# SUÉLY VIEIRA DA SILVA

# PAPEL DE ADAMTS-1 NUCLEAR EM CÉLULAS NORMAIS E TUMORAIS

Tese apresentada ao programa de Pósgraduação em Biologia de Sistemas, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo 2019

### SUÉLY VIEIRA SILVA

## PAPEL DE ADAMTS-1 NUCLEAR EM CÉLULAS NORMAIS E TUMORAIS

Tese apresentada ao programa de Pósgraduação em Biologia de Sistemas, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Morais Freitas

Versão original

São Paulo 2019

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)

Vieira da Silva, Suély Papel de ADAMTS-1 nuclear em células normais e tumorais / Suély Vieira da Silva; orientador Vanessa Morais Freitas. -- São Paulo, 2019. 128 p.

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

1. Metaloprotease. 2. Núcleo. 3. Endocitose. I. Morais Freitas, Vanessa , orientador. II. Título.

# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Suély Vieira da Silva

Titulo da Dissertação/Tese: Papel de ADAMTS-1 nuclear em células normais e tumorais

Orientador: Profa. Dra. Vanessa Morais Freitas

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

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

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
	Accincture
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Providento:	Assistura
Fresidente.	
	Nome:
	Instituição:



#### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

Comissão de Ética em Pesquisa

### CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 708/15 referente

ao projeto intitulado: "Papel funcional de ADAMTS-1 (uma desintegrina e metaloproteinase com domínios trombospondina) no núcleo de células humanas malignas e não malignas" sob a responsabilidade de Suély Vieira da Silva, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº466 de 2012.

São Paulo, 24 de fevereiro de 2015.

ma X

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

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

### AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, pela minha vida e por cuidar dela. Pela alegria de mais uma conquista. O caminho percorrido pode ser cansativo e difícil, mas com Ele nada é impossível. Obrigada, Senhor!

Aos meus presentes de Deus, a minha família. Aos meus pais, José Vieira da Silva e Maria José Duvale da Silva pelo amor, paciência e confiança, e por mais esta oportunidade proporcionada. Aos meus irmãos Thainan e Alisson, pelo apoio e carinho. Obrigada pela torcida e apoio incondicional ao longo de todo esse tempo. Vocês fazem parte desta conquista. Amo vocês!

Ao meu amor e amigo, Daniel Alves de Figueiredo, pelo amor e paciência, pelo incentivo e motivação a seguir rumo ao alcance de mais este objetivo. Você faz parte desta alegria. Obrigada!

### AGRADECIMENTOS

- A Profa. Dra. Vanessa Morais Freitas, do Laboratório de Biologia da Matriz Extracelular, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), pela oportunidade de realização do curso de doutorado. Pela orientação e motivação no desenvolvimento e conclusão deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Ruy Gastaldoni Jaeger, do Laboratório de Biologia Tumoral, ICB-USP, pela colaboração e auxílio em todo decorrer desta pesquisa, obrigada por toda disposição e ajuda oferecida.
- Às professoras, Dra. Marilene Hohmuth Lopes (Laboratório de Neurobiologia e Células-tronco, ICB-USP), Dra. Nathalie Cella (Laboratório de Biologia Molecular da Célula Epitelial Mamária, ICB-USP) e a todo grupo de pesquisa. Pelo auxílio e disponibilização de espaço e equipamentos para a realização da parte experimental deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Juan Carlos Rodriguez-Manzaneque, do laboratório de Proteases e Matriz Extracelular, no centro de Genômica e Investigação Oncológica (Genyo) da Universidade de Granada na Espanha. Obrigada por me receber para desenvolvimento de parte do meu trabalho, e pela experiência científica.
- À Profa. Dra. Telma Maria Tenório Zorn, do Laboratório de Biologia da Reprodução e Matriz Extracelular, ICB-USP, e a sua técnica Fernanda C. Barrence. Obrigada por disponibilizar a sala de cultura celular.
- Às professoras, Dra. Alison Colquhoun, Dra. Ana Paula Zen Petisco Fiore e Profa. Dra. Carolina Beltrame Del Debbio pelas sugestões e críticas durante o Exame de Qualificação.
- Às funcionárias da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual, ICB-USP, muito obrigada pelo auxílio durante o curso e pelo carinho e atenção prestada em todos os momentos.

A todos meus amigos e pesquisadores do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, ICB-USP. Em especial às minhas deusas Maíra A. Lima e Luciana Dzik, pela amizade, apoio, consolo e pelas simples e boas gargalhadas em todos estes anos.

À prof. Dra Ana Paula Lepique, por compartilhar o reagente LPS utilizado nos experimentos com importazole.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Agência de Fomento à Pesquisa Científica e Tecnológica do país, pelo auxílio financeiro necessário para a realização desta pesquisa e pela bolsa de doutorado concedida.

Muito obrigada!

### RESUMO

SILVA,S.V. **PAPEL DE ADAMTS-1 NUCLEAR EM CÉLULAS NORMAIS E TUMORAIS**. 2019. 128 páginas. Tese de Doutorado em Biologia De Sistemas– Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A tumorigênese é um processo complexo e dinâmico, que conta com a participação de moléculas presentes na matriz extracelular para progressão. Assim, metaloproteases presentes no estroma tumoral contribuem para a invasão tumoral, pois atuam degradando a matriz extracelular e aumentando o potencial maligno das células. As ADAMTSs (uma desintegrina e metaloprotease com domínios trombospondina) são proteases secretadas pelas células na matriz extracelular, que possuem atividade proteolítica sobre os componentes que fazem parte da matriz extracelular, remodelando-a. São proteases conhecidamente extracelulares presentes na matriz, porém nós identificamos um dos membros dessa família de ADAMTSs, a ADAMTS-1 presente predominantemente no núcleo das células mamárias com diferentes graus de diferenciação. Com isso, o objetivo deste estudo foi analisar se essa seria a única protease dessa família localizada no núcleo e qual seria a função dessa protease nuclear (se ela teria função enzimática). Além disso, tentamos entender como ela atinge o núcleo das células, analisando o papel do citoesqueleto neste transporte, além de avaliarmos se ADAMTS-1 seria endocitada após secretada, ou se ela atingiria o núcleo através do transporte núcleo citoplasmático descrito na literatura.

Nossos resultados evidenciam que ADAMTS-1 é a única agrecanase presente no núcleo das células, e que ao ser silenciada, a protease apresentou menor expressão proteica neste compartimento, assim como no citoplasma e meio condicionado. A expressão nuclear de ADAMTS-1 não é observada em todas as linhagens celulares, e observamos que células com origem e fenótipo epitelial apresentam a protease nuclear, enquanto que células com origem mesenquimal (como o fibroblasto) apresentam a protease no compartimento citoplasmático. Através de um ensaio de digestão do agrecam, observamos que assim como ocorre na matriz extracelular, ADAMTS-1 nuclear apresenta também atividade enzimática, fato observado pela presença de produtos da

degradação do agrecam gerados pela presença da protease na fração nuclear das células que apresentam ADAMTS-1 neste compartimento. Observamos que o tratamento com monensina implicou na não secreção de ADAMTS-1, e no acúmulo da protease no compartimento citoplasmático. Células de origem mesenquimal após serem mantidas em meio contendo a protease solúvel apresentam ADAMTS-1 nuclear. Com isso, estabelecemos um possível papel de ADAMTS-1 nuclear, com função proteolítica ativa, visto que foi a única agrecanase caracterizada no compartimento nuclear. Temos também que a compartimentalização da protease pode ser alterada se as vias de secreção forem perturbadas. Utilizando o meio secretado por células que apresentam ADAMTS-1 nuclear, vimos que as células HT-1080 e os fibroblastos (que não apresentam a protease nuclear) internalizaram a protease, e que a localização de ADAMTS-1 foi vista no compartimento nuclear. Utilizando o mesmo meio condicionado, vimos que quanto maior a disponibilidade de ADAMTS-1 no meio extracelular, menor é o potencial migratório das células de origem mesenquimal. Com isso temos que ADAMTS-1 é uma molécula secretada pelas células para a matriz extracelular, que apresenta a particularidade de ser endocitada após ser secretada e sua localização torna-se nuclear. ADAMTS-1 tem localização nuclear em células de origem epitelial, ao contrário do que se observa em células de origem mesenquimal. ADAMTS-1 nuclear pode representar uma importante molécula do microambiente tumoral, visto que apresenta atividade proteolítica funcional neste compartimento.

