

MARIA RAQUEL UNTERKIRCHER GALHEIGO

Estudo da interação entre o peptídeo derivado da laminina 111, C16, e a subunidade β 1 da integrina em células de linhagens mamárias: consequências morfofuncionais

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de doutora em Ciências.

São Paulo

2021

MARIA RAQUEL UNTERKIRCHER GALHEIGO

Estudo da interação entre o peptídeo derivado da laminina 111, C16, e a subunidade β 1 da integrina em células de linhagens mamárias: consequências morfofuncionais

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de doutora em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. Ruy Gastaldoni Jaeger

Versão corrigida.

São Paulo

2021

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Unterkircher Galheigo, Maria Raquel
Estudo da interação entre o peptídeo derivado da
laminina 111, C16, e a subunidade beta 1 da
integrina em células de linhagens mamárias:
consequências morfofuncionais / Maria Raquel
Unterkircher Galheigo; orientador Ruy Gastaldoni
Jaeger. -- São Paulo, 2021.
96 p.

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

1. Laminina 111. 2. Câncer de mama. 3. Integrina
beta 1. 4. Endocitose. I. Gastaldoni Jaeger, Ruy ,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Maria Raquel Unterkircher Galheigo

Título da Tese: Estudo da interação entre o peptídeo derivado da laminina 111, C16, e a integrina β 1 em células de linhagens mamárias e consequências morfofuncionais.

Orientador: Prof. Dr. Ruy Gastaldoni Jaeger

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



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

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **836/2016** referente ao projeto intitulado: "**Mecanismos envolvidos na interação entre o peptídeo C16, derivado da lâmina-111 e integrina $\beta 1$ em células de mama**" sob a responsabilidade de **Maria Raquel Unterkircher Galheigo** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Ruy Gastaldoni Jaeger**, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 13 de setembro de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paulo Marinho A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP

Aos meus pais e avós; minhas referências em ética, responsabilidade, compromisso e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, agradeço o suporte financeiro dado através do processo 2016/20228-4, o qual foi de fundamental importância para o desenvolvimento desta tese, além de ter me proporcionado grandes oportunidades de crescimento profissional.

Ao professor Dr. Ruy Jaeger, agradeço a oportunidade de poder fazer parte da sua equipe e a confiança em tocar um dos seus projetos. Agradeço também a generosidade em compartilhar comigo um pouco do seu conhecimento nas áreas de pesquisa, biologia celular, microscopia, dentre tantos outros ensinamentos.

À professora Dra. Vanessa Freitas, agradeço por sua colaboração e contribuição durante o desenvolvimento de todo o trabalho, estando sempre disponível para me auxiliar no que fosse preciso e sanar minhas dúvidas; além da generosidade em dedicar parte do seu tempo na correção desta tese.

À professora Dra. Maria Aparecida Juliano, da Universidade Federal de São Paulo, agradeço imensamente a colaboração na síntese dos peptídeos C16 e C16Rv.

Ao Guilherme, agradeço o companheirismo em todos os momentos, pelos conselhos assertivos nas horas de aflição, e, especialmente, por compreender a importância dessa fase na minha vida, me apoiando sempre, mesmo com a minha ausência em várias noites, feriados e finais de semana.

Às amigas Olga e Raquel e ao amigo Basílio, agradeço a parceria durante esses anos, o auxílio nos experimentos, as sugestões dadas em relação ao projeto, e a descontração nos momentos livres. Levo nossos momentos com muito carinho na minha memória.

Ao Mário Cruz, especialista técnico do setor de microscopia confocal, agradeço sua contribuição para esse trabalho, a qual foi fundamental para a obtenção dos resultados de time lapse e citometria de fluxo.

Aos sr. Gaspar e Gisela, especialistas da área de técnicas histológicas, agradeço a colaboração no preparo das amostras para análise no microscópio eletrônico.

Ao Roberto Cabado, especialista técnico do microscópio eletrônico de transmissão, agradeço o auxílio durante a obtenção das imagens nesse equipamento.

Ao Edilberto Oliveira, responsável técnico do Laboratório de Biologia Tumoral, agradeço o suporte durante o desenvolvimento do trabalho.

RESUMO

GALHEIGO, M. R. U. Estudo da interação entre o peptídeo derivado da laminina 111, C16, e a integrina $\beta 1$ em células de linhagens mamárias: consequências morfofuncionais. 2021. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O câncer de mama está entre as principais causas de morte provocadas por neoplasias no mundo. Nesse contexto, a matriz extracelular (MEC), que compõe o microambiente tumoral, assume papel importante durante a carcinogênese. A laminina-111 é a principal glicoproteína da MEC e exibe diferentes peptídeos bioativos que influenciam a biologia do câncer. Nossos trabalhos anteriores demonstram que o peptídeo derivado da laminina 111, C16, regula a migração, invasão e a formação de invadopódios em diferentes células tumorais. Outros achados indicam que os mecanismos regulatórios relativos aos efeitos do C16 se devem à integrina $\beta 1$. Isso nos levou a investigar uma possível interação entre o peptídeo C16 e a integrina $\beta 1$ nas células de mama, bem como as consequências morfofuncionais resultantes dessa interação. Assim, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que as células de mama aderem ao peptídeo C16 e que essa adesão é diminuída com o *knockdown* da integrina $\beta 1$ por RNAi. Além disso, mostramos que o C16 conjugado à rodamina se sobrepõe à integrina $\beta 1$ ativa nas células mamárias, indicando uma possível colocalização entre ambos. Através de citometria de fluxo, mostramos também que essa subunidade pode ser ativada por aquele peptídeo. Ainda, as análises das amostras de células MDA-MB-231 tratadas com C16 conjugado a partículas de *Nanogold* mostraram o peptídeo decorando a membrana e dentro de vesículas no interior das células. Foi também demonstrado que o peptídeo é internalizado pelas células de mama com o passar do tempo e que essa internalização é diminuída por inibidor químico de dinamina e por RNAi contra caveolina-1. Após a internalização, parte desse peptídeo é direcionado para via endocítica, tendo sido encontrado em endossomos iniciais e lisossomos. Juntos, os resultados sugerem que, após a interação com a membrana e possível ativação da integrina $\beta 1$, as células de mama endocitam o peptídeo C16 através de vesículas revestidas por caveolina-1. Após endocitose, o peptídeo será, pelo menos em parte, degradado nos lisossomos.

Palavras-chave: Laminina 111. Câncer de mama. Integrina $\beta 1$. Endocitose.

ABSTRACT

GALHEIGO, M. R. U. **Study of the interaction between laminin 111-derived peptide, C16, and $\beta 1$ integrin in breast cells: morphofunctional consequences.** 96 p. 2021. PhD thesis (Cell and tissue biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Breast cancer is among the most frequent worldwide mortality. Tumor microenvironment undertakes important role during cancer progression. Different cells enmeshed in the extracellular matrix (ECM) compose such microenvironment. Laminin 111 is a major ECM glycoprotein and exhibits different bioactive peptides influencing tumor biology. We have demonstrated that the laminin-derived peptide C16 (KAFDITYVRLKF, short arm of gamma 1 chain) regulates migration, invasion, and invadopodia formation in different cancer cells. Our findings indicate that regulatory mechanisms underlying C16 effects are related to $\beta 1$ integrin. This prompted us to investigate the interaction between C16 peptide and $\beta 1$ integrin in breast cancer cells as well as its morphofunctional effects. These cells attach to C16 peptide and this attachment is inhibited by $\beta 1$ integrin depletion by siRNA. Moreover, rhodamine-C16 colocalized with activated $\beta 1$ integrins in breast cancer cells. Flow cytometry assay showed that C16 increased $\beta 1$ activation after 20 minutes in these cells. Cellular localization of C16 was carried out by transmission electron microscopy (TEM) and time-lapse fluorescence microscopy. TEM showed nanogold-conjugated C16 decorating cell membrane and inside cellular vesicles. The presence of C16 inside vesicles would imply peptide endocytosis. Time-lapse confocal microscopy displayed peptide C16 internalized by breast cells over time and decreased internalization of this peptide by dynasore in MCF-7 cells. Moreover, fluorescence microscopy also showed that a caveolin-1 depletion by siRNA decreases C16 internalization. According to these results, we hypothesized whether the endocytosed peptide would be directed to the endosome-lysosome pathway for degradation. Time-lapse and immunofluorescence illustrated part of the internalized peptide colocalized with early endosomes and lysosomes in the studied cells. Taken together, our results suggested that after membrane interaction and $\beta 1$ integrin activation, breast cells would internalize peptide C16, which, at least in part, will be degraded in lysosomes.

Keywords: Laminin 111. Breast cancer. $\beta 1$ Integrin. Endocytosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura anatômica e histológica da mama feminina.....	21
Figura 2	Estrutura da laminina-111.....	26
Figura 3	Heterodímero de integrinas α e β	32
Figura 4	Dinâmica de ativação das subunidades α e β da integrina	34
Figura 5	Quelantes de íons divalentes diminuem a adesão de células MCF-7 ao peptídeo C16.....	46
Figura 6	O <i>knockdown</i> da subunidade β 1 da integrina reduz a adesão de células MDA-MB-231 ao peptídeo C16.....	48
Figura 7	O peptídeo C16 e a integrina β 1 colocalizam nas células de mama.....	51
Figura 8	O peptídeo C16 e seu controle C16Rv ativam a integrina β 1 em células MDA-MB-231.....	52
Figura 9	O peptídeo C16 é encontrado aderido a membrana de vesículas e células MDA-MB-231.....	55
Figura 10	C16 é internalizado pelas células MCF-7.....	57
Figura 11	C16 é internalizado pelas células MCF-10A.....	58
Figura 12	Células MDA-MB-231 também internalizam o peptídeo C16.....	59
Figura 13	A internalização do peptídeo C16 é evidenciada por projeção ortogonal.....	60
Figura 14	A endocitose do peptídeo C16 é reduzida pelo tratamento das células MCF-7 com o inibidor químico da dinamina.....	62
Figura 15	A endocitose do peptídeo C16 não acontece através de vesículas revestidas por clatrina.....	65
Figura 16	A endocitose do peptídeo C16 pelas células MDA-MB-231 ocorre através de vesículas revestidas por caveolina-1.....	67
Figura 17	O peptídeo C16 está presente em endossomos iniciais.....	70
Figura 18	O peptídeo C16 é encontrado em vesículas ácidas de células MCF7.....	73

Figura 19	O peptídeo C16 também é encontrado em vesículas ácidas de células MDA-MB-231.....	75
Figura 20	C16 está presente em lisossomos.....	78
Figura 21	Diagrama esquemático mostrando a endocitose do peptídeo C16 por células MDA-MB-231.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMIDAS	do inglês, <i>adjacent to metal ion-dependent adhesion site</i> (sítio adjacente ao sítio de adesão dependente de íon metal)
AG73	sequência de aminoácidos RKRLQVQLSIRT (arginina-lisina-arginina-leucina-glutamina-valina-glutamina-leucina-serina-isoleucina-arginina-treonina) presentes na cadeia α 1 da laminina 111
BRCA1	do inglês, <i>breast cancer gene 1</i> (gene para o câncer de mama 1)
BRCA2	do inglês, <i>breast cancer gene 2</i> (gene para o câncer de mama 2)
BSA	do inglês, <i>bovine serum albumin</i> (albumina sérica bovina)
C16	sequência de aminoácidos KAFDITYVRLKF (lisina-alanina-fenilalanina-ác.aspártico-isoleucina-treonina-tirosina-valina-arginina-leucina-lisina-fenilalanina) presentes na cadeia γ 1 da laminina 111
CDH1	gene que codifica a proteína caderina epitelial
CEFAP-ICB	Centro de Facilidades para Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas
CHEK2	gene que codifica a proteína quinase de <i>checkpoint 2</i> (CHK2)
CLHC	do inglês, <i>clathrin heavy chain</i> (cadeia pesada da clatrina)
C16N	sequência de aminoácidos KAFDITYVRLKF conjugada a Nanogold
C16R	sequência de aminoácidos KAFDITYVRLKF conjugada ao fluorocromo rodamina
C16Rv	sequência de aminoácidos FKLRYVTIDFAK (fenilalanina-lisina-leucina-arginina-valina-tirosina-treonina-isoleucina-ác.aspártico-fenilalanina-alanina-lisina)

C16RvN	sequência de aminoácidos FKLRVYTIDFAK conjugada a Nanogold
C16RvR	sequência de aminoácidos FKLRVYTIDFAK conjugada ao fluorocromo rodamina
DMEM F12 HAM	do inglês, <i>Dulbecco's modified eagle medium and Ham's F12 media</i> (meio eagle modificado de Dulbecco associado aos meios de Ham)
DMSO	sulfóxido de dimetilo
ECL	do inglês, <i>eletrogenerated chemiluminescence</i> (eletronquimioluminescência)
EDTA	do inglês, <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetraacético)
EEA1	do inglês, <i>early endosomal antigen 1</i> (antígeno de endossomo inicial 1)
EGF	do inglês, <i>epidermal growth factor</i> (fator de crescimento epidermal)
EGTA	do inglês, <i>ethylene glycol – bis (β-aminoethyl ether) - N,N,N',N' - tetraacetic acid</i> (ácido diamino trietileno glicol)
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
ER	do inglês, <i>estrogen receptor</i> (receptor de estrógeno)
ERK	proteína quinase regulada por sinais extracelulares
GAG	glicosaminoglicano
GPNMB	gene que codifica a glicoproteína transmembrana NMB
HER2	do inglês, <i>human epidermal growth factor receptor 2</i> (receptor para fator de crescimento epidermal humano tipo 2)
HRP	do inglês, <i>horseradish peroxidase</i> (peroxidase de rábano)
IgG	imunoglobulina G
LAMP1	do inglês, <i>lysosomal-associated membrane protein 1</i> (proteína de membrana associada ao lisossomo 1)

MCF10-A	linhagem de células derivadas de mama humana saudável
MCF-7	linhagem de células derivadas de adenocarcinoma mamário humano
MDA-MB-231	linhagem de células derivadas de câncer de mama metastático humano
MEC	matriz extracelular
MIDAS	do inglês, <i>metal-ion-dependent adhesion site</i> (sítio de adesão dependente de íon metal)
MMP	do inglês, <i>matrix metalloproteinases</i> (metaloproteinases de matriz)
MT1-MMP	do inglês, <i>membrane type-1 matrix metalloproteinase</i> (metaloproteinases de membrana tipo 1)
PALB2	gene que codifica a proteína parceira e localizadora de BRCA2 (PALB2)
PBS	do inglês, <i>phosphate buffered saline</i> (tampão salina fosfato)
PSI	do inglês <i>plexin-semaphorin-integrin</i> (plexina-semaforina-integrina)
PR	do inglês, <i>progesterone receptor</i> (receptor de progesterona)
PTEN	gene que codifica a proteína fosfatase homóloga à tensina (PTEN)
RIPA	do inglês, <i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i> (tampão de ensaio de radioimunoprecipitação)
RNAi	RNA de interferência
SDS	do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i> (dodecil sulfato de sódio)
SFB	soro fetal bovino
SFC	soro fetal de cavalo
SIKVAV	sequência de aminoácidos (serina-isoleucina-lisina-valina-alanina-valina) presentes na porção carboxi-terminal da cadeia α 1 da laminina 111

Src	proteína tirosina quinase proto-oncogênica
STK11	gene que codifica a proteína quinase serina/treonina 11
TBS	do inglês, <i>tris buffered saline</i> (tampão tris salina)
TRIS-HCl	do inglês, <i>tris hydrochloride</i> (tampão tris cloreto de hidrogênio)
Tks	proteína substrato de tirosina quinase
TP53	gene que codifica para a síntese da proteína de tumor de 53 kD (p53)
YIGSR	sequência de aminoácidos (tirosina-isoleucina-glicina-serina-arginina) presentes na cadeia β 1 da laminina 111

LISTA DE SÍMBOLOS

α	letra “alfa” do alfabeto grego
β	letra “beta” do alfabeto grego
γ	letra “gama” do alfabeto grego
μ	letra “mi” do alfabeto grego
μg	micrograma
mg	miligrama
kD	quilo Dalton
kV	quilo Volt
nM	nanomolar
μM	micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	Mama feminina: estrutura e função.....	20
2.2	Câncer de mama	22
2.3	Matriz extracelular e membrana basal	23
2.3.1	Membrana basal.....	25
2.4	Família das lamininas e laminina 111	25
2.5	Peptídeos da laminina 111	28
2.5.1	Peptídeo C16	30
2.6	Integrinas.....	31
2.6.1	Integrina β 1	34
2.7	Endocitose.....	35
3	PROPOSIÇÃO	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1	Linhagens Celulares	38
4.2	Tratamento com peptídeo sintético C16.....	38
4.3	Ensaio de adesão	39
4.3.1	<i>Knockdown</i> da integrina β 1	39
4.3.2	<i>Western blot</i>	39
4.4	Ensaio de colocalização	40
4.5	Citometria de fluxo	40
4.6	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	41
4.6.1	Conjugação do peptídeo a partículas de <i>Nanogold</i>	41
4.6.2	Tratamento das células reparo das amostras para MET	41
4.7	Ensaio em <i>time lapse</i>	42

4.8	Estudo da endocitose do peptídeo C16	43
4.8.1	<i>Knockdown</i> cadeia pesada da clatrina e caveolina-1	43
4.8.2	Imunofluorescência de marcadores endossomais	43
4.9	Análise estatística	44
5	RESULTADOS	45
5.1	As células de mama aderem ao peptídeo C16 e essa adesão depende da integrina β 1 em células MDA-MB-231	45
5.2	C16 colocaliza com a integrina β 1 em células de mama.....	49
5.3	C16 ativa integrina β 1 em células MDA-MB-231	52
5.4	O peptídeo C16 decora a membrana de células MDA-MB-231	53
5.5	C16 é internalizado pelas células de mama	56
5.6	A inibição química da endocitose reduz a internalização de C16 pelas células MCF-7	61
5.7	A endocitose do peptídeo C16 ocorre por meio de cavéolas	63
5.8	Após sua internalização, o peptídeo C16 é direcionado para degradação nos lisossomos	68
5.8.1	Apenas parte do peptídeo endocitado é encontrado em endossomos iniciais.....	68
5.8.2	O peptídeo C16 também está presente em lisossomos.....	71
6	DISCUSSÃO	79
7	CONCLUSÃO.....	85
	REFERÊNCIAS.....	86
	APÊNDICE.....	96

1 INTRODUÇÃO

A mama feminina corresponde a um conjunto de glândulas alveolares compostas, as quais estão envoltas por um estroma de tecido fibro-adiposo (JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, 2017). Esse órgão têm função de sintetizar, secretar e fornecer o leite para o recém-nascido, constituindo sua fonte de nutrição para proteção e desenvolvimento (MEDINA, 1996).

Dentre os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento de câncer na mama estão: exposição a longo prazo ao estrógeno, reposição hormonal pós menopausa, idade (mulheres com 50 anos ou mais têm maior risco), alterações genéticas como mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, histórico familiar, assim como a associação de mais de um desses fatores (FENG et al., 2018; American Cancer Society, 2020; KARLSSON et al., 2021). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), são esperados 66.280 novos casos de câncer para cada ano do triênio 2020-2022, só no Brasil. Ainda de acordo com o INCA, sem considerar os tumores de pele do tipo não melanoma, o câncer de mama feminina ocupa a primeira posição mais frequente em todas as regiões brasileiras (INCA, 2020). Nota-se, portanto, a importância da compreensão dos fatores envolvidos com o desenvolvimento tumoral a fim de encontrarem-se alternativas de tratamento e prevenção para essa doença.

A maioria das mortes relacionadas ao câncer estão associadas à disseminação das células transformadas pelo organismo, levando ao crescimento tumoral, muitas vezes mais agressivo, em outros órgãos (OSKARSSON; BATLLE; MASSAGUÉ, 2014). Apesar de o câncer de mama ser facilmente tratável em seus estágios iniciais, a metástase dificilmente pode ser inibida ou controlada. Logo, há grande necessidade de compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no processo metastático. Nesse contexto, a literatura mostra claramente o importante papel que o microambiente assume durante a progressão e metástase não só do câncer de mama, mas das neoplasias malignas em geral (MAO et al., 2013; JUSTUS; SANDERLIN; YANG, 2015). Tal microambiente é composto por diversos tipos de células, como células do sistema imune, endoteliais, pericitos e fibroblastos, os quais estão inseridos em uma matriz extracelular (MEC).

A MEC, por sua vez, constitui-se em uma rede complexa e dinâmica de proteínas, glicosaminoglicanos e proteoglicanos que fornecem os sinais bioquímicos e biomecânicos necessários para o desenvolvimento e homeostase tecidual

(FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010). Com isso, a MEC têm sido alvo de grande atenção por demonstrar papel chave durante a progressão e metástase tumoral, já que está envolvida com a ativação de diversas vias de sinalização e da promoção de alterações epigenéticas (LOCHTER; BISSELL, 1995; PICKUP; MOUW; WEAVER, 2014; INSUA-RODRÍGUEZ; OSKARSSON, 2016).

Uma das famílias de glicoproteínas que constituem a matriz extracelular é a laminina, que está localizada mais especificamente na membrana basal (uma organização da MEC). Essa família envolve glicoproteínas heterotriméricas formadas por cadeias α , β e γ associadas por pontes dissulfeto, formando uma tripla hélice espiralada (AUMAILLEY, 2013). Elas são sintetizadas por diversos tipos de células, suas isoformas são tecido-específicas e suas funções envolvem: a sinalização, a adesão e a migração celulares (PATARROYO; TRYGGVASON; VIRTANEN, 2012). Essas funções ocorrem por meio da sua associação a uma grande família de proteínas receptoras heterodiméricas chamadas integrinas (AUMAILLEY, 2013). Assim, esses receptores permitem a interação entre as células e a MEC, promovendo a ligação entre a matriz e as estruturas intracelulares e transmitindo sinais que induzirão respostas (YURCHENCO, 2011).

Na glândula mamária, o epitélio glandular interage diretamente com a membrana basal. Essa é uma estrutura formada por duas lâminas basais, as quais são constituídas principalmente por colágeno tipo IV, epiligrina, entactina, proteoglicanos e pelas lamininas 332 e 111, sendo essa última a principal responsável pela manutenção da polaridade das células (GUDJONSSON et al., 2002; MAJIDINIA; YOUSEFI, 2017). Durante a progressão tumoral, diversas alterações ocorrem na MEC, principalmente a clivagem de seus componentes. As metaloproteinases da matriz (MMPs) são enzimas fundamentais durante esse processo, sendo que sua atividade favorece a liberação de elementos que permitem o crescimento e evasão das células tumorais, como fatores de crescimento e sítios críticos de proteínas da MEC (OSKARSSON, 2013; BONNANS; CHOU; WERB, 2014). Estudos mostram que a clivagem da laminina 111 por MMPs é parte do processo de remodelamento da matriz extracelular, desempenhando importante papel para a progressão tumoral da mama (IOACHIM et al., 2002; BELIVEAU et al., 2010).

Esse fenômeno leva à exposição de sequências ativas ou fragmentos capazes de promover proliferação, produção de proteases e angiogênese (KIKKAWA et al., 2013). Nesse contexto, trabalhos realizados em nosso laboratório mostram que

algumas dessas sequências, como SIKVAV, AG73 e C16 são responsáveis por importantes etapas da biologia tumoral, como migração, invasão, secreção de proteases, e formação de invadopódios (FREITAS; JAEGER, 2002; FREITAS et al., 2004, 2007; NASCIMENTO et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2010, 2016; CAIRES-DOS-SANTOS et al., 2020)

Dentre esses, o C16 (sequência KAFDITYVRLKF), localizado na cadeia $\gamma 1$, têm ganhado destaque devido ao seu grande potencial pró tumoral (NOMIZU et al., 1997). Nesse sentido, estudos mostraram esse peptídeo induz metástases tumorais de células de melanoma B16-F10 (KURATOMI et al., 2002). Além disso, outras investigações também mostraram forte atividade pró angiogênica relacionada a esse peptídeo, além do potencial em aumentar a migração de células de melanoma (PONCE; NOMIZU; KLEINMAN, 2001; LUGASSY et al., 2007). Ainda nesse contexto, Ponce e colaboradores (2001) sugeriram como potenciais receptores de C16 as integrinas $\alpha\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$, sendo que essa última se liga apenas ao peptídeo e não à laminina íntegra, sugerindo que esse peptídeo represente um sítio crítico na molécula intacta.

Nosso grupo mostrou também que o peptídeo C16 é capaz de regular a atividade de formação de invadopódios em células tumorais (NASCIMENTO et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2016). Adicionalmente, a depleção da integrina $\beta 1$ por RNAi reduziu esse efeito.

Diante disso, nos motivamos a estudar em maior detalhe a ocorrência de uma possível interação C16 e integrinas $\beta 1$ em células de mama, assim como as consequências morfofuncionais desse evento. Para tanto, analisamos se essas células aderem ao peptídeo C16 por ensaio de adesão. Em seguida, investigamos se C16 colocalizaria com a integrina $\beta 1$ e se haveria ativação desse receptor pelo peptídeo. Adicionalmente, estudamos se C16 decoraria a membrana de células tumorais e investigamos o processo de endocitose desse peptídeo pelas células tumorais e normais de mama.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Na revisão de literatura serão abordados os seguintes temas referentes a essa tese: 1- Estrutura da mama feminina, tecidos que a constituem, tipo de células ali presentes e função da glândula no organismo humano; 2- O que é câncer de mama em aspectos moleculares, fatores de risco associados, classificação e incidência tanto mundial quanto no Brasil; 3- Constituição, estrutura e função da matriz extracelular, enfatizando a membrana basal; 4- Estrutura e nomenclatura das moléculas de laminina, assim como sua função. Destaque para laminina 111; 5- Peptídeos da laminina, como são formados e funções anti e pró tumorais, em especial peptídeo C16; 6- Estrutura e função das integrinas e integrina $\beta 1$; 7- Como acontece o processo de endocitose, destacando as endocitoses por meio de vesículas revestidas por clatrina e caveolina1, bem como quais suas funções nas células.

2.1 Mama feminina: estrutura e função

O epitélio mamário se origina de uma placa epidérmica durante o desenvolvimento embrionário. As placas descendem para o mesênquima subjacente por meio de interações epitélio mesenquimais e produzem uma estrutura ductal rudimentar, presente no nascimento. Com a puberdade, gravidez e lactação, a mama feminina passa por alterações dramáticas de tamanho, forma e função em resposta a hormônios esteroides e a sinalizações por receptores de fatores de crescimento (HUEBNER; EWALD, 2014).

