vanderbilt University Medical Center, TN, EUA). Projeções ortogonais foram realizadas pelo software Volocity (Improvision, Perkin Elmer).

4.9 Co-participação entre receptores de proteínas da matriz extracelular e peptídeo C16

Para observar se a subunidade de integrina β 1 estaria relacionada à atividade funcional de invadopódios, células tiveram esse receptor silenciado por plasmídeo contendo miRNAs e codificando GFP (BLOCK-iT Pol II miR RNAi Expression Vector with EmGFP, Invitrogen). A utilização de vetores expressando miRNA e GFP permitiu-nos observar não só as células que foram eficientemente transfectadas com miRNA, mas também o efeito do silenciamento da integrina β 1 na atividade funcional dos invadopódios.

Com este intuito, células CAL27 foram cultivadas em placas de 6 poços até atingirem 50% de confluência. A seguir, meio de transfecção (Optimen, Gibco), reagente de transfecção (Lipofectamina 2000, Invitrogen) e plasmídeos contendo miRNAs para integrina β1 (BLOCK-iT, Invitrogen) foram misturados e incubados a temperatura ambiente por 30 minutos, de acordo com instruções do fabricante. Esta solução foi adicionada às células CAL27, que foram assim mantidas por um período de 48-72 horas a 37 °C.

4.9.1 Estudo por microscopia confocal 4D da dinâmica de formação de invadopódios utilizando células com expressão reduzida de integrina β 1

Células CAL27 transfectadas com BLOCK-iT contendo miRNAs contra integrina β1 foram cultivadas sobre substrato fluorescente conjugado a Alexa 568, tratadas com o peptídeo C16 (100 µg/ml) e submetidas à análise da dinâmica de invadopódios, utilizando microscopia confocal 4D, conforme descrito anteriormente. Como controles, utilizamos células transfectadas com plasmídeo controle (pcDNA 6.2TM-GW/EmGFP-miR, contendo sequência "scrambled" de miRNA) e incubadas com C16.

4.10 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 três ou mais grupos foram estimadas através de análise de variância (ANOVA), seguido por teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

5 RESULTADOS

5.1 Peptídeo C16 influencia atividade invasiva de células de carcinoma epidermóide e fibrossarcoma

Analisamos o processo de invasão celular *in vitro*, utilizando sistema de câmaras bipartites separadas por membrana porosa coberta por Matrigel. Após período de 40 horas, observamos que o peptídeo C16 estimulou aumento da taxa de invasão de células de carcinoma epidermóide (CAL27, Figura 1A) e fibrossarcoma (HT1080, Figura 2A). Contagem do número de células/poço demonstrou que o índice de invasão da linhagem CAL27 foi quatro vezes maior em amostras tratadas com C16, comparado ao do grupo controle C16SX (Figura 1A). Já em células HT1080, esse índice de invasão foi cinco vezes maior que o das amostras tratadas com C16SX (Figura 2A). Observamos ainda que a taxa de invasão de células HT1080 incubadas com C16 foi cinco vezes maior comparada à das células CAL27. Em relação aos controles não peptídicos, o índice de invasão estimulado por C16 foi maior que o observado nos grupos tratados com 0,5% SBF (controle negativo), em ambas as linhagens (Figuras 1A e 2A, linhas horizontais pontilhadas).

Ensaios de invasão foram realizados pelo menos três vezes, com resultados semelhantes.

5.2 Peptídeo C16 estimula atividade de invadopódios em células de carcinoma epidermóide e fibrossarcoma

Tendo em vista que C16 estimulou aumento da taxa de invasão em células CAL27 e HT1080, avaliamos a seguir sua participação na atividade de invadopódios nessas linhagens celulares, utilizando ensaios de degradação de substrato de gelatina fluorescente (ARTYM et al., 2006). Nesse ensaio, a formação de invadopódios é representada pela presença de pontos escuros (áreas de digestão) na matriz de gelatina fluorescente (Figuras 1C e 2C, setas brancas no painel gelatina-FITC). Mensurações das áreas de digestão de amostras tratadas com C16 demonstraram que, em células CAL27, a atividade de invadopódios foi cerca de três vezes maior comparada ao controle C16SX (Figura 1B). Já nas células HT1080, essa atividade foi onze vezes maior que a observada no grupo tratado com C16SX (Figura 2B). Em relação aos controles não peptídicos, a atividade de invadopódios

induzida por C16 foi maior que a dos controles negativos nas duas linhagens celulares (Figuras 1B e 2B, linhas horizontais pontilhadas). Neste ensaio, observamos também que as células de fibrossarcoma estavam associadas a focos de digestão maiores e mais numerosos (Figura 2C, seta branca no painel gelatina-FITC).

Exemplos de amostras tratadas com C16 são mostrados nas Figuras 1C e 2C. Em células cultivadas na presença do peptídeo, observamos pontos de acúmulos de actina (vermelho) colocalizados com áreas de digestão da gelatina (Figuras 1C e 2C, setas brancas no painel sobreposição). Projeções ortogonais (Figuras 1C e 2C, XZ e YZ) exibem protrusões de actina no interior de focos de digestão na matriz fluorescente (Figuras 1C e 2C, setas pretas em XZ e YZ). Células CAL27 e HT1080 tratadas com peptídeo controle C16SX apresentaram discretos focos de digestão (Figuras 1D e 2D).

Com o intuito de melhor caracterizar e observar os invadopódios, foram realizadas reconstruções volumétricas de imagens das células CAL27 e HT1080 tratadas com C16 (Figuras 1E e 2E). Por meio destas reconstruções, podemos observar o substrato de gelatina fluorescente (verde) em 3 dimensões, sobre o qual a célula (actina - vermelho) foi cultivada (Figura 1E). Vemos ainda algumas projeções de actina penetrando a matriz de gelatina (Figuras 1E e 2E, setas brancas).

Ensaios de degradação de substrato fluorescente foram realizados pelo menos três vezes, com resultados semelhantes.

5.3 Peptídeo C16 regula a dinâmica de formação de invadopódios em células de carcinoma epidermóide e fibrossarcoma

Para melhor compreender o processo de formação de invadopódios em células tumorais durante tratamento com C16, recorremos a experimentos que envolvem a utilização de microscopia fluorescente 4D ("time-lapse"). Deste modo, amostras de células CAL27 e HT1080 foram observadas em 3 dimensões espaciais (X, Y, Z), durante um determinado intervalo de tempo (T). Nestes experimentos, células transfectadas com cortactina-GFP foram cultivadas sobre substrato de gelatina conjugada ao fluorocromo Alexa-568, tratadas com os peptídeos de interesse, e analisadas em microscópio confocal. Filmes em "time-lapse" das células

transfectadas com cortactina-GFP foram adquiridos em intervalos de 15 minutos, por cerca de 12 horas, e estão disponíveis em CD que acompanha este trabalho (arquivos tipo *.MOV – Quick Time). As legendas dos vídeos encontram-se ao final da tese, na seção Apêndice.

Em células CAL27, o peptídeo C16 induziu aumento na atividade de invadopódios em função do tempo (Figura 3A e Filme S1). Mensurações dos focos de digestão da matriz de gelatina mostraram que áreas de degradação tornaram-se evidentes 6 horas após o tratamento com C16. Após 12 horas, a área de digestão associada às células incubadas com este peptídeo era cerca de dez vezes maior que a área de degradação inicial (Figura 3B). Nas amostras tratadas com C16SX, não notamos aumento expressivo das áreas de degradação no decorrer do tempo (Figura 3A e B, e Filme S2).

C16 também estimulou a atividade de invadopódios em função do tempo em células HT1080 (Figura 4A), que passaram a exibir aumento nas áreas de digestão cerca de 2 horas após incubação com o peptídeo (Figura 4A e B, e Filmes S3). Ao final do experimento, notamos que a área de digestão nas amostras tratadas com C16 era oito vezes maior que a área inicial (Figura 4B). Nas amostras tratadas com C16SX, não notamos aumento significativo das áreas de degradação (Figura 4A e B, e Filme S4).

A dinâmica de formação de invadopódios em linhagens tumorais tratadas com C16 também foi observada em projeções ortogonais XZ e YZ obtidas a partir dos filmes em "time-lapse". Nestas projeções, é possível notar a presença de protrusões de cortactina que se estendem a partir da superfície ventral de células CAL27 (Figura 3C, setas brancas) e HT1080 (Figura 4C, setas brancas).

5.4 Peptídeo C16 estimula fosforilação de cortactina e aumento dos níveis de MT1-MMP em células tumorais

Sabe-se que a dinâmica dos invadopódios está diretamente relacionada a modificações do citoesqueleto de actina, processo mediado por moléculas como nucleadores e ligantes de actina, quinases e proteases (LINDER, 2007; MURPHY; COURTNEIDGE, 2011). Diante desses dados, resolvemos analisar a distribuição celular e nível de expressão de cortactina e MT1-MMP em células CAL27 e HT1080. Levando em consideração que o estado de fosforilação da cortactina é importante

para a iniciação e estabilização dos invadopódios (OSER et al., 2009), também investigamos os níveis de fosforilação dessa proteína nas duas linhagens celulares.

Amostras de células CAL27 e HT1080 tratadas com peptídeos de interesse foram submetidas a ensaio de degradação de substrato fluorescente, e então duplamente marcadas para MT1-MMP e cortactina/p-cortactina (Tir-466). Expressão de cortactina foi visualizada como marcação citoplasmática difusa em células tratadas com C16 (Figuras 5A e 6A, painel cortactina). P-cortactina (Tir-466), por outro lado, apresenta tendência a concentrar-se na porção ventral das células (Figuras 5B e 6B, projeções ortogonais XZ e YZ). Já MT1-MMP encontra-se amplamente distribuída em células CAL27 (Figura 5A e B, painel MT1-MMP) e HT1080 (Figura 6A e B, painel MT1-MMP). Colocalização de cortactina/p-cortactina e MT1-MMP foi observada em focos de digestão da matriz de gelatina (Figuras 5 e 6, setas pretas). Amostras tratadas com C16SX, apesar de exibirem menores áreas de degradação, não apresentaram diferenças na distribuição de cortactina e MT1-MMP comparadas a C16 (dado não ilustrado).

Resultados de "immunoblot" permitiram-nos avaliar melhor os níveis de cortactina e MT1-MMP em células tumorais. Para este experimento, células foram tratadas com peptídeos de interesse em intervalos de tempo de 16 horas (duração dos ensaios de degradação de substrato fluorescente) e 40 horas (duração dos ensaios de invasão). Observamos que o peptídeo C16 estimulou aumento da taxa de fosforilação da cortactina da linhagem CAL27 após 16 horas de tratamento com o peptídeo. Nas amostras tratadas com C16SX, não observamos aumento no índice de fosforilação dessa proteína em função do tempo (Figura 5C, p-cortactina). Os níveis de cortactina e MT1-MMP permaneceram praticamente inalterados ao longo do tempo em amostras incubadas com C16, apesar de serem maiores que os observados no grupo controle C16SX (Figura 5C, cortactina e MT1-MMP).

Já nas células HT1080, C16 induz aumento da fosforilação de cortactina em função do tempo (Figura 6C, p-cortactina), especialmente após 16 horas de tratamento com C16. Esse padrão não é observado em amostras tratadas com C16SX. Níveis de cortactina não sofreram alterações no decorrer do tempo em células cultivadas na presença de C16, apesar de serem maiores que o do grupo controle (Figura 6C, cortactina). O peptídeo também estimulou aumento dos níveis proteicos de MT1-MMP em células HT1080, em comparação ao grupo controle C16SX (Figura 6C, MT1-MMP).

5.5 Vias de sinalização Src e ERK 1/2 podem estar relacionadas aos efeitos induzidos por C16 em células tumorais

Após verificarmos que C16 estimula tanto a formação de invadopódios quanto a expressão de proteínas relacionadas a esta estrutura, estamos tentando compreender os mecanismos envolvidos nesse processo.

Primeiramente, resolvemos verificar se o peptídeo C16 seria capaz de estimular a ativação da via de sinalização relacionada à Src, avaliando os níveis de fosforilação desta proteína. Resultados de "immunoblot" mostraram que C16 estimula a fosforilação de Src tanto em células CAL27 quanto em células HT1080. Na linhagem CAL27 (Figura 7A), aumento na fosforilação de Src (Tir-416) é observado cerca de 2 minutos após o tratamento com C16. Já células HT1080 (Figura 8A) exibem níveis elevados de fosforilação de Src 5 minutos após tratamento com peptídeo. Taxas significativas de fosforilação de Src são mantidas por até 20 minutos em células tratadas com C16, o que não é observado em amostras tratadas com C16SX (Figuras 7A e 8A). Não foram observadas alterações significativas nos níveis de fosforilação de Src em intervalos de tempo maiores (dado não ilustrado).

A fosforilação de Src pode promover a ativação da via de sinalização Ras-Raf-MEK-ERK (LARSEN et al., 2006). Neste contexto, resolvemos investigar o possível papel das ERK quinases nos processos de invasão e de formação de invadopódios em células CAL27 e HT1080.

Primeiramente, verificamos se C16 poderia induzir a fosforilação de ERK 1/2. Resultados de "immunoblot" demonstraram que este peptídeo promove aumento dos níveis de fosforilação de ERK em ambas as linhagens tumorais. Nas células CAL27 (Figura 7B), aumento na fosforilação de ERK (Tir-204) pôde ser observado cerca de 2 minutos após células serem cultivadas na presença de C16. Já células HT1080 (Figura 8B) passaram a exibir níveis elevados de fosforilação de ERK 5 minutos após tratamento com peptídeo. Taxas significativas de fosforilação de ERK foram mantidas por até 20 minutos em células tratadas com C16, evento que não foi observado em amostras incubadas com C16SX (Figuras 7B e 8B). Altos níveis de fosforilação de ERK foram detectados por até 16 horas após tratamento com C16 (dado não ilustrado).