Palavras-chave: Câncer de mama. Matriz extracelular. Proteólise. Núcleo. Endocitose. ADAMTS-1.

### ABSTRACT

SILVA, S.V. ROLE OF ADAMTS-1 IN THE NUCLEI OF NORMAL AND TUMORAL CELLS. 2019. 128 pages. PhD thesis in Systems Biology). Biomedical Science Institute, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2019.

Tumorigenesis is a complex and dynamic process with participation of molecules present in the extracellular matrix for progression. Thus, metalloproteases present in the tumor stroma contribute to tumor invasion, because they act degrading the extracellular matrix structures and increase the malignant potential of cells. ADAMTSs (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin domains) are secreted proteases to the extracellular matrix, which have proteolytic activity on the extracellular matrix components remodeling it. They are known to be extracellular proteases present in the matrix, but we identified one of the members of this family of ADAMTSs, ADAMTS-1, present predominantly in the nucleus of mammary cells with different degrees of differentiation. Thus, the objective of this study was to analyze if ADAMTS-1 would be the only protease of this family located in the nucleus, and what would be the function of this nuclear protease (if it would have enzymatic function). In addition, we attempted to understand how it reaches the nucleus of the cells by analyzing the role of the cytoskeleton in this transport, in addition to assessing whether ADAMTS-1 would be internalized after secreted, or whether it would reach the nucleus through the nucleocytoplasmic transport as described in the literature. Our results demonstrated that ADAMTS-1 is the only aggrecanase present in the nucleus of cells, and when it was silenced, had lower protein expression in this compartment, as well as in the cytoplasm and conditioned medium. ADAMTS-1 nuclear was not observed in all cell lines. We observed that cells with epithelial phenotype exhibit nuclear protease, whereas cells with mesenchymal origin (such as fibroblasts) presented the protease in the cytoplasmic compartment. In an assay of digestion of aggrecan we observed as well as in the extracellular matrix, nuclear ADAMTS-1 also presented enzymatic activity, event observed by the presence of aggrecan fragments generated by proteases in the nuclear fraction of cells. We observed the treatment with monensin impaired the secretion of ADAMTS-1, and accumulation of this protease at the cytoplasmic compartment. Cells of mesenchymal origin after being maintained under medium containing the soluble protease, presented nuclear compartmentalization. Thus, we established a possible role of nuclear ADAMTS-1, with active proteolytic function, since it was the only aggrecanase characterized in the nuclear compartment. We also observed the compartmentalization of protease could be altered if the secretory pathways are disturbed. Using the media secreted by cells with nuclear ADAMTS-1, we have seen that HT-1080 cells and fibroblasts (which do not present nuclear protease) was able to internalize the protease, and the localization of ADAMTS-1 was seen at nuclear compartment.

Using the same conditioned medium, we observed which a higher availability of ADAMTS-1 in the extracellular environment decreased the migratory potential of cells with mesenchymal phenotype. We have that ADAMTS-1 is a molecule secreted by cells into the extracellular matrix, which presents the particularity of being endocytosed after being secreted, and its location becomes nuclear. ADAMTS-1 has nuclear localization in cells of epithelial origin, contrary to what is observed in cells of mesenchymal origin. Nuclear ADAMTS-1 may represent an important molecule of the tumor microenvironment, since it has functional proteolytic activity in this compartment.

**Keywords:** Breast cancer. Extracellular matrix. Proteolysis. Nucleus. Endocytosis. ADAMTS-1.

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCA	do inglês "bicinchoninic acid", traduzido com ácido bicinconínico
BRCA	do inglês "breast cancer", traduzido como gene do câncer de mama
BSA	do inglês "Bovine serum albumin", traduzido como albumina sérica bovina
CEPSH	Comissão de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
DMEM	do inglês "Dulbecco's Modified Eagle's Medium", traduzido como meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMEM-F12	do inglês "Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12", traduzido como meio de Eagle modificado por Dulbecco/Misturado com nutriente F-12
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	do inglês "deoxyribonucleic acid", traduzido como ácido desoxirribonucleico
ECL	do inglês "Enhanced chemiluminescence"
EDTA	do inglês "Ethylenediamine-tetra acetic acid", traduzido como ácido etilenodiamino tetra acético
EGF	do inglês "Epidermal growth fator", traduzido como fator de crescimento epidérmico
HER-2	do inglês "human epidermal growth factor receptor 2", traduzido como receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
IHQ	Imunohistoquímica
INCA/MS	Instituto Nacional do Câncer/Ministério da Saúde
MCF-10A	linhagem celular epitelial não tumoral de mama humana proveniente de uma paciente com alterações fibrocística
MCF-7	linhagem celular epitelial tumoral de mama humana derivada de infusão pleural de adenocarcinoma
MDA-MB-231	linhagem celular epitelial tumoral de mama humana derivada de infusão pleural de adenocarcinoma
MEC	matriz extracelular
miRNA	micro RNA
mRNA	RNA mensageiro
PBS	do inglês "phosphate buffered saline", traduzido como tampão fosfato- salino
PFA	paraformaldeído
рН	potencial hidrogeniônico ou potencial de hidrogênio

RNA	do inglês "ribonucleic acid", traduzido como ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
SDS	do inglês "sodium dodecyl sulfate", traduzido como Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
siRNA	do inglês "small interfering RNA"
TBS	do inglês "Tris-buffered saline", traduzido como tampão tris-salino
TEMED	do inglês "Tetramethylethylenediamine", traduzido como tetrametil etilenodiamina
TfR	do inglês "transferrin receptor", traduzido como receptor de transferrina

# LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
μΙ	microlitro
μm	micrômetro
μΜ	micromolar
Ca2+	íon cálcio
cm2	centímetros quadrados
CO2	gás carbônico
g Centrifugal	força de gravidade (centrífuga) ou RCF (do inglês "Relative Force")
HCI	ácido clorídrico
kDa	kilodalton
Μ	molar
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
Ν	normal (normalidade)
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
ng	nanograma
nL	nanolitro
nm	nanômetro
U	unidade
α	alfa
β	beta
μg	micrograma

# SUMÁRIO

1. INT	ſRODUÇÃO	17
1.1	Câncer	17
1.2	Incidência de câncer	17
1.3	Câncer de mama	18
1.4	Progressão tumoral	19
1.5	Microambiente tumoral	22
1.6	Matriz Extracelular (MEC)	26
1.7	Metaloproteinases de Matriz Extracelular (MMPs)	28
1.8	Adamalisinas	31
1.9	ADAMTS-1	37
1.10	MMPs nucleares	40
2. JU	STIFICATIVA	43
3. OB	JETIVOS GERAIS	44
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4. MA	TERIAL E MÉTODOS	45
4.1	Linhagens celulares e condições de cultivo	45
4.2	Análise da endocitose de ADAMTS-1	45
4.3	Análise da secreção de ADAMTS-1	46
4.4	Bloqueio da exocitose de ADAMTS-1	47
4.5 Impo	Bloqueio do transporte mediado por poros nucleares utilizando rtazole	47
4.6	Análise de endocitose	48
4.7	Western Blotting	48
4.8	Imunofluorescência indireta	49
4.9	Digestão de substratos	50
4.10	Análise da interação ADAMTS-1 e cromatina	50
4.11	Transfecção celular	51
4.12	Imunohistoquímica	52
4.13	Ensaio de "ferida"	53
4.14	Análises estatísticas	53
5. RE	SULTADOS	54
5.1	ADAMTS-1 é a única agrecanase nuclear	54
5.2	Localização de ADAMTS-1 em tecidos mamários	59