A mama feminina é uma glândula constituída por 15 a 25 lóbulos de glândulas tubuloalveolares compostas, cuja função é sintetizar, secretar e fornecer o leite ao recém-nascido (MEDINA, 1996; JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, 2017). Essa glândula constitui-se por um tecido epitelial que forma ductos e alvéolos que são envoltos por tecido conjuntivo. O tecido epitelial é formado por duas camadas, uma interna e uma externa. A camada mais interna é constituída por células alveolares cuboides, as quais têm o potencial de se diferenciar em células produtoras de leite durante a gravidez; e a camada basal mais externa está em contato com a membrana basal e é formada por células mioepiteliais que circundam as células epiteliais e têm propriedades de células musculares lisas (figura 1) (HENNIGHAUSEN; ROBINSON, 2005;

HASSIOTOU; GEDDES, 2013). É também nessa camada onde se encontram populações de células tronco bipotentes (VISVADER, 2008; LEE et al., 2019b).

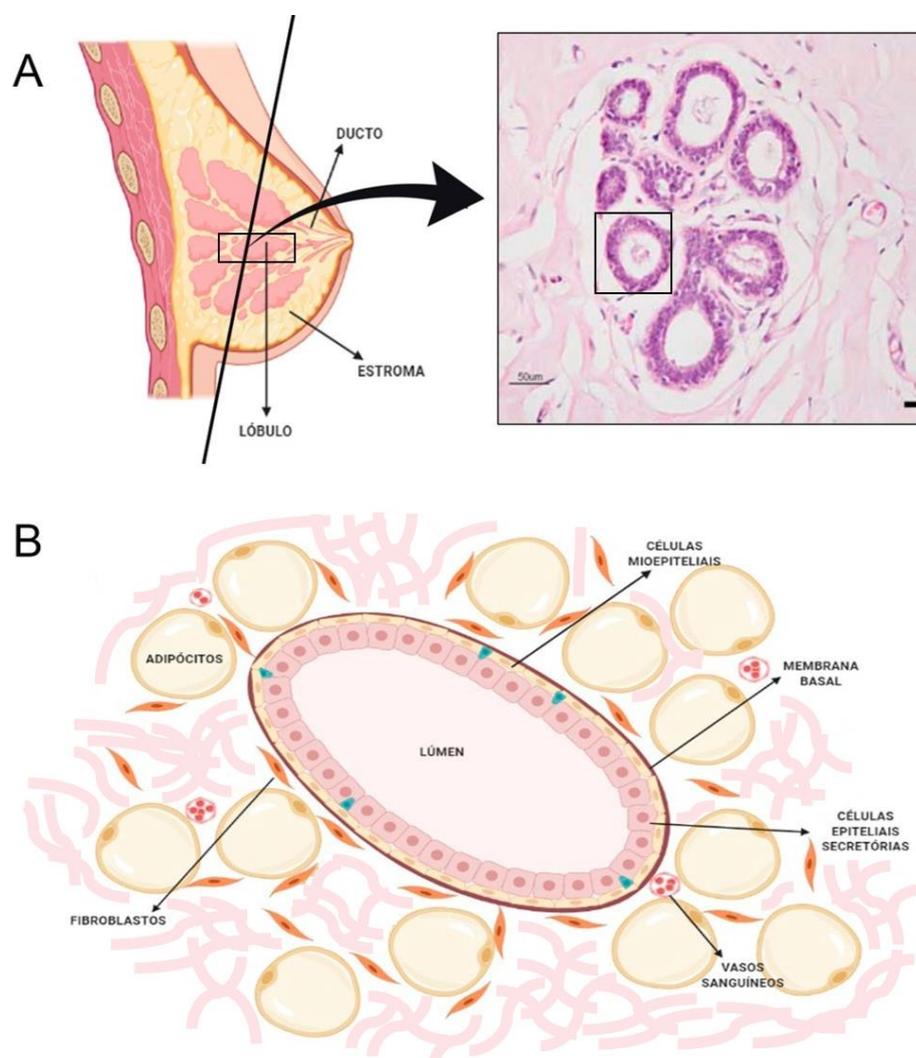


Figura 1. Estrutura anatômica e histológica da mama feminina. A- A glândula mamária é constituída por lóbulos, os quais são formados por alvéolos, onde o leite materno é sintetizado e secretado para o exterior do corpo através dos ductos. A figura histológica corada por hematoxilina e eosina (HASSIOTOU; GEDDES, 2013) mostra o corte transversal de um lóbulo, sendo possível notar os alvéolos da glândula envolvidos pelo estroma. B- O esquema mostra a estrutura de um alvéolo (destacado em A): uma bicamada de células epiteliais (células secretórias apoiadas em células mioepiteliais, entre as quais se encontram células tronco mesenquimais – em verde) apoiada à membrana basal. Esse alvéolo é envolto pelo estroma, sendo esse representado aqui apenas pelos fibroblastos, células adiposas, fibras de colágeno (em rosa claro, ao redor dos fibroblastos e adipócitos) e vasos sanguíneos. As ilustrações esquemáticas em A e B foram feitas utilizando a ferramenta BioRender (www.biorender.com).

No estroma ou tecido conjuntivo estão presentes fibroblastos, células do tecido adiposo e vasos sanguíneos. De maneira geral, as células epiteliais formam alvéolos e ductos com um lúmen central, os ductos confluem e levarão o leite até o exterior do corpo através dos mamilos (HENNIGHAUSEN; ROBINSON, 2005).

2.2 Câncer de mama

O câncer de mama é um conjunto de malignidades distintas que se manifestam na mama. Ele basicamente se desenvolve a partir de alterações genéticas e epigenéticas que levam à perda do controle celular dos mecanismos de proliferação, sobrevivência e migração. A progressão tumoral subsequente é dirigida pelo acúmulo de mudanças genéticas adicionais combinadas com a expansão clonal e seleção. Sendo assim, sinalizações ativadoras de proto-oncogenes podem causar a hiperativação daquelas vias sinalizadoras, enquanto a inativação de genes supressores eliminam reguladores críticos das mesmas (POLYAK, 2007; SEVER; BRUGGE, 2015). Existem hipóteses de que esses processos de transformação tumoral possam ocorrer não somente em células mamárias já diferenciadas como as luminais, basais e mioepiteliais, mas também nas células tronco presentes nesse epitélio (FENG et al., 2018).

A classificação mais usada para os tumores invasivos é baseada na expressão dos receptores de estrogênio (ER), progesterona (PR) e de fator de crescimento epidermal humano (HER2) (MOMENIMOVAHED; SALEHINIYA, 2019). Sendo assim, a malignidade da lesão está relacionada à ausência desses receptores, ou seja, à não responsividade a hormônios e fatores de crescimento, indicando, portanto, graus de indiferenciação das células. Com isso, os tumores que não expressam nenhum dos receptores supracitados são consideradas do tipo triplo negativo e caracterizam a forma mais agressiva da doença (FENG et al., 2018).

Os fatores associados ao desencadeamento dessas alterações celulares estão relacionados aos mais diversos âmbitos. Por exemplo, à tratamentos, como na utilização de hormônios exógenos como método contraceptivo ou na terapia de reposição hormonal na menopausa; ao estilo de vida, quando há alta ingestão de álcool; ao envelhecimento (a maioria dos casos de câncer de mama são diagnosticados em mulheres com mais de 55 anos de idade) (American Cancer Society, 2020); e, aos fatores genéticos relativos à ocorrência de câncer em parentes de primeiro grau (COLDITZ et al., 2012; LEE et al., 2019a). A causa hereditária mais comum são mutações hereditárias nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Alguns dos genes mutados que também podem ser herdados são: *ATM*, *TP53*, *CHEK2*, *PTEN*, *CDH1*, *STK11* e *PALB2* (FENG et al., 2018).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer de mama é o mais frequente em mulheres, impactando 2,1 milhões de pessoas por ano. Essa doença também é a maior causa de morte em mulheres no mundo. Da mesma forma, como já mencionado anteriormente, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2020), no Brasil o câncer de mama lidera a incidências malignas em mulheres, correspondendo a 66.280 novos casos para cada ano do triênio 2020-2022.

O relapso na prevenção e diagnóstico resultantes da falta de conhecimento e acesso à saúde estão diretamente relacionados às mortes causadas por esse tipo de câncer (NAEEM et al., 2019). Isso porque, tanto os exames preventivos, como a mamografia, quanto os tratamentos com mastectomia e quimioterapia têm aumentado significativamente a sobrevivência das pacientes (DU; FOX; LAI, 2008). Além disso, novas cirurgias têm surgido no sentido de minimizar os impactos psicológicos pós tratamento (PANCHAL; MATROS, 2017). Mesmo assim, sem o completo entendimento dos mecanismos intrínsecos à patogênese desse câncer, a eficiência na prevenção e tratamento do mesmo serão sempre limitados.

A maioria das mortes relacionadas ao câncer estão associadas à disseminação das células transformadas pelo organismo, levando ao crescimento tumoral, muitas vezes mais agressivo, em outros órgãos. Apesar de o câncer de mama ser facilmente tratável em seus estágios iniciais, a metástase dificilmente pode ser inibida ou controlada (OSKARSSON; BATLLE; MASSAGUÉ, 2014). Logo, há grande necessidade de compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no processo metastático.

2.3 Matriz extracelular e membrana basal

O microambiente assume grande importância durante a progressão e metástase não só do câncer de mama, mas das neoplasias malignas em geral (LIAO et al., 2019; TIAINEN et al., 2020). Esse microambiente é composto por diversos tipos de células, como células imunes, endoteliais e fibroblastos, as quais se encontram inseridas na MEC (VANNUCCI, 2015). Com isso, a matriz extracelular têm sido alvo de grande atenção por demonstrar papel chave durante a progressão e metástase tumoral, já que está envolvida com a ativação de diversas vias de sinalização e da promoção de alterações epigenéticas (EBLE; NILAND, 2019).

A MEC constitui-se em uma rede complexa e dinâmica de proteínas, glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos que fornecem os sinais bioquímicos e biomecânicos necessários para o desenvolvimento e homeostase tecidual, além de fornecer suporte estrutural para as células ali presentes (THEOCHARIS; MANOU; KARAMANOS, 2019). Portanto, essa rede é organizada de maneira tecido-específica e funciona como reservatório de fatores de crescimento e moléculas bioativas. Os principais componentes da matriz são os colágenos, proteínas elásticas, GAGs, proteoglicanos, e glicoproteínas que se ligam às células (MCKEE et al., 2019).

Os colágenos são categorizados em: colágenos formadores de fibrilas (ex. colágenos tipos I, II e III), colágenos formadores de redes (ex. colágeno tipo IV), colágenos associados a fibrilas (ex. colágenos tipos IX e XII), dentre outros. A estrutura colagênica dita a arquitetura e a organização do tecido (YUE, 2014).

As fibras elásticas são formadas pela elastina, a qual, por sua vez, é construída basicamente pela associação entre os monômeros de tropoelastina e microfibrilas. Como o próprio nome diz, as fibras elásticas conferem elasticidade ao tecido (YUE, 2014).

Os GAGs são polissacarídeos lineares e aniônicos formados por repetições de unidades de dissacarídeos. São moléculas altamente negativas e, por isso, têm a propriedade de sequestrar água e cátions divalentes, o que confere a eles as funções de preenchimento e lubrificação. Essas moléculas também aparecem associadas a proteínas, formando proteoglicanos, o quais, por sua vez, são macromoléculas que se intercalam entre as fibrilas de colágeno nas diferentes matrizes. Consistem em um “core” formado por uma glicoproteína, à qual se ligam as cadeias de GAGs. Os proteoglicanos interagem com fatores de crescimento, assim como com receptores de fatores de crescimento, sendo, portanto, importantes para a sinalização celular. (HYNES; NABA, 2012).

Além dos colágenos, fibras elásticas e proteoglicanos, que conferem as funções de resistência, elasticidade e preenchimento à MEC, existem mais de 200 tipos de glicoproteínas que participam da sua estruturação. Essas proteínas apresentam domínios que favorecem a migração e domínios que participam da sinalização celular (HYNES; NABA, 2012; YUE, 2014). Dentre as glicoproteínas mais estudadas estão a trombospondina, o nidogênio, a tenascina, a fibronectina e a laminina (HYNES; NABA, 2012).

2.3.1 *Membrana basal*

A região da matriz que “apoia” os tecidos epiteliais é chamada de membrana basal. Trata-se de uma especialização densa e fina da MEC formada por duas camadas constituídas basicamente por laminina e colágeno tipo IV, chamadas lâminas basais, ambas formando redes independentes, as quais se conectam através de proteínas adaptadoras, como o nidogênio e o perlecan (SANES, 2003; JAYADEV; SHERWOOD, 2017). Várias outras glicoproteínas e proteoglicanos também participam da formação dessa estrutura.

Na glândula mamária, o epitélio glandular interage com a lâmina basal, que é constituída principalmente por colágeno tipo IV, nidogênios, diversos proteoglicanos, e pelas lamininas 332 e 111, sendo essa última a principal responsável pela manutenção da polaridade das células (GUDJONSSON et al., 2002; CHANG; CHAUDHURI, 2019).

Durante a progressão tumoral, diversas alterações ocorrem na MEC, principalmente a clivagem de seus componentes. As metaloproteinases da matriz são enzimas fundamentais durante esse processo, sendo que sua atividade favorece a liberação de elementos, como fatores de crescimento e sítios críticos de proteínas da MEC, que permitem o crescimento e evasão das células tumorais (EBLE; NILAND, 2019). As pesquisas mostram que a clivagem da laminina-111 por MMPs é parte do processo de remodelamento da matriz extracelular, desempenhando importante papel para a progressão tumoral da mama (BELIVEAU et al., 2010). Esse fenômeno leva à exposição de sequências ativas ou de fragmentos capazes de promover proliferação, produção de proteases e angiogênese (KIKKAWA et al., 2013).

2.4 Família das lamininas e laminina 111

A primeira proteína caracterizada como laminina foi isolada em 1979 a partir do sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), um tipo de tumor murino rico em membrana basal (CHUNG et al., 1979). As análises bioquímicas mostraram que se tratava de uma glicoproteína constituída por três cadeias polipeptídicas interligadas por pontes dissulfeto, hoje designadas como cadeias α , β e γ . Mais adiante, estudos feitos por microscopia eletrônica mostraram que as três cadeias interagem assumindo um formato cruciforme (ENGEL et al., 1981). Atualmente se sabe que as lamininas constituem uma família de proteínas com diversas subunidades de cadeias

geneticamente distintas, as quais se combinam de várias maneiras, formando diferentes isoformas triméricas (AUMAILLEY, 2013).

Quanto à sua nomenclatura, cada cadeia da laminina é identificada pelo número arábico, de acordo com a ordem de sua descoberta. Sendo assim, a laminina 111, por exemplo, é um heterotrímero composto pelas cadeias $\alpha 1$, $\beta 1$ e $\gamma 1$ – as primeiras a serem identificadas (figura 2) (AUMAILLEY, 2013).

As subunidades de cadeia α contém um domínio globular na região carboxi terminal, denominado “G”. O domínio G pode ser subdividido em cinco módulos enovelados chamados laminina G (LG) e que vão de 1 a 5, como indicado na figura 2 (TIMPL et al., 2000). Todas as subunidades α também contém um longo domínio em hélice que medeia a formação do heterotrímero com os domínios similares das subunidades de cadeias β e γ . Na laminina 111 mais especificamente, a cadeia $\alpha 1$ contém um braço curto que consiste em domínios globulares alternados IVa, IVb e VI/laminina, que estão localizados na região amino terminal, e em domínios *rod-like*, os quais consistem em repetições do tipo EGF (LEa, LEb e LEc – figura 2) (MINER, 2008).

Já as subunidades das cadeias β e γ também contém domínios de I a VI, mas perdem as repetições dos domínios III e IV encontrados em tamanho completo no braço curto das subunidades de cadeia α . O que distingue as cadeias β das γ é a inserção de um *loop* entre os domínios I e II (MINER, 2008).

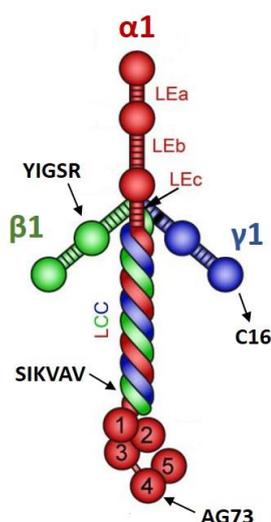


Figura 2. Estrutura da laminina-111. Em vermelho, cadeia $\alpha 1$, em verde, $\beta 1$ e em azul, cadeia $\gamma 1$. LEa, LEb e LEc correspondem as repetições tipo fator de crescimento epidérmico. LCC corresponde à região de tripla hélice espiralada e os números 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem aos domínios globulares. As indicações correspondem às regiões onde se encontram os principais peptídeos estudados. Adaptado de GAWLIK e DURBEEJ, 2011.

Nos mamíferos, as proteínas que constituem a família das lamininas desempenham 3 papéis principais:

- Junto com o colágeno, são as maiores responsáveis pela estrutura das laminais basais, formando redes de proteínas às quais se ligam outras glicoproteínas e proteoglicanos (YURCHENCO; O'REAR, 1994);

- Promovem a adesão das células à MEC através de sua interação com componentes da superfície celular (HENRY; CAMPBELL, 1996);

- Interagem com receptores de membrana, como a integrina, agindo como moléculas sinalizadoras que transmitem sinais do exterior para o interior celular, (MERCURIO, 1995).

Como mencionado anteriormente, as lamininas desempenham importante papel durante a morfogênese e homeostase dos tecidos através da regulação da arquitetura tecidual, adesão e migração celulares e sinalização mediada pela matriz (BRYAN; CHIEN; KWAN, 2016; FURUTA et al., 2018). Tais funções ocorrem por meio da sua associação a dois grupos de receptores: os receptores integrinas e os não integrina, abordados adiante (GEHLSSEN et al., 2018; CLOUTIER; SALLENBACH-MORRISSETTE; BEAULIEU, 2019). Esses receptores permitem a interação entre as células e a MEC, promovendo a ligação entre a matriz e as estruturas intracelulares e transmitindo sinais que induzirão respostas (MALTSEVA; RODIN, 2018).

As integrinas são as principais ligantes das lamininas e correspondem a uma vasta família de receptores heterodiméricos, a qual é abordada em mais detalhes no tópico 2.6. Vários heterodímeros de integrinas já foram identificados como receptores de lamininas, dentre eles: $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 7\beta 1$ e $\alpha V\beta 3$ (MINER, 2008). Nesse contexto, pouco se sabe ainda sobre os sítios específicos de ligação das integrinas nas moléculas de laminina. Um dos estudos feitos a esse respeito mostra que o resíduo de ácido glutâmico na região carboxi terminal da cadeia $\gamma 1$ da laminina 111 é exposto e provavelmente é onde essa proteína interage com o sítio de adesão dependente de íon metal na subunidade $\beta 1$ da integrina (PULIDO; HUSSAIN; HOHENESTER, 2017).

Por outro lado, existem também receptores do tipo não integrina. O primeiro grupo compreende aos distroglicanos, que são compostos por uma cadeia α extracelular associada a uma cadeia β transmembrana. O α distroglicano têm alta afinidade pelos domínios LG1 e LG2 da cadeia α da laminina e menos afinidade aos demais domínios globulares. Outros desses receptores são os sindecans, uma família

de receptores transmembrana, que, como os distroglicanos, possuem cadeias de heparan sulfato. Os sindecans 1, 2 e 4 também se ligam às lamininas por meio dos domínios globulares dessas glicoproteínas (MINER, 2008). Ainda, um outro tipo de receptor não integrina bastante estudado corresponde a uma proteína transmembrana de 67 kD (também chamado de receptor 37/67kD), que têm o peptídeo YIGSR como a menor região de interação no braço curto da cadeia β 1 da laminina 111 (CLOUTIER; SALLENBACH-MORRISSETTE; BEAULIEU, 2019).

Por fim, as lamininas são sintetizadas por diversos tipos de células e suas isoformas são tecido-específicas, podendo sua síntese variar de acordo com o estágio do desenvolvimento e estado patológico. A distribuição da laminina 111, por exemplo, é uniforme em todo o embrião. No adulto, entretanto, sua presença se limita a algumas membranas basais apenas, sendo a membrana basal da glândula mamária uma delas, como já mencionado. Em contraste, as lamininas 511 e 521 são distribuídas uniformemente por todo o organismo adulto (MINER et al., 1997; AUMAILLEY, 2013).

2.5 Peptídeos da laminina 111

Uma etapa importante da progressão tumoral é a invasão das células através da membrana basal e da MEC. Para penetrar a matriz, as células tumorais secretam enzimas proteolíticas da família das MMPs. Durante o processo de invasão, essas enzimas clivam as proteínas estruturais, liberando fragmentos solúveis e ativos, chamados de matricinas, além de exporem sítios críticos nessas moléculas capazes de exercer atividades biológicas (KIKKAWA et al., 2013; BRASSART-PASCO et al., 2020). Nesse contexto, as diferentes matricinas derivadas das macromoléculas da MEC como os colágenos, proteoglicanos e glicoproteínas, mostraram ter efeitos tanto anti quanto pró tumorais em vários modelos de câncer (BRASSART-PASCO et al., 2020).

Alguns trabalhos mostram através de ensaios de imunohistoquímica uma marcação descontínua da laminina 111 em amostras câncer de mama (ALBRECHTSEN et al., 1981; IOACHIM et al., 2002). Além disso, dados recentes do nosso grupo também mostram a clivagem das cadeias da laminina 111 tanto *in vitro* como em amostras de câncer humano, tendo identificado fragmentos de menor massa molecular da proteína nessas amostras (SMUCZEK, 2019).

Nesse sentido, Kikkawa e colaboradores (2013) sintetizaram 673 peptídeos compreendidos em toda a molécula de laminina 111 através de uma abordagem

sistemática. Em seguida, conhecidas as atividades da laminina na adesão, crescimento, migração e angiogênese nos mais diversos tecidos, surgiu o interesse em investigar o papel desses peptídeos nessas atividades. Para tanto, os peptídeos sintetizados tiveram sua atividade testada através de ensaios de adesão e utilizados em estudos de atividades pró tumorais e angiogênicas (NOMIZU et al., 1995, 2000; MALINDA et al., 1999; HOZUMI et al., 2010).

Sendo assim, peptídeos sintéticos e fragmentos da molécula de laminina 111 têm sido vastamente utilizados no estudo das atividades atribuídas a essa proteína, permitindo a identificação de vários sítios ativos em sua molécula. Além disso, cada vez mais têm se descoberto diferentes funções desses peptídeos. Essas funções abrangem tanto papéis no reparo ósseo e nervoso até efeitos pró e anti neoplásicos (SAKAMOTO et al., 1991; KURATOMI et al., 2002; PATEL et al., 2019; PUCHALAPALLI et al., 2019; LI et al., 2020). Além disso, devido ao fato da molécula de laminina se ligar a diversos tipos de células através de sítios ativos, atualmente têm sido feitas muitas pesquisas da utilização desses peptídeos em sistemas de *delivery* de drogas ou genes utilizados no tratamento do câncer (NEGISHI; NOMIZU, 2019).

No que diz respeito a atividades na progressão tumoral, o foco do nosso grupo foi estudar o efeito dos peptídeos YIGSR, IKVAV, RKRLQVQLSIRT (AG73) e KAFDITYVRLKF (C16), os quais serão abordados a seguir.

O peptídeo YIGSR está localizado na cadeia β 1 e foi primeiramente caracterizado como a menor sequência da cadeia β da laminina responsável pela sua capacidade adesiva (GRAF et al., 1987). Ao contrário dos demais, esse peptídeo é capaz de inibir o crescimento tumoral e a angiogênese através da sua ligação ao receptor 37/67 kD da laminina (YOSHIDA et al., 1999). Essas atividades biológicas fazem do YIGSR um ligante atrativo para estudos de estratégias de tratamento do câncer. Trabalhos mais recentes têm mostrado a sua utilização acoplado a nanopartículas as quais são utilizadas para o *delivery* de drogas a alvos específicos no tratamento de câncer colorretal e de pulmão (SARFATI et al., 2011; CARVALHO et al., 2019). Outros estudos mostram a diminuição do crescimento do tumor e inibição da metástase provocados pelo tratamento de camundongos com esse peptídeo (IWAMOTO et al., 1987; NOMIZU et al., 1993; MORAIS FREITAS et al., 2007).

Já o peptídeo SIKVAV, localizado na cadeia α da laminina 111, é muito estudado devido a seu potencial angiogênico e metastático (KIBBEY; GRANT;

KLEINMAN, 1992; KIBBEY et al., 1994; CHEN et al., 2018). Além disso, nosso grupo demonstrou seus efeitos pró tumorais em células de carcinoma adenoide cístico de glândula salivar (FREITAS; JAEGER, 2002; FREITAS et al., 2004). Sabe-se também que essa sequência se liga aos pares de integrinas $\alpha6\beta1$, sendo a subunidade $\alpha6$ muito expressa em células tronco tumorais presentes em vários tipos de tumores, como o de pulmão e de cólon (KREBSBACH; VILLA-DIAZ, 2017). Portanto, assim como o YIGSR, esse peptídeo têm sido bastante estudado na utilização de nanopartículas carreadoras de substâncias quimioterápicas, visando atingir alvos tumorais específicos (ROSKAMP et al., 2016; TASCHAUER et al., 2019).

Localizado na região globular da cadeia $\alpha1$, a sequência do peptídeo AG73 é outra já bastante estudada por nosso grupo. Nossos trabalhos mostram que esse peptídeo regula a migração, invasão e atividade de proteases em células derivadas de carcinoma de cabeça e pescoço e de tumores de glândula salivar (GAMA-DE-SOUZA et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2010). Esses trabalhos também mostram que esse peptídeo têm afinidade pelos receptores sindecana 1 e integrina $\beta1$ nessas células, além de atuar regulando na formação de invadopódios em linhagem celular de carcinoma adenoide cístico (NASCIMENTO et al., 2011). Além disso, sabe-se que o AG73 também se liga aos sindecans em células derivadas de câncer de mama metastático, alterando a formação de filopódios nessas células (PUCHALAPALLI et al., 2019).

2.5.1 Peptídeo C16

O peptídeo C16, cuja sequência é KAFDITYVRLKF, está localizado no primeiro domínio globular da cadeia $\gamma1$ da laminina 111 (indicado na figura 2). Além disso, foi identificado como uma das sequências mais ativas dessa proteína, sendo a sequência VRL, seu *core* ativo (NOMIZU et al., 1997).

Estudos mostraram o peptídeo C16 induz metástases tumorais de células de melanoma B16-F10 (KURATOMI et al., 2002). Além disso, outras investigações também mostraram forte atividade pró angiogênica relacionada a esse peptídeo, além do potencial em aumentar a migração de células de melanoma (PONCE; NOMIZU; KLEINMAN, 2001; LUGASSY et al., 2007). Ainda nesse contexto, Ponce e colaboradores (2001) sugeriram como potenciais receptores de C16 as integrinas $\alpha v\beta3$ e $\alpha5\beta1$, sendo que essa última se liga apenas ao peptídeo e não à laminina na

sua forma íntegra, sugerindo que esse peptídeo represente um sítio críptico da molécula de laminina 111.