O próximo passo foi avaliar se os efeitos induzidos por C16 em ambas as linhagens tumorais estavam relacionados à sinalização mediada pela proteína ERK.

Deste modo, células CAL27 e HT1080 com atividade de ERK quinases reduzida pelo inibidor U0126 e tratadas com C16 foram submetidas a ensaios de invasão e de degradação de substrato de gelatina fluorescente, conforme descrito anteriormente.

Resultados obtidos com células CAL27 e HT1080 demonstram que redução da atividade de ERK por meio do inibidor U0126 promoveu diminuição tanto das taxas de invasão (Figuras 7C e 8C) quanto da atividade de invadopódios (Figuras 7D e 8D) relacionadas ao peptídeo C16. Nos ensaios de invasão, notamos que o número de células CAL27 em amostras tratadas com C16 e U0126 é aproximadamente três vezes menor que o do grupo controle tratado com C16 e metanol, veículo onde o inibidor foi diluído (Figura 7C). Na linhagem HT1080, a taxa de invasão em células cultivadas com C16 e U0126 foi cerca de cinco vezes menor que a do grupo controle (Figura 8C). Não observamos diferenças significativas na taxa de invasão entre as amostras tratadas com U0126 ou metanol e incubadas com C16SX (Figuras 7C e 8C). Adicionalmente, amostras tratadas com metanol ou U0126 e incubadas com 10% SBF exibiram taxa elevada de invasão (Figuras 7C e 8C). Estes resultados demonstram uma correlação direta entre C16 e a via de sinalização das ERK guinases no comportamento invasivo de células tumorais. Eficácia da inibição da via ERK promovida por U0126 foi demonstrada por "immunoblot" (Figuras 7C e 8C, quadro), onde notamos que células tratadas com o inibidor apresentam diminuição considerável da taxa de fosforilação de ERK (p-ERK), em comparação a amostras tratadas com metanol (veículo).

Já nos ensaios de degradação de substrato fluorescente, células CAL27 (Figura 7D) e HT1080 (Figura 8D) tratadas com U0126 e incubadas com C16 apresentaram redução em sua capacidade de digerir a matriz de gelatina, em comparação às amostras tratadas com metanol e C16. Não observamos diferenças significativas na atividade de invadopódios em amostras tratadas com U0126 ou metanol e incubadas com C16SX (Figuras 7D e 8D). Neste ensaio, também observamos que grupos controle tratados com metanol ou U0126 e incubados com 10% SBF exibiram maior atividade de invadopódios que amostras tratadas com U0126 e 8D).

O efeito da inibição de ERK na dinâmica de formação de invadopódios ao longo do tempo também foi analisado. Na linhagem CAL27, observamos que células incubadas com C16 e metanol (veículo) apresentam elevada atividade de

invadopódios (Figura 7E, painel C16+metanol, e Filme S5). Células com reduzida ativação da via ERK, por sua vez, estão relacionadas a discretas áreas de digestão da matriz de gelatina, mesmo na presença de C16 (Figura 7E, painel C16+U0126, e Filme S6). Mensurações dessas áreas de digestão mostram que a inibição de ERK em células tratadas com C16 promove redução na atividade de invadopódios em função do tempo. Este fenômeno não é observado nas amostras tratadas com C16 e metanol (Figura 7E, gráfico).

Em relação às células HT1080, também foi observado que o emprego do inibidor U0126 promoveu redução na atividade de invadopódios em função do tempo, mesmo após tratamento com C16 (Figura 8E, painel C16+U0126, e Filme S8). Já células incubadas com C16 e metanol estão associadas à elevada atividade de digestão da matriz de gelatina (Figura 8E, painel C16+metanol, e Filme S7). Mensuração das áreas de degradação (Figura 8E, gráfico) demonstra que inibição de ERK em células tratadas com C16 causa a diminuição da formação de invadopódios em função do tempo, em comparação a amostras tratadas com C16 e metanol.

5.6 Peptídeo C16 decora a superfície de células CAL27

Com o intuito de melhor compreender as interações entre C16 e células CAL27, decidimos avaliar a sua localização celular, utilizando peptídeos fluorescentes. Células CAL27 foram incubadas com C16 e C16SX conjugados com rodamina, fixadas e depois marcadas para actina. Observou-se que C16 decora a membrana das células CAL27 (Figura 9A, painel C16, projeções ortogonais XZ e YZ). Já o peptídeo controle C16SX parece não aderir à superfície celular (Figura 9A, painel C16SX). Este resultado reforça a hipótese de que C16 pode interagir com algum receptor de membrana celular.

5.7 Integrina β 1 está relacionada à atividade de invadopódios induzida por C16 em células CAL27

A subunidade β1 da integrina já foi previamente reconhecida como receptor para C16 (PONCE; NOMIZU; KLEINMAN, 2001). Deste modo, resolvemos analisar o papel desta integrina na atividade de invadopódios mediada por C16. Para tanto, células CAL27 foram transfectadas com plasmídeo que codifica GFP e contém miRNA para silenciar a expressão de integrina β1 (BLOCK-iT Pol II miR RNAi Expression Vector with EmGFP, Invitrogen). Posteriormente, a dinâmica de formação de invadopódios nessas células foi analisada por meio de microscopia confocal em "time-lapse". Verificamos que células com níveis reduzidos de integrina β1 e incubadas com C16 apresentaram diminuição da atividade de invadopódios, em comparação a células transfectadas com plasmídeo controle (pcDNA 6.2-GW/EmGFPmiR-neg control) e tratadas com o mesmo peptídeo (Figura 9B, e Filmes S9 e S10). Mensuração das áreas de digestão mostraram que células CAL27 com integrina β1 silenciada estavam associadas a áreas de digestão menores que as do grupo controle nos intervalos de tempo analisados (Figura 9B, gráfico).

Figura 5.1

C16 estimula invasão e atividade de invadopódios em células de carcinoma epidermóide (CAL27). Nos ensaios de invasão, contagem do número de células/poço revelou que taxa de invasão em amostras tratadas por C16 é maior que no grupo controle C16SX (A). Em ensaios de degradação de substrato fluorescente, mensuração das áreas de digestão/célula demonstra que C16 estimula atividade de invadopódios em relação a C16SX (B). Áreas de digestão do substrato fluorescente (C, seta branca em gelatina-FITC) associadas à atividade de invadopódio são proeminentes em células tratadas com C16 (C). Colocalização de protrusões de actina com áreas de digestão é evidenciada nos painéis sobreposição (C, seta branca em sobreposição) e nas projeções ortogonais XZ e YZ (C, setas pretas). Células tratadas com C16SX apresentam poucos focos de degradação (D). Reconstrução volumétrica (E) de amostra de célula CAL27 tratada com C16 exibe protrusões de actina distribuídas no interior da gelatina fluorescente (E, setas). Linhas vermelhas em C indicam pontos da imagem XY projetados para gerar planos ortogonais XZ e YZ. Asteriscos em A e B indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos C16 e C16SX (p<0,05). Linhas horizontais pontilhadas em A e B representam média das áreas de digestão de células dos grupos controles não peptídicos positivo (10% SBF) e negativo (0,5% SBF). Resultados em A representam média ± erro da média de três experimentos. Resultados em B representam média ± erro da média de 15 células, em três experimentos distintos. Escalas: 10 µm.





Figura 5.1 - C16 estimula invasão e atividade de invadopódios em células de carcinoma epidermóide (CAL27).
C16 estimula invasão e atividade de invadopódios em células de fibrossarcoma (HT1080). Nos ensaios de invasão, contagem do número de células/poco revelou que taxa de invasão induzida por C16 é maior que no grupo controle C16SX (A). Em ensaios de degradação de substrato fluorescente, mensuração das áreas de digestão/célula demonstra que C16 promove aumento da atividade de invadopódios em comparação a C16SX (B). Áreas de digestão do substrato fluorescente (C, seta branca em gelatina-FITC) associadas à atividade de invadopódios são proeminentes em células tratadas com C16 (C). Colocalização de protrusões de actina com áreas de digestão é evidenciada nos painéis sobreposição (C, seta branca em sobreposição) e nas projeções ortogonais XZ e YZ (C, setas pretas). Células tratadas com C16SX apresentaram poucos focos de degradação (D). Reconstrução volumétrica (E) de amostra de célula HT1080 tratada com C16 exibe protrusões de actina distribuídas no interior da gelatina fluorescente (E, setas). Linhas vermelhas em C indicam pontos da imagem XY projetados para gerar planos ortogonais XZ e YZ. Asteriscos em A e B indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos C16 e C16SX (p<0,05). Linhas horizontais pontilhadas em A e B representam média das áreas de digestão dos grupos controles não peptídicos positivo (10% SBF) e negativo (0,5% SBF). Resultados em A representam média ± erro da média de três experimentos. Resultados em B representam média ± erro da média de 15 células, em três experimentos distintos. Escalas: 10 µm.



Figura 5.2 - C16 estimula invasão e atividade de invadopódios em células de fibrossarcoma (HT1080).

74

C16 regula atividade e dinâmica de invadopódios em células de carcinoma epidermóide (CAL27). Sequência de imagens de "time-lapse" de células transfectadas com cortactina-GFP e cultivadas sobre substrato de gelatina-Alexa-568 revela que C16 estimula atividade de invadopódios em células CAL27 no decorrer do tempo (A, setas brancas em painel C16). C16SX não induz aumento na atividade de invadopódios em função do tempo (A, painel C16SX). Mensurações das áreas de digestão/célula foram expressas como valores relativos à área de digestão inicial (B). Projeções ortogonais XZ e YZ exibem protrusões de cortactina que se estendem a partir da superfície ventral das células (C, setas brancas). Asteriscos em B indicam diferenças estatisticamente significantes entre grupos tratados com C16 e C16SX (p<0,05). Dados representam média ± erro da média de 10 células analisadas. Escalas:10 μm.

CAL27



Figura 5.3 - C16 regula atividade e dinâmica de invadopódios em células de carcinoma epidermóide (CAL27).

76

C16 regula atividade e dinâmica de invadopódios em células de fibrossarcoma (HT1080). Sequência de imagens de "time-lapse" de células transfectadas com cortactina-GFP e cultivadas sobre substrato de gelatina-Alexa-568 revela que C16 estimula atividade de invadopódios em células HT1080 no decorrer do tempo (A, setas brancas em painel C16). C16SX não induz aumento na atividade de invadopódios em função do tempo (A, painel C16SX). Mensurações das áreas de digestão/célula foram expressas como valores relativos à área de digestão inicial (B). Projeções ortogonais XZ e YZ exibem protrusões de cortactina que se estendem a partir da superfície ventral das células (C, setas brancas). Asteriscos em B indicam diferenças estatisticamente significantes entre dados do grupo C16 e controle C16SX (p<0,05). Dados representam média ± erro da média de 10 células analisadas. Escalas:10 μm.



Figura 5.4 - C16 regula atividade e dinâmica de invadopódios em células de fibrossarcoma (HT1080).

Figura 5.5 - C16 estimula fosforilação de cortactina e aumento dos níveis de MT1-MMP em células de carcinoma epidermóide (CAL27). Cortactina apresenta-se distribuída pelo citoplasma de células CAL27 (A). P-cortactina encontra-se concentrada na porção ventral da célula (B, planos ortogonais XZ e YZ). MT1-MMP está amplamente distribuída pelo citoplasma (A e B, painel MT1-MMP). Colocalização de cortactina e MT1-MMP é visualizada em áreas de digestão da matriz (A, sobreposição e seta preta em projeção ortogonal YZ). O mesmo é observado para p-cortactina e MT1-MMP (B, sobreposição e seta preta em projeção ortogonal YZ). "Immunoblot" (C) demonstra que C16 estimula a fosforilação de cortactina (C, p-cortactina) e aumentos nos níveis de MT1-MMP (C, MT1-MMP), comparado ao controle C16SX. Linhas vermelhas em A e B indicam pontos da imagem XY projetados para gerar planos ortogonais XZ e YZ. Escala: 10 μm.

CAL27



Figura 5.5 - C16 estimula fosforilação de cortactina e aumento dos níveis de MT1-MMP em células de carcinoma epidermóide (CAL27).

C16 estimula fosforilação de cortactina e aumento dos níveis de MT1-MMP em células de fibrossarcoma (HT1080). Cortactina apresenta-se distribuída pelo citoplasma de células HT1080 (A). P-cortactina concentra-se na porção ventral da célula (B, planos ortogonais XZ e YZ). MT1-MMP está amplamente distribuída pelo citoplasma (A e B, MT1-MMP). Colocalização de cortactina e MT1-MMP é visualizada em áreas de digestão da matriz (A, sobreposição e seta preta em projeção ortogonal YZ). O mesmo é observado para amostras marcadas com p-cortactina e MT1-MMP (B, sobreposição e seta preta em projeção ortogonal YZ). "Immunoblot" (C) demonstra que C16 estimula a fosforilação de cortactina (C, p-cortactina) e aumentos nos níveis de MT1-MMP (C, MT1-MMP) em função do tempo, comparado ao controle C16SX. Linhas vermelhas em A e B indicam pontos da imagem XY projetados para gerar planos ortogonais XZ e YZ. Escala: 10 μm.

HT1080



Figura 5.6 - C16 estimula fosforilação de cortactina e aumento dos níveis de MT1-MMP em células de fibrossarcoma (HT1080).