	5.3	Localização de ADAMTS-1 em diferentes tipos celulares	59
	5.4	ADAMTS-1 está localizada no núcleo assim como o agrecam	64
	5.5	ADAMTS-1 tem função enzimática ativa no núcleo	67
	5.6	ADAMTS-1 está fortemente associada a estruturas nucleares	70
	5.7 prote	O aparelho de Golgi está envolvido na compartimentalização da ase nuclear	75
	5.8	A importação de ADAMTS-1 nuclear não é realizado por importinas	78
	5.9 quant	Heparina altera o perfil de secreção de ADAMTS-1, mas não a tidade de ADAMTS-1 nuclear	81
	5.10 prote	ADAMTS-1 solúvel é internalizada por células que não expressam a ase nuclear, que passam a apresentar ADAMTS-1 nuclear	84
	5.11	A disponibilidade de ADAMTS-1 altera o perfil migratório das células	92
6.	DIS	SCUSSÃO	95
7.	CO	NCLUSÃO	103
8.	RE	FERÊNCIAS	104

### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1 Câncer

O câncer é uma doença que se caracteriza por alterações dinâmicas no genoma das células. Células normais evoluem progressivamente para um estado neoplásico, devido à capacidade que essas células possuem de adquirirem algumas características que lhes permitam adotar um comportamento tumorigênico e tornarem-se malignas (Foulds, 1954). Os organismos multicelulares são formados por células especializadas que constituem os tecidos, onde células individuais interagem com outras células e com a <u>matriz extrac</u>elular (MEC) modelando o microambiente tecidual ou favorecendo esse microambiente para o processo de tumorigênese (Teti, 1992).

### 1.2 Incidência de câncer

De acordo com as estimativas mundiais, ocorreram 18,1 milhões de casos novos de câncer (17 milhões excluindo o câncer de pele não-melanoma) e um total de 9,6 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo em 2018 (Bray *et al.*, 2018).

Em ambos os sexos, o câncer de pulmão é o tipo mais diagnosticado, equivalente a 11,6% do total de casos) sendo a principal causa de mortes por câncer (18,4% do total de mortes por câncer), seguida por câncer de mama feminino (11,6%), câncer de próstata (7,1%), câncer colorretal (6,1%), câncer de estômago (8,2%) e de fígado (8,2%). Entre as mulheres, o câncer de mama é o tipo de câncer mais diagnosticado, e também a principal causa de morte, seguida pelo câncer colorretal e de pulmão (Bray *et al.*, 2018).

No Brasil, a estimativa para o ano de 2018, que é válida também para o ano de 2019, aponta para a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer. O

câncer de pele do tipo não melanoma foi o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata, mama feminina, cólon e reto, pulmão, estômago e colo do útero (Inca, 2014).

#### 1.3 Câncer de mama

O câncer de mama é tido como o segundo tipo de neoplasia mais frequente no mundo, e o de maior incidência entre as mulheres, respondendo por 25 % dos casos novos a cada ano, responsável também pelo maior índice de mortalidade. No Brasil, excluindo o câncer de pele não melanoma, o câncer de mama é a maior causa de morte entre as mulheres das regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste. O câncer de mama também acomete homens, representando 1% do total de casos da doença (Inca, 2014).

O desenvolvimento do câncer de mama está diretamente relacionado a alguns fatores de risco como: o envelhecimento (idade é um dos mais importantes fatores de risco), uma vez que a incidência da patologia aumenta ligeiramente até os 50 anos, reforçando a participação dos hormônios femininos na etiologia do câncer de mama; o histórico familiar aumenta cerca de 2 a 3 vezes o risco de desenvolvimento da doença, pois são vistas mutações genéticas nos genes BRCA1 e BRCA2 (do inglês "*breast cancer*") que são na maioria dos casos hereditários; outros fatores também são listados como de risco para o desenvolvimento da doença, como fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher, sedentarismo, excesso de peso, consumo excessivo de álcool, exposição à radiação ionizante, alta densidade do tecido mamário (razão entre o tecido glandular e o tecido adiposo).

A amamentação, a alimentação saudável com a manutenção do peso corporal ideal e a prática de atividade física regular estão associadas a um menor risco de desenvolver o câncer de mama. Cerca de 30% dos casos de câncer de mama podem ser evitados através destas simples medidas (INCA/MS, 2019).

Estratégias como a mamografia (a cada 2 anos) para mulheres entre 50 a 69 anos de idade e o exame clínico das mamas anualmente, a partir dos 40 anos,

são recomendadas para a detecção precoce do câncer de mama em mulheres com risco padrão. No entanto, estes mesmos exames são recomendados, anualmente, para mulheres mais jovens (a partir de 35 anos de idade), que fazem parte de grupos considerados de risco elevado para câncer de mama, com histórico familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau (INCA/MS, 2019).

### 1.4 Progressão tumoral

A tumorigênese é um processo complexo de múltiplas etapas, em que mutações na oncogênese e em genes supressores de tumor resulta no aumento da proliferação e resistência à morte celular (Yuan *et al.*, 2016).

características de células Atualmente. dez tumorais tem sido universalmente reconhecidas, incluindo multiplicação desordenada, evasão à supressores de tumor, promoção à invasão e metástase, resistência à apoptose, estimulação à angiogênese, manutenção de sinais proliferativos, eliminação de limitações energéticas celulares, evasão à destruição imune, instabilidade genômica e mutação, e aumento da inflamação tumoral (Wang et al., 2017). Como descrito, o processo tumoral acontece a partir de uma sucessão de alterações genéticas, cada uma conferindo um ou outro tipo de vantagem de crescimento, levando a uma progressiva conversão de células normais em células neoplásicas (Figura 1) (Hanahan and Weinberg, 2000; 2011).



**Figura 1. Capacidades adquiridas pelas células tumorais**. Através de diversos mecanismos, a maioria dos cânceres adquire o mesmo conjunto de capacidades funcionais durante o seu desenvolvimento. Adaptado de (Hanahan and Weinberg, 2011; Wang *et al.*, 2017).

Uma das características fundamentais que as células tumorais adquirem envolve sua capacidade de sustentar a proliferação. Nos tecidos normais, há um cuidadoso controle com a produção e liberação de sinais para a promoção do crescimento, controlando o número de células e, assim, promovendo a manutenção da arquitetura e função do tecido normal. Já as células cancerosas, através da desregulação destes sinais tornam-se independentes, produzindo muitos de seus fatores de crescimento (Bhowmick *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2008), ou super expressando os receptores dessas moléculas (Lemmon and Schlessinger, 2010).

Outra habilidade adquirida pelas células malignas é a insensibilidade que elas apresentam aos sinais das moléculas inibidoras de crescimento. Em um tecido normal, múltiplos sinais anti-proliferativos atuam de forma a manter a quiescência celular e a homeostasia tecidual (Sherr and Mccormick, 2002; Burkhart and Sage, 2008). De forma a sobreviver e a proliferar, as células neoplásicas têm que "escapar" destes sinais (Ghebranious and Donehower, 1998; Lipinski and Jacks, 1999).

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

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

A capacidade de invadir e metastatizar tecidos permite às células neoplásicas escaparem do tumor primário e colonizarem novos locais do organismo, onde pelo menos inicialmente, os nutrientes e o espaço não são limitados (Berx and Van Roy, 2009). Estes dois processos estão intimamente interligados e utilizam estratégias operacionais semelhantes, que envolvem alterações na ligação física das células ao seu microambiente (Cavallaro and Christofori, 2004), e a ativação de proteases extracelulares específicas (Hanahan and Weinberg, 2011).