Dados recentes do nosso laboratório mostram que C16 estimula a formação de invadopódios, regulando os níveis de MT1-MMP e cortactina através das proteínas sinalizadoras Src e Tks 4 e 5 em células de câncer de próstata (CAIRES-DOS-SANTOS et al., 2020). Nosso grupo mostrou também que o peptídeo C16 é capaz de regular a atividade de formação de invadopódios em células de carcinoma adenóide cístico, carcinoma de células escamosas e fibrossarcoma (NASCIMENTO et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2016). Esses trabalhos ainda reforçam a atividade de C16 ligada ao aumento de Src, ERK1/2; e sugerem que essa atividade pode estar relacionada à ativação da subunidade $\beta 1$ da integrina. Da mesma forma, foi demonstrado também que a sequência desse peptídeo é capaz de regular a expressão do gene GPNMB em células de câncer de mama metastático, também através da ativação da integrina $\beta 1$ (SMUCZEK et al., 2017).

2.6 Integrinas

As integrinas compreendem uma superfamília de receptores de adesão que reconhecem a maioria dos ligantes da MEC e de superfície celular, além de ligantes solúveis, como citocinas (HYNES, 1987; TAKADA; YE; SIMON, 2007). Esses receptores são heterodímeros $\alpha\beta$ transmembrânicos, dos quais são conhecidas pelo menos dezoito subunidades α e oito β em humanos. Essas subunidades se combinam formando 24 diferentes pares associados por ligações não covalentes (HYNES, 2002).

As subunidades α e β são totalmente distintas uma da outra. A cadeia α é formada por uma hélice β (*β propeller*), a qual está conectada aos domínios thigh, calf-1 e calf-2, formando uma estrutura que sustenta o domínio da “cabeça” da molécula. Na hélice β , estão inseridos domínios EF, que se ligam ao cálcio (Ca^{+2}) (BARCZYK; CARRACEDO; GULLBERG, 2010). A ligação desse íon interfere alostericamente na interação da molécula com o ligante. Também na hélice β está inserido o domínio I ou A, o qual está presente em nove das cadeias α já identificadas. A interação com o ligante ocorre devido a presença de magnésio (Mg^{+2}) no motivo do “sítio de adesão dependente de íon metal” (do inglês, *metal-ion-dependent adhesion site*, MIDAS) existente no domínio I; logo, a subunidade α determina a especificidade de ligação do receptor. Com relação ao domínio citoplasmático da subunidade α , sua estrutura diverge bastante entre seus subtipos, mantendo apenas a sequência GFFxR (x refere-

se a qualquer aminoácido) em comum em todos (TAKADA; YE; SIMON, 2007; BARCZYK; CARRACEDO; GULLBERG, 2010).

A subunidade β , por outro lado, é constituída pelos domínios plexina-semaforina-integrina (PSI), híbrido e βI , além de quatro repetições de fator de crescimento epidermal (EGF) ricos em cisteína. No domínio βI da subunidade β também está presente o motivo MIDAS regulado por íons Mg^{+2} , ao lado do qual se encontra o “sítio adjacente ao MIDAS”, ou ADMIDAS, onde se ligam íons Ca^{+2} inibitórios. A ligação de manganês (Mn^{+2}) ao ADMIDAS leva à alteração da conformação da subunidade β para um estado ativo (HUMPHRIES; SYMONDS; MOULD, 2003) .

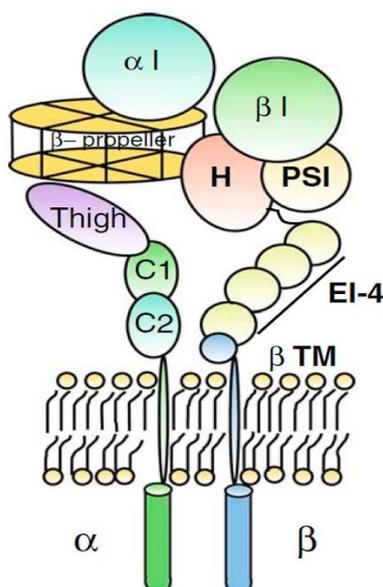


Figura 3. Heterodímero de integrinas α e β . Na integrina α : αI - domínio αI (“cabeça”); β propeller – domínio hélice β ; Thigh – domínio thigh; C1 e C2 – domínios calf-1 e calf-2. Na integrina β : H – domínio híbrido. PSI – domínio plexina-semaforina-integrina. EI-4 – domínio com repetições fator de crescimento epidermal (EGF). β TM – domínio β transmembrana. Fonte: (BARCZYK; CARRACEDO; GULLBERG, 2010).

Basicamente, a função desses receptores envolve tanto transmitir quanto detectar alterações de forças mecânicas em relação à matriz. Sendo assim, as integrinas são capazes de converter a energia gerada a partir de sua interação com ligantes extracelulares em sinal intracelular. Elas conectam o meio extracelular, o qual pode ser tanto a MEC quanto outras células, com os microfilamentos do citoesqueleto, os quais são modulados por esses receptores. Diversas proteínas citoplasmáticas, tais como a talina e a vinculina, fazem a conexão entre as integrinas e o citoesqueleto, resultando em interações complexas (BARCZYK; CARRACEDO; GULLBERG, 2010).

Ainda, a comunicação entre integrinas e ligantes extracelulares desencadeiam uma gama de eventos de transdução de sinais que modulam atividades celulares, tais como: adesão, migração, proliferação, apoptose ou sobrevivência, expressão gênica e diferenciação; a maioria através de efeitos no citoesqueleto (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999).

Nos mamíferos, a afinidade de cada integrina individualmente aos seus ligantes é altamente regulada por sua estrutura heterodimérica e por sinais citoplasmáticos (sinalização *inside-out*). As integrinas podem ser ativadas intracelularmente por sinais vindos de receptores acoplados à proteína G, os quais levam à fosforilação da cauda da subunidade β . Em contrapartida, a associação entre os domínios citoplasmáticos das subunidades α e β mantêm o receptor inativo, uma vez que a mesma se desfaz frente a presença de agonistas (HYNES, 2002; GINSBERG; PARTRIDGE; SHATTIL, 2005; LI et al., 2017).

Por outro lado, na sinalização da matriz para o interior da célula (*outside-in*), as integrinas, ao interagir com ligantes, se agrupam na membrana celular para transmitir o sinal. Essa interação induz alterações conformacionais nas moléculas do receptor, as quais resultam no desdobramento do domínio híbrido (“corpo” das moléculas) e separação das subunidades α e β , levando a porção intracelular a interagir com proteínas citoplasmáticas, desencadeando cascatas de sinalização que levam ao recrutamento de complexos proteicos (HYNES, 2002; GINSBERG; PARTRIDGE; SHATTIL, 2005; LI et al., 2017). Dentre as proteínas que participam desses complexos estão enzimas, como por exemplo a quinase de adesão focal Src e as GTPases Rho e Ras, que tem atividade na montagem de estruturas de adesão dinâmicas, incluindo as adesões focais que aderem à célula à matriz (TAKADA; YE; SIMON, 2007).

Na maior parte do tempo, as integrinas são expressas na superfície celular numa conformação inativa. O processo de ativação desses receptores é bastante complexo e ainda não é completamente conhecido, uma vez que as integrinas podem assumir diferentes estados conformacionais. De maneira bem simplificada, quando a molécula se encontra em um estado mais ativo, ela assume uma conformação totalmente estendida; por outro lado, quando o receptor está inativo, a molécula de integrina se encontra dobrada. Ou seja, conforme a molécula se estende, seu grau de ativação varia de uma conformação inativa até uma conformação de total ativação, de modo que algumas regiões, como as de ligação a íons, passam a ser expostas (HYNES, 2002; LI et al., 2017). Esse processo está esquematizado na figura 4.

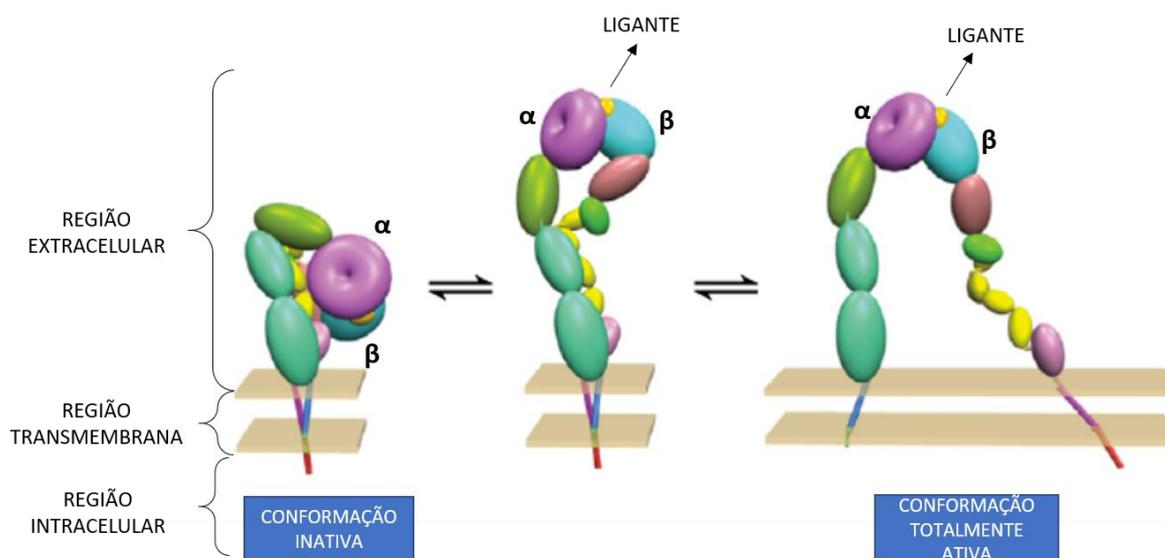


Figura 4. Dinâmica de ativação das subunidades α e β da integrina. Esse esquema mostra de maneira bastante simplificada a dinâmica de ativação da integrina, que varia de um estado totalmente inativado para outro de completa ativação e vice-versa. Presume-se total inativação do receptor quando ele se encontra na sua conformação mais dobrada. A ativação pode acontecer tanto através da interação com ligantes extracelulares (sinalização *outside-in*), como demonstrado nessa figura, quanto por ligantes intracelulares (sinalização *inside-out*). Essas interações induzem um processo de estiramento e separação das subunidades, levando a integrina a uma conformação de total ativação. Imagem adaptada de LI et al., 2017.

Durante os processos de migração e adesão celulares, as integrinas são constantemente endocitadas e recicladas de volta para a membrana celular (CASWELL; VADREVU; NORMAN, 2009). Essa cinética está alterada nas células tumorais, resultando numa mudança nas proporções normais de receptores na membrana celular e nas vesículas endoplasmáticas. Além disso, uma vez que a atividade das integrinas é altamente regulada em células normais, aberrações nessa atividade confere às células propriedades oncogênicas, através da dinâmica de adesão alterada e aumento na sinalização desse receptor (HAMIDI; IVASKA, 2018)

2.6.1 Integrina $\beta 1$

O subgrupo formado pelas integrinas $\beta 1$ é o maior, já que essa subunidade é capaz de formar heterodímeros com a maior gama de integrinas α (pelo menos doze). Todos os heterodímeros formados com essa subunidade podem se ligar a todas as proteínas ligantes da MEC, tais como a laminina, a fibronectina, a tenascina C, a vitronectina e o colágeno (JOKINEN et al., 2004; LAHLOU; MULLER, 2011).

Na glândula mamária normal, a integrina $\beta 1$ é essencial para a manutenção da integridade da arquitetura alveolar devido a sua interação com a membrana basal e com outros complexos de adesão. Os pares de integrina formados com a subunidade

$\beta 1$ encontrados no epitélio mamário são: $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha 6\beta 1$ (LAHLOU; MULLER, 2011). Essa subunidade também têm papel importante na proliferação das células epiteliais tanto normais quanto cancerígenas nesse órgão (LI et al., 2005). Além disso, a expressão elevada de integrina $\beta 1$ em tumores de mama têm sido associada a um mau prognóstico da doença (DOS SANTOS et al., 2012; SUN et al., 2018).

2.7 Endocitose

As integrinas e seus ligantes, assim como outros receptores e macromoléculas presentes na membrana, em algum momento são internalizadas pela célula através de um processo chamado endocitose. Trata-se de um processo de internalização de partículas e macromoléculas bastante complexo. Vários tipos de endocitose já foram identificados, dentre eles a pinocitose, a fagocitose e a macropinocitose (DOHERTY; MCMAHON, 2009; ALBERTS et al., 2010). Entretanto, esse trabalho abordará a endocitose apenas em aspectos gerais e destacará os dois tipos mais estudados.

Em aspectos gerais, a endocitose funciona da seguinte forma: uma fração da membrana celular – contendo receptores, seus ligantes, outras proteínas de membrana e solutos presentes no meio extracelular – se invagina e se projeta para o interior da célula, formando uma vesícula. A partir daí, parte dos receptores de membrana e dos solutos internalizados são selecionados para reciclagem, através da qual eles retornam para a membrana. A outra parte, geralmente formada por receptores regulados negativamente, além de seus ligantes e solutos remanescentes, é encaminhada para os corpos multivesiculares e, mais adiante, para os lisossomos, onde serão degradados (GRUENBERG; MAXFIELD, 1995; IVANOV, 2008).

Dessa forma, a endocitose têm muitas funções que vão das mais simples às mais complexas. Essas funções incluem captar nutrientes do meio extracelular, finalizar a sinalização de um receptor, regular o formato e tamanho da célula, regular a migração celular, transmissão sináptica, transporte transcelular, defesa, dentre outras (IVANOV, 2008).

O processo de internalização pode acontecer de diferentes maneiras. A mais estudada e, portanto, mais bem caracterizada, é a endocitose mediada por clatrina. Nesse tipo de endocitose, as vesículas são formadas a partir de uma sinalização que desencadeia a associação de várias proteínas adaptadoras que, por sua vez, formam um complexo com as clatrininas. Assim, é montando um revestimento em determinada

região da face citoplasmática da membrana, o qual induz a sua invaginação e formação da vesícula (ELKIN; LAKODUK; SCHMID, 2016). Formada essa vesícula, proteínas chamadas dinamina montam uma estrutura anelar ao redor da região que conecta a vesícula com a membrana. Esse anel “corta” a região de ligação, liberando a vesícula no citoplasma da célula, onde ela se associará a um endossomo inicial. Esse é um tipo de endocitose seletiva, uma vez que as proteínas adaptadoras reconhecem tipos específicos de receptores e ligantes (ELKIN; LAKODUK; SCHMID, 2016).

Outro tipo de endocitose muito estudado é a mediada por cavéolas. Esse tipo de internalização compartilha de algumas características comuns entre as vias de endocitose dependentes de clatrina, incluindo a mesma dinâmica de recrutamento de proteínas sinalizadoras durante o processo de fissão (KIRKHAM et al., 2005).

Essas estruturas correspondem a invaginações na membrana plasmática altamente hidrofóbicas, ricas em colesterol e esfingolipídios, e com diâmetro de 90 a 100 nanômetros (PARTON; SIMONS, 2007). Essas invaginações são formadas pela polimerização das caveolinas, especialmente a caveolina-1, a mais comum entre as células (HARDER; SIMONS, 1997).

A caveolina-1 é uma pequena proteína integral de membrana, cuja região N-terminal se liga ao colesterol, servindo como um domínio de ancoramento para proteínas sinalizadoras (ELKIN; LAKODUK; SCHMID, 2016). Além disso, a caveolina-1 têm como funções regular a homeostase do colesterol, a endocitose, a internalização de receptores, e assim a sinalização celular, além de assumir papéis na proliferação e morte celular (SIMÓN et al., 2020).

Em resumo, as cavéolas parecem ser regiões uniformes e estáticas, prontas para invaginação em resposta a sinais específicos, os quais ainda não foram bem caracterizados (KIRKHAM et al., 2005).

3 PROPOSIÇÃO

Por meio deste estudo buscamos elucidar os mecanismos desencadeados pela interação entre o peptídeo derivado da laminina-111, C16, e a integrina $\beta 1$ em células de mama, assim como as consequências morfofuncionais decorrentes dessa interação. Sendo assim, o trabalho foi desenvolvido passando pelas seguintes etapas:

1. Investigação da adesão das células MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 ao peptídeo C16 e a seu controle, C16Rv, bem como do envolvimento da integrina $\beta 1$ na capacidade adesiva dessas células ao peptídeo de estudo;
2. Análise da colocalização entre C16 e integrina $\beta 1$ ativada;
3. Estudo da ativação da integrina $\beta 1$ pelo peptídeo C16;
4. Estudo da localização do peptídeo C16 em células MDA-MB-231;
5. Investigação do processo de endocitose do peptídeo C16 pelas células mamárias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho não envolveu manipulação direta de seres humanos ou animais, tendo recebido isenção pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas (CEP/ICB) sob o número de processo 836/2016 no dia 13 de setembro de 2016.

4.1 Linhagens Celulares

Foram utilizadas células derivadas de carcinoma ductal invasivo de mama MDA-MB-231 (*basal-like*, triplo negativo para receptores de estrógeno, progesterona e HER2), células derivadas de adenocarcinoma de mama MCF-7 (luminal B, com receptores para progesterona, estrógeno e HER2) e células derivadas de glândula mamária normal MCF-10A. Ambas as linhagens MCF-7 e MCF-10A foram gentilmente cedidas pela profa. Dra. Nathalie Cella, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade de São Paulo (ICB, USP, São Paulo). As células MDA-MB-231 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 foram mantidas em meio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM F12 HAM, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, SP, Brasil), enquanto as MCF-10A foram tratadas com meio DMEM (Sigma) suplementado com 5% de soro fetal de cavalo (SFC, Cultilab), 20 ng/ml de fator de crescimento epidérmico (Sigma), 10 µg/ml de insulina, 0,5 µg/ml de hidrocortisona e 100 ng/ml de toxina colérica (Sigma). Todas as linhagens foram mantidas em atmosfera com 5% de CO₂ e a 37°C.

4.2 Tratamento com peptídeo sintético C16

Foi utilizado o peptídeo sintético C16 (sequência KAFDITYVRLKF) ou o peptídeo com a sequência de C16 invertida, C16 reverso (C16Rv; FKLRVYTIDFAK). Essa sequência reversa foi escolhida por ser o melhor controle para os efeitos de C16, conforme experiência do nosso laboratório e pela literatura (PONCE; NOMIZU; KLEINMAN, 2001; PONCE; KLEINMAN, 2003).

Os peptídeos foram utilizados na concentração de 10 ou 50 µg/ml. A diluição dos mesmos é feita em acetonitrila 10%. Tanto a sequência C16 quanto C16Rv foram sintetizadas pela empresa EZ Biolab (Westfield, IN, USA). Também são utilizados C16 e C16Rv conjugados à rodamina (C16R e C16RvR, respectivamente; EZ Biolab) ou a

partículas de *Nanogold* (C16N e C16RvN, respectivamente; Nanoprobes, Stony Brook, Nova York).

4.3 Ensaio de adesão

Placas de 96 poços de fundo em “U” foram revestidos com laminina 111 (1 µg/poço, Trevigen, Gaithersburg, Maryland, EUA), C16 ou C16Rv (3 µg/poço). Os poços foram bloqueados com 3% de albumina sérica bovina (BSA) a 37°C e lavados com tampão fosfato (PBS) contendo 0,1% BSA. Em seguida, as células das linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-10A foram incubadas por 20 minutos a 37°C. As células aderidas foram fixadas e coradas por 10 minutos com cristal violeta 0,2% em metanol 20%. Após lavagem e secagem dos poços, as células foram lisadas com detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, e a absorbância foi lida a 595 nm em espectrofotômetro de microplacas (BioRad, Berkeley, CA, EUA). As integrinas dependem de cátions divalentes para exercer suas funções. Sendo assim, as células foram pré incubadas com os quelantes de íons divalentes, o ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA, Sigma, 3mM) ou ácido diamino trietileno glicol (EGTA, Sigma, 3mM) por 10 minutos e então foram submetidas ao ensaio de adesão descrito acima.

4.3.1 *Knockdown da integrina β1*

Também foi realizado o *knockdown* transiente das integrinas β1 por RNA de interferência (RNAi), com o objetivo de analisar os efeitos desse bloqueio na adesão das células ao peptídeo C16. As células das linhagens MCF10A, MCF-7 e MDA-MB-231 foram transfectadas com RNAi contra integrina β1 disponível comercialmente (50 nM; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) utilizando o reagente de transfecção Lipofectamina 2000 (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. As células foram incubadas com uma mistura contendo o RNAi, o reagente de transfecção e meio Opti-Mem (Gibco, Waltham, Massachusetts, EUA) por 48 horas antes dos ensaios de adesão. Grupos controle incluíram células transfectadas com um controle contendo uma sequência *scrambled* do RNAi (Santa Cruz). A transfecção foi confirmada por *western blot*, como descrito adiante.

4.3.2 *Western blot*

Para confirmar a eficiência da transfecção das células com o RNAi, foi utilizado o ensaio de *western blot* para integrina β1 nas linhagens MCF10A, MCF-7 e MDA-MB-231. As amostras foram lisadas em tampão RIPA (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5%

deoxicolato, 0,1% SDS, 50 mM Tris pH 8) com inibidor de protease (1:1000, Sigma). As mesmas foram, em seguida, centrifugadas por 10 min a 4°C, e os sobrenadantes foram quantificados (kit BCA, Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Após dosagem de proteínas, as amostras foram ressuspensas em tampão Laemmli contendo 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β -mercaptoetanol e 0,001% azul de bromofenol. Quantidades iguais de proteína (30 μ g) dos lisados das células foram utilizados em géis de eletroforese com 10% de poliacrilamida. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, EUA), as quais foram bloqueadas em leite com 5% em TBST (tampão tris com 1% de tween 20) por 1 hora. Em sequência, as membranas foram incubadas com anticorpo monoclonal contra integrina β 1 (clone 7F10, 1:500, Invitrogen). O anticorpo primário foi revelado com anticorpo secundário conjugado a HRP (1:5000, Sigma) e a revelação da reação foi feita utilizando substrato quimioluminescente ECL (GE Healthcare). O controle da quantidade de proteína carregada por poço foi feito através da revelação da beta actina (1:5000, Sigma).

4.4 Ensaio de colocalização

As células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro por 24 horas e tratadas com os peptídeos C16 e C16Rv ligados à rodamina (C16R e C16RvR, respectivamente) pelo período de 2 horas e meia. Em seguida, foi feita a fixação das células em metanol por 5 minutos a 4°C. O bloqueio das interações inespecíficas foi feito com soro de cabra 10% (Kirkegaard & Perry Laboratories - KPL, Gaithersburg, MD, EUA). Por fim, as amostras foram incubadas com anticorpo anti-integrina β 1 (clone 12G10; 1:400; Millipore). O anticorpo primário foi revelado por anticorpo secundário anti mouse conjugado a Alexa Fluor 488 (1:500; Alexa Fluor; Invitrogen). A montagem das lâminas foi feita com ProLong Diamond (Invitrogen) e as imagens foram obtidas por microscópio de fluorescência Zeiss Axiophot (Zeiss, Oberkochen Alemanha). Foram analisadas 10 células por grupo amostral. A análise de colocalização nas imagens foi feita através da ferramenta Linescan pelo software Metamorph (Molecular Devices, San Jose, CA, EUA).

4.5 Citometria de fluxo

Células da linhagem MDA-MB-231 foram cultivadas em placas de 35 mm *overnight* e incubadas com os peptídeos C16 ou C16Rv (10 μ g/ml) por 20 minutos ou

1 hora. Em seguida, as células foram tripsinizadas e marcadas com anticorpo monoclonal contra integrina $\beta 1$ (clone 12G10; 1:50; Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA) ou IgG 1 (1:50; Millipore) seguida pela marcação com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (1 $\mu\text{g/ml}$; Invitrogen). O clone 12G10 reconhece um epítopo exposto quando a integrina está em sua conformação ativa como consequência da sua interação com um ligante (LAHLOU; MULLER, 2011). As células foram então analisadas em citômetro Fortessa (CEFAP-ICB, USP), através do software FlowJo (FlowJo, LLC, Ashland, Oregon, EUA). Foram adquiridos pelo menos 10.000 eventos por amostra analisada em três ensaios independentes.

4.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

4.6.1 Conjugação do peptídeo a partículas de Nanogold

Primeiramente, os peptídeos C16 (2 mg) e C16Rv (2 mg) foram conjugados *overnight* a partículas de Nanogold (6 nmol, mono-sulfo-NHS-Nanogold, Nanoprobe, Yaphank, NY, EUA). Chamaremos esses peptídeos de C16N e C16RvN, respectivamente. Após o período de conjugação, os peptídeos conjugados foram separados das partículas não conjugadas através de cromatografia em resina Sephadex G-75 (Sigma). Foram obtidos 2 eluatos: um mais escuro, o qual corresponde às partículas de menor massa atômica, representando o excesso de *Nanogold* (essas partículas têm aproximadamente 15 kD); e um de cor mais clara, o qual julgávamos ser o peptídeo conjugado (15 kD + 12 kD). As amostras obtidas foram lidas em espectrofotômetro de microplacas (EPOCH, Winooski, Vermont, EUA) nos comprimentos de onda de 280 e 420 nm, conforme especificado pelo fabricante.

4.6.2 Tratamento das células reparo das amostras para MET

As células MDA-MB-231 foram incubadas com os peptídeos conjugados na concentração de 1:20 por 1 hora a 4°C, e tratadas com Gold Enhancement (kit Nanoprobe) por 5 minutos. Como controles experimentais, utilizamos amostras incubadas com os peptídeos de estudo a 37°C ou incubadas com o eluato obtido contendo apenas partículas de Nanogold e no qual foi adicionado tampão Tris-HCl, a fim de impedir ligações inespecíficas entre o Nanogold e proteínas celulares. Por fim, as amostras foram fixadas com glutaraldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1M em geladeira por pelo menos 3 horas. A pós-fixação foi em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão, seguida de desidratação em etanol, imersão em óxido de propileno e

inclusão em resina epóxi (Spurr, Electron Microscopy Sciences). Cortes semifinos foram corados em azul de toluidina para seleção das áreas apropriadas. Em seguida, foram obtidos cortes ultrafinos (200 nm). Os cortes foram colhidos em telas de 200 *mesh* cobertas com película de formvar. Então, as amostras foram analisadas microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G20, 200 Kv (FeiCo, USA) do ICB-USP. Foram analisadas 15 células de cada grupo experimental.