82

Vias de sinalização Src e ERK 1/2 podem estar relacionadas aos efeitos induzidos por C16 em células de carcinoma epidermóide (CAL27). "Immunoblot" demonstra que C16 estimula fosforilação de Src (A) e ERK (B) 2 minutos após tratamento, evento que não é observado em nas amostras tratadas com C16SX. Participação da via ERK nas atividades reguladas por C16 foi analisada utilizando-se o inibidor de MEK U0126. Em ensaios de invasão (C), contagem do número de células/poco evidenciou uma redução dos índices de invasão relacionados a C16, quando células são tratadas com U0126. Em ensaios de degradação de substrato fluorescente (D), redução da atividade de invadopódios induzida por C16 está associada a células com a via de sinalização ERK inibida. Células transfectadas com cortactina-GFP e tratadas com inibidor U0126 e peptídeo C16 apresentam redução da atividade de invadopódios ao longo do tempo (E). "Immunoblot" (C, quadro) confirma a eficácia do inibidor U0126. Mensurações das áreas de digestão em E estão expressas como valores relativos à área de digestão inicial. Asteriscos em C, D e E indicam diferenças estatisticamente significantes entre dados dos grupos C16+U0126 e C16+metanol (controle) (p<0,05). Dados em C representam média ± erro da média de 3 experimentos. Resultados em D representam média ± erro da média de 15 células, em três experimentos distintos. Dados em E representam média ± erro da média de 10 células analisadas. Escalas: 15 μm.



Figura 5.7 - Vias de sinalização Src e ERK 1/2 podem estar relacionadas aos efeitos induzidos por C16 em células de carcinoma epidermóide (CAL27).

Figura 5.8

Figura 5.8 - Vias de sinalização Src e ERK 1/2 podem estar relacionadas aos efeitos induzidos por C16 em células de fibrossarcoma (HT1080). "Immunoblot" demonstra que C16 estimula a fosforilação de Src (A) e ERK (B) 5 minutos após tratamento, evento que não é observado nas amostras tratadas com C16SX. Participação da via ERK nas atividades reguladas por C16 analisada utilizando-se o inibidor U0126. Em ensaios de invasão (C), contagem do número de células/poço evidenciou uma redução dos índices de invasão relacionados a C16 em células tratadas com U0126. Em ensaios de degradação de substrato fluorescente (D), diminuição da atividade de invadopódios induzida por C16 está associada a células com via de sinalização ERK inibida. Células transfectadas com cortactina-GFP e tratadas com inibidor U0126 e peptídeo C16 apresentam redução da atividade de invadopódios ao longo do tempo (E). "Immunoblot" (C, quadro) confirma eficácia do inibidor U0126. Mensurações das áreas de digestão em E estão expressas como valores relativos à área de digestão inicial. Asteriscos em C, D e E indicam diferenças estatisticamente significantes entre dados do grupo C16+metanol (controle) e C16+U0126 (p<0,05). Dados em C representam média ± erro da média de 3 experimentos. Resultados em D representam média ± erro da média de 15 células, em três experimentos distintos. Dados em E representam média ± erro da média de 10 células analisadas. Escalas: 15 μm.



Figura 5.8 - Vias de sinalização Src e ERK 1/2 podem estar relacionadas aos efeitos induzidos por C16 em células de fibrossarcoma (HT1080).

85

86

Figura 5.9 - Integrina β 1 regula a dinâmica de invadopódios em células de carcinoma epidermóide (CAL27). Imunofluorescência utilizando peptídeos conjugados com rodamina demonstra que C16 é encontrado na superfície celular, enquanto C16SX parece não aderir às células (A). Sequência de imagens de "time-lapse" de células transfectadas com BLOCK-iT para integrina β 1 e células controle cultivadas em gelatina fluorescente (B) revelam discreta formação de áreas de degradação quando há silenciamento de integrina β 1, mesmo na presença de C16. Mensurações das áreas de digestão (B, gráfico) mostram redução da atividade de invadopódios em células silenciadas para integrina β 1 e tratadas com C16 em função do tempo, quando comparadas ao grupo controle (B, C16+cont negativo). Resultados em B representam média ± desvio padrão de 5 células analisadas. Escalas: 15 µm.

CAL27



Figura 5.9 - Integrina β 1 regula a dinâmica de invadopódios em células de carcinoma epidermóide (CAL27).

6 DISCUSSÃO

Demonstramos neste trabalho que o peptídeo C16, derivado da cadeia γ 1 da laminina, estimula invasão, atividade e dinâmica de formação de invadopódios em linhagens celulares de carcinoma epidermóide (CAL27) e fibrossarcoma (HT1080). Estes dois tumores malignos, apesar de terem origens diferentes, possuem prognóstico desfavorável na maioria dos casos (COLLINI et al., 2009; DE CAMARGO CANCELA et al., 2010; FICHER; VAN DEN BERG; MOLENAAR, 2002; LUBEK; CLAYMAN, 2012). C16 estimulou aumento proeminente das áreas de degradação relacionadas à atividade de invadopódios, bem como estimulou a fosforilação de cortactina e a expressão de MT1-MMP em ambas as linhagens celulares. Buscamos também elucidar possíveis mecanismos regulatórios envolvidos nos efeitos de C16 em células CAL27 e HT1080. Verificamos que este peptídeo promove a fosforilação das moléculas de sinalização Src e ERK 1/2. Observamos ainda que inibição de ERK resulta em diminuição da taxa de invasão e da atividade de invadopódios relacionadas a C16. Adicionalmente, silenciamento de integrina β1 promoveu redução na atividade de invadopódios em células CAL27 tratadas com C16. Esses resultados sugerem que as via de sinalização Src e ERK 1/2, bem como a integrina β1, podem regular a dinâmica de formação de invadopódios mediada por C16 em células tumorais. C16 já foi relacionado a efeitos biológicos semelhantes em células derivadas de carcinoma adenóide cístico (NASCIMENTO et al., 2011). No entanto, até onde sabemos, este é o primeiro estudo que endereça de maneira dinâmica os mecanismos de formação dos invadopódios em células tratadas por C16.

A disseminação de tumores malignos envolve complexas interações entre células neoplásicas e matriz extracelular, nas quais moléculas da MEC podem regular o comportamento de células tumorais enquanto estas ultrapassam a lâmina basal e o estroma intersticial (ROWE; WEISS, 2008, 2009; WILSON et al., 1999). Durante os eventos de invasão e metástase, células neoplásicas ligam-se à lâmina basal através de seus receptores e são subsequentemente estimuladas a produzir metaloproteinases de matriz (MMPs). Estas moléculas, por sua vez, podem promover a proteólise e fragmentação da lâmina basal, criando espaços que permitem a migração celular para o tecido subjacente (SOUZA et al., 2007). A ação

de MMPs regula também a liberação e ativação de fatores de crescimento, e pode induzir modificações em moléculas da MEC, no citoesqueleto e em vias de sinalização celular (MILES; SIKES, 2014).

Várias das moléculas que compõem a MEC e lâmina basal possuem sítios matricrípticos dotados de funções biológicas. Esses sítios podem ser expostos e liberados por meio de proteólise induzida por células tumorais, dando origem a fragmentos e peptídeos bioativos (FAISAL KHAN et al., 2002; MAQUART et al., 2004; MOTT; WERB, 2004; SCHENK; QUARANTA, 2003; TRAN; LAMB; DENG, 2005). Por tal motivo, durante a transformação maligna de células fibroblastóides (no caso do fibrosarcoma), bem como durante a progressão de carcinoma epidermóide *in situ* para invasivo, células neoplásicas ficam expostas a estímulos provenientes tanto de componentes intactos da MEC quanto de peptídeos bioativos (NIKITOVIC et al., 2013; WILSON et al., 1999). Estes eventos justificam o estudo de moléculas da MEC e lâmina basal que possam estar relacionados à invasão tumoral.

Devido à sua expressão pronunciada na lâmina basal, a laminina possivelmente influencia o comportamento biológico de tumores (GIVANT-HORWITZ; DAVIDSON; REICH, 2005; KULASEKARA et al., 2009; SOUZA et al., 2007). Esta glicoproteína representa um importante fator autócrino produzido por células neoplásicas para promover tumorigênese (SHARMA et al., 2013), e já foi associada à formação de colônias metastáticas pulmonares em camundongos atímicos (IWAMOTO et al., 1987). Células tumorais injetadas juntamente com laminina-111 em camundongos estão relacionadas a maiores taxas de crescimento tumoral, em comparação a células neoplásicas isoladas ou injetadas com colágeno I. As células tumorais, mesmo embebidas em colágeno I, não formaram tumores de tamanhos expressivos, demonstrando que o papel da laminina em criar uma espécie de arcabouço para as células não foi o responsável pela indução de crescimento tumoral (TERRANOVA et al., 1982). Desse modo, a laminina deve modular a progressão de neoplasias malignas por meio de outros mecanismos (KIKKAWA et al., 2013).

Acredita-se que, durante a degradação da lâmina basal induzida por células tumorais, ocorra a proteólise controlada de laminina e consequente liberação de peptídeos dotados de atividades biológicas (FAISAL KHAN et al., 2002; KIKKAWA et al., 2013; SCHENK; QUARANTA, 2003). Fragmentos de laminina já foram detectados em exames sorológicos de pacientes com carcinoma epidermóide de

cabeça e pescoço (KURATOMI et al., 2008), o que corrobora a hipótese de que degradação enzimática mediada por tumores pode promover a liberação de fragmentos da laminina e disponibilizá-los para o tumor.

Peptídeos bioativos da laminina estão envolvidos em diferentes atividades biológicas, incluindo adesão celular, proliferação, metástase tumoral e secreção de MMPs (FREITAS et al., 2007; GAMA-DE-SOUZA et al., 2008; KIKKAWA et al., 2013; KIKKAWA et al., 2011; KURATOMI et al., 2002; PONCE; NOMIZU; KLEINMAN, 2001; SIQUEIRA et al., 2010; SUZUKI; YOKOYAMA; NOMIZU, 2005). Dados obtidos em nosso laboratório já demonstraram que tanto a laminina-111 quanto alguns de seus peptídeos bioativos, como SIKVAV, C16 e AG73, regulam diferentes processos biológicos, como invasão e atividade de MMPs, em linhagens celulares derivadas de neoplasias de glândulas salivares e carcinoma epidermóide oral (CAPUANO; JAEGER, 2004; FRANCA et al., 2001; FREITAS; JAEGER, 2002; FREITAS et al., 2004; FREITAS et al., 2007; GAMA-DE-SOUZA et al., 2008; MORAIS FREITAS et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2010).

Isoformas da laminina contendo a cadeia γ 1, onde está localizado o peptídeo C16, estão expressas em lâminas basais do epitélio oral e ao redor de vasos sanguíneos (AUMAILLEY, 2013; DURBEEJ, 2010; YOUSIF; DI RUSSO; SOROKIN, 2013). Deste modo, o processo de proteólise da lâmina basal, tanto nas etapas iniciais da invasão quanto na intravasão de células tumorais para vasos sanguíneos, pode promover a clivagem da cadeia γ 1 e a liberação de C16 e outros peptídeos bioativos.

Estudos já demonstraram que C16 está envolvido nos processos de adesão celular, migração e secreção de MMPs (KIKKAWA et al., 2011; KURATOMI et al., 2002; LUGASSY et al., 2007; NOMIZU et al., 1997), eventos que regulam a invasão de células neoplásicas. Por tal motivo, resolvemos investigar se este peptídeo seria capaz de induzir fenótipo invasivo em células derivadas de carcinoma epidermóide e fibrossarcoma. Observamos, em ambas as linhagens tumorais, que tratamento com C16 estimulou aumento na taxa de invasão, demonstrando que este peptídeo é capaz de regular mecanismos celulares relacionados à progressão tumoral. Vale ressaltar que células HT1080 (fibrossarcoma) tratadas com C16 apresentaram maiores índices de invasão do que células CAL27, provavelmente devido às pronunciadas características agressivas e elevada secreção de proteases relacionadas a este tumor (GOROVETZ et al., 2008). Além disso, o fibrossarcoma é

uma neoplasia formada por células de origem mesenquimal, as quais apresentam maior capacidade migratória comparadas às células epiteliais (LEE et al., 2006).

Para que uma célula torne-se invasiva, ela deve coordenar atividades de receptores de superfície e de moléculas do citoesqueleto com secreção de proteases, o que permite sua locomoção através dos tecidos (KRAMER; SHEN; ZHOU, 2005). A reorganização do citoesqueleto de actina está envolvida em eventos celulares relacionados à progressão de tumores, e pode ser responsável pela dissolução de contatos entre células, geração de forças, motilidade e formação de protrusões na região da membrana plasmática (NURNBERG; KITZING; GROSSE, 2011).

Invadopódios são típicas protrusões encontradas em células neoplásicas, e são compostas por filamentos de actina circundados por proteínas adesivas e estruturais (AYALA et al., 2006; GIMONA et al., 2008; LINDER, 2007; SIBONY-BENYAMINI; GIL-HENN, 2012; STYLLI; KAYE; LOCK, 2008; WEAVER, 2006, 2008b). Os invadopódios estão localizados na superfície ventral das células, e distinguem-se de outras estruturas de adesão celular devido à sua associação com atividade proteolítica e polimerização de actina (BLOCK et al., 2008; CHAN; CORTESIO; HUTTENLOCHER, 2009; MURPHY; COURTNEIDGE, 2011). Invadopódios permitem às células sincronizar os eventos de degradação da MEC e motilidade celular, facilitando a migração através dos tecidos (MURPHY; COURTNEIDGE, 2011).