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

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

Portanto, células normais evoluem progressivamente para um estado neoplásico ao adquirirem uma sucessão de capacidades que lhes permitam evoluir para um fenótipo maligno. Porém, a biologia dos tumores não se define simplesmente pelas diversas características que as células cancerosas adquirem, mas também abrange contribuições do microambiente tumoral para o processo de tumorigênese (Hanahan and Weinberg, 2011).

### 1.5 Microambiente tumoral

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

A massa tumoral consiste em uma população heterogênea de células cancerígenas, e também de uma variedade de células hospedeiras infiltrantes, fatores secretados e proteínas de matriz extracelular, que são coletivamente denominados como microambiente tumoral (Finicle *et al.*, 2018). Este microambiente é constituído por moléculas e componentes da MEC, bem como por células normais (estromais) que cercam as células cancerosas. As células estromais circundantes (figura 2) podem ser: fibroblastos, células endoteliais, células do músculo liso, células do sistema imunológico e células inflamatórias (Lim *et al.*, 2018). Em células tumorais, essa elaborada infraestrutura responde ao processo de carcinogênese protegendo o tumor do sistema imune, auxiliando o crescimento, promovendo a invasão e a metástase tumoral (BURTON; LIBUTTI, 2009; SWARTZ et al., 2012; QUAIL E JOYCE, 2013). Estudos

genéticos e de biologia celular indicam que o crescimento tumoral não é apenas determinado pelo crescimento das células malignas, mas também pelo estroma circundante ao tumor (Kalluri, 2003; Denton *et al.*, 2018).



**Figura 2.** Representação esquemática do microambiente tumoral. O microambiente tumoral é constituído por moléculas e componentes da MEC, vasos sanguíneos e células estromais que cercam as células tumorais. As células estromais circundantes podem ser fibroblastos, células endoteliais, células do sistema imunológico, células inflamatórias, entre outras. Adaptado de (Lu *et al.*, 2012).

Curiosamente, para alguns cânceres as células tumorais representam o menor tipo de células presentes em termos de quantidade celular. Isto ocorre porque as células tiram vantagem desse denso microambiente e envolvem-se em um complexo de comunicação com as suas células circundantes (Gouirand *et al.*, 2018).

Como descrito, o microambiente tumoral é reconhecido por ser produto da interação entre diferentes tipos celulares. Elementos estromais, incluindo fibroblastos associados ao câncer (Mueller and Fusenig, 2004) propiciam uma rede de comunicação essencial, via secreção de fatores de crescimento e quimiocinas, induzindo alterações na <u>Matriz Extrac</u>elular (MEC), proporcionando assim sinais oncogênicos adicionais que aumentam a proliferação de células e invasão tumoral (Kalluri and Zeisberg, 2006).

O fibroblasto associado ao câncer (CAF) é o tipo de célula mais abundante no microambiente tumoral (De Wever et al., 2008; Leca et al., 2016), e recebem este nome após serem ativados, ou também podem ser descritos como miofibroblastos (Karvonen et al., 2014). Os CAF são uma subpopulação de fibroblastos encontrados no sítio tumoral que permanecem permanentemente ativados (Wang et al., 2017), enquanto que em condições fisiológicas os fibroblastos são transientemente presentes (Grotendorst et al., 2004; Huet et al., 2019). Estudos publicados evidenciam que somente os fibroblastos ativados são requeridos para iniciar e promover o crescimento tumoral (Orimo et al., 2005; Busch et al., 2015). A ativação dessas células pode ser induzida por vários mecanismos quando a lesão do tecido ocorre, incluindo fatores de crescimento, direta comunicação célula-célula, adesão de moléculas em contato com leucócitos, e microRNAs (Tanaka et al., 2015). Assim como ocorre com os fibroblastos ativados, a progressão do tumor é também dependente de angiogênese e de células inflamatórias e do sistema imune, que também contribuem para o seu crescimento (Rønnov-Jessen et al., 1996; Coussens and Werb, 2002; De Visser et al., 2005).

Assim como ocorre no tecido normal, o estroma tumoral sofre constante e significante remodelamento, o que leva a elaboração de um ambiente favorável para a vascularização, crescimento e invasão de células tumorais (Rocks, Paulissen, Quesada-Calvo, *et al.*, 2008). A heterogeneidade celular encontrada no microambiente tumoral contribui fortemente para a sua progressão, e esta abundante celularidade compõe a natureza e a abundância de componentes da MEC (Cao *et al.*, 2016; Gouirand *et al.*, 2018).

O remodelamento da MEC envolve a permanente produção de proteínas da matriz, montagem e *crosslinking*, assim como o seu processamento ou clivagem ocasionado por <u>metaloproteinases da matriz</u> (MMPs) (Northcott *et al.*, 2018). A degradação da matriz acontece em uma região próxima à superfície das células tumorais, onde há um desequilíbrio natural entre a quantidade de enzimas ativas, e a disponibilidade natural de inibidores dessas proteinases presentes na matriz ou secretados pelas células normais (Handsley and Edwards, 2005; Kim and Rhee, 2016). Proteínas secretadas pelas células tumorais no microambiente da MEC estão, portanto envolvidas na adesão celular, motilidade, comunicação intercelular e invasão (Mbeunkui and Johann, 2009; Castro-Castro *et al.*, 2016).

A alta heterogeneidade celular do microambiente tumoral está associado com substancial deposição de matriz extracelular. Este aumento na densidade da matriz extracelular durante o crescimento tumoral está associado com alterações na rigidez, elasticidade e propriedades mecânicas do microambiente, mas também aumenta a riqueza de macromoléculas circundando as células tumorais. Consequentemente, o microambiente tumoral se torna um centro de produção de nutrientes para as células tumorais, e esse centro é composto de quantidade abundante de macromoléculas, como colágeno, ácido hialurônico, fibronectina, albumina e lipídeos. Para se beneficiar desse microambiente enriquecido e otimizar o uso dessas macromoléculas, as células tumorais fazem macropinocitose, um processo endocítico não seletivo que capta componentes extracelulares e os internalizam dentro de vesículas, que libera esses componentes prontos para serem usados no citoplasma das células tumorais (Gouirand et al., 2018). No câncer de mama, por exemplo, ocorrem modificações quantitativas e qualitativas nos componentes da MEC e seu consequente remodelamento (Fata et al., 2000; Hansen and Bissell, 2000), causadas pela ação proteolítica das proteases secretadas pelas células mamárias (Radenkovic et al., 2014). Estas proteases contribuem para a invasão tumoral, aumentando o potencial maligno das células epiteliais (Rønnov-Jessen et al., 1996). Na glândula mamária neoplásica, há uma imensa atividade proteolítica, com a fragmentação da MEC induzida pelas MMPs, e essa fragmentação tem severas consequências. Isto gera uma via migratória para as células tumorais, que podem livremente ligarem-se a fatores de crescimento e fragmentos de moléculas da MEC que são liberados durante a degradação dessa matriz e ficam disponíveis para os receptores das células tumorais (Freitas et al., 2007; Noriega-Guerra et al., 2018). MMPs são as proteases mais abundantes encontradas durante o remodelamento tecidual e no câncer (Oskarsson, 2013). As metaloproteinases presentes nesse estroma, que degradam a matriz extracelular, são portanto, essenciais para a progressão tumoral e processo metastático (Rocks, Paulissen, Quesada-Calvo, *et al.*, 2008; Castro-Castro *et al.*, 2016; Kim and Rhee, 2016).