4.7 Ensaio em *time lapse*

As células das linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-10A foram mantidas em placas de cultura de 35 mm em meio sem vermelho fenol (Sigma) e tratadas com peptídeo C16 ligado à rodamina (C16R) na concentração de 50 µg/ml. O C16Rv ligado à rodamina (C16RvR) foi utilizado como controle. Em seguida, foram feitos vídeos em *time lapse* em microscópio confocal e multifóton Carl Zeiss LSM 780-NLO (CEFAP-ICB, USP). Esse microscópio possui câmaras de incubação que mantém as células a 37°C, 5% de CO₂, e em condições ideais de umidade.

A fim de identificar a presença de C16 em vesículas, as células foram incubadas com reagente CellMask Deep Red (0,2x, Invitrogen) ou Lyso Tracker Green (85 nM, Invitrogen). As células da linhagem MCF-7 foram tratadas com reagente Dysanore monohidratado (100 µg/ml, Sigma) juntamente com o peptídeo C16 conjugado à rodamina, nas mesmas condições especificadas acima.

As imagens das células foram adquiridas em intervalos de 15 minutos durante 6 horas ou por uma noite (*overnight*). O microscópio e demais equipamentos foram controlados pelo software ZEN (Zeiss). A montagem dos vídeos de *time lapse* foi realizada utilizando o software FIJI (<https://fiji.sc>). Para cada grupo experimental foram analisados 5 a 6 campos escolhidos aleatoriamente. Imagens de projeção ortogonal foram feitas no software ZEN. A fim de obter maior contraste para melhor visualização do peptídeo nas imagens, foram usadas pseudocores amarela e ciano para os peptídeos e lisossomos, respectivamente, e cinza para o corante CellMask. Por fim, foram feitas contagens da quantidade de peptídeo no interior das células. Para tanto, foi utilizado a ferramenta “Analyse particles” do software FIJI e dez células foram analisadas por campo amostral.

4.8 Estudo da endocitose do peptídeo C16

4.8.1 *Knockdown cadeia pesada da clatrina e caveolina-1*

Foi realizado o *knockdown* das proteínas de revestimento de vesículas, clatrina e caveolina-1 por RNAi (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA), com o objetivo de analisar os efeitos desse bloqueio da endocitose nas células tratadas com o peptídeo C16. Para tanto, as células das linhagens MDA-MB-231 foram transfectadas com RNAs de interferência contra a cadeia pesada da clatrina (CLHC) ou caveolina-1 disponíveis comercialmente (100 nM). Tanto a transfecção quanto a confirmação da eficiência da mesma foram feitas conforme já descrito anteriormente.

Em seguida, as células transfectadas foram tratadas com peptídeo C16R na concentração de 10 µg/ml por 2 horas e 30 minutos a 37°C. C16RvR foi utilizado como controle. Após o tempo de incubação, as células foram fixadas em metanol a 4°C. A montagem das lâminas foi feita com ProLong Diamond (Invitrogen) e as imagens foram obtidas por microscópio de fluorescência Zeiss Axiophot. A quantidade de partículas dentro das células foi contada através da ferramenta "Analyse particles" do software FIJI. Foram analisadas 30 células a partir de 3 experimentos independentes.

4.8.2 *Imunofluorescência de marcadores endossomais*

Para identificar a presença do peptídeo C16 na via endocítica, foram feitas imunofluorescências para a identificação do marcador de endossomos iniciais, EEA1, e do marcador de lisossomos, LAMP1.

Sendo assim, as células MDA-MB-231 foram incubadas com o peptídeo C16R ou C16RvR da mesma forma como descrito anteriormente. Em seguida, elas foram fixadas em paraformaldeído 4% por 10 minutos. O bloqueio das interações inespecíficas foi feito com SFB na proporção 2:3 em PBS. As proteínas de interesse foram marcadas com anticorpos anti-EEA1 (1:250, Cell signaling, Danvers, Massachusetts, EUA) ou anti-LAMP1 (1:250, Cell signaling), e secundário anti-rabbit Alexa 488 (1:500, Invitrogen). A montagem das lâminas foi feita com meio de montagem ProLong Diamond (Invitrogen).

Foram adquiridas quarenta e cinco imagens a partir de três experimentos diferentes em microscópio Zeiss Axiophot (Zeiss), e as regiões de colocalização foram mostradas através de projeções ortogonais feitas com o software Volocity.

4.9 Análise estatística

Os dados obtidos a partir dos experimentos foram analisados usando o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). As diferenças entre três ou mais grupos foram calculadas através de análise de variância (ANOVA), seguida por teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

5 RESULTADOS

5.1 As células de mama aderem ao peptídeo C16 e essa adesão depende da integrina $\beta 1$ em células MDA-MB-231

O ensaio de adesão das células de mama ao peptídeo C16 mostrou que células da linhagem MDA-MB-231 aderiram mais ao C16 comparado aos controles BSA e C16Rv (figura 5A). Além disso, a adesão das células com *knockdown* para a integrina $\beta 1$ a esse peptídeo diminuiu significativamente (figura 6A). Ainda, foi mostrado que o peptídeo C16Rv não exerce efeitos adesivos consideráveis nessas células (figuras 5A e 6A).

Por outro lado, ao estudar as células “normal-like” (MCF-10A) e aquelas derivadas de adenocarcinoma não invasivo (MCF-7), observamos que ambas as linhagens apresentam boa aderência ao peptídeo C16, entretanto, nas células MCF-10A, os tratamentos com quelantes ou RNAi não alteraram esse efeito (figuras 5C e 6C). Em contrapartida, a adesão da MCF-7 ao C16 diminuiu após o tratamento das células com EDTA ou EGTA (figura 5B), enquanto o tratamento com RNAi não mostrou efeitos significativos (figura 6B).

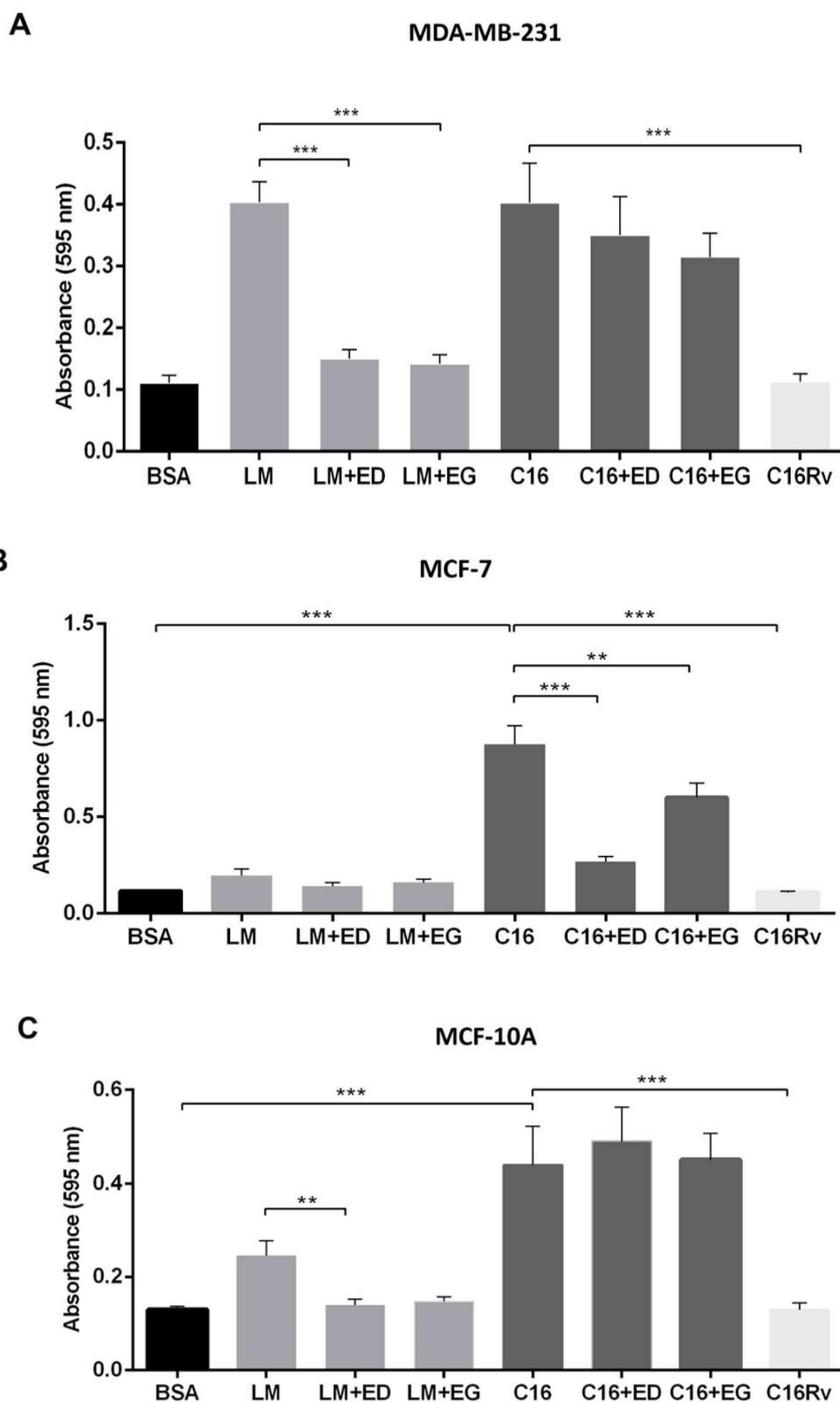


Figura 5. Quelantes de íons divalentes diminuem a adesão de células MCF-7 ao peptídeo C16. A – Linhagem MDA-MB-231 de câncer metastático. B – Linhagem de adenocarcinoma de mama MCF-7. Essas células aderiram ao C16 e o tratamento com EDTA e EGTA foi capaz de diminuí-la. C – Linhagem normal-like MCF-10A. O tratamento com EDTA e EGTA não exerceu efeitos na adesão dessas células ao peptídeo. BSA – Albumina Sérica Bovina; LM - laminina-111; ED - EDTA; EG - EGTA. ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni. Os dados representam a média \pm erro padrão de três experimentos independentes. * $p \leq 0.05$.

Figura 6. O *knockdown* da subunidade $\beta 1$ da integrina reduz a adesão de células MDA-MB-231 ao peptídeo C16. A – Linhagem de câncer metastático MDA-MB-231. O RNAi contra integrina $\beta 1$ diminuiu a adesão ao C16. B – Linhagem de adenocarcinoma de mama MCF-7. Houve tendência de diminuição da adesão ao C16 pelas células tratadas com RNAi. C – Linhagem celular normal like MCF-10A. O *knockdown* da integrina não exerceu efeitos na adesão ao peptídeo. BSA - albumina sérica bovina; LM - laminina-111; sc - *scrambled*. ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni. Os dados representam a média \pm erro padrão de três experimentos independentes. * $p \leq 0.05$.

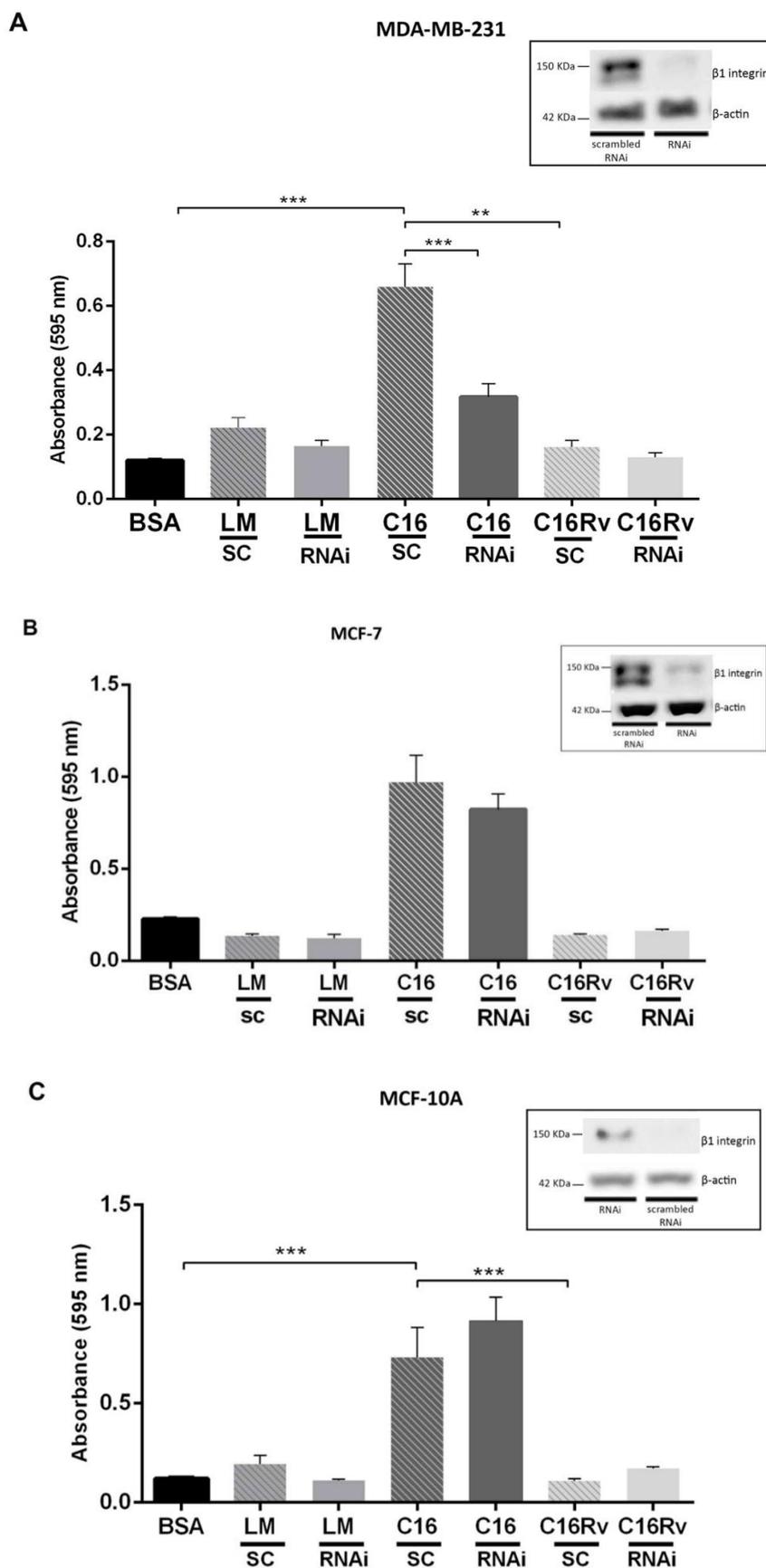


Figura 6. O *knockdown* da subunidade $\beta 1$ da integrina reduz a adesão de células MDA-MB-231 ao peptídeo C16

5.2 C16 colocaliza com a integrina β 1 em células de mama

Uma vez observado o envolvimento da subunidade β 1 da integrina na adesão, principalmente das células MDA-MB-231, ao peptídeo C16, nosso próximo passo foi estudar se ambos estariam colocalizados nas linhagens estudadas.

As análises de colocalização mostram picos de intensidade de fluorescência da rodamina e do Alexa 488 concomitantes, evidenciando uma sobreposição entre o peptídeo e a marcação para integrina β 1 ativa. O evento foi observado nas 3 linhagens, ocorrendo predominantemente nas células incubadas com C16-rodamina (C16R; figuras 7A, C e E), em comparação com as incubadas com C16Rv-rodamina (C16RvR; Figuras 7B, D e F). Em contrapartida, nesse caso, observamos que o controle C16RvR se mostrou distribuído mais uniformemente por toda a célula, padrão que se reproduziu em todas as células analisadas (figuras 7B, D e F).

Figura 7. O peptídeo C16 e a integrina $\beta 1$ colocalizam em células de mama. Células incubadas com C16 ou C16Rv conjugados à rodamina (C16R e C16RvR, respectivamente, em vermelho) e com marcação para integrina $\beta 1$ ativada (verde). Os pontos de possível colocalização estão indicados pelas setas. A área destacada é mostrada ampliada abaixo de cada imagem. O gráfico mostra um aumento da intensidade de fluorescência das cores vermelha e verde no mesmo ponto onde é observada a colocalização (linha branca). A – MCF-7 tratada com peptídeo C16R; B – MCF-7 tratada com peptídeo C16RvR; C – MCF-10A tratada com C16R; D – MCF-10A tratada com C16RvR; E – MDA-MB-231 tratada com C16R; F – MDA-MB-231 tratada com C16RvR. Barra de escala: 25 μ m. Aumento de 100X.

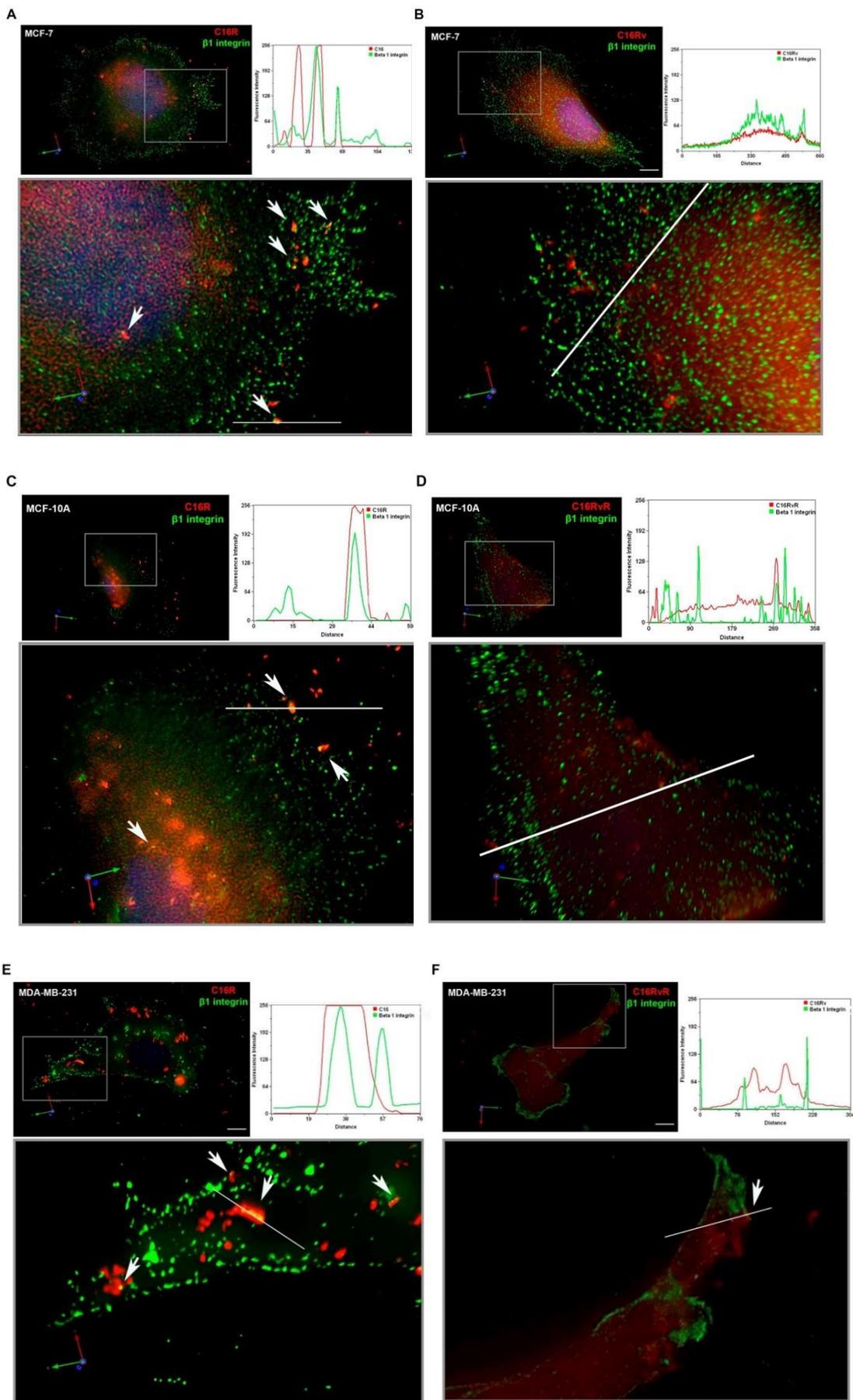


Figura 7. O peptídeo C16 e a integrina $\beta 1$ colocalizam em células de mama

5.3 C16 ativa integrina $\beta 1$ em células MDA-MB-231

Depois de observarmos a colocalização, decidimos investigar a possível ativação da integrina $\beta 1$ através de ensaio de citometria de fluxo utilizando anticorpo que reconhece esse receptor na sua conformação ativa (12G10).

Os gráficos mostram que ambos os peptídeos C16 e C16Rv ativam a integrina $\beta 1$ (figura 8).

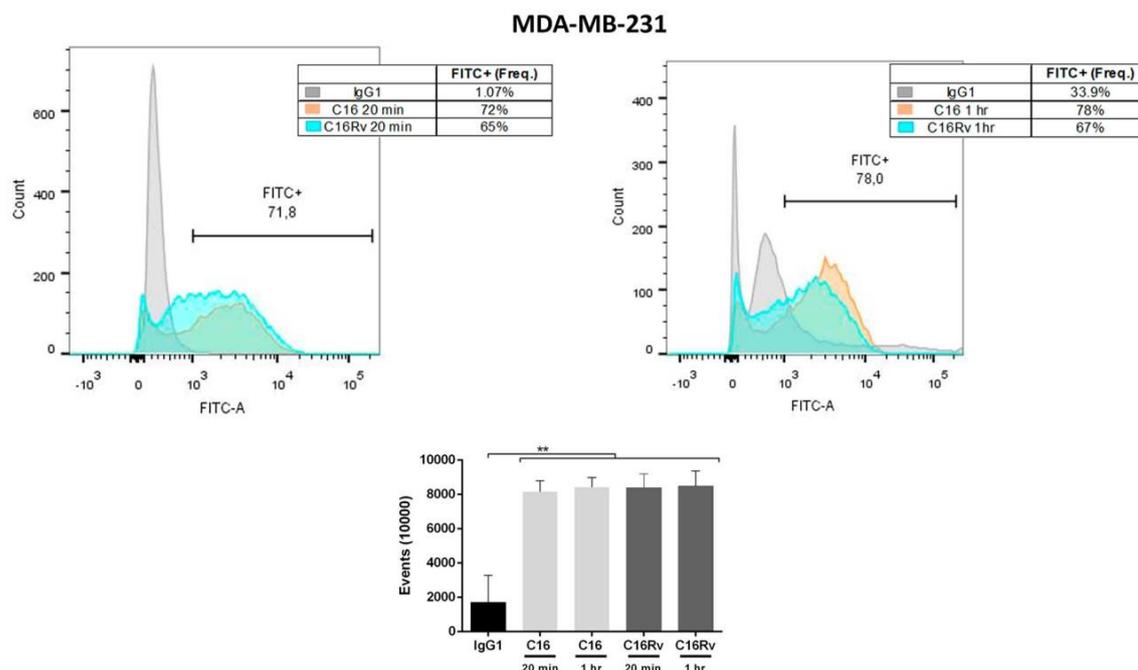


Figura 8. O peptídeo C16 e seu controle C16Rv ativam a integrina $\beta 1$ em células MDA-MB-231. Os picos demonstrados nos histogramas referem-se contagem de células em relação à intensidade de marcação no comprimento de onda 488 (FITC+). A barra horizontal de cada gráfico mostra a região do gráfico em que as células contadas são positivas para FITC (intensidade $\geq 10^3$). O número acima dessa barra refere-se à frequência das células tratadas com C16 que foram positivas para FITC. À esquerda, gráfico das amostras tratadas com os peptídeos por 20 minutos e, à direita, histograma das células tratadas pelo tempo de 1 hora. O gráfico de barras mostra a análise estatística dos eventos positivos de cada amostra. ANOVA seguida por pós teste Bonferroni. Os dados representam média \pm erro padrão de pelo menos 10000 eventos de três experimentos independentes. ** $p \leq 0,001$.

5.4 O peptídeo C16 decora a membrana de células MDA-MB-231

Após observarmos que a subunidade da integrina $\beta 1$ interage com o peptídeo C16, buscamos investigar a localização desse peptídeo nas células de maneira mais detalhada, a fim de confirmar sua ligação à membrana celular. Para isso, células MDA-MB-231 foram incubadas com os peptídeos C16 ou C16Rv conjugados a *Nanogold* (C16N ou C16RvN) e analisadas por microscópio eletrônico de transmissão. Nossos dados mostram a presença do peptídeo decorando a membrana celular e dentro de estruturas vesiculares após 1 hora de incubação (figura 9, acima). Por outro lado, apenas 3 das 15 células estudadas mostraram o peptídeo controle (C16RvN) aderido à membrana (figura 9, abaixo).

Figura 9. O peptídeo C16 é encontrado aderido à membrana de vesículas e células MDA-MB-231. Células MDA-MB-231 incubadas com peptídeo C16 ou C16Rv conjugados a partículas de *Nanogold* (C16N e C16RvN, respectivamente). As setas indicam partículas de peptídeo presentes em vesículas e projeções celulares. N = 15 células analisadas. Menor aumento: 2500X. Maior aumento: 8000X.