Os invadopódios já foram identificados em linhagens celulares derivadas de melanoma, carcinoma de mama, glioma e carcinoma epidermóide da região de cabeça e pescoço (CLARK et al., 2007; HARPER et al., 2010; STYLLI; KAYE; LOCK, 2008). Ensaios para detectar a atividade de invadopódios *in vitro* envolvem o cultivo de células sobre lamínulas cobertas com substratos fluorescentes de gelatina (colágeno denaturado), ou derivados de proteínas da MEC (como fibronectina) (ARTYM et al., 2006; STYLLI; KAYE; LOCK, 2008). Por meio deste ensaio, verificamos que C16 induziu atividade de invadopódios em células CAL27 e HT1080, já que áreas maiores de digestão do substrato estavam associadas a células tratadas por este peptídeo. Assim como observado nos ensaios de invasão, células HT1080 apresentaram índices elevados de atividade de invadopódios em comparação a células CAL27. O peptídeo C16 já foi anteriormente relacionado com aumento da atividade de invadopódios em células derivadas de carcinoma adenóide

cístico (NASCIMENTO et al., 2011). Além dos resultados que demonstram a influência de C16 na atividade de invadopódios em células CAL27 e HT1080, projeções ortogonais e reconstruções em 3D a partir de amostras tratadas com este peptídeo forneceram-nos uma visão singular de protrusões de actina penetrando a matriz de gelatina fluorescente, permitindo assim uma melhor caracterização de invadopódios nessas duas linhagens tumorais.

Para analisar a evolução e a dinâmica de formação dos invadopódios durante o tratamento com o peptídeo C16, recorremos a técnicas de microscopia confocal em "time-lapse", utilizando células transfectadas com cDNA de cortactina-GFP cultivadas sobre gelatina fluorescente. Nossos resultados demonstraram que C16 promove aumento na atividade de invadopódios em células derivadas de carcinoma epidermóide e fibrossarcoma em função do tempo, evento que não foi observado nos grupos de células tratados por C16SX. Mensurações das áreas de digestão ao longo do tempo mostraram que C16 começa a induzir a degradação da matriz de gelatina duas e seis horas após o tratamento em células HT1080 e CAL27, respectivamente. Apesar de maiores áreas de digestão terem sido observadas em células HT1080, o aumento da atividade de invadopódios em função do tempo foi semelhante entre as duas linhagens utilizadas. Isso se deve ao fato de os dados terem sido expressos como valores relativos da área inicial de degradação observada para cada amostra. Alguns estudos prévios analisaram aspectos de invadopódios utilizando microscopia em "time-lapse". Em um deles, os invadopódios foram caracterizados como estruturas móveis que passavam por um processo de estabilização, permanecendo na mesma posição por várias horas. Além disso, quando invadopódios tornavam-se estacionários, estavam sempre associados a estruturas circulares que cercavam os filamentos de actina (YAMAGUCHI et al., 2005).

O comportamento dinâmico de invadopódios observado por meio de microscopia em "time-lapse" pode estar diretamente relacionado à influência de algumas proteínas estruturais que circundam os núcleos de actina nessas estruturas. Uma série de nucleadores e proteínas ligantes de actina, ativadores de polimerização, entre outros, regulam a maquinaria de actina dos invadopódios (LINDER, 2007; MURPHY; COURTNEIDGE, 2011). Dentre estas moléculas, a cortactina destaca-se como importante proteína estrutural, e pode ser utilizada como marcador de invadopódios por causa de sua forte colocalização com sítios de

digestão focal da MEC (WEAVER, 2008a). Nossos resultados mostraram uma alta concentração de cortactina em células CAL27 e HT1080 tratadas com o peptídeo C16. No entanto, não observamos diferenças nos níveis de cortactina ao longo do tempo, nem na distribuição celular de cortactina entre células tratadas com C16 e amostras controle. A cortactina regula a organização de actina por meio de múltiplos mecanismos, já que esta molécula estimula a nucleação mediada por Arp2/3, ativa N-WASp e promove a estabilização de filamentos de actina (MURPHY; COURTNEIDGE, 2011; WEAVER, 2008a). Por tal motivo, acredita-se que a formação de agregados de cortactina em sítios de ligação da célula à MEC pode ser um evento inicial importante na formação de invadopódios (ARTYM et al., 2006). Altos níveis de cortactina estão correlacionados à maior agressividade em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, e a diminuição dos níveis desta molécula inibe o crescimento tumoral (CLARK et al., 2009).

A fosforilação de cortactina em resíduos de tirosina é crucial para a organização dos invadopódios (OSER et al., 2009; YAMAGUCHI et al., 2005). Nesse sentido, já foi demonstrado que fosforilação da tirosina 466 é requerida para a formação de terminações livres de actina nos invadopódios (OSER et al., 2010). Assim sendo, decidimos investigar se o status de fosforilação de cortactina poderia ser influenciado pelo peptídeo C16 em células CAL27 e HT1080. Por meio de "immunoblot", observamos que C16 promoveu aumento nos níveis de fosforilação do resíduo de tirosina 466 da cortactina em ambas as linhagens celulares, especialmente após 16 horas de incubação com o peptídeo. Adicionalmente, verificamos uma maior concentração de cortactina fosforilada próximo à membrana ventral das células tumorais, local onde se formam os invadopódios. Este resultado demonstra que C16 pode promover a fosforilação de cortactina nos sítios de contato das células com o substrato de gelatina, evento necessário para a formação dos invadopódios.

Recrutamento de cortactina para sítios de degradação da MEC pode regular a secreção localizada de MMPs (CLARK et al., 2007; LINDER, 2007). Dentre estas, MT1-MMP é reconhecida como componente fundamental dos invadopódios (ARTYM et al., 2006), sendo considerada importante promotora da atividade colagenolítica de células invasivas (SABEH et al., 2009). Notamos que células tumorais tratadas com peptídeo C16 exibiram altos níveis de MT1-MMP comparadas às amostras controle. Além disso, observamos que esta protease estava colocalizada com cortactina

fosforilada em sítios de digestão de gelatina, sugerindo uma possível interação entre estas duas moléculas. MT1-MMP exerce papel dominante na migração e invasão de células metastáticas, e sua localização em invadopódios é um fator essencial para a maturação dessas estruturas (MURPHY; COURTNEIDGE, 2011; SABEH et al., 2009). Além de sua notável atividade colagenolítica, MT1-MMP também participa ativamente da clivagem das lamininas-111 e 511 (antiga laminina-10), que são formadas pela cadeia γ1 da laminina (BAIR et al., 2005; OHUCHI et al., 1997). Assim, podemos supor que esta MMP participa da geração e disponibilização do peptídeo C16 para células tumorais, contribuindo para seu fenótipo invasivo. Em resumo, nossos resultados sugerem que, em células CAL27 e HT1080, a fosforilação de cortactina e a expressão de MT1-MMP, moléculas relevantes para a formação e atividade de invadopódios, são estimuladas por C16.

Diante dos resultados que mostraram papel funcional do peptídeo C16 na invasão, formação de invadopódios, fosforilação de cortactina e aumento dos níveis de MT1-MMP, resolvemos explorar os mecanismos regulatórios envolvidos nesses processos. Estímulos extracelulares, como peptídeos da laminina e outros componentes da MEC, podem promover a ativação de moléculas associadas aos invadopódios por meio de vias de sinalização celular (MURPHY; COURTNEIDGE, 2011). Cortactina, por exemplo, pode ser fosforilada por diversas guinases, incluindo as da família Src (WEAVER, 2008a). As Src quinases participam de uma variedade de funções celulares como proliferação celular, migração e invasão (GUARINO, 2010), e estão envolvidas em diferentes eventos relacionados à formação dos invadopódios (DESTAING et al., 2008; KELLEY et al., 2010). Demonstramos neste trabalho que C16 estimula a fosforilação do resíduo de tirosina 416 de Src tanto em células CAL27 quanto em células HT1080, poucos minutos após o tratamento. A fosforilação da tirosina 416 permite o acesso de Src a seus substratos, e regula positivamente a atividade desta molécula (BJORGE; JAKYMIW; FUJITA, 2000). Níveis elevados de Src constituem potentes mediadores de transformação celular e progressão tumoral, e estão associados à grande maioria dos tumores humanos, incluindo o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (SUMMY; GALLICK, 2003)

A fosforilação de Src, por sua vez, pode levar à formação de complexos multimoleculares que promovem a ativação da via de sinalização formada pelas MAP quinases Ras-Raf-MEK-ERK (LARSEN et al., 2006; MITRA; SCHLAEPFER, 2006). A ativação de ERK é mediada pela fosforilação de seu resíduo de tirosina

204, processo que é controlado pela quinase MEK 1/2 (ROSKOSKI, 2012). Dados prévios de nosso grupo já demostraram que ERK pode estar envolvido em efeitos associados a peptídeos da laminina, como invasão, indução de invadopódios e secreção de MMPs (FREITAS et al., 2007; MORAIS FREITAS et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2011). Nossos resultados demonstraram que tratamento com C16 também promoveu aumento da fosforilação dos resíduos de tirosina 204 de ERK 1/2 em células tumorais, comparado a amostras tratadas com C16SX. Vale ressaltar que o aumento dos níveis de fosforilação de ERK também ocorreu poucos minutos após o tratamento com o peptídeo, o que destaca a ligação entre esta molécula e a via de sinalização Src. Evidências sugerem que a sinalização celular mediada por Src-ERK 1/2 pode regular a progressão tumoral (MAAT et al., 2009; SHIN et al., 2002). Deste modo, as duas quinases podem promover a fosforilação de centenas de substratos citoplasmáticos e nucleares, como moléculas regulatórias e fatores de transcrição, desencadeando diversos processos biológicos (YOON; SEGER, 2006). Além disso, ERK regula a transcrição de MMPs em resposta a diferentes sinais, sendo que sua ativação persistente em células malignas pode levar a um aumento exacerbado da atividade destas enzimas. Por conseguinte, a ativação de ERK possivelmente contribui para o processo de degradação da MEC e da lâmina basal inerente a tumores malignos (EGEBLAD; WERB, 2002; REDDY; NABHA; ATANASKOVA, 2003).

Optamos por aprofundar nossos estudos sobre o papel da via de sinalização ERK nos efeitos mediados por C16. Utilizamos um inibidor de MEK (U0126) para avaliar se redução da atividade de ERK poderia interferir nas atividades biológicas mediadas por este peptídeo da laminina. Observamos que U0126 inibe os processos de invasão e formação de invadopódios relacionados a C16 em células CAL27 e HT1080, mostrando que a via de sinalização ERK pode participar da transdução de sinais gerados por este peptídeo. Verificamos ainda que o inibidor U0126 não reduziu drasticamente as taxas de invasão e de atividade de invadopódios em células tumorais cultivadas com 10% SBF, resultado que confirma uma possível correlação direta entre C16 e ERK na regulação do comportamento de células tumorais. A inibição da atividade de ERK também reduziu a formação de invadopódios estimulada por C16 em células de carcinoma adenóide cístico (NASCIMENTO et al., 2011). Além disso, outros trabalhos já demonstraram que a inibição da via de sinalização das MAP quinases promove a redução da migração e invasão celulares, bem como diminuição da secreção e atividade de MMPs (FREITAS et al., 2007; LU et al., 2012).

Ainda na tentativa de melhor compreender como o peptídeo C16 interage com células tumorais e regula os processos de invasão e formação de invadopódios, avaliamos sua localização celular utilizando peptídeos fluorescentes. Notamos que C16 está localizado na superfície das células CAL27, o que reforça a hipótese de que este peptídeo pode interagir com algum receptor de membrana celular. Sabe-se que integrinas, receptores transmembrana que modulam a interação célula-matriz, desempenham importante função mediando efeitos da laminina no comportamento celular (PATARROYO; TRYGGVASON; VIRTANEN, 2002). As integrinas possuem papel relevante em todos os estágios da carcinogênese, desde a formação inicial do tumor, até seu crescimento, invasão e metástase (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010; FELDING-HABERMANN, 2003).

As integrinas são capazes de interagir diretamente com a MEC e transmitirem tanto sinais extracelulares para o citoplasma, quanto informações do status da célula para o espaço extracelular. Por conta disso, estas moléculas encontram-se em posição favorável para modular a biologia dos invadopódios (MURPHY; COURTNEIDGE, 2011). A subunidade β 1 da integrina já foi previamente reconhecida como receptor para C16 (PONCE; NOMIZU; KLEINMAN, 2001), e sua expressão parece ser crítica para a iniciação e progressão de uma variedade de tumores (XIONG; BALCIOGLU; DANEN, 2013). Demonstramos que a inibição de integrina β 1 em células CAL27 promoveu redução da atividade de invadopódios induzida por C16 em função do tempo. A partir deste resultado, supomos que esta integrina liga-se a C16 e tem participação importante na regulação de vias de sinalização moduladas por este peptídeo. Sabe-se que a ativação de Src e de outras moléculas pode ser mediada por "clusterings" de integrinas, os quais surgem preferencialmente em locais de adesão da célula a moléculas da MEC (TAKINO et al., 2010).

Mesmo quando apresentam a habilidade de sobreviver sem contato com substratos da matriz extracelular, as células neoplásicas ainda dependem de sinais gerados por integrinas no processo de desenvolvimento da doença (BERRIER; YAMADA, 2007; DESGROSELLIER; CHERESH, 2010; FELDING-HABERMANN, 2003). Estes sinais podem influenciar o comportamento tumoral de maneira direta, por meio de adesão e eventos de sinalização, assim como indiretamente, por seus efeitos na remodelação da MEC (MISSAN; DIPERSIO, 2013). Neoplasias malignas como o carcinoma epidermóide apresentam expressiva concentração de integrina β1 na frente de invasão do tumor (AHSAN et al., 2011; SHARMA et al., 2013; ZHANG et al., 1996). Esta maior concentração de integrinas pode representar um aumento no número de sítios celulares para ligação de laminina e de seus peptídeos bioativos, e desse modo contribuir para a progressão tumoral.