### **1.6 Matriz Extracelular (MEC)**

A MEC é encontrada nos espaços intercelulares do tecido conjuntivo, e malha fibrosa consiste de proteínas. proteoglicanos, em uma glicosaminoglicanos (GAGs), material amorfo, minerais e água (Theocharis et al., 2016; Eble and Niland, 2019). Circunda as células em todos os tecidos, propiciando suporte estrutural e definindo as características de forma e função desses tecidos (Rozario and Desimone, 2010; Halper and Kjaer, 2014; Theocharis et al., 2016). A interação com a MEC fornece para as células além do suporte, informações necessárias para regular o destino celular e sua morfologia (Werb, 1997). Assim sendo, as interações célula-MEC são importantes para mediar várias alterações fisiológicas, tais como as decisões de linhagem durante o desenvolvimento, diferenciação, migração celular, e de morte celular programada. Durante o crescimento e desenvolvimento, ocorre um largo espectro de remodelamento da MEC (Page-Mccaw et al., 2007; Stanic et al., 2016), bem como em estados patológicos como o câncer, onde a superfície celular e as proteases da MEC, desempenham papéis fundamentais nestes processos (Coussens et al., 2002).

A proteólise ocasionada pelas metaloproteinases regula a montagem e o remodelamento de estruturas da MEC, através do controle do excesso de componentes, liberando fragmentos bioativos e fatores de crescimento durante o crescimento, morfogênese, reparo tecidual e processos patológicos. Durante as respostas celulares ao desenvolvimento e em condições patológicas, as proteínas de superfície e receptores, são ativados ou removidos pela proteólise (Werb, 1997; Solomonov *et al.*, 2016; Talmi-Frank *et al.*, 2016). A MEC também forma fina camada, denominada de lâmina basal, que delimita o estroma de outros tecidos, como camada de células epiteliais e endoteliais, neurônios e células musculares ou adipócitos. Esta lâmina basal tem como função principal fornecer um substrato mecânico para a adesão celular (Chang *et al.*, 2017; Miller,

2017). As moléculas presentes na MEC podem atuar como reservatórios de substâncias secretadas pelas células, incluindo fatores de crescimento e citocinas. Tais substâncias ficam disponíveis para as células quando a MEC é remodelada pelas MMPs, como ocorrem, por exemplo, durante processos de cicatrização e de invasão de tumores malignos (Miles and Sikes, 2014).

Existe entre as superfícies celulares e a MEC, vias de comunicação que permite às células perceber o ambiente no qual estão inseridas, e essa comunicação é mediada por moléculas de adesão (Tanzer, 2006).





Para que as células tumorais possam migrar para o estroma circundante, faz-se necessário a ação de enzimas proteolíticas responsáveis por propiciar o remodelamento da matriz através da ruptura da membrana basal e por promover a degradação de diferentes moléculas presentes na MEC causando alterações nos níveis de expressão dessas moléculas (Miles and Sikes, 2014). Estes eventos de remodelamento e degradação são em grande parte mediados pelas enzimas proteolíticas denominadas como as metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs) (Rundhaug, 2005; Page-Mccaw *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2013; Dubail and Apte, 2015; Ligi and Mannello, 2016).

### **1.7** Metaloproteinases de Matriz Extracelular (MMPs)

As metaloproteinases de matriz extracelular (também conhecidas como matrixinas ou MMPs) são as principais enzimas responsáveis por efetuar a degradação dos componentes da matriz extracelular. Elas são essenciais para que vários processos biológicos normais, como desenvolvimento embrionário, morfogênese e remodelamento (Szarvas *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2012). Também estão envolvidas em vários processos patológicos, incluindo inflamação, fibrose, artrite, doenças pulmonares e câncer (Amălinei *et al.*, 2010).

MMPs são endopeptidases, que pertencem a uma família de mais de 25 subtipos de proteases zinco-dependentes, capazes de degradar diversos componentes presentes na MEC (Page-Mccaw *et al.*, 2007; Kessenbrock *et al.*, 2010).

As metaloenzimas compreendem uma vasta família de proteínas que desenvolvem importantes funções em vários processos fisiológicos, incluindo o remodelamento tecidual e desenvolvimento dos órgãos, na regulação de processos inflamatórios e em doenças como o câncer (Grasso and Bonnet, 2014). Constituem uma grande família heterogênea de proteínas proteolíticas presentes na MEC, que podem ser classificadas levando em consideração critérios como os mecanismos que desencadeiam uma reação catalítica, substrato de preferência, produtos resultantes e homologia estrutural (Przemyslaw *et al.*, 2013; Jabłońska-Trypuć *et al.*, 2016).

O diagrama estrutural das MMPs mostra 3 domínios que são comuns para quase todas as MMPs (Figura 4), que são: o pró-domínio (ou domínio auto inibitório); o domínio catalítico; e o domínio hemopexina-*like*, que é acoplado ao domínio catalítico através de uma alça flexível (Kessenbrock *et al.*, 2010). O domínio hemopexina contribui para o reconhecimento adequado do substrato, ativação, localização, internalização e degradação da enzima (Overall, 2002; Riley, 2005). As MMPs são sintetizadas na forma de pró-enzima, inicialmente expressas no meio extracelular em um estado enzimaticamente inativo (zimogênio), devido à interação que ocorre entre um resíduo cisteína presente no pró-domínio com o íon zinco do sítio catalítico. Somente após a quebra desta interação, usualmente mediada por remoção proteolítica do pró-domínio ou modificações químicas do resíduo cisteína, o sítio ativo torna-se disponível para que ocorra a interação e a clivagem de substratos (Overall, 2002; Page-Mccaw *et al.*, 2007; Nam *et al.*, 2018). O pró-domínio requer uma clivagem proteolítica realizada por convertases (Kim and Joh, 2012), e essa clivagem pode ocorrer intracelularmente por furinas endopeptidases ou extracelularmente por outras MMPs ou proteases serina, como a plasmina (Sternlicht and Werb, 2001; Remacle *et al.*, 2003; Deryugina *et al.*, 2004; Rozanov *et al.*, 2004).



**Figura 4. Estrutura esquemática das MMPs.** Adaptado de (Tokito and Jougasaki, 2016).

Os substratos das MMPs são moléculas presentes na MEC, e incluem também fatores de crescimento, receptores tirosino-quinase, moléculas de adesão celular, citocinas e quimiocinas, assim como outras MMPs e proteases não relacionadas (Sternlicht *et al.*, 2005; Kessenbrock *et al.*, 2010; Ratnikov *et al.*, 2014). Baseado na estrutura e substratos específicos, as MMPs podem ser classificadas como matrilisinas, colagenases, gelatinases, estromelisinas e MMPs de matriz tipo membrana (Hua *et al.*, 2011; Ratnikov *et al.*, 2014).

As matrilisinas são MMPs com um domínio mínimo, que exibe atividade proteolítica contra os componentes da MEC (Silveira *et al.*, 2018). Desempenha importante papel não somente na degradação das proteínas presentes na MEC, mas também na regulação de vários processos bioquímicos como ativação e degradação de proteínas que não são da MEC (Ii *et al.*, 2006). As colagenases degradam colágenos tipo I,II, III ( colágenos intersticiais) e outras isoformas dessa proteína (Madsen *et al.*, 2007). As estromelisinas possuem domínios estruturais semelhantes aos das colagenases, porém apresentam como substratos várias proteínas da MEC, como proteoglicanos, fibronectina e lamininas (Rundhaug, 2005). As gelatinases interagem com o colágeno tipo IV (presente na membrana basal), V, VII e X, além de fibronectina, elastina e laminina (Rundhaug, 2005; Kurzepa *et al.*, 2014). As MMPs tipo membrana (MT-MMPs) estão ligadas à superfície celular através de um domínio transmembrânico, e degradam gelatina, fibronectina e agrecam, além de outros substratos da MEC (Chen *et al.*, 2013).

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

tem a ligação glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Tatti et al., 2011; Maradni et al., 2013; Chen et al., 2014; Porlan et al., 2014).