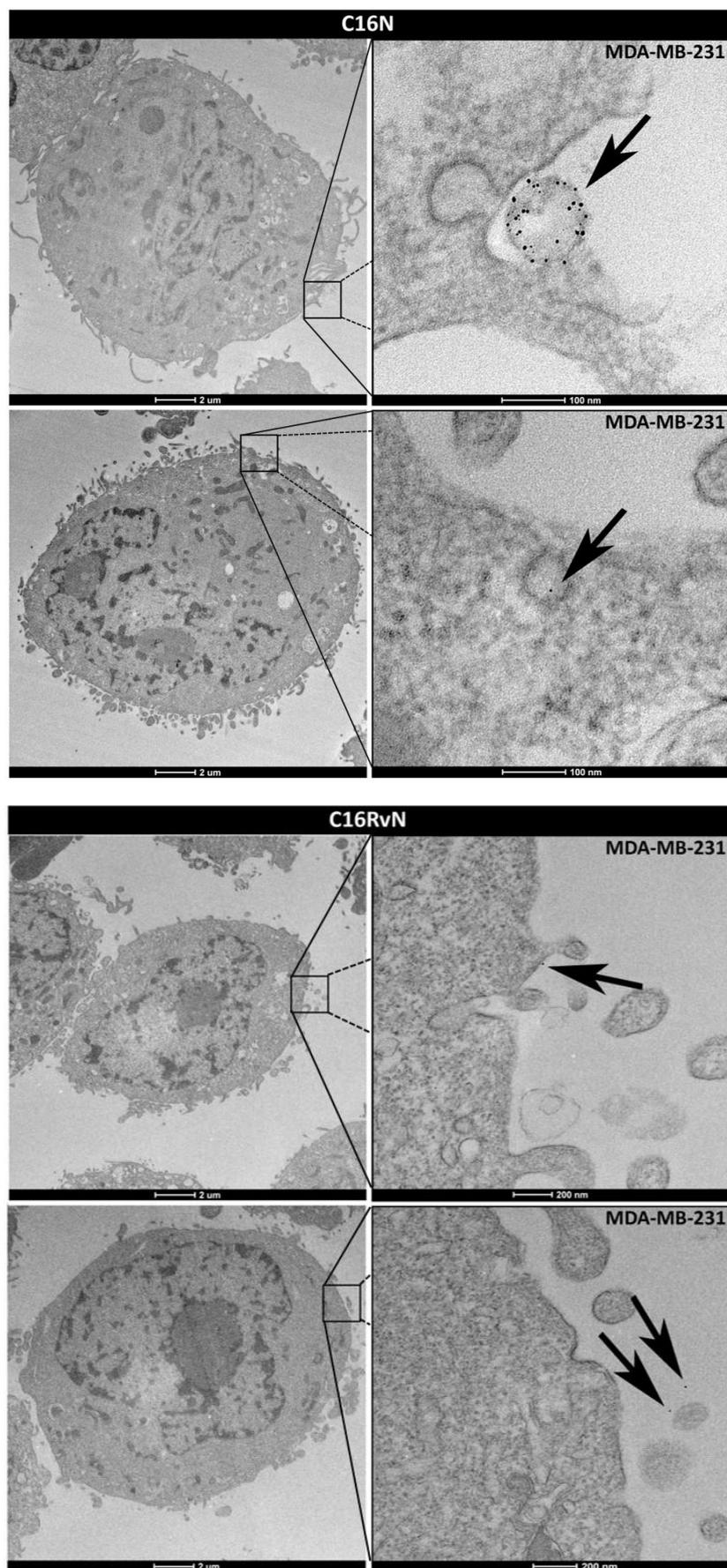


Figura 9. O peptídeo C16 é encontrado aderido à membrana de vesículas e células MDA-MB-231

5.5 C16 é internalizado pelas células de mama

Uma vez observada a presença do peptídeo C16 aderido à membrana das células MDA-MB-231, passamos a estudar a dinâmica de interação entre C16 e as células tumorais e normais. Dessa forma, essas linhagens foram incubadas com o peptídeo ou seu controle conjugados à rodamina (C16R ou C16RvR, respectivamente), e acompanhadas *overnight* através de *time lapse* em microscópio confocal.

Inicialmente, observamos que o peptídeo C16 começa a ser incorporado pelas linhagens MCF-7 e MCF-10A após 2 horas, e que esse processo aumenta com o passar do tempo (figuras 10 e 11, respectivamente). Por outro lado, o peptídeo C16Rv também parece sofrer endocitose em alguns casos, porém, em quantidades menores (figuras 10B e 11B).

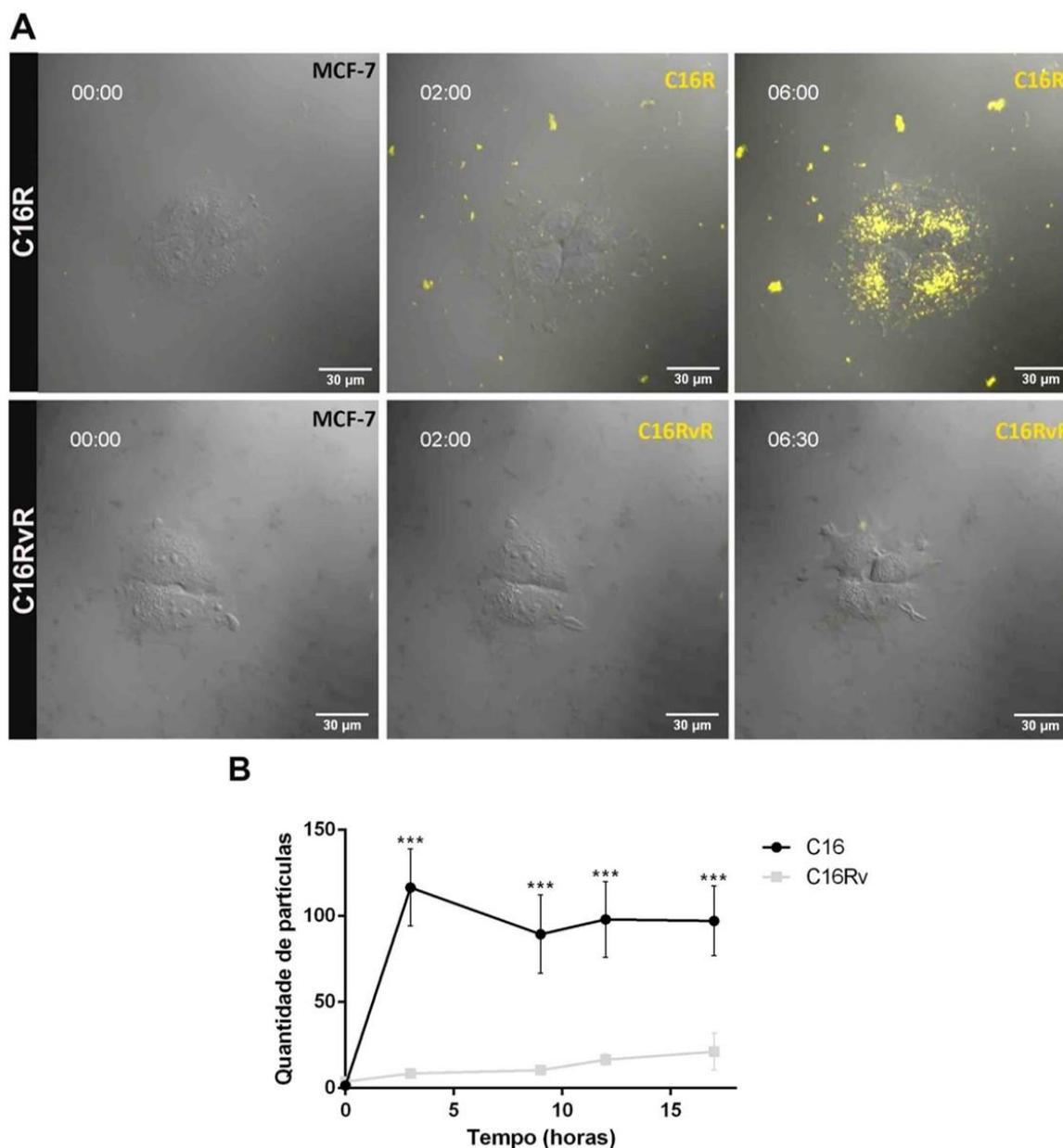
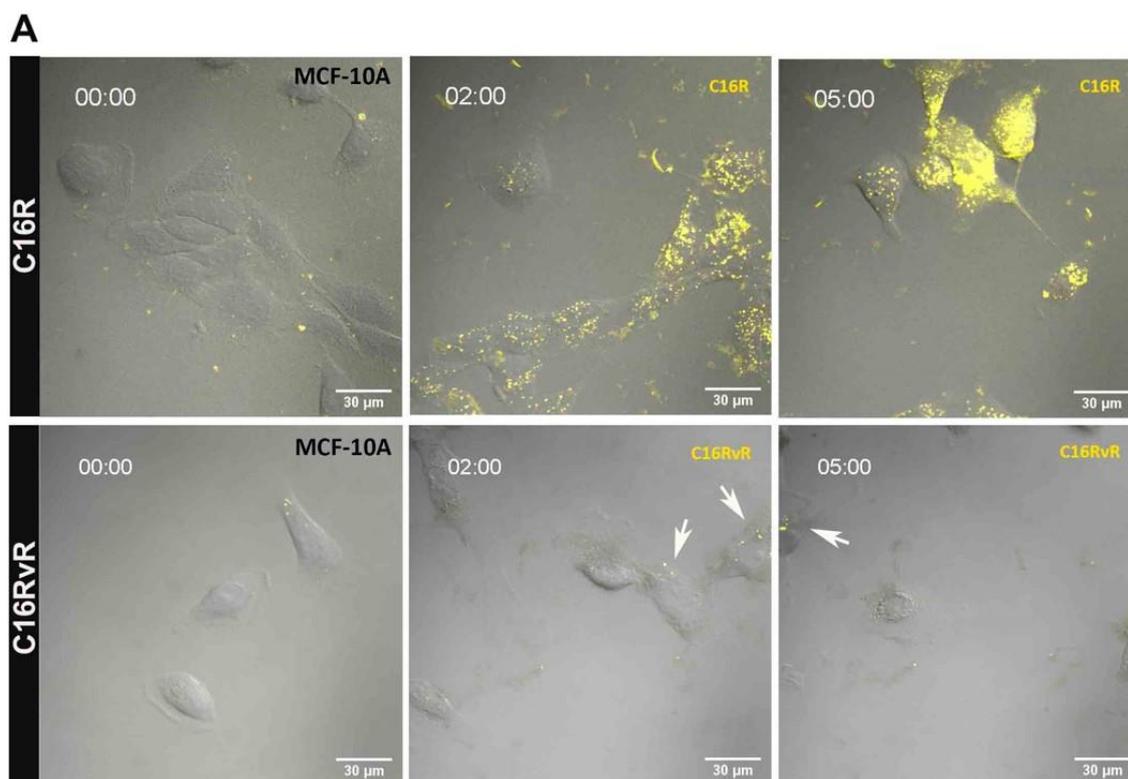


Figura 10. C16 é internalizado pelas células MCF-7. A – Células MCF-7 incubadas com peptídeo C16-rodamina (C16R) representado na cor amarela (acima; vídeo 1) ou C16Rv-rodamina (C16RvR; abaixo; vídeo 2). Observa-se um aumento da quantidade de peptídeo na região das células. Células imageadas por contraste interferencial diferencial (DIC). Aumento de 63X. B – Gráfico de contagem da quantidade de partículas em relação ao tempo. A quantidade de C16 interagindo com as células é maior em relação ao seu controle. Análise por ANOVA de dois caminhos seguido de pós teste de Bonferroni. * $P \leq 0,001$.



B

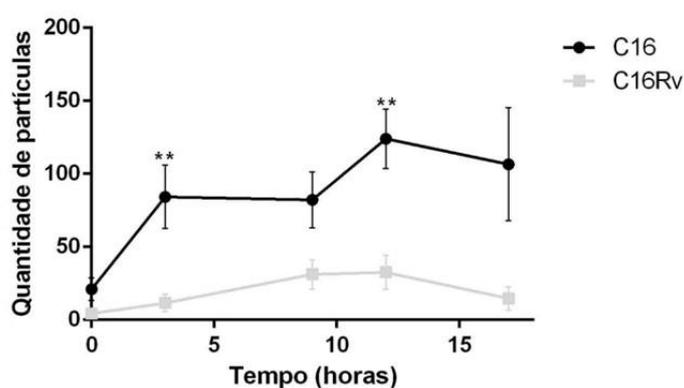


Figura 11. C16 é internalizado pelas células MCF-10A. A – Células MCF-10A incubadas com peptídeo C16-rodamina (C16R; acima; vídeo 3) ou C16Rv-rodamina (C16RvR; abaixo; vídeo 4) representados pela cor amarela. Observa-se um aumento da quantidade de peptídeo na região das células. Células imageadas por contraste interferencial diferencial (DIC). Aumento de 63X. B – Gráfico de contagem da quantidade de partículas em relação ao tempo. A quantidade de C16 interagindo com as células é maior em relação ao seu controle. Análise por ANOVA de dois caminhos seguido de pós teste de Bonferroni. * $P \leq 0,0001$.

Dessa forma, visando evidenciar a internalização do peptídeo pelas células, utilizamos corante de membrana CellMask nas células MDA-MB-231 (figuras 12 e 13). Os dados obtidos corroboram com o fenômeno observado nas linhagens MCF-7 e MCF-10A e são confirmados em imagem de projeção ortogonal (figura 13).

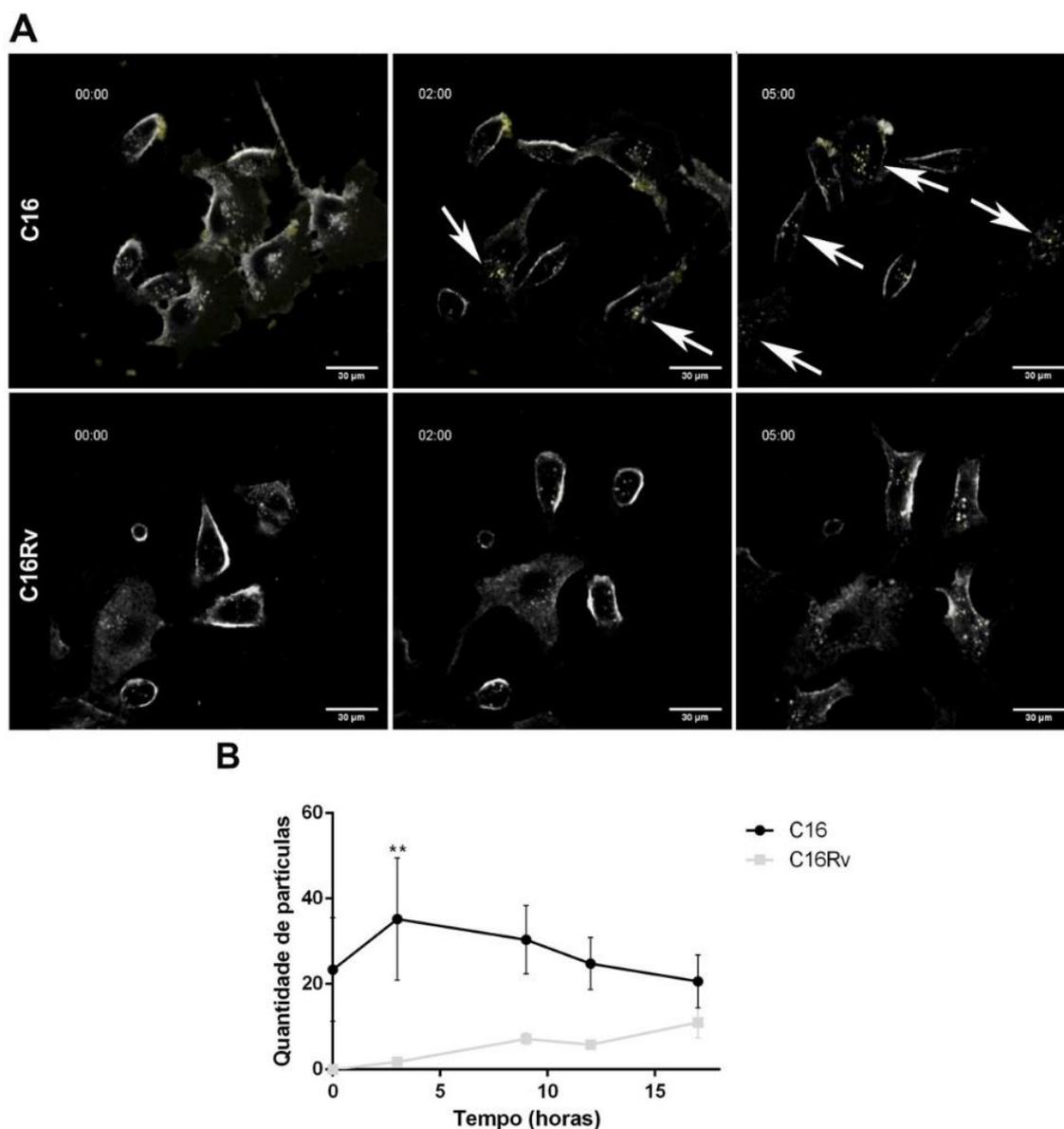


Figura 12. Células MDA-MB-231 também internalizam o peptídeo C16. A – Células MDA-MB-231 incubadas com peptídeo C16-rodamina (C16R; vídeo 5) ou C16-rodamina (C16RvR; vídeo 6) nos tempos: 0h, 2h e 5h (barra de escala: 30 μ m). As setas indicam o peptídeo C16 supostamente dentro de vesículas. Células imageadas por contraste interferencial diferencial (DIC). Aumento de 63X. B – Gráfico de contagem da quantidade de partículas em relação ao tempo. Análise por ANOVA de dois caminhos seguido de pós teste de Bonferroni. * $P \leq 0,001$.

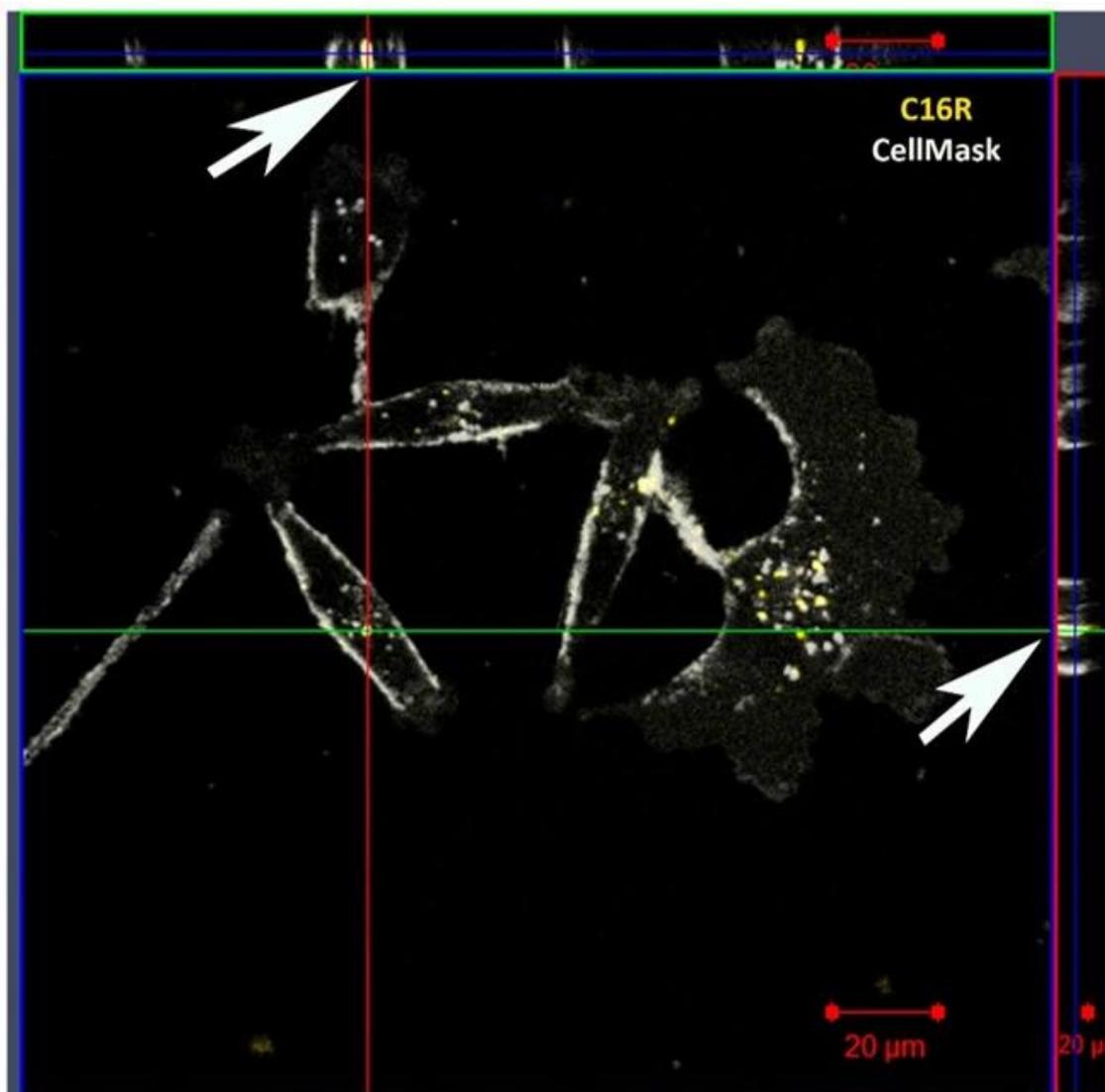


Figura 13. A internalização do peptídeo C16 é evidenciada por projeção ortogonal. As linhas verde e vermelha indicam as imagens XY, respectivamente, projetadas para gerar planos ortogonais XZ e YZ. As setas indicam a presença do peptídeo dentro da célula.

Esses resultados também são observado nos vídeos 1 (MCF-7_C16), 2 (MCF-7_C16Rv), 3 (MCF-10A_C16), 4 (MCF10A_C16Rv), 5 (MDA_C16) e 6 (MDA_C16Rv).

Esses vídeos, assim como os de outros experimentos (Vídeo 1 até Vídeo 12), podem ser carregados no seguinte [link](#). As legendas referentes a cada vídeo se encontram na página 96 dessa tese.

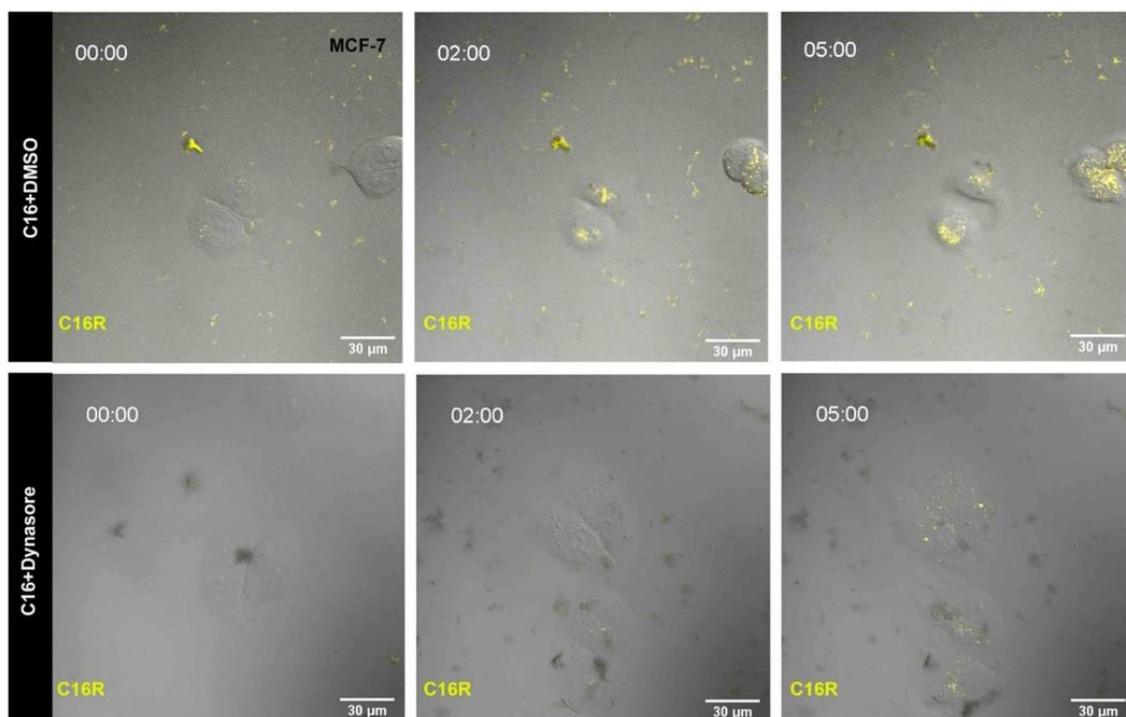
5.6 A inibição química da endocitose reduz a internalização de C16 pelas células MCF-7

Uma vez comprovada a internalização do peptídeo C16 pelas células de mama, passamos a investigar por qual via esse processo estaria ocorrendo.

Assim, as células MCF-7 foram incubadas com o peptídeo C16R juntamente com DMSO (controle) ou com o inibidor de dinamina (Dynasore) com o objetivo de comprovar a internalização do peptídeo através de vesículas.

Os resultados mostraram que o inibidor de dinamina retarda e diminui a internalização das vesículas contendo o peptídeo C16, corroborando com a hipótese de que ele poderia estar sendo endocitado (figura 14). O mesmo resultado também pode ser visto através dos vídeos 7 (MCF-7_DMSO_C16) e 8 (MCF-7_INIBIDOR_C16).

A



B

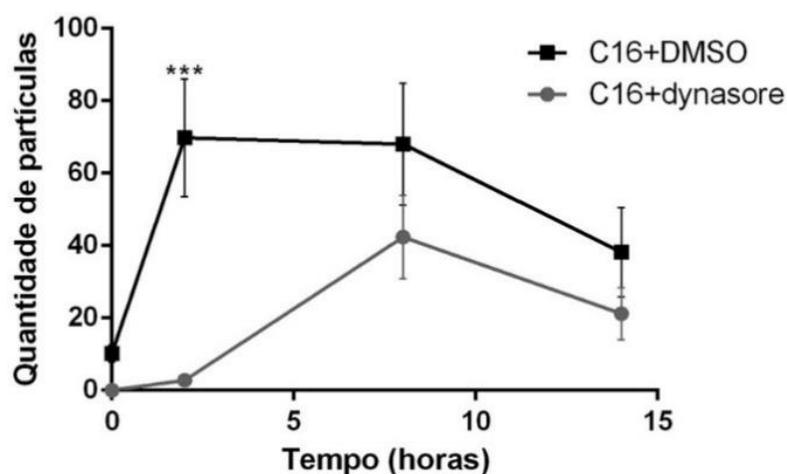


Figura 14. A endocitose do peptídeo C16 é reduzida pelo tratamento das células MCF-7 com o inibidor químico da dinamina. A – As imagens acima mostram as células tratadas com o peptídeo e DMSO (grupo controle, vídeo 7). Abaixo, imagens das células incubadas com o peptídeo e o inibidor de dinamina (vídeo 8). Observa-se que o peptídeo continua sendo endocitado na presença do inibidor. Imageamento por contraste interferencial diferencial (DIC) Aumento de 63X. B – Gráfico da contagem da quantidade de partículas nas células em relação ao tempo. Além de diminuir a internalização do peptídeo, o tratamento com inibidor também a retarda. Análise por ANOVA de dois caminhos seguido de pós teste de Bonferroni. * $P \leq 0,001$.

5.7 A endocitose do peptídeo C16 ocorre por meio de cavéolas

Através da técnica de RNA de interferência (RNAi), estudamos se a endocitose do peptídeo observada estaria ocorrendo de fato através de vesículas revestidas.

As células tratadas com RNAi contra a cadeia pesada da clatrina (CLHC) não apresentaram diminuição da endocitose do peptídeo C16-rodamina (C16R) (figura 15). Com relação às células tratadas com o peptídeo controle (C16RvR), não foi observada a formação de vesículas nesse tipo de ensaio. O C16RvR parece apenas recobrir as células.