O papel de peptídeos derivados da laminina no comportamento biológico de células tumorais ainda não foi totalmente elucidado. Neste trabalho, tentamos conectar alguns eventos biológicos, para melhor compreender a relação entre o peptídeo C16 e processos associados à invasão tumoral. A Figura 6.1 resume a nossa hipótese sobre como C16 poderia estimular a formação de invadopódios em células de carcinoma epidermóide e fibrossarcoma. De acordo com nossos achados, podemos inferir que, nos estágios iniciais da invasão, invadopódios associados a células tumorais promovem a degradação da lâmina basal e a consequente clivagem de laminina. Deste modo, C16 e outros peptídeos bioativos poderiam então ser expostos e liberados por meio de processamento proteolítico, tornando-se disponíveis para exercer seus efeitos biológicos. A seguir, C16 poderia ligar-se a heterodímeros de integrina contendo a subunidade β1 e estimular, diretamente ou por meio de interação com outras moléculas, a fosforilação/ativação de Src quinases. Src, por sua vez, promoveria a fosforilação de cortactina e ERK 1/2. A fosforilação de ERK poderia gerar uma maior síntese de MMPs, enquanto que ativação de cortactina seria responsável pela reorganização de filamentos de actina e recrutamento de MT1-MMP, fundamentais para a formação dos invadopódios. Estes eventos, em conjunto, seriam capazes de aumentar significativamente a atividade de invadopódios em células de carcinoma epidermóide e fibrossarcoma, de modo a gerar maior quantidade de produtos de degradação da lâmina basal (incluindo peptídeos da laminina) compatíveis com a manutenção de um fenótipo celular invasivo.



Figura 6.1 – Diagrama esquemático dos eventos celulares relacionados à formação de invadopódios estimulada pelo peptídeo C16. Linhas pontilhadas indicam interações indiretas entre moléculas.

7 CONCLUSÕES

Baseados nos resultados dos experimentos realizados, concluímos que:

- Peptídeo C16, derivado da laminina, promove aumento na atividade invasiva de células de carcinoma epidermóide oral (CAL27) e fibrossarcoma (HT1080).
- 2) C16 estimula atividade de invadopódios em células CAL27 e HT1080.
- C16 regula a dinâmica de formação de invadopódios em células CAL27 e HT1080.
- C16 induz aumento nas taxas de fosforilação de cortactina e nos níveis de MT1-MMP em células tumorais.
- C16 estimula a ativação de vias de sinalização Src e ERK 1/2 em células CAL27 e HT1080.
- A via de sinalização ERK 1/2 regula a atividade e a dinâmica de formação de invadopódios nas células tumorais analisadas.
- 7) Integrina β1 parece estar relacionada à atividade e dinâmica de formação de invadopódios mediada por C16 em células CAL27.

REFERÊNCIAS*

ABRAM, C. L.; SEALS, D. F.; PASS, I.; SALINSKY, D.; MAURER, L.; ROTH, T. M.; COURTNEIDGE, S. A. The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 19, p. 16844-16851, 2003.

AHSAN, M. S.; YAMAZAKI, M.; MARUYAMA, S.; KOBAYASHI, T.; IDA-YONEMOCHI, H.; HASEGAWA, M.; HENRY ADEMOLA, A.; CHENG, J.; SAKU, T. Differential expression of perlecan receptors, alpha-dystroglycan and integrin beta1, before and after invasion of oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 40, n. 7, p. 552-559, 2011.

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

ARGIRIS, A.; KARAMOUZIS, M. V.; RABEN, D.; FERRIS, R. L. Head and neck cancer. Lancet, v. 371, n. 9625, p. 1695-1709, 2008.

ARIAS-SALGADO, E. G.; LIZANO, S.; SARKAR, S.; BRUGGE, J. S.; GINSBERG, M. H.; SHATTIL, S. J. Src kinase activation by direct interaction with the integrin beta cytoplasmic domain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, n. 23, p. 13298-13302, 2003.

ARTYM, V. V.; ZHANG, Y.; SEILLIER-MOISEIWITSCH, F.; YAMADA, K. M.; MUELLER, S. C. Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. **Cancer Res.**, v. 66, n. 6, p. 3034-3043, 2006.

ASTIER, A.; AVRAHAM, H.; MANIE, S. N.; GROOPMAN, J.; CANTY, T.; AVRAHAM, S.; FREEDMAN, A. S. The related adhesion focal tyrosine kinase is tyrosinephosphorylated after beta1-integrin stimulation in B cells and binds to p130cas. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 1, p. 228-232, 1997.

AUMAILLEY, M. The laminin family. Cell Adh. Migr., v. 7, n. 1, p. 48-55, 2013.

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

^{*} De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

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

AVIZIENYTE, E.; FRAME, M. C. Src and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 17, n. 5, p. 542-547, 2005.

AYALA, I.; BALDASSARRE, M.; CALDIERI, G.; BUCCIONE, R. Invadopodia: a guided tour. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 85, n. 3-4, p. 159-164, 2006.

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

BAIR, E. L.; CHEN, M. L.; MCDANIEL, K.; SEKIGUCHI, K.; CRESS, A. E.; NAGLE, R. B.; BOWDEN, G. T. Membrane type 1 matrix metalloprotease cleaves laminin-10 and promotes prostate cancer cell migration. **Neoplasia**, v. 7, n. 4, p. 380-389, 2005.

BALDASSARRE, M.; RAZINIA, Z.; BRAHME, N. N.; BUCCIONE, R.; CALDERWOOD, D. A. Filamin A controls matrix metalloproteinase activity and regulates cell invasion in human fibrosarcoma cells. **J. Cell Sci.**, v. 125, n. Pt 16, p. 3858-3869, 2012.

BARBOLINA, M. V.; STACK, M. S. Membrane type 1-matrix metalloproteinase: substrate diversity in pericellular proteolysis. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 19, n. 1, p. 24-33, 2008.

BERRIER, A. L.; YAMADA, K. M. Cell-matrix adhesion. J. Cell. Physiol., v. 213, n. 3, p. 565-573, 2007.

BIFULCO, K.; DE CHIARA, A.; FAZIOLI, F.; LONGANESI-CATTANI, I.; CANTELMO, A. R.; TIRINO, V.; APICE, G.; ROCCO, G.; LOMBARDI, M. L.; CARRIERO, M. V. Cell invasiveness in sarcomas: a possibly useful clinical correlation. **Tumori.**, v. 94, n. 4, p. 505-510, 2008.

BJORGE, J. D.; JAKYMIW, A.; FUJITA, D. J. Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. **Oncogene**, v. 19, n. 49, p. 5620-5635, 2000.

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

BLOCK, M. R.; BADOWSKI, C.; MILLON-FREMILLON, A.; BOUVARD, D.; BOUIN, A. P.; FAUROBERT, E.; GERBER-SCOKAERT, D.; PLANUS, E.; ALBIGES-RIZO, C. Podosome-type adhesions and focal adhesions, so alike yet so different. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 87, n. 8-9, p. 491-506, 2008.

BLOUW, B.; SEALS, D. F.; PASS, I.; DIAZ, B.; COURTNEIDGE, S. A. A role for the podosome/invadopodia scaffold protein Tks5 in tumor growth in vivo. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 87, n. 8-9, p. 555-567, 2008.

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

BRAVO-CORDERO, J. J.; MARRERO-DIAZ, R.; MEGIAS, D.; GENIS, L.; GARCIA-GRANDE, A.; GARCIA, M. A.; ARROYO, A. G.; MONTOYA, M. C. MT1-MMP proinvasive activity is regulated by a novel Rab8-dependent exocytic pathway. **EMBO J.**, v. 26, n. 6, p. 1499-1510, 2007.

BUCCIONE, R.; CALDIERI, G.; AYALA, I. Invadopodia: specialized tumor cell structures for the focal degradation of the extracellular matrix. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 28, n. 1-2, p. 137-149, 2009.

BUCCIONE, R.; ORTH, J. D.; MCNIVEN, M. A. Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 5, n. 8, p. 647-657, 2004.

BUSCHMAN, M. D.; BROMANN, P. A.; CEJUDO-MARTIN, P.; WEN, F.; PASS, I.; COURTNEIDGE, S. A. The novel adaptor protein Tks4 (SH3PXD2B) is required for functional podosome formation. **Mol. Biol. Cell**, v. 20, n. 5, p. 1302-1311, 2009.

CANDIELLO, J.; BALASUBRAMANI, M.; SCHREIBER, E. M.; COLE, G. J.; MAYER, U.; HALFTER, W.; LIN, H. Biomechanical properties of native basement membranes. **FEBS J.**, v. 274, n. 11, p. 2897-2908, 2007.

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

CATALANO, V.; TURDO, A.; DI FRANCO, S.; DIELI, F.; TODARO, M.; STASSI, G. Tumor and its microenvironment: a synergistic interplay. **Semin. Cancer Biol.**, v. 23, n. 6 Pt B, p. 522-532, 2013.

CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 8, p. 563-572, 2002.

CHAN, K. T.; CORTESIO, C. L.; HUTTENLOCHER, A. FAK alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate breast cancer invasion. **J. Cell Biol.**, v. 185, n. 2, p. 357-370, 2009.

CHEN, W. T. Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. **J. Exp. Zool.**, v. 251, n. 2, p. 167-185, 1989.

CHEN, W. T.; CHEN, J. M.; PARSONS, S. J.; PARSONS, J. T. Local degradation of fibronectin at sites of expression of the transforming gene product pp60src. **Nature**, v. 316, n. 6024, p. 156-158, 1985.

CHIANG, A. C.; MASSAGUE, J. Molecular basis of metastasis. **N. Engl. J. Med.**, v. 359, n. 26, p. 2814-2823, 2008.

CLARK, E. S.; BROWN, B.; WHIGHAM, A. S.; KOCHAISHVILI, A.; YARBROUGH, W. G.; WEAVER, A. M. Aggressiveness of HNSCC tumors depends on expression levels of cortactin, a gene in the 11q13 amplicon. **Oncogene**, v. 28, n. 3, p. 431-444, 2009.

CLARK, E. S.; WEAVER, A. M. A new role for cortactin in invadopodia: regulation of protease secretion. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 87, n. 8-9, p. 581-590, 2008.

CLARK, E. S.; WHIGHAM, A. S.; YARBROUGH, W. G.; WEAVER, A. M. Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. **Cancer Res.**, v. 67, n. 9, p. 4227-4235, 2007.

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

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

CONDEELIS, J.; SEGALL, J. E. Intravital imaging of cell movement in tumours. **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, n. 12, p. 921-930, 2003.

CORTESIO, C. L.; CHAN, K. T.; PERRIN, B. J.; BURTON, N. O.; ZHANG, S.; ZHANG, Z. Y.; HUTTENLOCHER, A. Calpain 2 and PTP1B function in a novel pathway with Src to regulate invadopodia dynamics and breast cancer cell invasion. **J. Cell Biol.**, v. 180, n. 5, p. 957-971, 2008.

CURADO, M. P.; BOYLE, P. Epidemiology of head and neck squamous cell carcinoma not related to tobacco or alcohol. **Curr. Opin. Oncol.**, v. 25, n. 3, p. 229-234, 2013.

CURADO, M. P.; HASHIBE, M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. **Curr. Opin. Oncol.**, v. 21, n. 3, p. 194-200, 2009.

D'ORTHO, M. P.; WILL, H.; ATKINSON, S.; BUTLER, G.; MESSENT, A.; GAVRILOVIC, J.; SMITH, B.; TIMPL, R.; ZARDI, L.; MURPHY, G. Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. **Eur. J. Biochem.**, v. 250, n. 3, p. 751-757, 1997.

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. **Am. J. Pathol.**, v. 156, n. 5, p. 1489-1498, 2000.

DE BREE, R.; VAN DER WAAL, I.; DE BREE, E.; LEEMANS, C. R. Management of adult soft tissue sarcomas of the head and neck. **Oral Oncol.**, v. 46, n. 11, p. 786-790, 2010.

DE CAMARGO CANCELA, M.; VOTI, L.; GUERRA-YI, M.; CHAPUIS, F.; MAZUIR, M.; CURADO, M. P. Oral cavity cancer in developed and in developing countries: population-based incidence. **Head Neck**, v. 32, n. 3, p. 357-367, 2010.

DELON, I.; BROWN, N. H. Integrins and the actin cytoskeleton. Curr. Opin. Cell Biol., v. 19, n. 1, p. 43-50, 2007.

DESCHENES-SIMARD, X.; KOTTAKIS, F.; MELOCHE, S.; FERBEYRE, G. ERKs in cancer: friends or foes? **Cancer Res.**, v. 74, n. 2, p. 412-419, 2014.

DESGROSELLIER, J. S.; CHERESH, D. A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. **Nat. Rev. Cancer**, v. 10, n. 1, p. 9-22, 2010.

DESTAING, O.; BLOCK, M. R.; PLANUS, E.; ALBIGES-RIZO, C. Invadosome regulation by adhesion signaling. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 23, n. 5, p. 597-606, 2011.