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

### 1.8 Adamalisinas

As adamalisinas compreendem uma vasta família de enzimas MMPrelacionadas, que são dependentes de zinco (Porter *et al.*, 2005). Dois grupos de metaloproteinases são distinguidos na família das adamalisinas: as ADAMs (Figura 5) que são proteases ancoradas à membrana plasmática, e as ADAMTS (Figura 5) que são secretadas na MEC (Rocks, Paulissen, El Hour, *et al.*, 2008).



Figura 5. Representação esquemática das ADAMs, ADAMTSs e MMPs. (A) Domínios estruturais das ADAMs, ADAMTSs e MMPs. As ADAMs e ADAMTSs apresentam pró-domínios e domínios catalíticos homólogos às MMPs. As três metaloproteinases diferem nos seus domínios auxiliares C-terminais, os quais medeiam a interação com substratos e outras proteínas. (B) Em contraste com as ADAMs, as ADAMTSs são metaloproteinases secretadas que não possuem domínios transmembrânicos e citoplasmáticos. Adaptado de (Yang *et al.*, 2017).

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

As ADAMs são caracterizadas por seus domínios estruturais conservados (Figura 5), consistindo de um sinal de sequência N-terminal, seguido por um pródomínio, um domínio metaloproteinase, um domínio desintegrina com a região rica em cisteína, um domínio EGF (fator de crescimento epidermal), um domínio transmembrânico e uma cauda citoplasmática. A modulação da atividade das ADAMs ocorre, assim como nas MMPs, pela remoção do pró-domínio, e mudança da sua distribuição intracelular (Reiss and Saftig, 2009). São capazes de mediar a adesão celular, via domínios desintegrina e rico em cisteína, assim como a liberação de moléculas de superfície celular, e também agem na liberação de fatores solúveis, como os fatores de crescimento, hormônios e citocinas. A clivagem ativa a pró-forma ligada à membrana, através da liberação de peptídeos extracelulares que contém atividade biológica (por exemplo, fator de necrose tumoral  $\alpha$  ou EGFR (receptor do fator de crescimento epidermal) ligantes). Esses peptídeos liberados podem ligar-se a seus receptores, e desencadear alguns sinais em eventos autócrinos ou parácrinos (Fluhrer and Haass, 2007).

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



Figura 6. Estrutura das proteinases ADAM e ADAMTS. Adaptado de (Rocks, Paulissen, El Hour, *et al.*, 2008).

As ADAMTSs (uma desintegrina e metaloproteinase com domínios trombospondina) formam uma família de aproximadamente 19 membros de proteases que são enzimas secretadas pelas células, e pelo menos 7 proteínas ADAMTS-*like*, que não possuem atividade enzimática (Kuno *et al.*, 1997; Apte, 2004; Le Goff and Cormier-Daire, 2011). Muitos estudos realizados na década de 90 deixaram claro a ideia de que as proteínas ADAMTS, representam uma importante classe de proteases que são intimamente relacionadas com as ADAMs (Tang and Hong, 1999).

As ADAMTSs pertencem à superfamília de metaloproteinases (enzimas dependentes de zinco) com funções no processamento da MEC, organogênese e hemostasia. São proteases solúveis, que tem como substratos outras proteínas presentes na MEC (Porter *et al.*, 2004). Atuam em muitos processos bioquímicos e biológicos (fisiológicos ou patológicos), incluindo a degradação específica dos proteoglicanos agrecam e versicam, ativação de receptores de superfície celular e fatores de crescimento (Le Goff and Cormier-Daire, 2011), processamento de colágeno (Fernandes *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003; Le Goff *et al.*, 2006), migração celular (Keller *et al.*, 2009), estrutura do tecido conjuntivo, câncer, coagulação, artrite e angiogênese (Le Goff and Cormier-Daire, 2011).

Embora mais de 20 membros da família ADAMTS tenham sido relatados com características próprias, distintos subtipos têm sido descritos de acordo com

a estrutura. Sua estrutura possui multidomínios (Figura 5 e 6) que os permitem diferentes e várias funções, dependendo de qual a combinação de domínios é formada, e se a molécula formada está inteira ou fragmentada (Liu *et al.*, 2006).

Todas as enzimas ADAMTS compartilham domínios estruturais comuns (Figura 7), que compreendem a partir da região N-terminal, um peptídeo sinal, um pró-domínio, um domínio catalítico, um domínio desintegrina-*like*, um domínio trombospondina central, um domínio rico em cisteína, e uma região espaçadora. O que diferencia os membros dessa família é a quantidade de domínios trombospondinas que cada uma delas apresenta (Kuno *et al.*, 1997; Tang and Hong, 1999; Stanton *et al.*, 2011).



Figura 7. Domínios estruturais dos membros da família ADAMTS. Adaptado de (Kumar *et al.*, 2012).

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

As ADAMTSs são sintetizadas como zimogênios inativos, e para que a protease seja ativada, é necessário que haja a excisão do pró-domínio. Essa ativação pode ser mediada por diversos processos, como por pró-proteínas convertases (enzimas furina e furina-like), e é provável que o processamento por convertases seja comum entre todas as ADAMTSs (Rocks, Paulissen, El Hour, et al., 2008; Le Goff and Cormier-Daire, 2011; Stanton et al., 2011). É no domínio metaloproteinase, que segue imediatamente o pró-domínio, que é o ponto da organização estrutural onde se iniciam as diferenças entre as famílias de metaloproteinases (Niewiarowski et al., 1994). O domínio catalítico possui um elevado grau de homologia entre as diferentes ADAMTSs, e contém a sequência de ligação ao zinco HEXXHXXGXXH, na qual o zinco catalítico é coordenado pelos três resíduos de histidina (Gomis-Rüth, 2009; Tallant et al., 2010). O domínio desintegrina-like localiza-se em estreita proximidade com o sítio ativo, e funciona provavelmente regulando a atividade da enzima, fornecendo substrato auxiliar de ligação à superfície (Gerhardt et al., 2007; Mosyak et al., 2008). O domínio rico em cisteína e a região espaçadora, determinam o reconhecimento e a ligação da protease aos substratos, assim como a sua localização na MEC (Gendron et al., 2007; Fushimi et al., 2008). O domínio trombospondina (TSP) central é altamente conservado entre todas as ADAMTSs. Os domínios TSP adicionais (que variam em quantidade entre os membros da família ADAMTS) presentes na região C-terminal da protease, atuam juntamente com o domínio desintegrina, para manter a protease em uma localização apropriada na MEC e para o correto reconhecimento dos substratos (Stanton et al., 2011).

Substratos	Proteases
Agrecam	ADAMTS 1, 4, 5, 9 e 15
Versicam	ADAMTS 1, 4 e 9
Brevicam	ADAMTS 4
Pró- colágeno	ADAMTS 2, 3 e 14
Fator de Von Willebrand	ADAMTS 13
Proteína oligomérica da matriz da cartilagem	ADAMTS 7 e 20
Desconhecido	ADAMTS 6, 16, 17, 18 e 19

## Tabela 1.Substratos das ADAMTSs.

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

## 1.9 ADAMTS-1

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

ADAMTS-1 remodela a MEC através da degradação proteolítica de substratos chave (presentes na MEC) como os proteoglicanos agrecam,

versicam, brevicam, sulfato de condroitina (Nakamura *et al.*, 2005) e colágeno (Hu *et al.*, 2012). Também atua como fator anti-angiogênico, por sequestrar fatores de crescimento VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), impedindo a interação do fator de crescimento com seu respectivo receptor (Kuno *et al.*, 2000; Sandy *et al.*, 2001; Russell *et al.*, 2003). ADAMTS-1 é conhecida como uma das enzimas que degradam versicam, por exemplo, na aorta humana (Sandy *et al.*, 2001). Estudos relatam que a expressão de ADAMTS-1 é induzida em células endoteliais devido a uma variedade de diferentes condições, por exemplo por hipóxia (Hatipoglu *et al.*, 2009).