Por outro lado, o *knockdown* da caveolina-1 (Cav-1) diminuiu significativamente a endocitose do peptídeo C16 pelas células de mama (figura 16). O comportamento do peptídeo C16RvR foi reproduzido como nos demais experimentos.

Figura 15. A endocitose do peptídeo C16 não acontece através de vesículas revestidas por clatrina. A – As imagens mostram as células MDA-MB-231 tratadas com o peptídeo e a sequência *scrambled* do RNAi contra a cadeia pesada da clatrina (CT CLHC). À esquerda células tratadas com o peptídeo C16 conjugado à rodamina (C16R); à direita imagens das células incubadas com o peptídeo controle (C16RvR). B – Células MDA-MB-231 tratadas com o peptídeo e RNAi contra a cadeia pesada da clatrina (RNAi CLHC). À esquerda células tratadas com o peptídeo C16 conjugado à rodamina (C16R); à direita imagens das células incubadas com o peptídeo controle (C16RvR). As linhas vermelhas nas fotos indicam as imagens X (horizontal) e Y (vertical) projetadas para gerar planos ortogonais XZ e YZ. As setas indicam a presença do peptídeo dentro da célula. Aumento de 40X. CLHC – cadeia pesada da clatrina. Barra de escala: 50 μm . C – Gráfico da contagem da quantidade de partículas nas células após os tratamentos. Observa-se que o peptídeo continua sendo endocitado, mesmo com o tratamento com RNAi. Análise por ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni.

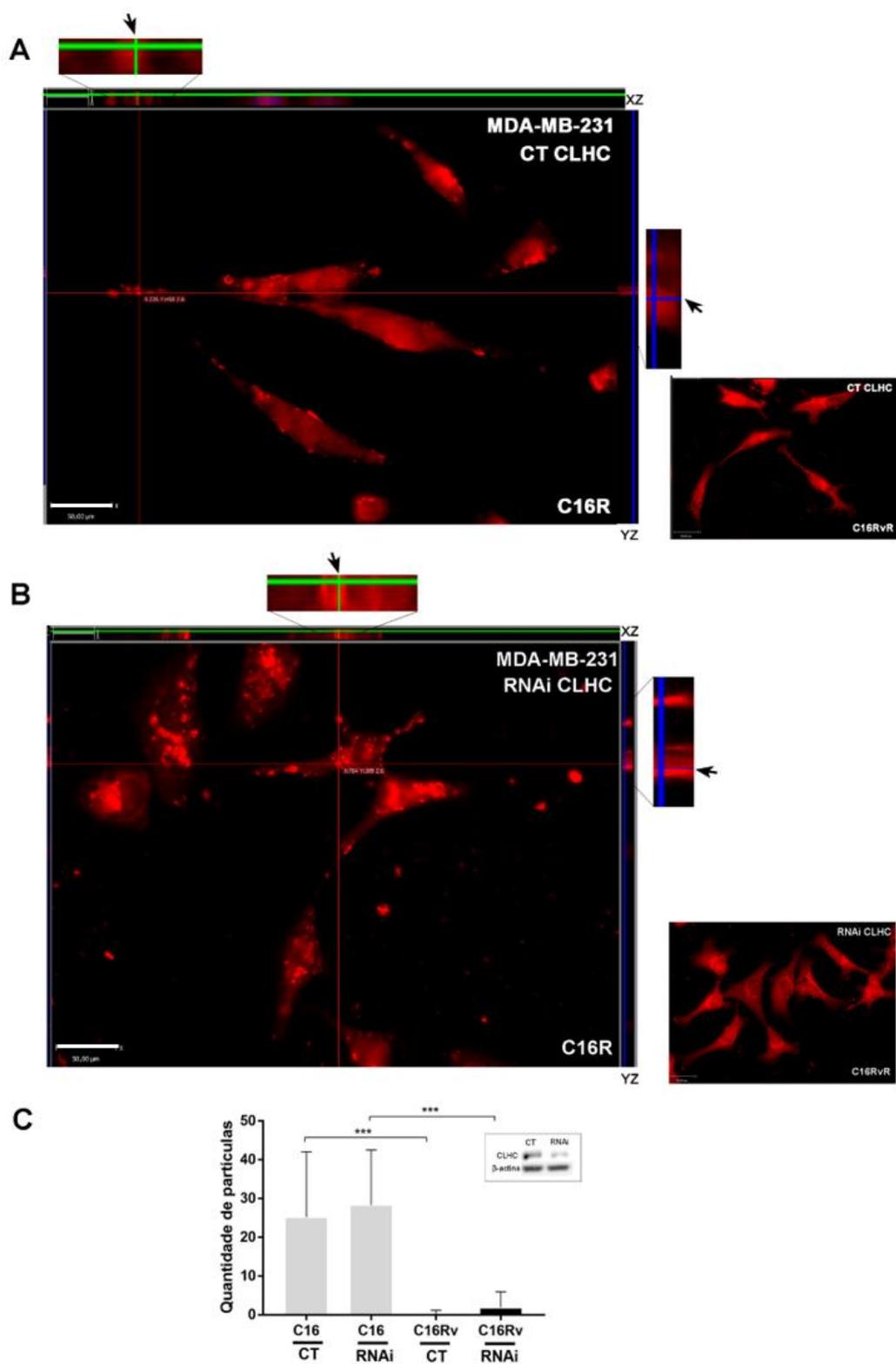


Figura 15. A endocitose do peptídeo C16 não acontece através de vesículas revestidas por clatrina

Figura 16. A endocitose do peptídeo C16 pelas células MDA-MB-231 ocorre através de vesículas revestidas por caveolina-1. A – As imagens mostram as células MDA-MB-231 tratadas com o peptídeo e a sequência *scrambled* do RNAi contra a caveolina-1 (CT Cav1). À esquerda células tratadas com o peptídeo C16 conjugado à rodamina (C16R); à direita imagens das células incubadas com o peptídeo controle (C16RvR). Barra de escala: 50µm. B – Células MDA-MB-231 tratadas com o peptídeo e RNAi contra a cadeia pesada da clatrina (RNAi CLHC). À esquerda células tratadas com o peptídeo C16 conjugado à rodamina (C16R); à direita imagens das células incubadas com o peptídeo controle (C16RvR). Barra de escala: 37µm. As linhas vermelhas nas fotos indicam as imagens X (horizontal) e Y (vertical), projetadas para gerar planos ortogonais XZ e YZ. As setas indicam a presença do peptídeo dentro da célula. Aumento de 40X. Cav1 – caveolina-1. C – Gráfico da contagem da quantidade de partículas nas células após os tratamentos. Observa-se que o tratamento com RNAi contra caveolina-1 foi capaz de reduzir significativamente a endocitose do peptídeo C16. Análise por ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni. ***P≤0,001.

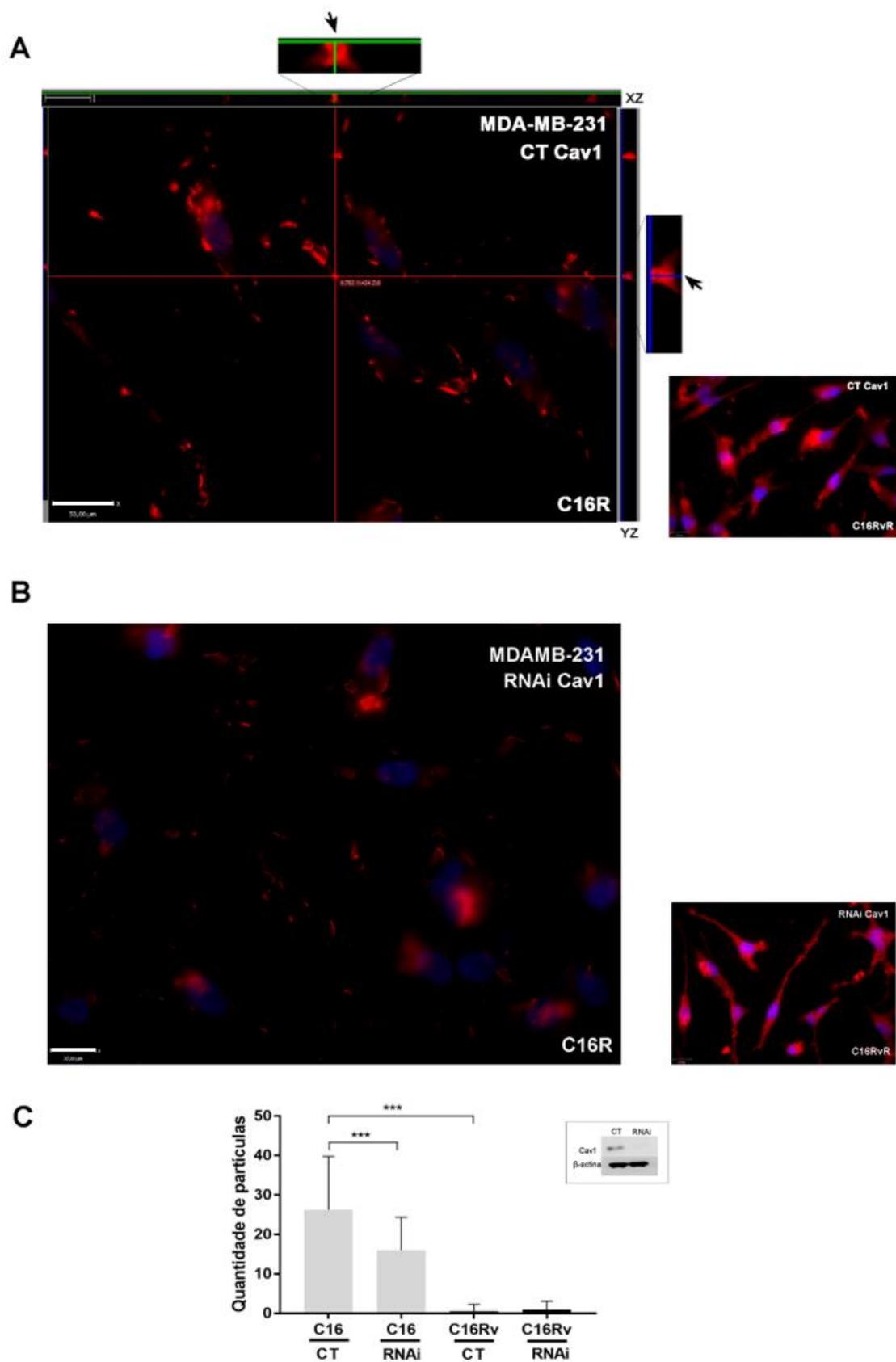


Figura 16. A endocitose do peptídeo C16 pelas células MDA-MB-231 ocorre através de vesículas revestidas por caveolina-1

5.8 Após sua internalização, o peptídeo C16 é direcionado para degradação nos lisossomos

Uma vez endocitado, nossa hipótese seria a de que o peptídeo C16 fosse direcionado para a via endocítica. Assim, fizemos a marcação de endossomos iniciais (EEA1), vesículas ácidas e lisossomos (LAMP1) em células tratadas com C16R ou C16RvR.

5.8.1 Apenas parte do peptídeo endocitado é encontrado em endossomos iniciais

Observamos então, que parte do peptídeo C16R co-compartimentaliza com a marcação para os endossomos iniciais, confirmando o direcionamento do peptídeo para a via endocítica (figura 17A). O peptídeo C16RvR não co-compartimentalizou com a marcação para EEA1 (figura 17B).

Figura 17. O peptídeo C16 está presente em endossomos iniciais. A – Células MDA-MB-231 tratadas com o peptídeo C16 conjugado à rodamina (C16R - vermelho) e com marcação para endossomos iniciais (EEA1 – verde). À esquerda, as linhas vermelhas indicam as imagens X (horizontal) e Y (vertical), projetadas para gerar planos ortogonais XZ e YZ. As setas indicam as regiões de co-compartimentalização (amarelo). À esquerda, na primeira imagem, zoom destacando as duas células. Abaixo, imagem da marcação para EEA1 em verde e da marcação do C16R, em vermelho. Barra de escala: 50 μ m. B – Células MDA-MB-231 tratadas com o peptídeo C16Rv conjugado à rodamina (C16RvR - vermelho) e com marcação para endossomos iniciais (EEA1 – verde). À esquerda, merge entre os dois canais; à direita acima, apenas o canal para EEA1 e, abaixo, apenas o canal para o C16RvR. Barra de escala: 37 μ m. Aumento de 40X.

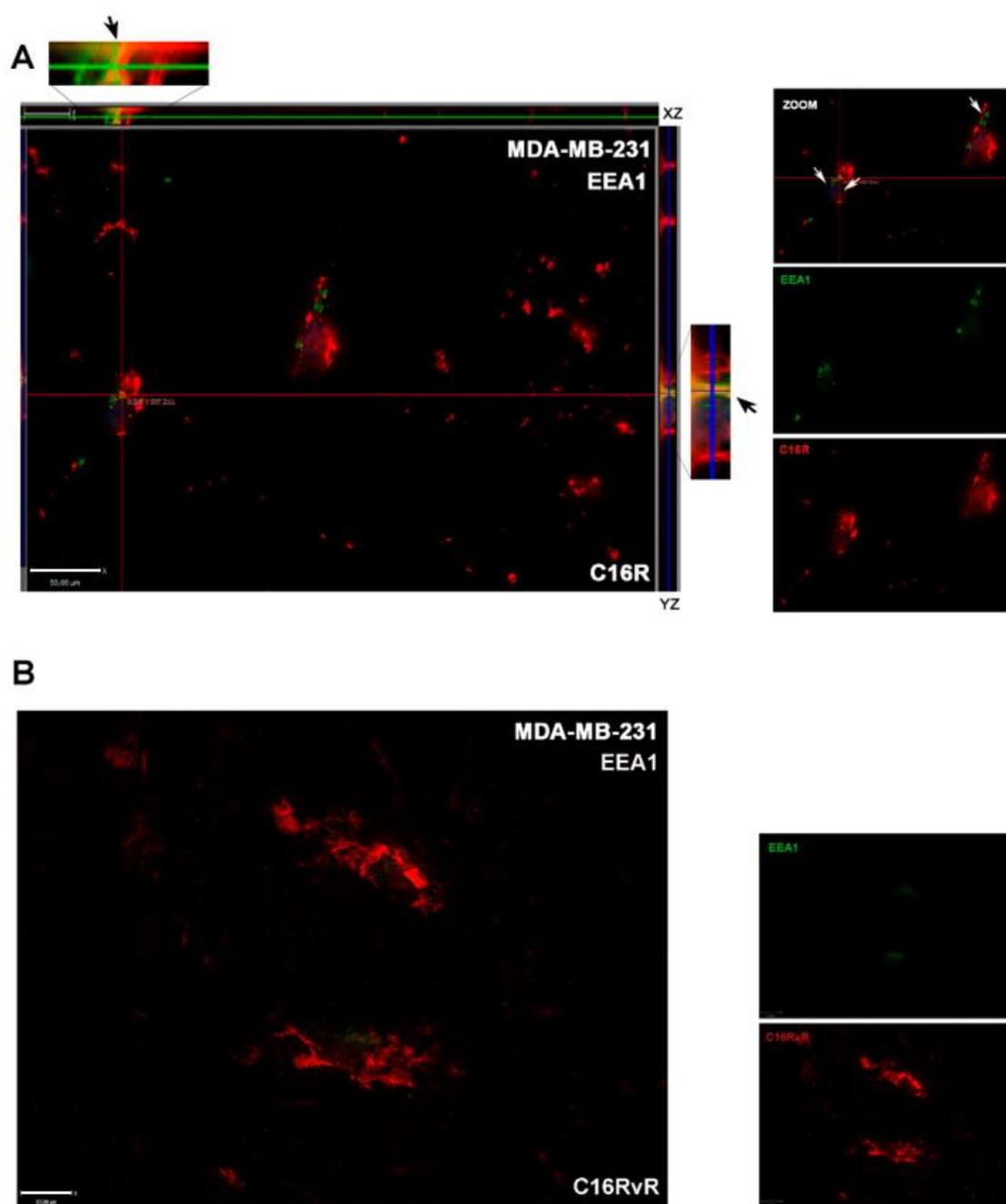


Figura 17. O peptídeo C16 está presente em endossomos iniciais

5.8.2 *O peptídeo C16 também está presente em lisossomos*

As células das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 foram incubadas com marcador de vesículas ácidas (figuras 18 e 19, respectivamente) para confirmar o direcionamento do peptídeo C16 para a via endocítica.

As imagens obtidas mostraram que parte do peptídeo endocitado estaria de fato sendo direcionado para vesículas ácidas nos dois tipos celulares, o que fica evidente através da colocação das cores amarelo e ciano, gerando a cor branca (figuras 18B e 19B). Tal fenômeno foi observado tanto para C16 quanto para C16Rv. Esse resultado também pode ser observado nos vídeos 9 (MCF-7_LYSO_C16), 10 (MCF-7_LYSO_C16Rv), 11 (MDA-MB-231_LYSO_C16) e 12 (MDA_LYSO_C16Rv).

Figura 18. O peptídeo C16 é encontrado dentro vesículas ácidas de células MCF-7. A – Acima, C16-rodamina (C16R; amarelo), abaixo, C16Rv-rodamina (C16RvR; amarelo). Vesículas ácidas coradas por Lyso Tracker Green representadas pela pseudocor azul ciano (vídeos 9 e 10). B – Quadro destacado em projeção ortogonal. As linhas verde e vermelha indicam as imagens XY, respectivamente, projetadas para gerar planos ortogonais XZ e YZ. A região branca indicada pelas setas evidencia a sobreposição das cores ciano (lisossomo) e amarelo (peptídeo). As células são imageadas por contraste interferencial diferencial (DIC). Aumento de 63X.

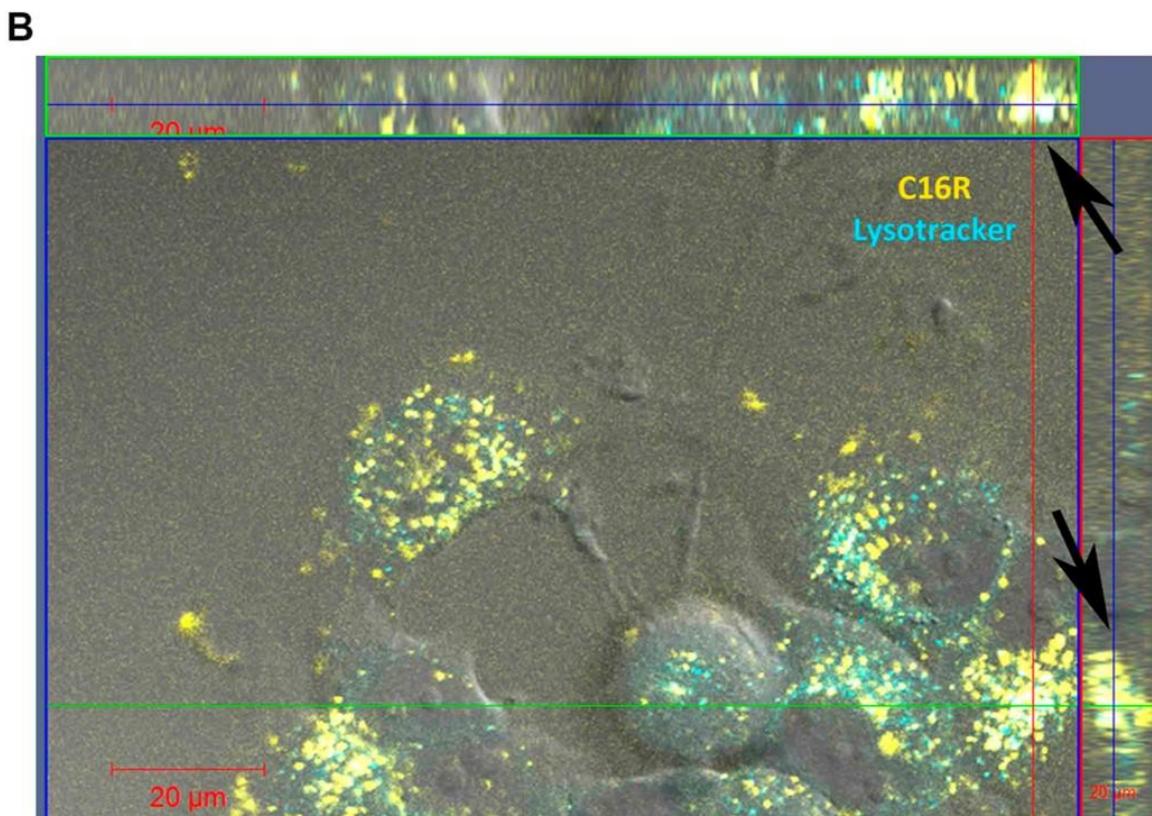
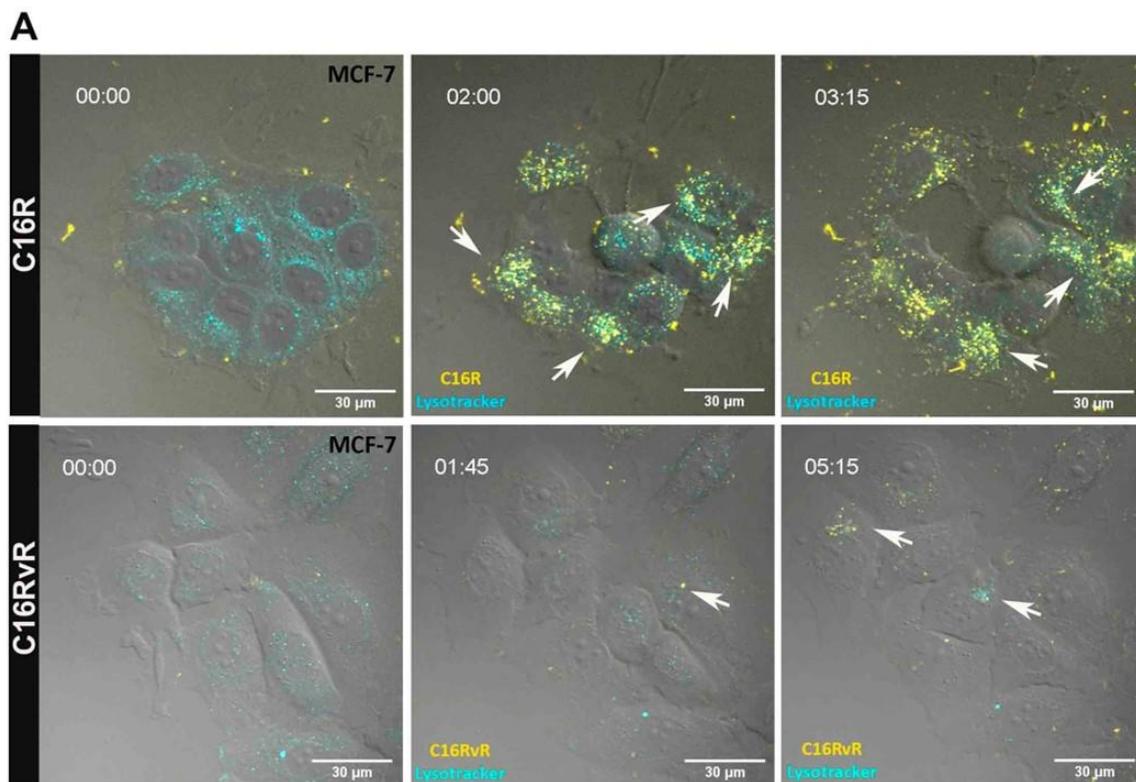


Figura 18. O peptídeo C16 é encontrado dentro vesículas ácidas de células MCF-7

Figura 19. O peptídeo C16 também é encontrado em vesículas ácidas de células MDA-MB-231. A – Acima, C16 conjugado à rodamina (amarelo, vídeo 11), abaixo, C16Rv conjugado à rodamina (amarelo, vídeo 12). Vesículas lisossomais coradas por Lyso Tracker Green representadas em pseudocor azul ciano. Em destaque, as células apontam a sobreposição entre a marcação amarela e ciano (branco). B - Células MDA-MB-231 em projeção ortogonal. As linhas verde e vermelha indicam as imagens XY, respectivamente, projetadas para gerar planos ortogonais XZ e YZ. O ponto branco indicado por cada linha evidencia a co-compartimentalização entre o peptídeo e os lisossomos. As células são imageadas por contraste interferencial diferencial (DIC). Aumento de 63X.