DESTAING, O.; PLANUS, E.; BOUVARD, D.; ODDOU, C.; BADOWSKI, C.; BOSSY, V.; RADUCANU, A.; FOURCADE, B.; ALBIGES-RIZO, C.; BLOCK, M. R. beta1A integrin is a master regulator of invadosome organization and function. **Mol. Biol. Cell**, v. 21, n. 23, p. 4108-4119, 2010.

DESTAING, O.; SANJAY, A.; ITZSTEIN, C.; HORNE, W. C.; TOOMRE, D.; DE CAMILLI, P.; BARON, R. The tyrosine kinase activity of c-Src regulates actin dynamics and organization of podosomes in osteoclasts. **Mol. Biol. Cell**, v. 19, n. 1, p. 394-404, 2008.

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

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

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 3, p. 161-174, 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. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 25, n. 3, p. 241-252, 2008.

ERHARDT, P.; SCHREMSER, E. J.; COOPER, G. M. B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, n. 8, p. 5308-5315, 1999.

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. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 16, p. 13778-13786, 2002.

FAN, S.; TANG, Q. L.; LIN, Y. J.; CHEN, W. L.; LI, J. S.; HUANG, Z. Q.; YANG, Z. H.; WANG, Y. Y.; ZHANG, D. M.; WANG, H. J.; DIAS-RIBEIRO, E.; CAI, Q.; WANG, L. A review of clinical and histological parameters associated with contralateral neck metastases in oral squamous cell carcinoma. **Int. J. Oral Sci.**, v. 3, n. 4, p. 180-191, 2011.

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.

FELDING-HABERMANN, B. Integrin adhesion receptors in tumor metastasis. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 20, n. 3, p. 203-213, 2003.

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

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

FRANCA, C. M.; JAEGER, R. G.; FREITAS, V. M.; ARAUJO, N. S.; JAEGER, M. M. Effect of N-CAM on in vitro invasion of human adenoid cystic carcinoma cells. **Oral Oncol.**, v. 37, n. 8, p. 638-642, 2001.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. J. Cell Sci., v. 123, n. Pt 24, p. 4195-4200, 2010.

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

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

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

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

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

GIANNI, D.; TAULET, N.; DERMARDIROSSIAN, C.; BOKOCH, G. M. c-Srcmediated phosphorylation of NoxA1 and Tks4 induces the reactive oxygen species (ROS)-dependent formation of functional invadopodia in human colon cancer cells. **Mol. Biol. Cell**, v. 21, n. 23, p. 4287-4298, 2010.

GIMONA, M.; BUCCIONE, R.; COURTNEIDGE, S. A.; LINDER, S. Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 20, n. 2, p. 235-241, 2008.

GIOANNI, J.; FISCHEL, J. L.; LAMBERT, J. C.; DEMARD, F.; MAZEAU, C.; ZANGHELLINI, E.; ETTORE, F.; FORMENTO, P.; CHAUVEL, P.; LALANNE, C. M. Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.**, v. 24, n. 9, p. 1445-1455, 1988.

GIVANT-HORWITZ, V.; DAVIDSON, B.; REICH, R. Laminin-induced signaling in tumor cells. **Cancer Lett.**, v. 223, n. 1, p. 1-10, 2005.

GOROVETZ, M.; SCHWOB, O.; KRIMSKY, M.; YEDGAR, S.; REICH, R. MMP production in human fibrosarcoma cells and their invasiveness are regulated by group IB secretory phospholipase A2 receptor-mediated activation of cytosolic phospholipase A2. **Front. Biosci.**, v. 13, p. 1917-1925, 2008.

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.; KINSELLA, J. L.; FRIDMAN, R.; AUERBACH, R.; PIASECKI, B. A.; YAMADA, Y.; ZAIN, M.; KLEINMAN, H. K. Interaction of endothelial cells with a laminin A chain peptide (SIKVAV) in vitro and induction of angiogenic behavior in vivo. **J. Cell. Physiol.**, v. 153, n. 3, p. 614-625, 1992.

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.

GUARINO, M. Src signaling in cancer invasion. J. Cell. Physiol., v. 223, n. 1, p. 14-26, 2010.

GUHA, N.; BOFFETTA, P.; WUNSCH FILHO, V.; ELUF NETO, J.; SHANGINA, O.; ZARIDZE, D.; CURADO, M. P.; KOIFMAN, S.; MATOS, E.; MENEZES, A.; SZESZENIA-DABROWSKA, N.; FERNANDEZ, L.; MATES, D.; DAUDT, A. W.; LISSOWSKA, J.; DIKSHIT, R.; BRENNAN, P. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. **Am. J. Epidemiol.**, v. 166, n. 10, p. 1159-1173, 2007.

HALFTER, W.; CANDIELLO, J.; HU, H.; ZHANG, P.; SCHREIBER, E.; BALASUBRAMANI, M. Protein composition and biomechanical properties of in vivoderived basement membranes. **Cell Adh. Migr.**, v. 7, n. 1, p. 64-71, 2013.

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

HANSEN, T.; KATENKAMP, K.; BRODHUN, M.; KATENKAMP, D. Low-grade fibrosarcoma--report on 39 not otherwise specified cases and comparison with defined low-grade fibrosarcoma types. **Histopathology**, v. 49, n. 2, p. 152-160, 2006.

HANYU, A.; KOJIMA, K.; HATAKE, K.; NOMURA, K.; MURAYAMA, H.; ISHIKAWA, Y.; MIYATA, S.; USHIJIMA, M.; MATSUURA, M.; OGATA, E.; MIYAZAWA, K.; IMAMURA, T. Functional in vivo optical imaging of tumor angiogenesis, growth, and metastasis prevented by administration of anti-human VEGF antibody in xenograft model of human fibrosarcoma HT1080 cells. **Cancer Sci.**, v. 100, n. 11, p. 2085-2092, 2009.

HARBURGER, D. S.; CALDERWOOD, D. A. Integrin signalling at a glance. J. Cell Sci., v. 122, n. Pt 2, p. 159-163, 2009.

HARPER, K.; ARSENAULT, D.; BOULAY-JEAN, S.; LAUZIER, A.; LUCIEN, F.; DUBOIS, C. M. Autotaxin promotes cancer invasion via the lysophosphatidic acid receptor 4: participation of the cyclic AMP/EPAC/Rac1 signaling pathway in invadopodia formation. **Cancer Res.**, v. 70, n. 11, p. 4634-4643, 2010.

HARVATH, L.; BROWNSON, N. E.; FIELDS, G. B.; SKUBITZ, A. P. Laminin peptides stimulate human neutrophil motility. **J. Immunol.**, v. 152, n. 11, p. 5447-5456, 1994.

HASHIBE, M.; BRENNAN, P.; CHUANG, S. C.; BOCCIA, S.; CASTELLSAGUE, X.; CHEN, C.; CURADO, M. P.; DAL MASO, L.; DAUDT, A. W.; FABIANOVA, E.; FERNANDEZ, L.; WUNSCH-FILHO, V.; FRANCESCHI, S.; HAYES, R. B.; HERRERO, R.; KELSEY, K.; KOIFMAN, S.; LA VECCHIA, C.; LAZARUS, P.; LEVI, F.; LENCE, J. J.; MATES, D.; MATOS, E.; MENEZES, A.; MCCLEAN, M. D.; MUSCAT, J.; ELUF-NETO, J.; OLSHAN, A. F.; PURDUE, M.; RUDNAI, P.; SCHWARTZ, S. M.; SMITH, E.; STURGIS, E. M.; SZESZENIA-DABROWSKA, N.; TALAMINI, R.; WEI, Q.; WINN, D. M.; SHANGINA, O.; PILARSKA, A.; ZHANG, Z. F.; FERRO, G.; BERTHILLER, J.; BOFFETTA, P. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 18, n. 2, p. 541-550, 2009.

HOTARY, K.; ALLEN, E.; PUNTURIERI, A.; YANA, I.; WEISS, S. J. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by
membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. J. Cell Biol., v. 149, n. 6, p. 1309-1323, 2000.

HOTARY, K.; LI, X. Y.; ALLEN, E.; STEVENS, S. L.; WEISS, S. J. A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. **Genes Dev.**, v. 20, n. 19, p. 2673-2686, 2006.

HOTARY, K. B.; ALLEN, E. D.; BROOKS, P. C.; DATTA, N. S.; LONG, M. W.; WEISS, S. J. Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. **Cell**, v. 114, n. 1, p. 33-45, 2003.

HOZUMI, K.; AKIZUKI, T.; YAMADA, Y.; HARA, T.; URUSHIBATA, S.; KATAGIRI, F.; KIKKAWA, Y.; NOMIZU, M. Cell adhesive peptide screening of the mouse laminin alpha1 chain G domain. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 503, n. 2, p. 213-222, 2010.

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

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

HYNES, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, v. 69, n. 1, p. 11-25, 1992.

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

HYNES, R. O.; LIVELY, J. C.; MCCARTY, J. H.; TAVERNA, D.; FRANCIS, S. E.; HODIVALA-DILKE, K.; XIAO, Q. The diverse roles of integrins and their ligands in angiogenesis. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, v. 67, p. 143-153, 2002.

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

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

IWAMOTO, Y.; FUJITA, Y.; SUGIOKA, Y. YIGSR, a synthetic laminin peptide, inhibits the enhancement by cyclophosphamide of experimental lung metastasis of human fibrosarcoma cells. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 10, n. 3, p. 183-189, 1992.

IWAMOTO, Y.; NOMIZU, M.; YAMADA, Y.; ITO, Y.; TANAKA, K.; SUGIOKA, Y. Inhibition of angiogenesis, tumour growth and experimental metastasis of human fibrosarcoma cells HT1080 by a multimeric form of the laminin sequence Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR). **Br. J. Cancer**, v. 73, n. 5, p. 589-595, 1996.

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.

JADHAV, K. B.; GUPTA, N. Clinicopathological Prognostic Implicators of Oral Squamous Cell Carcinoma: Need to Understand and Revise. **N. Am. J. Med. Sci.**, v. 5, n. 12, p. 671-679, 2013.

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

JOHNSON, N.; FRANCESCHI, S.; FERLAY, J.; RAMADAS, K.; SCHMID, S.; MACDONALD, D. G.; BOUQUOT, J. E.; SLOOTWEG, P. J. Tumours of the Oral Cavity and Oropharynx - Squamous Cell Carcinoma. In: BARNES, L.; EVESON, J. W.; REICHART, P; SIDRANSKY, D. World Health Organization Classification of Tumours - Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press, 2005. p. 168-175.

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

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

KELLEY, L. C.; AMMER, A. G.; HAYES, K. E.; MARTIN, K. H.; MACHIDA, K.; JIA, L.; MAYER, B. J.; WEED, S. A. Oncogenic Src requires a wild-type counterpart to regulate invadopodia maturation. **J. Cell Sci.**, v. 123, n. Pt 22, p. 3923-3932, 2010.

KELLY, T.; MUELLER, S. C.; YEH, Y.; CHEN, W. T. Invadopodia promote proteolysis of a wide variety of extracellular matrix proteins. **J. Cell. Physiol.**, v. 158, n. 2, p. 299-308, 1994.

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

KIELOSTO, M.; NUMMELA, P.; JARVINEN, K.; YIN, M.; HOLTTA, E. Identification of integrins alpha6 and beta7 as c-Jun- and transformation-relevant genes in highly invasive fibrosarcoma cells. **Int. J. Cancer**, v. 125, n. 5, p. 1065-1073, 2009.

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

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

KIM, W. H.; NOMIZU, M.; SONG, S. Y.; TANAKA, K.; KURATOMI, Y.; KLEINMAN, H. K.; YAMADA, Y. Laminin-alpha1-chain sequence Leu-Gln-Val-Gln-Leu-Ser-IIe-Arg (LQVQLSIR) enhances murine melanoma cell metastases. **Int. J. Cancer**, v. 77, n. 4, p. 632-639, 1998.

KIM, W. H.; SCHNAPER, H. W.; NOMIZU, M.; YAMADA, Y.; KLEINMAN, H. K. Apoptosis in human fibrosarcoma cells is induced by a multimeric synthetic Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR)-containing polypeptide from laminin. **Cancer Res.**, v. 54, n. 18, p. 5005-5010, 1994.

KOONTONGKAEW, S.; AMORNPHIMOLTHAM, P.; MONTHANPISUT, P.; SAENSUK, T.; LEELAKRIANGSAK, M. Fibroblasts and extracellular matrix differently modulate MMP activation by primary and metastatic head and neck cancer cells. **Med. Oncol.**, v. 29, n. 2, p. 690-703, 2011.

KOSHIKAWA, N.; SCHENK, S.; MOECKEL, G.; SHARABI, A.; MIYAZAKI, K.; GARDNER, H.; ZENT, R.; QUARANTA, V. Proteolytic processing of laminin-5 by MT1-MMP in tissues and its effects on epithelial cell morphology. **FASEB J.**, v. 18, n. 2, p. 364-366, 2004.

KOSMEHL, H.; BERNDT, A.; STRASSBURGER, S.; BORSI, L.; ROUSSELLE, P.; MANDEL, U.; HYCKEL, P.; ZARDI, L.; KATENKAMP, D. Distribution of laminin and fibronectin isoforms in oral mucosa and oral squamous cell carcinoma. **Br. J. Cancer**, v. 81, n. 6, p. 1071-1079, 1999.

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

KRAMER, R. H.; SHEN, X.; ZHOU, H. Tumor cell invasion and survival in head and neck cancer. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 24, n. 1, p. 35-45, 2005.

KRUEGER, J. S.; KESHAMOUNI, V. G.; ATANASKOVA, N.; REDDY, K. B. Temporal and quantitative regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) modulates cell motility and invasion. **Oncogene**, v. 20, n. 31, p. 4209-4218, 2001.