ADAMTS-1 possui na sua região C-terminal, três domínios TSP tipo 1 (TSP1), separados por um domínio rico em cisteína e a região espacadora, que a diferencia dos outros membros da família de ADAMTSs (Kuno et al., 1997). É sintetizada como um pró-zimogênio e sofre glicosilação logo após a tradução da proteína. A secreção de ADAMTS-1 para a MEC requer a excisão desse pródomínio da proteína madura de 87 kDa, por endopeptidases furina relacionadas. ADAMTS-1 pode ser processada, e ser detectada como uma proteína de 65 kDa. A região C-terminal da protease madura liga-se diretamente na MEC, e se associa com outras proteínas tais como fibulina-1, TGF-B (fator de transformação do crescimento beta) latente e com proteoglicanos sulfatados. A protease catalisa a degradação do colágeno tipo I (Rehn et al., 2007), proteoglicanos do estroma de tecidos específicos como o versicam (Russell et al., 2003; Ricciardelli et al., 2011), agrecam (Rodríguez-Manzaneque et al., 2002), sindecam-4 (Rodríguez-Manzaneque et al., 2009) e proteínas da membrana basal (nidogênio 1 e 2) (Canals et al., 2006; Tan et al., 2013). Assim, a estrutura complexa de ADAMTS-1 pode, portanto, influenciar o ambiente tumoral por uma série de vias (Tan et al., 2013).

ADAMTS-1 é uma molécula secretada que não possui domínio transmembrânico, e que portanto, faz parte da MEC (Kelwick *et al.*, 2015). A interação dessa molécula com proteínas da MEC e receptores celulares tumorais, a torna candidata a modular o microambiente tumoral, influenciando a progressão do tumor (Porter *et al.*, 2005). Proteases de matriz extracelular estão envolvidas em várias etapas do desenvolvimento e progressão dos cânceres, incluindo a angiogênese e metástase. Por clivagem de componentes da MEC,

as proteases regulam a migração de células endoteliais e modulam seletivamente a liberação de fatores pró e antiangiogênicos (Gustavsson *et al.*, 2010). Dessa forma, ADAMTS-1 poderia ser uma molécula regulatória do câncer de mama. ADAMTS-1 possui atividade anti-angiogênica, e suprime o crescimento tumoral e potencial metastático (Shozu *et al.*, 2005).

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

Elevados níveis de ADAMTS-1 conferem mudanças no comportamento das células cancerosas, que auxiliam o processo de metástase. No câncer de mama, o aumento da expressão de ADAMTS-1 que ocorre durante a tumorigênese, ocorre também na progressão metastática (Minn *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2013). Em contraste, há um estudo feito por Porter e seus colaboradores em 2004, que mostra que os níveis de mRNA de ADAMTS-1 estão diminuídos nas amostras de câncer de mama, quando comparados ao tecido mamário não neoplásico. Este estudo porém, não foi capaz de encontrar uma forte relação entre os níveis de mRNA de ADAMTS-1 e as características clínicas patológicas dessas neoplasias (Porter *et al.*, 2004). Estudo publicado pelo nosso grupo mostrou que neoplasias de mama que não possuem receptores de estrógeno, progesterona e HERBB2 (tumores *triple negative*), possuem quantidades

menores de ADAMTS-1 no estroma quando comparadas com o tecido mamário normal e neoplasias mais diferenciadas (Freitas *et al.*, 2013). O mecanismo de ação de ADAMTS-1 na progressão do câncer ainda não está claramente definido. Embora a molécula inteira de ADAMTS-1 promova a metástase, fragmentos da molécula NH<sub>2</sub> ou COOH, que não possuem atividade catalítica mostraram um efeito inibitório contra a metástase (Liu *et al.*, 2006). Essa informação sugere que ADAMTS-1 poderia ser uma molécula com atividade tanto tumoral como antitumoral (Porter *et al.*, 2005).



**Figura 8. Síntese e função da protease ADAMTS-1.** Adaptado de (Tan *et al.*, 2013).

## 1.10 MMPs nucleares

As MMPs são usualmente localizadas no compartimento extracelular, causando o remodelamento da MEC. Porém, estudos tem caracterizado MMPs também localizadas no núcleo das células com distintas funções, como por exemplo a MMP-2, MMP-3, MMP-9 e MMP-13 foram descritas presentes no núcleo celular (Si-Tayeb *et al.*, 2006; Sinha *et al.*, 2014). Existem evidências de

que as MMPs possuem o sinal de localização nuclear (NLS) que permite sua entrada no núcleo e regula alguns eventos nucleares, e que este sinal é comumente localizada no domínio catalítico (Xie *et al.*, 2017). O NSL é uma sequência peptídica que permite o transporte ativo de proteínas para o núcleo (Chang *et al.*, 2013). Há na literatura estudos demonstrando que após serem ativadas, alguns tipos de MMPs nucleares são translocadas para o núcleo devido à presença do NSL na região carboxi-terminal de pró-MMPs (Mittal *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2017).

Em 2016, Silva e seus colaboradores publicaram um estudo caracterizando ADAMTS-1 no núcleo de células mamárias humanas normais e tumorais. Neste estudo, eles analisaram a atividade proteolítica de ADAMTS-1 compartimento nuclear, demonstrando que é uma protease com função ativa sobre um de seus substratos, o agrecam (Silva et al., 2016). Já foi observado também TIMP-1 acumulado no núcleo de fibroblastos gengivais humanos, e MMP-2 localizada no núcleo de miócitos cardíacos (Kwan et al., 2004). Um estudo molecular e imunocitoquímico realizado para avaliar a expressão de MMPs no tecido mamário saudável e no câncer de mama, descreveu que a MMP-1 está predominantemente presente no núcleo das células tumorais, com uma leve marcação citoplasmática (Köhrmann et al., 2009), enquanto que no tecido mamário normal não foi detectada a marcação de MMP-1 (Mannello, 2011). Além da localização dessa protease no núcleo das células de mama, dados não publicados pelo nosso grupo também evidenciam a presença de ADAMTS-1 no núcleo de células malignas de ovário. Além desses estudos in vitro, um estudo publicado pelo nosso grupo em 2013, demonstrou por imunohistoquímica, que ADAMTS-1 está localizada no núcleo das células de mama não malignas e de carcinomas ductais invasivos em diferentes graus de estadiamento, demonstrando que esse padrão de localização nuclear da protease, também é observada nos tumores humanos (Freitas et al., 2013). Marchant e seus colaboradores, em 2014, somaram às funções já estabelecidas da MMP-12, novos mecanismos de ação da protease que antes conhecidamente de matriz extracelular, com função intracelular, pode estar no núcleo celular, envolvida com a regulação da transcrição de genes (MARCHANT et al., 2014).

A identificação da localização nuclear de algumas MMPs sugere que esta localização alternativa representa um importante aspecto da função das MMPs. De fato, existem fortes evidências de que essa compartimentalização nuclear das MMPs possa participar em muitos processos celulares fisiológicos e patológicos, e que elas podem atuar de forma constitutiva, regulatória e como proteinases induzíveis (Mannello and Medda, 2012).

# 2. JUSTIFICATIVA

Sabendo-se que a protease ADAMTS-1 apesar de ser uma molécula conhecidamente secretada para a matriz extracelular apresenta uma inusitada localização nuclear, temos interesse em saber as condições em que a ADAMTS-1 está presente no núcleo dessas células, quais seus possíveis ligantes nesse compartimento e por último mas não menos importante, qual a função que essa protease exerce no núcleo.

