

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

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 β 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 β 1 integrin. This prompted us to investigate the interaction between C16 peptide and β 1 integrin in breast cancer cells as well as its morpho functional effects. These cells attach to C16 peptide and this attachment is inhibited by β 1 integrin depletion by siRNA. Moreover, rhodamine-C16 colocalized with activated β 1 integrins in breast cancer cells. Flow cytometry assay showed that C16 increased β 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 β 1 integrin activation, breast cells would internalize peptide C16, which, at least in part, will be degraded in lysosomes.

Keywords: Laminin 111. Breast cancer. β 1 Integrin. Endocytosis.

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 tem 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 críptico 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. 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.; VADREU, 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 . Gehlssen , 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. September, 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.

KATZMANN, D. J.; BABST, M.; EMR, S. D. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. **Cell**, v. 106, n. 2, p. 145–155, 2001.

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 Stem Cells: More than a Conserved Biomarker. **Stem 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 stem 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 angiotropic 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 $\beta 1$ - 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 $\beta 1$ 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 $\beta 1$ 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.