KULASEKARA, K. K.; LUKANDU, O. M.; NEPPELBERG, E.; VINTERMYR, O. K.; JOHANNESSEN, A. C.; COSTEA, D. E. Cancer progression is associated with increased expression of basement membrane proteins in three-dimensional in vitro models of human oral cancer. **Arch. Oral Biol.**, v. 54, n. 10, p. 924-931, 2009.

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

KURATOMI, Y.; SATO, S.; MONJI, M.; SHIMAZU, R.; TANAKA, G.; YOKOGAWA, K.; INOUE, A.; INOKUCHI, A.; KATAYAMA, M. Serum concentrations of laminin

gamma2 fragments in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck**, v. 30, n. 8, p. 1058-1063, 2008.

LARSEN, M.; ARTYM, V. V.; GREEN, J. A.; YAMADA, K. M. The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 18, n. 5, p. 463-471, 2006.

LARSEN, S. R.; JOHANSEN, J.; SORENSEN, J. A.; KROGDAHL, A. The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 38, n. 8, p. 657-662, 2009.

LAUFFENBURGER, D. A.; HORWITZ, A. F. Cell migration: a physically integrated molecular process. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 359-369, 1996.

LEE, J. M.; DEDHAR, S.; KALLURI, R.; THOMPSON, E. W. The epithelialmesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. **J. Cell Biol.**, v. 172, n. 7, p. 973-981, 2006.

LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 11, n. 1, p. 9-22, 2011.

LI, A.; DAWSON, J. C.; FORERO-VARGAS, M.; SPENCE, H. J.; YU, X.; KONIG, I.; ANDERSON, K.; MACHESKY, L. M. The actin-bundling protein fascin stabilizes actin in invadopodia and potentiates protrusive invasion. **Curr. Biol.**, v. 20, n. 4, p. 339-345, 2010.

LI, H.; FAN, X.; HOUGHTON, J. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. **J. Cell. Biochem.**, v. 101, n. 4, p. 805-815, 2007.

LI, S.; LIQUARI, P.; MCKEE, K. K.; HARRISON, D.; PATEL, R.; LEE, S.; YURCHENCO, P. D. Laminin-sulfatide binding initiates basement membrane assembly and enables receptor signaling in Schwann cells and fibroblasts. **J. Cell Biol.**, v. 169, n. 1, p. 179-189, 2005.

LINDER, S. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. **Trends Cell Biol.**, v. 17, n. 3, p. 107-117, 2007.

LINDER, S. Invadosomes at a glance. **J. Cell Sci.**, v. 122, n. Pt 17, p. 3009-3013, 2009.

LU, C. C.; YANG, J. S.; CHIANG, J. H.; HOUR, M. J.; AMAGAYA, S.; LU, K. W.; LIN, J. P.; TANG, N. Y.; LEE, T. H.; CHUNG, J. G. Inhibition of invasion and migration by newly synthesized quinazolinone MJ-29 in human oral cancer CAL 27 cells through suppression of MMP-2/9 expression and combined down-regulation of MAPK and AKT signaling. **Anticancer Res.**, v. 32, n. 7, p. 2895-2903, 2012.

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

LUBEK, J. E.; CLAYMAN, L. An update on squamous carcinoma of the oral cavity, oropharynx, and maxillary sinus. **Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.**, v. 24, n. 2, p. 307-316, x, 2012.

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

LUO, B. H.; CARMAN, C. V.; SPRINGER, T. A. Structural basis of integrin regulation and signaling. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 25, p. 619-647, 2007.

MAAT, W.; EL FILALI, M.; DIRKS-MULDER, A.; LUYTEN, G. P.; GRUIS, N. A.; DESJARDINS, L.; BOENDER, P.; JAGER, M. J.; VAN DER VELDEN, P. A. Episodic Src activation in uveal melanoma revealed by kinase activity profiling. **Br. J. Cancer**, v. 101, n. 2, p. 312-319, 2009.

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

MAGALHAES, M. A.; LARSON, D. R.; MADER, C. C.; BRAVO-CORDERO, J. J.; GIL-HENN, H.; OSER, M.; CHEN, X.; KOLESKE, A. J.; CONDEELIS, J. Cortactin phosphorylation regulates cell invasion through a pH-dependent pathway. **J. Cell Biol.**, v. 195, n. 5, p. 903-920, 2011.

MAJCHRZAK, E.; SZYBIAK, B.; WEGNER, A.; PIENKOWSKI, P.; PAZDROWSKI, J.; LUCZEWSKI, L.; SOWKA, M.; GOLUSINSKI, P.; MALICKI, J.; GOLUSINSKI, W. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature. **Radiol. Oncol.**, v. 48, n. 1, p. 1-10, 2014.

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

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

MAQUART, F. X.; PASCO, S.; RAMONT, L.; HORNEBECK, W.; MONBOISSE, J. C. An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity. Implication in tumor invasion. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 49, n. 3, p. 199-202, 2004.

MARCHISIO, P. C.; CIRILLO, D.; NALDINI, L.; PRIMAVERA, M. V.; TETI, A.; ZAMBONIN-ZALLONE, A. Cell-substratum interaction of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures. **J. Cell Biol.**, v. 99, n. 5, p. 1696-1705, 1984.

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

MAYNE, S. T.; MORSE, D. E.; WINN, D. M. Cancers of the oral cavity and pharynx. In: SCHOTTENFELD, D; FRAUMENI, J. F. **Cancer Epidemiology and Prevention.** 3 ed. New York: Oxford University Press, 2006. p. 674-696.

MCKEE, K. K.; CAPIZZI, S.; YURCHENCO, P. D. Scaffold-forming and Adhesive Contributions of Synthetic Laminin-binding Proteins to Basement Membrane Assembly. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 13, p. 8984-8994, 2009.

MEHROTRA, R.; YADAV, S. Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. **Indian J. Cancer**, v. 43, n. 2, p. 60-66, 2006.

MILES, F. L.; SIKES, R. A. Insidious Changes in Stromal Matrix Fuel Cancer Progression. **Mol. Cancer Res.**, v. 12, n. 3, p. 297-312, 2014.

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

MIOSGE, N. The ultrastructural composition of basement membranes in vivo. **Histol. Histopathol.**, v. 16, n. 4, p. 1239-1248, 2001.

MISSAN, D. S.; DIPERSIO, M. Integrin control of tumor invasion. Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr., v. 22, n. 4, p. 309-324, 2013.

MITRA, S. K.; SCHLAEPFER, D. D. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 18, n. 5, p. 516-523, 2006.

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

MORAIS FREITAS, V.; NOGUEIRA DA GAMA DE SOUZA, L.; CYRENO OLIVEIRA, E.; FURUSE, C.; CAVALCANTI DE ARAUJO, V.; GASTALDONI JAEGER, R. Malignancy-related 67kDa laminin receptor in adenoid cystic carcinoma. Effect on migration and beta-catenin expression. **Oral Oncol.**, v. 43, n. 10, p. 987-998, 2007.

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

MUELLER, S. C.; CHEN, W. T. Cellular invasion into matrix beads: localization of beta 1 integrins and fibronectin to the invadopodia. **J. Cell Sci.**, v. 99 (Pt 2), p. 213-225, 1991.

MURPHY, D. A.; COURTNEIDGE, S. A. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 12, n. 7, p. 413-426, 2011.

NAKAHARA, H.; MUELLER, S. C.; NOMIZU, M.; YAMADA, Y.; YEH, Y.; CHEN, W. T. Activation of beta1 integrin signaling stimulates tyrosine phosphorylation of

p190RhoGAP and membrane-protrusive activities at invadopodia. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 1, p. 9-12, 1998.

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 Res.**, v. 52, n. 19, p. 5395-5399, 1992.

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

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral cancer and precancerous lesions. C.A. Cancer J. Clin., v. 52, n. 4, p. 195-215, 2002.

NIELSEN, J. D.; MOESLUND, M.; WANDALL, H. H.; DABELSTEEN, S. Influences of tumor stroma on the malignant phenotype. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 37, n. 7, p. 412-416, 2008.

NIKITOVIC, D.; BERDIAKI, A.; BANOS, A.; TSATSAKIS, A.; KARAMANOS, N. K.; TZANAKAKIS, G. N. Could growth factor-mediated extracellular matrix deposition and degradation offer the ground for directed pharmacological targeting in fibrosarcoma? **Curr. Med. Chem.**, v. 20, n. 23, p. 2868-2880, 2013.

NOMIZU, M.; KIM, W. H.; YAMAMURA, K.; UTANI, A.; SONG, S. Y.; OTAKA, A.; ROLLER, P. P.; KLEINMAN, H. K.; YAMADA, Y. Identification of cell binding sites in the laminin alpha 1 chain carboxyl-terminal globular domain by systematic screening of synthetic peptides. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 35, p. 20583-20590, 1995.

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

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

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

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

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

NURNBERG, A.; KITZING, T.; GROSSE, R. Nucleating actin for invasion. **Nat. Rev. Cancer**, v. 11, n. 3, p. 177-187, 2011.

OHUCHI, E.; IMAI, K.; FUJII, Y.; SATO, H.; SEIKI, M.; OKADA, Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 4, p. 2446-2451, 1997.

OSER, M.; MADER, C. C.; GIL-HENN, H.; MAGALHAES, M.; BRAVO-CORDERO, J. J.; KOLESKE, A. J.; CONDEELIS, J. Specific tyrosine phosphorylation sites on cortactin regulate Nck1-dependent actin polymerization in invadopodia. **J. Cell Sci.**, v. 123, n. Pt 21, p. 3662-3673, 2010.

OSER, M.; YAMAGUCHI, H.; MADER, C. C.; BRAVO-CORDERO, J. J.; ARIAS, M.; CHEN, X.; DESMARAIS, V.; VAN RHEENEN, J.; KOLESKE, A. J.; CONDEELIS, J. Cortactin regulates cofilin and N-WASp activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation. **J. Cell Biol.**, v. 186, n. 4, p. 571-587, 2009.

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.

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

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

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

PARK, S. J.; SUETSUGU, S.; TAKENAWA, T. Interaction of HSP90 to N-WASP leads to activation and protection from proteasome-dependent degradation. **EMBO J.**, v. 24, n. 8, p. 1557-1570, 2005.

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

PATTARAMALAI, S.; SKUBITZ, A. P. Promotion of human oral squamous cell carcinoma adhesion in vitro by the carboxy-terminal globular domain of laminin. **Arch. Oral Biol.**, v. 39, n. 11, p. 925-933, 1994.

PATTARAMALAI, S.; SKUBITZ, K. M.; SKUBITZ, A. P. A novel recognition site on laminin for the alpha 3 beta 1 integrin. **Exp. Cell Res.**, v. 222, n. 2, p. 281-290, 1996.

PEREIRA, M. C.; OLIVEIRA, D. T.; LANDMAN, G.; KOWALSKI, L. P. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. **J. Can. Dent. Assoc.**, v. 73, n. 4, p. 339-344, 2007.

POLISHCHUK, R. S.; POLISHCHUK, E. V.; MARRA, P.; ALBERTI, S.; BUCCIONE, R.; LUINI, A.; MIRONOV, A. A. Correlative light-electron microscopy reveals the tubular-saccular ultrastructure of carriers operating between Golgi apparatus and plasma membrane. **J. Cell Biol.**, v. 148, n. 1, p. 45-58, 2000.

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 Res.**, v. 63, n. 16, p. 5060-5064, 2003.

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

PONCE, M. L.; NOMIZU, M.; DELGADO, M. C.; KURATOMI, Y.; HOFFMAN, M. P.; POWELL, S.; YAMADA, Y.; KLEINMAN, H. K.; MALINDA, K. M. Identification of endothelial cell binding sites on the laminin gamma 1 chain. **Circ. Res.**, v. 84, n. 6, p. 688-694, 1999.

PONCE, M. L.; NOMIZU, M.; KLEINMAN, H. K. An angiogenic laminin site and its antagonist bind through the alpha(v)beta3 and alpha5beta1 integrins. **FASEB J.**, v. 15, n. 8, p. 1389-1397, 2001.

QUINTAVALLE, M.; ELIA, L.; CONDORELLI, G.; COURTNEIDGE, S. A. MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. **J. Cell Biol.**, v. 189, n. 1, p. 13-22, 2010.

RASHEED, S.; NELSON-REES, W. A.; TOTH, E. M.; ARNSTEIN, P.; GARDNER, M. B. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). **Cancer**, v. 33, n. 4, p. 1027-1033, 1974.

REDDY, K. B.; NABHA, S. M.; ATANASKOVA, N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 22, n. 4, p. 395-403, 2003.

ROSKOSKI, R., JR. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. **Pharmacol. Res.**, v. 66, n. 2, p. 105-143, 2012.

ROWE, R. G.; WEISS, S. J. Breaching the basement membrane: who, when and how? **Trends Cell Biol.**, v. 18, n. 11, p. 560-574, 2008.

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

SABEH, F.; LI, X. Y.; SAUNDERS, T. L.; ROWE, R. G.; WEISS, S. J. Secreted versus membrane-anchored collagenases: relative roles in fibroblast-dependent collagenolysis and invasion. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 34, p. 23001-23011, 2009.

SASAKI, T.; FASSLER, R.; HOHENESTER, E. Laminin: the crux of basement membrane assembly. **J. Cell Biol.**, v. 164, n. 7, p. 959-963, 2004.

SCANLON, C. S.; VAN TUBERGEN, E. A.; INGLEHART, R. C.; D'SILVA, N. J. Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. **J. Dent. Res.**, v. 92, n. 2, p. 114-121, 2013.