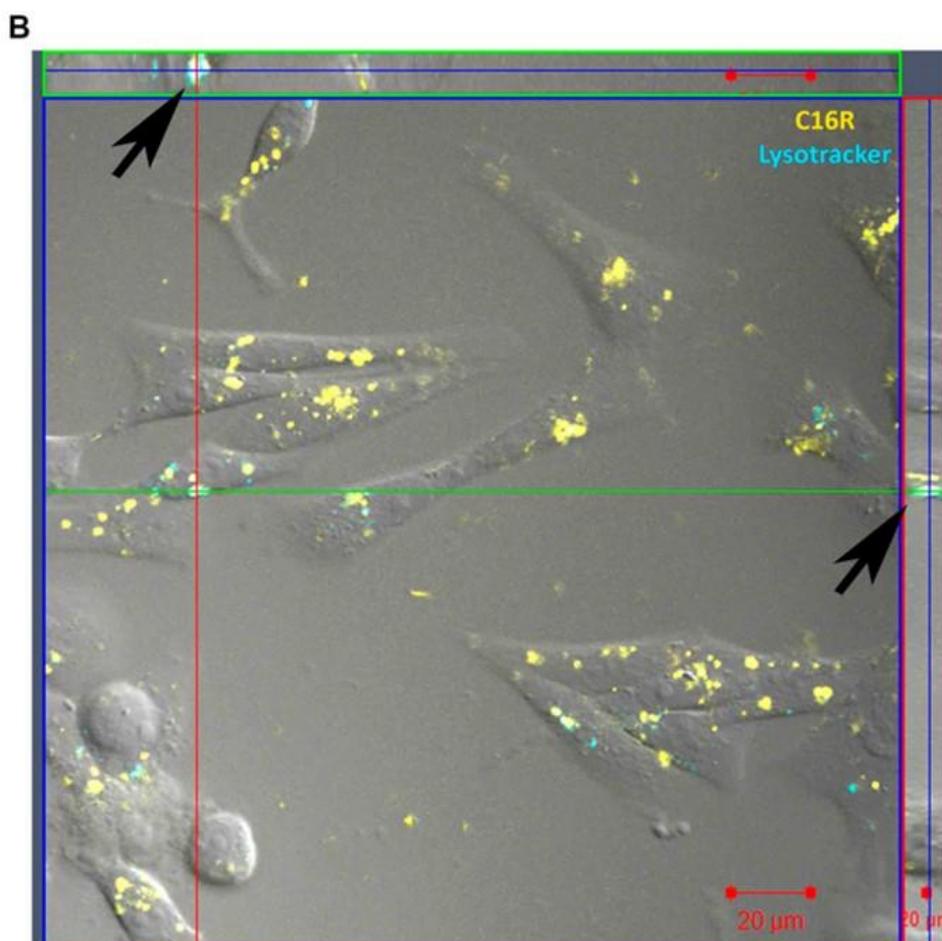
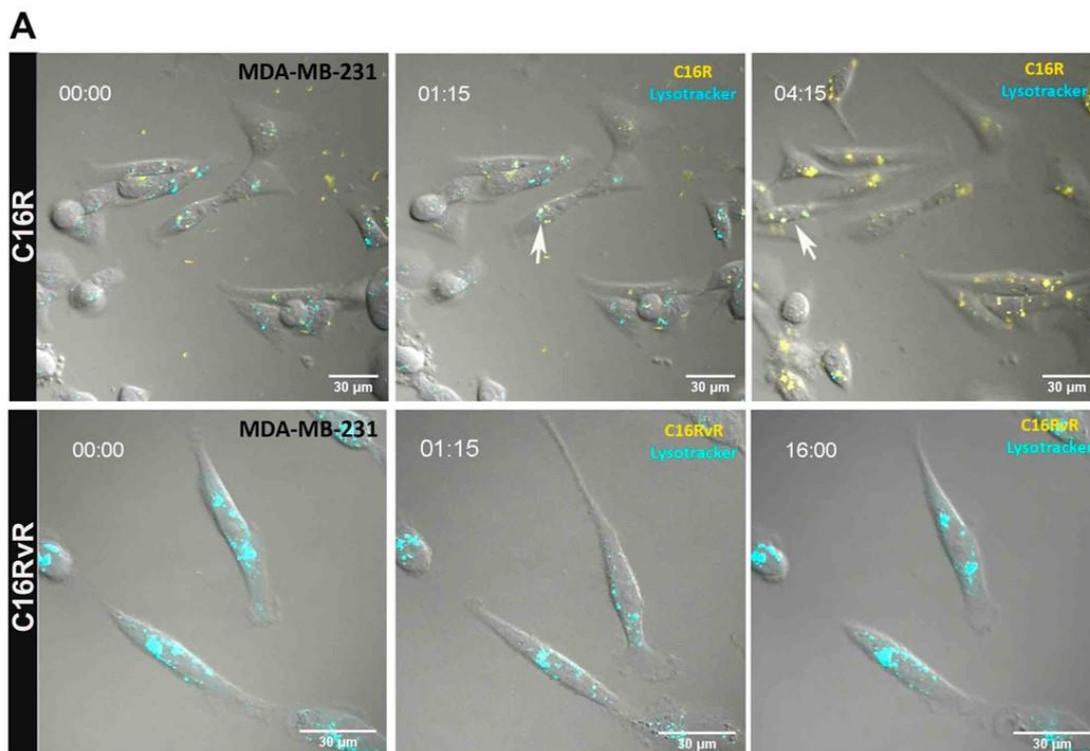


Figura 19. O peptídeo C16 também é encontrado em vesículas ácidas de células MDA-MB-231

Além disso, a imunofluorescência para LAMP1, um marcador específico para lisossomos, reforça a co-compartimentalização entre essas organelas e o peptídeo C16, confirmando que parte desse peptídeo é direcionado para degradação em lisossomos após internalização (figura 20A). Não foram encontradas regiões de co-compartimentalização entre o peptídeo controle e LAMP1 (figura 20B).

Figura 20. C16 está presente em lisossomos. A – Células MDA-MB-231 tratadas com o peptídeo C16 conjugado à rodamina (C16R - vermelho) e com marcação para lisossomos (LAMP1 – verde). À esquerda, as linhas vermelhas indicam as imagens X (horizontal) e Y (vertical), projetadas para gerar planos ortogonais XZ e YZ. As setas indicam as regiões de co-compartimentalização (amarelo). À direita, imagem da marcação para LAMP1 em verde e da marcação do C16R em vermelho. Barra de escala: 55 μ m. B – Células MDA-MB-231 tratadas com o peptídeo C16Rv conjugado à rodamina (C16RvR - vermelho) e com marcação para lisossomos (LAMP1 – verde). À esquerda, merge entre os canais verde e vermelho; à direita acima, apenas o canal para LAMP1 e, abaixo, apenas o canal para o C16RvR. Barra de escala: 37 μ m. Aumento de 40X.

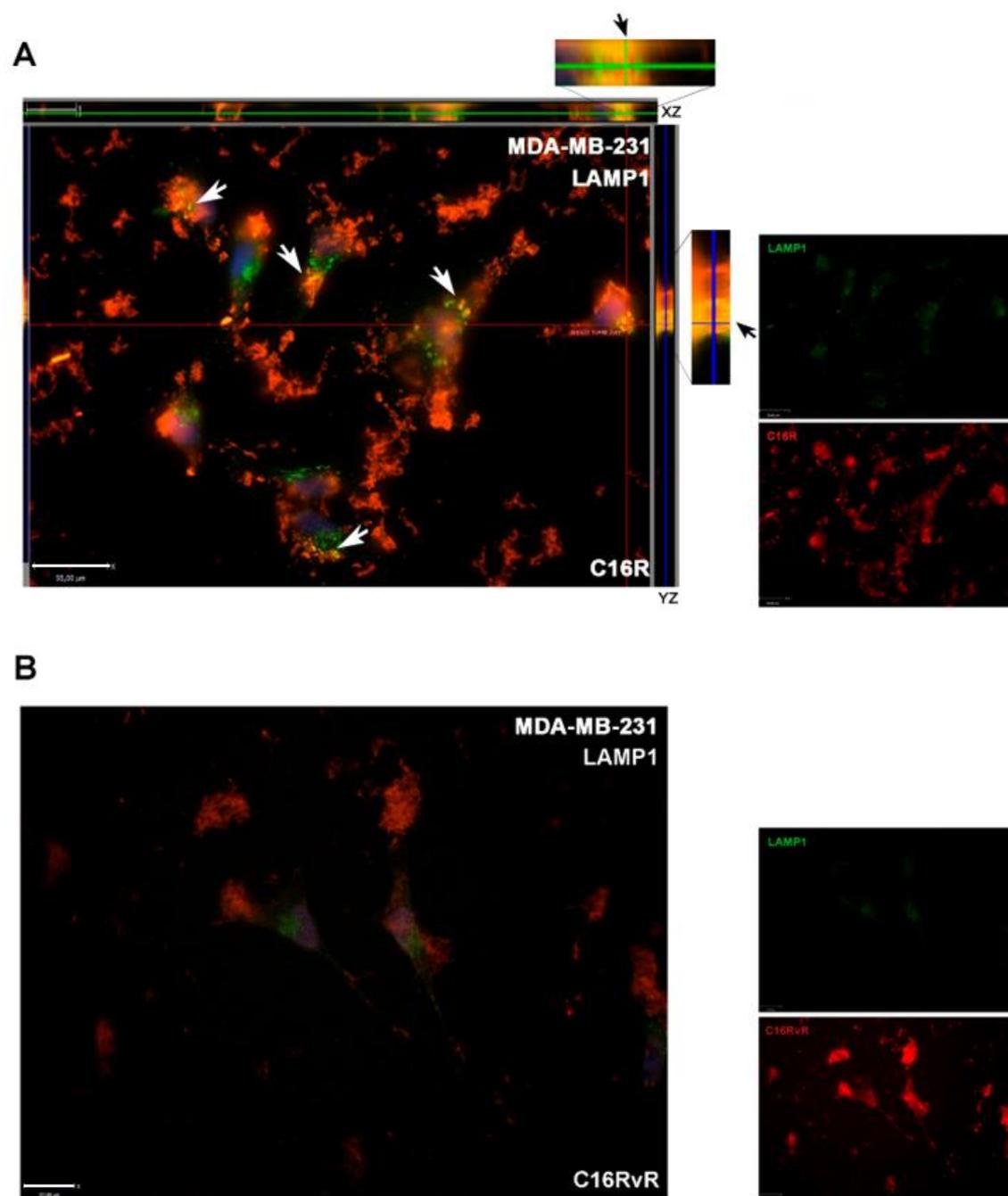


Figura 20. C16 está presente em lisossomos

6 DISCUSSÃO

Ponce, Nomizu e Kleinman (2001) identificaram o heterodímero $\alpha 5\beta 1$ como um dos receptores do peptídeo C16 relacionados a sua atividade angiogênica em células endoteliais HUVEC. Além disso, dados anteriores do nosso grupo mostraram que o peptídeo C16 decora a membrana de células tumorais e que os efeitos observados pelo tratamento das células com esse peptídeo poderiam estar relacionados com a ativação da subunidade $\beta 1$ da integrina (SIQUEIRA et al., 2016). Esses dados nos motivaram a estudar a existência de uma possível interação entre o peptídeo e esse receptor, assim como os possíveis efeitos resultantes desse fenômeno em células mamárias.

Esse trabalho mostrou que as células de mama MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 aderem ao peptídeo C16 e que essa adesão é diminuída por quelantes de íons divalentes em células MCF-7 e pelo *knockdown* da integrina $\beta 1$ em células MDA-MB-231. Nossas análises também indicam que o peptídeo C16 conjugado à rodamina colocaliza com a integrina $\beta 1$ ativa nessas células mamárias. Além disso, de acordo com os dados obtidos por citometria de fluxo, o peptídeo ativa esse receptor. Em seguida, as análises das amostras de células MDA-MB-231 tratadas com C16 conjugado a partículas de *Nanogold* mostraram o peptídeo decorando a membrana e dentro de vesículas intracelulares. Foi também demonstrado por microscopia confocal que o C16 é internalizado pelas células de mama com o passar do tempo e que essa internalização é diminuída por inibidor químico de dinamina em células MCF-7 e por RNAi contra caveolina-1 em células MDA-MB-231. Após a endocitose, parte desse peptídeo é direcionado para via endocítica, tendo sido encontrado em endossomos iniciais e em lisossomos.

Cátions divalentes são muito importantes para a ativação das integrinas, desde o processo de alteração da sua conformação para um estado estendido até a separação das subunidades α e β , inclusive determinando seu grau de afinidade aos ligantes (HUMPHRIES, 1996; BAZZONI; HEMLER, 1998; ZHANG; CHEN, 2012). Esses íons interagem com sítios de ligação a íons no domínio da subunidade tipo I β dessas proteínas (TAKADA; YE; SIMON, 2007). Assim, fizemos o tratamento das células de mama com os ácidos EDTA e EGTA, amplamente conhecidos por sua ação como quelantes de cátions divalentes, a fim de entendermos se a adesão das células ao peptídeo C16 teria relação com a atividade de integrinas.

Nesse contexto, nossos ensaios de adesão mostraram que as células de mama MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 aderem ao peptídeo C16. Além disso, observamos também que essa adesão ao peptídeo é sensível aos quelantes EDTA e EGTA nas células tumorais da linhagem MCF-7, ao contrário do que é observado nas células de linhagem *normal like*, MCF-10A. Entretanto, a queda da adesão ao peptídeo observada é apenas parcial, o que indica que possivelmente esse fenômeno ocorra através da interação do peptídeo não apenas as integrinas, mas também com receptores do tipo não integrina.

Sendo assim, lançamos mão da técnica de RNAi para buscar de maneira mais objetiva uma resposta sobre a relação entre a atividade da subunidade $\beta 1$ da integrina e a adesão das células de estudo ao C16. Nesse sentido, observamos que apenas as células tumorais metastáticas (MDA-MB-231) apresentaram uma redução significativa da sua adesividade ao peptídeo nessas condições, demonstrando a importância da participação da subunidade $\beta 1$ da integrina na adesão dessas células ao peptídeo C16. Por outro lado, fica claro que a atividade dessa subunidade especificamente não é determinante para a adesão das células MCF-7 e MCF-10A a esse peptídeo.

Corroborando com nossos dados, Sundaram e colaboradores (2017) mostraram que o *knockdown* para integrina $\beta 1$ em células MDA-MB-231 altera negativamente sua capacidade de adesão e migração, demonstrando a importância dessa subunidade na atividade invasiva das células de linhagem de câncer de mama metastático. Com isso, nossos resultados reforçam a importância da atividade da subunidade $\beta 1$ da integrina na capacidade adesiva dessa linhagem e demonstram a relação desse receptor com o papel desempenhado pelo peptídeo C16 nessas células.

Tendo em vista a adesividade das linhagens ao C16, investigamos a colocalização entre o mesmo e a integrina $\beta 1$ ativada nas três linhagens de estudo. Os resultados mostraram então que essa colocalização acontece nos três tipos de células. Isso demonstra que a integrina $\beta 1$ pode não estar envolvida com a adesão de MCF-7 e MCF-10A ao peptídeo C16, mas pode ter participação em possíveis atividades exercidas por esse peptídeo nessas células.

Uma vez identificada a participação da integrina $\beta 1$ na adesão das células MDA-MB-231 ao C16, estudamos se ele seria capaz de ativar essa integrina nessa linhagem celular. Com isso, observamos que o peptídeo foi capaz de ativar a integrina $\beta 1$ em células de câncer de mama metastático. Entretanto, de maneira inesperada, o

peptídeo C16Rv também ativou a integrina $\beta 1$. Esses resultados corroboram em parte com dados anteriores do nosso grupo, através dos quais foi mostrado que o peptídeo C16 também ativou a integrina $\beta 1$ em células de carcinoma epidermóide de boca e fibrosarcoma. Entretanto, naquele trabalho, foi detectada diferença nas intensidades de fluorescência entre o peptídeo e seu controle (SIQUEIRA et al., 2016). Naquele caso, o controle correspondia a uma sequência embaralhada (*scrambled*) do peptídeo e não a uma sequência reversa, como utilizado aqui. Assim, a similaridade na ativação da integrina $\beta 1$ por ambos C16 e C16Rv encontrada nesse trabalho pode estar associada a uma atividade da sequência reversa do peptídeo identificada nesse tipo de experimento, já que esse controle se mostrou bastante eficiente nos demais ensaios.

Na sequência, nossos dados de microscopia eletrônica e confocal mostraram que somente o peptídeo C16, e não seu controle, após interagir com a membrana celular, é internalizado. Assim, passamos a investigar se o peptídeo endocitado avançaria para sua degradação através da via endocítica-lisossomal.

Já se sabe que muitos ligantes, após interagirem com seus receptores, acabam sendo internalizados junto com os mesmos e sendo encaminhados para degradação nos lisossomos através das vesículas endocíticas. O processo de formação dessas vesículas requer a atividade de proteínas acessórias, as quais são importantes para formação, revestimento e liberação das vesículas no meio intracelular (DOHERTY; MCMAHON, 2009).

Nesse contexto, com a intenção de abordar em mais detalhes o processo de endocitose do peptídeo C16, tratamos as células MCF-7 com um inibidor químico da dinamina, uma proteína responsável pela liberação de vesículas revestidas por clatrina ou caveolina no citoplasma da célula (OH; MCINTOSH; SCHNITZER, 1998; SINGH; JADHAV; BHATT, 2017). Assim, observamos que o tratamento retarda e diminui a internalização do peptídeo, sugerindo que a sua endocitose pode estar ocorrendo por meio de vesículas revestidas.

Dessa forma, em seguida, realizamos experimentos com RNA de interferência contra a cadeia pesada da clatrina e caveolina-1 com a finalidade de confirmar a endocitose do peptídeo e investigar por qual via ela estaria ocorrendo. Então, nossos resultados mostraram que a internalização do C16 ocorre por meio de cavéolas, uma vez que eles demonstraram uma redução significativa do número de vesículas após *knockdown* da caveolina-1.

De acordo com a literatura, as cavéolas podem ser internalizadas mediante estímulo, o qual ocorre através de vários tipos de agentes, tais como, vírus, toxinas, lipídios e receptores (MONTESANO et al., 1982; PELKMANS; PÜNTENER; HELENIUS, 2002; SHARMA et al., 2004).

Após internalizada, a vesícula revestida por caveolina pode seguir por diversos caminhos: voltar à membrana da célula, se fundir a corpos multivesiculares ou se fundir ao endossomo inicial (PELKMAN; KARTENBECK; HELENIUS, 2001; PELKMANS et al., 2004; SHARMA et al., 2004; KIRKHAM et al., 2005). Nesse último caso, os receptores de membrana associados a seus ligantes são direcionados para os endossomos iniciais, onde se dá o início da seleção do material endocitado (KALAIIDZIDIS et al., 2015). Durante os sucessivos processos de separação vão sendo formadas vesículas intraluminais contendo o material a ser degradado. Essas vesículas se acidificam e amadurecem em endossomos tardios que, por sua vez, se fundem entre si formando corpos multivesiculares. Esses compartimentos podem então tanto serem direcionados para a membrana, para liberarem seu conteúdo no meio extracelular, quanto se unir aos lisossomos, onde o material é finalmente degradado (BABST et al., 2002; SAFTIG; KLUMPERMAN, 2009).

Nesse contexto, nossos resultados mostraram que o peptídeo C16 compartimentaliza com marcadores para vesículas ácidas (Lyso Tracker), com os antígenos de endossomos iniciais (EEA1) e com as proteínas de membrana associadas a lisossomos (LAMP1), o que indica que o peptídeo, após endocitado por vesículas revestidas por caveolina, é direcionado para a via endocítica-lisossomal (figura 21). Entretanto, notamos também que apenas parte desse material endocitado é direcionado para a via de degradação.

Paralelamente a formação das vesículas intraluminais, existe a seleção das proteínas e ligantes que passarão pelo processo de reciclagem. O conteúdo selecionado pode retornar a membrana tanto por um processo chamado de reciclagem rápida, através do qual o material é direcionado diretamente de volta para a membrana, quanto através do compartimento de reciclagem endocítica (chamada reciclagem lenta). Nesse caso, o material acaba sendo direcionado para a rede *trans* de Golgi, onde sofrerá modificações e será então encaminhado para a via secretória, através de um processo chamado transporte retrógrado (SAFTIG; KLUMPERMAN, 2009; CULLEN; STEINBERG, 2018).

A distribuição dessas vesículas no interior da célula acontece através de um processo dinâmico, o qual é coordenado pela atividade de diversos complexos proteicos, dentre os quais estão as GTPases da família Rab (JORDENS et al., 2005). Essas proteínas estão envolvidas com a seleção do conteúdo das vesículas, seu brotamento na membrana, direcionamento e fusão nos compartimentos alvo. Alguns exemplos de Rab são as Rabs 4, 5, 7, 9 e 11. A Rab4, por exemplo, caracteriza aqueles endossomos iniciais que serão direcionados para a via de reciclagem (DARO et al., 1996). A Rab5, cujo efetor é o EEA1, regula o transporte de vesículas recém-formadas da membrana aos endossomos iniciais (MENDOZA; DIAZ; TORRES, 2014; GONZÁLEZ; LAZO; BRONFMAN, 2019). A Rab7, associada tanto a endossomos quanto a lisossomos, é reconhecida por participar da maturação dos endossomos, do transporte dos endossomos tardios para os lisossomos e da regulação do movimento dessas organelas ao longo do citoesqueleto (RINK et al., 2005; VONDERHEIT; HELENIUS, 2005). A Rab9 está envolvida com o transporte dos endossomos tardios à região *trans* do complexo de Golgi (MURRAY et al., 2005). A Rab11, por fim, está envolvida basicamente com o transporte de vesículas de reciclagem (WILCKE et al., 2000; CAMPA; HIRSCH, 2017).

Dessa forma, nossa hipótese é a de que aquele peptídeo que não está sendo encaminhado para a degradação nos lisossomos talvez esteja retornando à membrana ou até sendo secretado através de vesículas extracelulares por meio da via de reciclagem de receptores (figura 21).

Tendo em vista a possível interação da integrina $\beta 1$ com o peptídeo C16, assim como sua ativação pelo mesmo, acreditamos na hipótese que esse peptídeo possa estar sendo internalizado juntamente com esse receptor. Isso porque a função das cavéolas também é associada à internalização e reciclagem da integrina $\beta 1$, uma vez que glicosíngolipídeos causam *clustering* desses receptores, estimulando a endocitose das cavéolas, dados esses que também associam essas estruturas à participação no processo de adesão e sinalização das células tumorais (SHARMA et al., 2005; HYNES; NABA, 2012; DE FRANCESCHI et al., 2015).

Entretanto, são necessários estudos futuros que visem caracterizar em maiores detalhes as vesículas que contém esse peptídeo, por exemplo através da marcação das proteínas Rab descritas acima; além de verificar se aquele peptídeo que não foi direcionado para os lisossomos estaria retornando para a membrana celular

associado a integrina β_1 , confirmando assim sua presença em um processo de reciclagem.

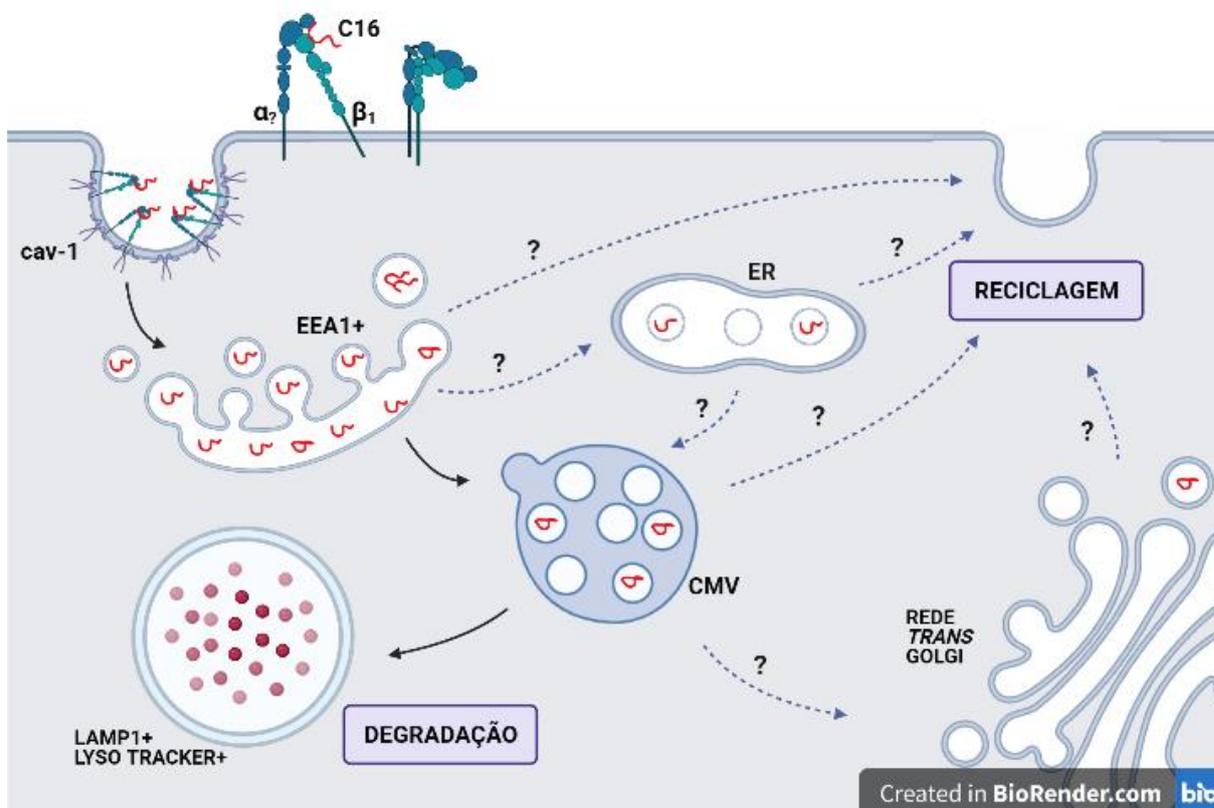


Figura 21. Diagrama esquemático mostrando a endocitose do peptídeo C16 por células MDA-MB-231. O peptídeo C16 (vermelho) ativa a integrina β_1 (verde), é internalizado por vesículas revestidas por caveolina-1 (cav-1) e segue para os endossomos iniciais (EEA1+). Esses endossomos dão origem às vesículas intraluminais (não representadas), as quais se fundem formando corpos multivesiculares (CMV) que, por sua vez, se unem aos lisossomos (LAMP1+ e Lyso Tracker+). As setas tracejadas indicam os demais possíveis caminhos percorridos pelo peptídeo C16 até voltar à membrana através da via de reciclagem, mas que permanecem por serem investigados. ER: endossomo de reciclagem. Essa ilustração foi criada através da ferramenta BioRender (www.biorender.com).

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados nos levaram às seguintes conclusões:

- 1- As células de mama MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 aderem ao peptídeo C16, mas não a seu controle C16Rv, sendo a subunidade $\beta 1$ da integrina importante para a adesão das células de câncer metastático (MDA-MB-231) a esse peptídeo;
- 2- O peptídeo C16 colocaliza com a integrina $\beta 1$ ativada nas três linhagens estudadas;
- 3- O peptídeo C16 ativa a subunidade $\beta 1$ da integrina em células MDA-MB-231;
- 4- O peptídeo C16 está associado à membrana de vesículas de células MDA-MB-231;
- 5- O peptídeo C16 é endocitado por vesículas revestidas por caveolina-1 e é direcionado em parte para degradação em lisossomos através de endossomos iniciais em células de câncer de mama metastático.

REFERÊNCIAS*1

- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ALBRECHTSEN, R. et al. Basement Membrane Changes in Breast Cancer Detected by Immunohistochemical Staining for Laminin. **Cancer Research**, v. 41, n. December, p. 5076–5081, 1981.
- AUMAILLEY, M. The laminin family. **Cell Adhesion and Migration**, v. 7, n. 1, p. 48–55, 2013.
- BABST, M. et al. ESCRT-III: An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting. **Developmental Cell**, v. 3, n. 2, p. 271–282, 2002.
- BARCZYK, M.; CARRACEDO, S.; GULLBERG, D. Integrins. **Cell and Tissue Research**, v. 339, n. 1, p. 269–280, 2010.
- BAZZONI, G.; HEMLER, M. E. Are changes in integrin affinity and conformation overemphasized? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 30–34, 1998.
- BELIVEAU, A. et al. Raf-induced MMP9 disrupts tissue architecture of human breast cells in three-dimensional culture and is necessary for tumor growth in vivo. **Genes and Development**, v. 24, n. 24, p. 2800–2811, 2010.
- BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 786–801, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3904>>.
- BRASSART-PASCO, S. et al. Tumor Microenvironment: Extracellular Matrix Alterations Influence Tumor Progression. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. April, p. 1–13, 2020.
- BRYAN, C. D.; CHIEN, C. Bin; KWAN, K. M. Loss of laminin alpha 1 results in multiple structural defects and divergent effects on adhesion during vertebrate optic cup morphogenesis. **Developmental Biology**, v. 416, n. 2, p. 324–337, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.06.025>>.
- CAIRES-DOS-SANTOS, L. et al. Laminin-derived peptide C16 regulates Tks expression and reactive oxygen species generation in human prostate cancer cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 1, p. 587–598, 2020.
- CAMPA, C. C.; HIRSCH, E. Rab11 and phosphoinositides: A synergy of signal transducers in the control of vesicular trafficking. **Advances in Biological Regulation**, v. 63, p. 132–139, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbior.2016.09.002>>.
- CARVALHO, M. R. et al. Peptide-Modified Dendrimer Nanoparticles for Targeted Therapy of Colorectal Cancer. **Advanced Therapeutics**, v. 2, n. 11, p. 1900132, 2019.
- CASWELL, P. T.; VADREUVU, S.; NORMAN, J. C. Integrins: Masters and slaves of endocytic transport. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 12, p. 843–

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

853, 2009.

CHANG, J.; CHAUDHURI, O. Beyond proteases: Basement membrane mechanics and cancer invasion. **Journal of Cell Biology**, v. 218, n. 8, p. 2456–2469, 2019.

CHEN, X. et al. Peptide SIKVAV-modified chitosan hydrogels promote skin wound healing by accelerating angiogenesis and regulating cytokine secretion. **American Journal of Translational Research**, v. 10, n. 12, p. 4258–4268, 2018.

CHUNG, A. E. et al. <1-S2.0-0092867479900059-Main.Pdf>. v. 16, n. February, p. 277–287, 1979.

CLOUTIER, G.; SALLENBACH-MORRISSETTE, A.; BEAULIEU, J. F. Non-integrin laminin receptors in epithelia. **Tissue and Cell**, v. 56, n. October 2018, p. 71–78, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.12.005>>.

COLDITZ, G. A. et al. Family history and risk of breast cancer: Nurses' health study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, n. 3, p. 1097–1104, 2012.

CULLEN, P. J.; STEINBERG, F. To degrade or not to degrade: mechanisms and significance of endocytic recycling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 11, p. 679–696, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41580-018-0053-7>>.

DARO, E. et al. Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 18, p. 9559–9564, 3 set. 1996. Disponível em: <<https://www.pnas.org/content/93/18/9559>>. Acesso em: 21 mar. 2021.

DE FRANCESCHI, N. et al. Integrin traffic-the update. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 5, p. 839–852, 2015.

DOHERTY, G. J.; MCMAHON, H. T. Mechanisms of endocytosis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 857–902, 2009.

DOS SANTOS, P. B. et al. Beta 1 integrin predicts survival in breast cancer: A clinicopathological and immunohistochemical study. **Diagnostic Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2012.

DU, X. L.; FOX, E. E.; LAI, D. Competing causes of death for women with breast cancer and change over time from 1975 to 2003. **American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials**, v. 31, n. 2, p. 105–116, 2008.

EBLE, J. A.; NILAND, S. The extracellular matrix in tumor progression and metastasis. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 36, n. 3, p. 171–198, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10585-019-09966-1>>.

ELKIN, S. R.; LAKODUK, A. M.; SCHMID, S. L. Endocytic pathways and endosomal trafficking: a primer. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 166, n. 7–8, p. 196–204, 2016.

ENGEL, J. et al. Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix. **Journal of Molecular Biology**, v. 150, n. 1, p. 97–120, 1981.

FENG, Y. et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes and Diseases**, v. 5, n. 2, p. 77–106, 2018. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>>.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 24, p. 4195–4200, 2010.

FREITAS, V. M. et al. Laminin-1 and SIKVAV a laminin-1-derived peptide, regulate the morphology and protease activity of a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line. **Oral Oncology**, v. 40, n. 5, p. 483–489, 2004.

FREITAS, V. M. et al. SIKVAV, a laminin α 1-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. **American Journal of Pathology**, v. 171, n. 1, p. 124–138, 2007.

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 Archiv**, v. 441, n. 6, p. 569–576, 2002.

FURUTA, S. et al. **Laminin signals initiate the reciprocal loop that informs breast-specific gene expression and homeostasis by activating no, p53 and micrnas.** [s.l: s.n.]v. 7

GAMA-DE-SOUZA, L. N. et al. Adhesion and protease activity in cell lines from human salivary gland tumors are regulated by the laminin-derived peptide AG73, syndecan-1 and β 1 integrin. **Matrix Biology**, v. 27, n. 5, p. 402–419, 2008.

GEHLSSEN, K. R. et al. The Human Laminin Receptor is a Member of the Integrin Family of Cell Adhesion Receptors Author (s): Kurt R . Gehlsen , Lena Dillner , Eva Engvall and Erkki Ruoslahti Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://.> v. 241, n. 4870, p. 1228–1229, 2018.

GIANCOTTI, F. G.; RUOSLAHTI, E. Integrin Signaling. **Science**, v. 285, n. August, p. 1028–1033, 1999.

GINSBERG, M. H.; PARTRIDGE, A.; SHATTIL, S. J. Integrin regulation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 17, n. 5 SPEC. ISS., p. 509–516, 2005.

GONZÁLEZ, A. G.; LAZO, O. M.; BRONFMAN, F. C. The Rab5-Rab11 endosomal pathway is required for BDNF-induced CREB transcriptional regulation in neurons. **bioRxiv**, n. Septêmber, 2019.

GRAF, J. et al. 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.

GRUENBERG, J.; MAXFIELD, F. R. Membrane transport in the endocytic pathway. **Current opinion in cell biology**, v. 7, p. 552–563, 1995.

GUDJONSSON, T. et al. Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 1, p. 39–50, 2002.

HAMIDI, H.; IVASKA, J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. **Nature Reviews Cancer**, p. 1–16, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41568-018-0038-z>>.

HARDER, T.; SIMONS, K. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-

cholesterol microdomains. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, n. 4, p. 534–542, 1997.

HASSIOTOU, F.; GEDDES, D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. **Clinical Anatomy**, v. 26, n. 1, p. 29–48, 2013.

HENNIGHAUSEN, L.; ROBINSON, G. W. Information networks in the mammary gland. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 9, p. 715–725, 2005.

HENRY, M. D.; CAMPBELL, K. P. Dystroglycan: An extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 8, n. 5, p. 625–631, 1996.

HOZUMI, K. et al. Cell adhesive peptide screening of the mouse laminin α 1 chain G domain. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 503, n. 2, p. 213–222, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2010.08.012>>.

HUEBNER, R. J.; EWALD, A. J. Cellular foundations of mammary tubulogenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 31, p. 124–131, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2014.04.019>>.

HUMPHRIES, M. J. Integrin activation: The link between ligand binding and signal transduction. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 8, n. 5, p. 632–640, 1996.

HUMPHRIES, M. J.; SYMONDS, E. J. H.; MOULD, A. P. Mapping functional residues onto integrin crystal structures. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 13, n. 2, p. 236–243, 2003.

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

HYNES, R. O. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. **Cell**, v. 110, p. 673–687, 2002.

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

INSUA-RODRÍGUEZ, J.; OSKARSSON, T. The extracellular matrix in breast cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 41–55, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.017>>.

IOACHIM, E. et al. Ioachim 2002 Eur J Cancer.pdf. v. 38, p. 2362–2370, 2002.

IVANOV, A. I. Pharmacological inhibition of endocytic pathways: Is it specific enough to be useful? **Methods in Molecular Biology**, v. 440, p. 15–33, 2008.

IWAMOTO, Y. et al. YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. **Science**, v. 238, p. 3–5, 1987.

JAYADEV, R.; SHERWOOD, D. R. Basement membranes. **Current Biology**, v. 27, n. 6, p. R207–R211, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.006>>.

JOKINEN, J. et al. Integrin-mediated cell adhesion to type I collagen fibrils. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 30, p. 31956–31963, 2004.

JORDENS, I. et al. Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. **Traffic**, v. 6,

n. 12, p. 1070–1077, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Sistema genital feminino: glândulas mamárias. In: **HISTOLOGIA BÁSICA. Texto e atlas**. 13a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. p. 457.

JUSTUS, C. R.; SANDERLIN, E. J.; YANG, L. V. Molecular connections between cancer cell metabolism and the tumor microenvironment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 5, p. 11055–11086, 2015.

KALAIIDZIDIS, I. et al. APPL endosomes are not obligatory endocytic intermediates but act as stable cargo-sorting compartments. **Journal of Cell Biology**, v. 211, n. 1, p. 123–144, 2015.

KARLSSON, T. et al. Time-Dependent Effects of Oral Contraceptive Use on Breast, Ovarian, and Endometrial Cancers. **Cancer Research**, v. 81, n. 4, p. 1153–1162, 2021.

KIBBEY, M. C. et al. Laminin SI KQAV Peptide-I nduced Angiogenesis In Vivo is Potentiated by Neutrophils. v. 193, p. 185–193, 1994.

KIBBEY, M. C.; GRANT, D. S.; KLEINMAN, H. K. Role of the SIQVAV site of laminin in promotion of angiogenesis and tumor growth: An in vivo matrigel model. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 84, n. 21, p. 1633–1638, 1992.

KIKKAWA, Y. et al. Laminin-111-derived peptides and cancer. **Cell Adhesion and Migration**, v. 7, n. 1, p. 150–159, 2013.

KIRKHAM, M. et al. Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. **Journal of Cell Biology**, v. 168, n. 3, p. 465–476, 2005.

KREBSBACH, P. H.; VILLA-DIAZ, L. G. The Role of Integrin $\alpha 6$ (CD49f) in St \acute{e} m Cells: More than a Conserved Biomarker. **St \acute{e} m Cells and Development**, v. 26, n. 15, p. 1090–1099, 2017.

KURATOMI, Y. et al. Laminin $\gamma 1$ chain peptide, C-16 (KAFDITYVRLKF), promotes migration, MMP-9 secretion, and pulmonary metastasis of B16-F10 mouse melanoma cells. **British Journal of Cancer**, v. 86, n. 7, p. 1169–1173, 2002.

LAHLOU, H.; MULLER, W. J. $\beta 1$ -integrins signaling and mammary tumor progression in transgenic mouse models: Implications for human breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 6, p. 1–10, 2011.

LEE, A. et al. BOADICEA: a comprehensive breast cancer risk prediction model incorporating genetic and nongenetic risk factors. **Genetics in Medicine**, v. 21, n. 8, p. 1708–1718, 2019a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41436-018-0406-9>>.

LEE, E. et al. Plasticity and potency of mammary st \acute{e} m cell subsets during mammary gland development. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, 2019b.

LI, J. et al. Conformational equilibria and intrinsic affinities define integrin activation. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 5, p. 629–645, 2017.

LI, L. et al. Dual-Peptide-Functionalized Nanofibrous Scaffolds Recruit Host Endothelial Progenitor Cells for Vasculogenesis to Repair Calvarial Defects. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 12, n. 3, p. 3474–3493, 2020.

- LI, N. et al. B1 Integrins Regulate Mammary Gland Proliferation and Maintain the Integrity of Mammary Alveoli. **EMBO Journal**, v. 24, n. 11, p. 1942–1953, 2005.
- LIAO, Z. et al. Cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment – Accomplices in tumor malignancy. **Cellular Immunology**, v. 343, n. December 2017, p. 0–1, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.12.003>>.
- LOCHTER, A.; BISSELL, M. J. Involvement of extracellular matrix constituents in breast cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 6, n. 3, p. 165–173, jun. 1995. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044579X8570017X>>.
- LUGASSY, C. et al. C16 laminin peptide increases angiogenic extravascular migration of human melanoma cells in a shell-less chick chorioallantoic membrane assay. **British Journal of Dermatology**, v. 157, n. 4, p. 780–782, 2007.
- MAJIDINIA, M.; YOUSEFI, B. Breast tumor stroma: A driving force in the development of resistance to therapies. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 89, n. 3, p. 309–318, 2017.
- MALINDA, K. M. et al. Identification of laminin α 1 and β 1 chain peptides active for endothelial cell adhesion, tube formation, and aortic sprouting. **The FASEB Journal**, v. 13, n. 1, p. 53–62, 1999.
- MALTSEVA, D. V.; RODIN, S. A. Laminins in Metastatic Cancer. **Molecular Biology**, v. 52, n. 3, p. 350–371, 2018.
- MAO, Y. et al. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 32, n. 1–2, p. 303–315, 2013.
- MCKEE, T. J. et al. Extracellular matrix composition of connective tissues: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-46896-0>>.
- MEDINA, D. The mammary gland: a unique organ for the study of development and tumorigenesis. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 1, n. 1, p. 5–19, 1996.
- MEENAKSHI SUNDARAM, D. N. et al. Polymeric Delivery of siRNA against Integrin- β 1 (CD29) to Reduce Attachment and Migration of Breast Cancer Cells. **Macromolecular Bioscience**, v. 17, n. 6, p. 1–13, 2017.
- MENDOZA, P.; DIAZ, J.; TORRES, V. A. On the Role of Rab5 in Cell Migration. **Current Molecular Medicine**, v. 14, n. 2, p. 235–245, 2014.
- MERCURIO, A. M. Laminin receptors: achieving specificity through cooperation. **Trends in Cell Biology**, v. 5, n. 11, p. 419–423, 1995.
- MINER, J. H. et al. The laminin α chains: Expression, developmental transitions, and chromosomal locations of α 1-5, identification of heterotrimeric laminins 8- 11, and cloning of a novel α 3 isoform. **Journal of Cell Biology**, v. 137, n. 3, p. 685–701, 1997.
- MINER, J. H. Laminins and their roles in mammals. **Microscopy Research and Technique**, v. 71, n. 5, p. 349–356, 2008.
- MOMENIMOVAHED, Z.; SALEHINIYA, H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 11, p. 151–164, 2019.

MONTESANO, R. et al. Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. **Nature**, v. 296, n. 5858, p. 651–653, 1982.

MORAIS FREITAS, V. et al. Malignancy-related 67 kDa laminin receptor in adenoid cystic carcinoma. Effect on migration and β -catenin expression. **Oral Oncology**, v. 43, n. 10, p. 987–998, 2007.

MURRAY, J. L. et al. Rab9 GTPase Is Required for Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1, Filoviruses, and Measles Virus. **Journal of Virology**, v. 79, n. 18, p. 11742–11751, 2005.

NAEEM, M. et al. Risk factors, genetic mutations and prevention of breast cancer Advanced DNA Barcoding View project DNA Barcodes of Different Plants and Protein Analysis View project Risk factors, genetic mutations and prevention of breast cancer International Journal of. v. 14, n. 4, p. 492–496, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.12692/ijb/14.4.492-496>>.

NASCIMENTO, C. F. et al. Role of MMP9 on invadopodia formation in cells from adenoid cystic carcinoma. study by laser scanning confocal microscopy. **Microscopy Research and Technique**, v. 73, n. 2, p. 99–108, 2010.

NASCIMENTO, C. F. et al. Laminin-111 derived peptides AG73 and C16 regulate invadopodia activity of a human adenoid cystic carcinoma cell line. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 18, p. 2562–2572, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.08.022>>.

NEGISHI, Y.; NOMIZU, M. Laminin-derived peptides: Applications in drug delivery systems for targeting. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 202, p. 91–97, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.05.017>>.

NOMIZU, M. et al. Multimene Forms of Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg of Tumor Growth and Metastasis. p. 3459–3462, 1993.

NOMIZU, M. et al. Structure-activity study of a laminin α 1 chain active peptide segment Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV). **FEBS Letters**, v. 365, n. 2–3, p. 227–231, 1995.

NOMIZU, M. et al. Identification of cell binding sequences in mouse laminin chain by systematic peptide screening. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 51, p. 32198–32205, 1997.

NOMIZU, M. et al. Cell adhesive sequences in mouse laminin β 1 chain. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 378, n. 2, p. 311–320, 2000.

OH, P.; MCINTOSH, D. P.; SCHNITZER, J. E. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. **Journal of Cell Biology**, v. 141, n. 1, p. 101–114, 1998.

OSKARSSON, T. Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. **Breast**, v. 22, n. S2, p. S66–S72, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2013.07.012>>.

OSKARSSON, T.; BATLLE, E.; MASSAGUÉ, J. Metastatic stem cells: Sources, niches, and vital pathways. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 3, p. 306–321, 2014.

- PANCHAL, H.; MATROS, E. Current trends in postmastectomy breast reconstruction. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 140, n. 5S, p. 7S-13S, 2017.
- PARTON, R. G.; SIMONS, K. The multiple faces of caveolae. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 3, p. 185–194, 2007.
- PATARROYO, M.; TRYGGVASON, K.; VIRTANEN, I. Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 12, n. 02, p. 197–207, 2012.
- PATEL, R. et al. Ile-Lys-Val-ala-Val (IKVAV) peptide for neuronal tissue engineering. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 30, n. 1, p. 4–12, 2019.
- PELKMANS, L. et al. Caveolin-Stabilized Membrane Domains as Multifunctional Transport and Sorting Devices in Endocytic Membrane Traffic Other Rab GTPases of early and recycling endosomes are segregated into distinct membrane domains that display different biochemical composition. **Cell**, v. 118, p. 767–780, 2004. Disponível em: <<http://www.cell.>>.
- PELKMANS, L.; KARTENBECK, J.; HELENIUS, A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 5, p. 473–483, 2001.
- PELKMANS, L.; PÜNTENER, D.; HELENIUS, A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. **Science**, v. 296, n. 5567, p. 535–539, 2002.
- PICKUP, M. W.; MOUW, J. K.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. **EMBO reports**, v. 15, n. 12, p. 1243–1253, 2014.
- POLYAK, K. Science in medicine Breast cancer : origins and evolution. **Cell**, v. 117, n. 11, p. 3155–63, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2045618&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- PONCE, M. L.; KLEINMAN, H. K. Identification of redundant angiogenic sites in laminin $\alpha 1$ and $\gamma 1$ chains. **Experimental Cell Research**, v. 285, n. 2, p. 189–195, 2003.
- PONCE, M. L.; NOMIZU, M.; KLEINMAN, H. K. An angiogenic laminin site and its antagonist bind through the $\alpha v \beta 3$ and $\alpha 5 \beta 1$ integrins. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 8, p. 1389–1397, 2001.
- PUCHALAPALLI, M. et al. The Laminin- $\alpha 1$ Chain-Derived Peptide, AG73, Binds to Syndecans on MDA-231 Breast Cancer Cells and Alters Filopodium Formation. **Analytical cellular pathology (Amsterdam)**, v. 2019, p. 9192516, 2019.
- PULIDO, D.; HUSSAIN, S. A.; HOHENESTER, E. Crystal Structure of the Heterotrimeric Integrin-Binding Region of Laminin-111. **Structure**, v. 25, n. 3, p. 530–535, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2017.01.002>>.
- RINK, J. et al. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. **Cell**, v. 122, n. 5, p. 735–749, 2005.
- ROSKAMP, M. et al. SIKVAV peptide functionalized ultra-small gold nanoparticles for selective targeting of $\alpha 6 \beta 1$ integrin in hepatocellular carcinoma. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 755, n. 1, 2016.

- SAFTIG, P.; KLUMPERMAN, J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: Trafficking meets function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 9, p. 623–635, 2009.
- SAKAMOTO, N. et al. Inhibition of Angiogenesis and Tumor Growth by a Synthetic Laminin Peptide, CDPGYIGSR-NH₂. **Cancer Research**, v. 51, n. 3, p. 903–906, 1991.
- SANES, J. R. The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 15, p. 12601–12604, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R200027200>>.
- SARFATI, G. et al. Targeting of polymeric nanoparticles to lung metastases by surface-attachment of YIGSR peptide from laminin. **Biomaterials**, v. 32, n. 1, p. 152–161, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.014>>.
- SEVER, R.; BRUGGE, J. S. Signal transduction in cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 4, 2015.
- SHARMA, D. K. et al. Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol. **Mol Biol Cell**, v. 15, n. July, p. 3114–3122, 2004.
- SHARMA, D. K. et al. The glycosphingolipid, lactosylceramide, regulates β 1- integrin clustering and endocytosis. **Cancer Research**, v. 65, n. 18, p. 8233–8241, 2005.
- SIMÓN, L. et al. Caveolin-1 function at the plasma membrane and in intracellular compartments in cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 39, n. 2, p. 435–453, 2020.
- SINGH, M.; JADHAV, H. R.; BHATT, T. Dynamin functions and ligands: Classical mechanisms behind. **Molecular Pharmacology**, v. 91, n. 2, p. 123–134, 2017.
- SIQUEIRA, A. S. et al. Laminin-derived peptide AG73 regulates migration, invasion, and protease activity of human oral squamous cell carcinoma cells through syndecan-1 and β 1 integrin. **Tumor Biology**, v. 31, n. 1, p. 46–58, 2010.
- SIQUEIRA, A. S. et al. Laminin-111 peptide C16 regulates invadopodia activity of malignant cells through β 1 integrin, Src and ERK 1/2. **Oncotarget**, v. 7, n. 30, p. 47904–47917, 2016.
- SMUCZEK, B. et al. The laminin-derived peptide C16 regulates GPNMB expression and function in breast cancer. **Experimental Cell Research**, v. 358, n. 2, p. 323–334, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.07.005>>.
- SUN, Q. et al. Prognostic value of increased integrin-beta 1 expression in solid cancers: A meta-analysis. **OncoTargets and Therapy**, v. 11, p. 1787–1799, 2018.
- TAKADA, Y.; YE, X.; SIMON, S. The integrins. **Genome Biology**, v. 8, n. 5, 2007.
- TASCHAUER, A. et al. Peptide-Targeted Polyplexes for Aerosol-Mediated Gene Delivery to CD49f-Overexpressing Tumor Lesions in Lung. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 18, n. December, p. 774–786, 2019.
- THEOCHARIS, A. D.; MANOU, D.; KARAMANOS, N. K. The extracellular matrix as a multitasking player in disease. **FEBS Journal**, v. 286, n. 15, p. 2830–2869, 2019.
- TIAINEN, S. et al. Tumor microenvironment and breast cancer survival: combined effects of breast fat, M2 macrophages and hyaluronan create a dismal prognosis.

Breast Cancer Research and Treatment, v. 179, n. 3, p. 565–575, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10549-019-05491-7>>.

TIMPL, R. et al. Structure and function of laminin LG modules. **Matrix Biology**, v. 19, n. 4, p. 309–317, 2000.

VANNUCCI, L. Stroma as an Active Player in the Development of the Tumor Microenvironment. **Cancer Microenvironment**, v. 8, n. 3, p. 159–166, 2015.

VISVADER, J. E. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. **Genes and Development**, v. 23, p. 2563–2577, 2008.

VONDERHEIT, A.; HELENIUS, A. Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. **PLoS Biology**, v. 3, n. 7, p. 1225–1238, 2005.

WILCKE, M. et al. Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-Golgi network. **Journal of Cell Biology**, v. 151, n. 6, p. 1207–1220, 2000.

YOSHIDA, N. et al. The laminin-derived peptide YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg) inhibits human pre-B leukaemic cell growth and dissemination to organs in SCID mice. **British Journal of Cancer**, v. 80, n. 12, p. 1898–1904, 1999.

YUE, B. Biology of the extracellular matrix: An overview. **Journal of Glaucoma**, v. 23, n. 8, p. S20–S23, 2014.

YURCHENCO, P. D. Basement membranes: Cell scaffoldings and signaling platforms. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 2, p. 1–27, 2011.

YURCHENCO, P. D.; O'REAR, J. J. Basal lamina assembly. **Current opinion in cell biology**, v. 6, p. 674–681, 1994.

ZHANG, K.; CHEN, J. F. The regulation of integrin function by divalent cations. **Cell Adhesion and Migration**, v. 6, n. 1, p. 20–29, 2012.

APÊNDICE - Lista de legendas dos vídeos ([link](#))

Vídeo 1: C16 é internalizado pelas células MCF-7. Células MCF-7 tratadas com peptídeo C16 conjugado a rodamina (C16R, em vermelho) *overnight*.

Vídeo 2: Células MCF-7 não internalizam o peptídeo controle C16Rv. Células MCF-7 tratadas com peptídeo controle C16Rv conjugado a rodamina (C16RvR, em vermelho) *overnight*.

Vídeo 3: C16 é internalizado pelas células MCF-10A. Células MCF-10A tratadas com peptídeo C16 conjugado a rodamina (C16R, em amarelo) *overnight*.

Vídeo 4: Células MCF-10^a não internalizam o peptídeo controle C16Rv. Células MCF-10A tratadas com peptídeo controle C16Rv conjugado a rodamina (C16RvR, em amarelo) *overnight* (Arquivo Movie_4).

Vídeo 5: Células MDA-MB-231 também internalizam o peptídeo C16. Células MDA-MB-231 tratadas com peptídeo C16 conjugado a rodamina (C16R, em vermelho) e corante CellMask (em branco). As áreas demarcadas mostram C16R internalizado.

Vídeo 6: O peptídeo C16Rv não é internalizado pelas células MDA-MB-231. Células MDA-MB-231 tratadas com peptídeo controle C16Rv conjugado a rodamina (C16RvR, em vermelho) e corante CellMask (em branco). As áreas demarcadas mostram C16R internalizado.

Vídeo 7: A endocitose do peptídeo C16 não é alterada pelo tratamento das células MCF-7 com DMSO. Células MCF-7 tratadas com peptídeo C16 conjugado a rodamina (C16R, em amarelo) e DMSO (grupo controle).

Vídeo 8: A endocitose do peptídeo C16 é reduzida pelo tratamento das células MCF-7 com o inibidor químico da dinamina. Células MCF-7 tratadas com peptídeo C16 conjugado a rodamina (C16R, em amarelo) e Dynasore.

Vídeo 9: O peptídeo C16 é encontrado dentro vesículas ácidas de células MCF-7. Células MCF-7 tratadas com peptídeo C16 conjugado a rodamina (C16R, em amarelo) e corante para vesículas ácidas (Lyso Tracker, em azul ciano). As áreas demarcadas mostram a colocalização entre o C16 e os lisossomos.

Vídeo 10: O peptídeo C16Rv que é internalizado pelas células MCF-7 é degradado. Células MCF-7 tratadas com peptídeo C16Rv conjugado a rodamina (C16RvR, em amarelo) e corante para vesículas ácidas (Lyso Tracker, em azul ciano). As áreas demarcadas mostram a colocalização entre o C16 e os lisossomos.

Vídeo 11: O peptídeo C16 também é encontrado em vesículas ácidas de células MDA-MB-231. Células MDA-MB-231 tratadas com peptídeo C16 conjugado a rodamina (C16R, em vermelho) e corante para vesículas ácidas (Lyso Tracker, em verde). As setas azuis mostram a colocalização entre o peptídeo e os lisossomos.

Vídeo 12: O peptídeo C16Rv não foi encontrado em vesículas ácidas de células MDA-MB-231. Células MDA-MB-231 tratadas com peptídeo controle C16Rv conjugado a rodamina (C16RvR, em amarelo) e corante para vesículas ácidas (Lyso Tracker, em azul ciano).