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

SCHOUMACHER, M.; GOLDMAN, R. D.; LOUVARD, D.; VIGNJEVIC, D. M. Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. **J. Cell Biol.**, v. 189, n. 3, p. 541-556, 2010.

SCOTT, S. M.; REIMAN, H. M.; PRITCHARD, D. J.; ILSTRUP, D. M. Soft tissue fibrosarcoma. A clinicopathologic study of 132 cases. **Cancer**, v. 64, n. 4, p. 925-931, 1989.

SEALS, D. F.; AZUCENA, E. F., JR.; PASS, I.; TESFAY, L.; GORDON, R.; WOODROW, M.; RESAU, J. H.; COURTNEIDGE, S. A. The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. **Cancer Cell**, v. 7, n. 2, p. 155-165, 2005.

SEIKI, M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. **Cancer Lett.**, v. 194, n. 1, p. 1-11, 2003.

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

SHIN, E. Y.; MA, E. K.; KIM, C. K.; KWAK, S. J.; KIM, E. G. Src/ERK but not phospholipase D is involved in keratinocyte growth factor-stimulated secretion of matrix metalloprotease-9 and urokinase-type plasminogen activator in SNU-16 human stomach cancer cell. J. Cancer Res. Clin. Oncol., v. 128, n. 11, p. 596-602, 2002.

SHRUTHY, R.; SHARADA, P.; SWAMINATHAN, U.; NAGAMALINI, B. Immunohistochemical expression of basement membrane laminin in histological grades of oral squamous cell carcinoma: A semiquantitative analysis. **J. Oral Maxillofac. Pathol.**, v. 17, n. 2, p. 185-189, 2013.

SIBONY-BENYAMINI, H.; GIL-HENN, H. Invadopodia: the leading force. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 91, n. 11-12, p. 896-901, 2012.

SIQUEIRA, A. S.; GAMA-DE-SOUZA, L. N.; ARNAUD, M. V.; PINHEIRO, J. J.; JAEGER, R. G. Laminin-derived peptide AG73 regulates migration, invasion, and

protease activity of human oral squamous cell carcinoma cells through syndecan-1 and beta1 integrin. **Tumour Biol.**, v. 31, n. 1, p. 46-58, 2010.

SKUBITZ, A. P.; MCCARTHY, J. B.; ZHAO, Q.; YI, X. Y.; FURCHT, L. T. Definition of a sequence, RYVVLPR, within laminin peptide F-9 that mediates metastatic fibrosarcoma cell adhesion and spreading. **Cancer Res.**, v. 50, n. 23, p. 7612-7622, 1990.

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

SOUZA, L. F.; SOUZA, V. F.; SILVA, L. D.; SANTOS, J. N.; REIS, S. R. Expression of basement membrane laminin in oral squamous cell carcinomas. **Braz. J. Otorhinolaryngol**, v. 73, n. 6, p. 768-774, 2007.

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

STYLLI, S. S.; KAYE, A. H.; LOCK, P. Invadopodia: at the cutting edge of tumour invasion. **J. Clin. Neurosci.**, v. 15, n. 7, p. 725-737, 2008.

SUMMY, J. M.; GALLICK, G. E. Src family kinases in tumor progression and metastasis. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 22, n. 4, p. 337-358, 2003.

SUZUKI, N.; YOKOYAMA, F.; NOMIZU, M. Functional sites in the laminin alpha chains. **Connect. Tissue Res.**, v. 46, n. 3, p. 142-152, 2005.

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

TAKINO, T.; TSUGE, H.; OZAWA, T.; SATO, H. MT1-MMP promotes cell growth and ERK activation through c-Src and paxillin in three-dimensional collagen matrix. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 396, n. 4, p. 1042-1047, 2010.

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

TARONE, G.; CIRILLO, D.; GIANCOTTI, F. G.; COMOGLIO, P. M.; MARCHISIO, P. C. Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. **Exp. Cell Res.**, v. 159, n. 1, p. 141-157, 1985.

TASHIRO, K.; SEPHEL, G. C.; WEEKS, B.; SASAKI, M.; MARTIN, G. R.; KLEINMAN, H. K.; YAMADA, Y. A synthetic peptide containing the IKVAV sequence from the A chain of laminin mediates cell attachment, migration, and neurite outgrowth. **J. Biol. Chem.**, v. 264, n. 27, p. 16174-16182, 1989.

TEHRANI, S.; FACCIO, R.; CHANDRASEKAR, I.; ROSS, F. P.; COOPER, J. A. Cortactin has an essential and specific role in osteoclast actin assembly. **Mol. Biol. Cell**, v. 17, n. 7, p. 2882-2895, 2006.

TERRANOVA, V. P.; LIOTTA, L. A.; RUSSO, R. G.; MARTIN, G. R. Role of laminin in the attachment and metastasis of murine tumor cells. **Cancer Res.**, v. 42, n. 6, p. 2265-2269, 1982.

TERRANOVA, V. P.; WILLIAMS, J. E.; LIOTTA, L. A.; MARTIN, G. R. Modulation of the metastatic activity of melanoma cells by laminin and fibronectin. **Science**, v. 226, n. 4677, p. 982-985, 1984.

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

TOLDE, O.; ROSEL, D.; VESELY, P.; FOLK, P.; BRABEK, J. The structure of invadopodia in a complex 3D environment. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 89, n. 9, p. 674-680, 2010.

TRAN, K. T.; LAMB, P.; DENG, J. S. Matrikines and matricryptins: Implications for cutaneous cancers and skin repair. **J. Dermatol. Sci.**, v. 40, n. 1, p. 11-20, 2005.

URUSHIBATA, S.; KATAGIRI, F.; TAKAKI, S.; YAMADA, Y.; FUJIMORI, C.; HOZUMI, K.; KIKKAWA, Y.; KADOYA, Y.; NOMIZU, M. Biologically active sequences in the mouse laminin alpha3 chain G domain. **Biochemistry**, v. 48, n. 44, p. 10522-10532, 2009.

WEAVER, A. M. Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 23, n. 2, p. 97-105, 2006.

WEAVER, A. M. Cortactin in tumor invasiveness. **Cancer Lett.**, v. 265, n. 2, p. 157-166, 2008a.

WEAVER, A. M. Invadopodia. Curr. Biol., v. 18, n. 9, p. R362-364, 2008b.

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

WILSON, D. F.; JIANG, D. J.; PIERCE, A. M.; WIEBKIN, O. W. Oral cancer: role of the basement membrane in invasion. **Aust. Dent. J.**, v. 44, n. 2, p. 93-97, 1999.

WOLFENSON, H.; LAVELIN, I.; GEIGER, B. Dynamic regulation of the structure and functions of integrin adhesions. **Dev. Cell**, v. 24, n. 5, p. 447-458, 2013.

WOOLGAR, J. A.; TRIANTAFYLLOU, A. Pitfalls and procedures in the histopathological diagnosis of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma and

a review of the role of pathology in prognosis. **Oral Oncol.**, v. 45, n. 4-5, p. 361-385, 2009.

WOOLGAR, J. A.; TRIANTAFYLLOU, A. Squamous cell carcinoma and precursor lesions: clinical pathology. **Periodontol. 2000**, v. 57, n. 1, p. 51-72, 2011.

XIONG, J.; BALCIOGLU, H. E.; DANEN, E. H. Integrin signaling in control of tumor growth and progression. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 45, n. 5, p. 1012-1015, 2013.

YAMADA, Y.; KLEINMAN, H. K. Functional domains of cell adhesion molecules. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 4, n. 5, p. 819-823, 1992.

YAMAGUCHI, H.; LORENZ, M.; KEMPIAK, S.; SARMIENTO, C.; CONIGLIO, S.; SYMONS, M.; SEGALL, J.; EDDY, R.; MIKI, H.; TAKENAWA, T.; CONDEELIS, J. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. **J. Cell Biol.**, v. 168, n. 3, p. 441-452, 2005.

YAMAMURA, K.; KIBBEY, M. C.; JUN, S. H.; KLEINMAN, H. K. Effect of Matrigel and laminin peptide YIGSR on tumor growth and metastasis. **Semin. Cancer Biol.**, v. 4, n. 4, p. 259-265, 1993.

YOON, S.; SEGER, R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. **Growth Factors**, v. 24, n. 1, p. 21-44, 2006.

YOSHIDA, I.; TASHIRO, K.; MONJI, A.; NAGATA, I.; HAYASHI, Y.; MITSUYAMA, Y.; TASHIRO, N. Identification of a heparin binding site and the biological activities of the laminin alpha1 chain carboxy-terminal globular domain. **J. Cell. Physiol.**, v. 179, n. 1, p. 18-28, 1999.

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

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

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

ZAMBONIN-ZALLONE, A.; TETI, A.; CARANO, A.; MARCHISIO, P. C. The distribution of podosomes in osteoclasts cultured on bone laminae: effect of retinol. **J. Bone Miner. Res.**, v. 3, n. 5, p. 517-523, 1988.

ZHANG, K.; KIM, J. P.; WOODLEY, D. T.; WALEH, N. S.; CHEN, Y. Q.; KRAMER, R. H. Restricted expression and function of laminin 1-binding integrins in normal and malignant oral mucosal keratinocytes. **Cell Adhes. Commun.**, v. 4, n. 3, p. 159-174, 1996.

ZIOBER, A. F.; FALLS, E. M.; ZIOBER, B. L. The extracellular matrix in oral squamous cell carcinoma: friend or foe? **Head Neck**, v. 28, n. 8, p. 740-749, 2006.

ZIOBER, B. L.; SILVERMAN, S. S., JR.; KRAMER, R. H. Adhesive mechanisms regulating invasion and metastasis in oral cancer. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 12, n. 6, p. 499-510, 2001.

ZUBER, C.; KNACKMUSS, S.; ZEMORA, G.; REUSCH, U.; VLASOVA, E.; DIEHL, D.; MICK, V.; HOFFMANN, K.; NIKLES, D.; FROHLICH, T.; ARNOLD, G. J.; BRENIG, B.; WOLF, E.; LAHM, H.; LITTLE, M.; WEISS, S. Invasion of tumorigenic HT1080 cells is impeded by blocking or downregulating the 37-kDa/67-kDa laminin receptor. J. Mol. Biol., v. 378, n. 3, p. 530-539, 2008.

APÊNDICE - Legendas – Filmes em "time-lapse"

Filme S1 - C16 regula dinâmica de invadopódios em células CAL27. Vídeos em "time-lapse" de célula transfectada com cortactina-GFP (canal verde) e cultivada sobre gelatina fluorescente (canal vermelho), mostrando que C16 estimula a formação de áreas de digestão do substrato ao longo do tempo (seta em vídeo "Gelatina").

Filme S2 - C16SX (peptídeo controle) não regula dinâmica de invadopódios em células CAL27. Vídeos em "time-lapse" de células transfectadas com cortactina-GFP e cultivadas sobre gelatina mostram que C16SX não estimula células CAL27 a digerirem o substrato fluorescente.

Filme S3 - C16 regula dinâmica de invadopódios em células HT1080. Vídeos em "time-lapse" de células transfectadas com cortactina-GFP e cultivadas sobre gelatina fluorescente mostram que C16 estimula aumento da digestão do substrato em função do tempo (setas em vídeo "Gelatina").

Filme S4 - C16SX não regula dinâmica de invadopódios em células HT1080. Vídeos em "time-lapse" de célula transfectada com cortactina-GFP e cultivada sobre gelatina mostram que C16SX não estimula células HT1080 a digerirem o substrato fluorescente.

Filme S5 – Inibidor de MEK U0126 diminui a atividade de invadopódios de células CAL27 tratadas com C16 (Controle). Vídeos em "time-lapse" de célula transfectada com cortactina-GFP e incubada com C16 e metanol (veículo de diluição do inibidor U0126), demostrando a formação de áreas de digestão do substrato ao longo do tempo (seta em vídeo "Gelatina").

Filme S6 – Inibidor de MEK U0126 diminui a atividade de invadopódios de células CAL27 tratadas com C16. Vídeos em "time-lapse" de célula transfectada com cortactina-GFP e tratada com U0126 demonstram que inibição da via de sinalização ERK reduz áreas de digestão da matriz fluorescente relacionadas a este peptídeo

Filme S7 – Inibidor de MEK U0126 diminui a atividade de invadopódios de células HT1080 tratadas com C16 (Controle). Vídeos em "time-lapse" de célula transfectada com cortactina-GFP e incubada com C16 e metanol, demostrando a formação de áreas de digestão do substrato ao longo do tempo (seta em vídeo "Gelatina").

Filme S8 – Inibidor de MEK U0126 diminui a atividade de invadopódios de células HT1080 tratadas com C16. Vídeos em "time-lapse" de célula transfectada com cortactina-GFP e tratada com U0126 demonstram que inibição da via de sinalização ERK reduz áreas de digestão da matriz fluorescente relacionadas a este peptídeo.

Filme S9 – Silenciamento de integrina β1 reduz a atividade de invadopódios em células CAL27 (Controle). Vídeos em "time-lapse" de célula transfectada com vetor contendo miRNA controle (pcDNA 6.2-GW/EmGFPmiR-neg control) e tratada com C16, demostrando a formação de áreas de digestão do substrato ao longo do tempo (seta em vídeo "Gelatina").

Filme S10 – Silenciamento de integrina β 1 reduz a atividade de invadopódios em células CAL27. Vídeos em "time-lapse" de células transfectadas com vetor contendo miRNA para reduzir a expressão de integrina β 1 (Block-iT) demonstram que silenciamento desse receptor promove a diminuição de áreas de digestão da matriz fluorescente, mesmo na presença de C16.