## 3. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar como ocorre a localização e distribuição da protease ADAMTS-1 entre os compartimentos citoplasmáticos e nucleares das linhagens celulares MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231;

Identificar qual sua atividade quando presente no núcleo das células.

# 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a localização e distribuição de outras proteases como a ADAMTS-4 e 5 nas três linhagens celulares estudadas, a fim de verificar se existem outras proteases da família ADAMTS classificadas como agrecanases também presentes no compartimento nuclear;
- Avaliar a função de ADAMTS-1 no compartimento nuclear;
- Avaliar se ocorrem mudanças na localização nuclear da ADAMTS-1 em diferentes condições de cultivo celular;
- Com o auxílio de inibidores seletivos de secreção ou endocitose, estudar como a ADAMTS-1 alcança o núcleo da célula;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1 Linhagens celulares e condições de cultivo

As linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231, HEK-293T, HTR-8, NIH-OVCAR 3 e os fibroblastos foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco/Diluído com nutriente F-12 na concentração de 1:1 (DMEM/F-12, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB - Cultilab, Campinas, Brasil).

Temos no nosso laboratório uma linhagem bem estabelecida de células que superexpressam ADAMTS-1, denominada HEK-293T MPA (<u>m</u>cherry <u>p</u>uromycin <u>ADAMTS-1</u>). Essa linhagem foi cultivada nas mesmas condições que as células acima citadas.

A linhagem MCF-10A, derivada de epitélio mamário normal, foi cultivada em DMEM/F-12, suplementado com 5 % de soro de cavalo, 20 ng/ml de EGF, 0,5 mg/ml de hidrocortisona, 10 mg/ml de insulina e 100 ng/ml de toxina colérica. As células foram mantidas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> a 37 °C, em atmosfera contendo 5 % de CO<sub>2</sub>.

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

#### 4.2 Análise da endocitose de ADAMTS-1

Ensaios de endocitose foram realizados com o objetivo de avaliar a localização da protease quando a endocitose de moléculas é impedida. Para isso, utilizamos o Dynasore (Sigma, D7693), na concentração de 80 µM. Dynasore é uma droga que age inibindo a ação da proteína dinamina, que tem

papel importante na fusão de vesículas endocíticas. Para esses ensaios, utilizamos as células com uma densidade entre 40 % a 70 %, pois culturas mais confluentes são mais resistentes aos efeitos da droga. Para analisar o resultado da incubação das células com Dynasore, fizemos Western blotting e imunofluorescência. Para imunofluorescência, as células foram plaqueadas sobre lamínulas, em meio de cultura próprio para crescimento de cada linhagem na concentração de 2 x 10<sup>5</sup> por 24 horas, e para Western blotting as células foram plaqueadas em plaças de 100 mm x 20 mm em meio próprio para crescimento de cada linhagem na concentração de 1 x 10<sup>6</sup> por 24 horas. Depois disso, as células foram lavadas por 3 vezes com meio de cultura sem SFB, e mantidas em cultura por 2 horas para carenciamento de nutrientes. Passadas 2 horas, as células foram tratadas com 80 µM de Dynasore por 24 horas. A amostra controle foi mantida em meio de cultura sem adição de suplementos contendo 0,2 % de DMSO (veículo).

#### 4.3 Análise da secreção de ADAMTS-1

A fim de verificar se a secreção de ADAMTS-1 contribui para a localização nuclear da protease, avaliamos o perfil secretório da protease utilizando Heparina. A heparina é uma substância que impede que ocorra a clivagem da protease, fazendo com que ela seja secretada na sua forma total. Com a utilização dessa substância, avaliamos se a protease é endocitada na sua forma completa e/ou também após sofrer clivagem.

Para imunofluorescência, as células foram plaqueadas sobre lamínulas, em meio de cultura próprio para crescimento de cada linhagem na concentração de  $2 \times 10^5$  por 24 horas, e para Western blotting as células foram plaqueadas em placas de 100 mm x 20 mm em meio próprio para crescimento de cada linhagem na concentração de 1 x 10<sup>6</sup> por 24 horas. Depois disso, as células foram lavadas por 3 vezes com meio de cultura sem SFB, e mantidas em cultura por 2 horas para carenciamento de nutrientes. Passadas 2 horas, as células foram tratadas com 5 µg/ml de heparina (diluída em meio de cultura sem SFB) por 24 horas. Após esse tempo, as células foram lisadas e o meio de cultura coletado para análise do meio condicionado.

#### 4.4 Bloqueio da exocitose de ADAMTS-1

Para o ensaio de bloqueio da exocitose, utilizamos Monensina (ab 120499), para bloquear a exportação de proteínas feita pelo aparelho de Golgi, depois proceder com fracionamento celular e subsequente análise por Western Blot e imunofluorescência.

Para imunofluorescência, as células foram plaqueadas sobre lamínulas, em meio de cultura próprio para crescimento de cada linhagem na concentração de  $2 \times 10^5$  por 24 horas, e para Western blotting as células foram plaqueadas em placas de 100 mm x 20 mm em meio próprio para crescimento de cada linhagem na concentração de 1 x 10<sup>6</sup> por 24 horas. Depois disso, as células foram lavadas por 3 vezes com meio de cultura sem SFB, e mantidas em cultura por 2 horas para carenciamento de nutrientes. Passadas 2 horas, as células foram tratadas com 2 µM de Monensina por 24 horas, em meio completo com 10 % de soro fetal bovino. Após esse tempo, as células foram lisadas e o meio de cultura coletado para análise do meio condicionado.

# 4.5 Bloqueio do transporte mediado por poros nucleares utilizando Importazole

A fim de avaliar se ADAMTS-1 presente no citoplasma das células poderia ser transportada para o núcleo através do transporte núcleo citoplasmático, utilizamos o Importazole.

Para imunofluorescência, as células foram plaqueadas sobre lamínulas, em meio de cultura próprio para crescimento de cada linhagem na concentração de 2 x 10<sup>5</sup> por 24 horas, e para Western blotting as células foram plaqueadas em placas de 100 mm x 20 mm em meio próprio para crescimento de cada linhagem na concentração de 1 x 10<sup>6</sup> por 24 horas. Depois disso, as células foram lavadas por 3 vezes com meio de cultura sem SFB, e mantidas em cultura por 2 horas para carenciamento de nutrientes, seguido do tratamento com 50  $\mu$ M de Importazole (Sigma Aldrich) diluído em DMSO, por 5 horas em meio sem soro, seguido do tratamento com 10 ug/ml de LPS (Sigma Aldrich) por 1 hora. As células foram lavadas com PBS 1X, então adicionado meio sem soro por 24 horas para a avaliação do meio condicionado e do lisado celular. As células controle foram mantidas em meio de cultura contendo DMSO (o veículo de diluição de Importazole), com o volume equivalente ao que foi adicionado nas células tratadas com importazole.

## 4.6 Análise de endocitose

As células HT-1080 e os fibroblastos foram utilizadas para esse ensaio por não apresentarem o padrão de localização nuclear de ADAMTS-1, sendo um bom modelo para monitorar a possível endocitose da protease. As células plaqueadas sobre lamínulas foram carenciadas por 1 hora ou 24 horas. Depois, foi adicionado meio condicionado das células MDA-MB-231, HEK-293T, HEK-293T MPA à essas células por 1 hora ou 24 horas na presença ou ausência de Dynasore. O tratamento foi feito com 80 µM de Dynasore (Sigma Aldrich) por 1 hora ou 24 horas adicionado ao meio de cultura. As amostras do grupo controle foram mantidas em meio de cultura contendo DMSO (o veículo de diluição de Dynasore), com o volume equivalente ao que foi adicionado nas células tratadas com Dynasore.

Como controle positivo do ensaio, para as células HT-1080 utilizamos o anticorpo Anti β-integrina conjugado com fluoróforo Alexa-568, incubando o anticorpo com a célula viva durante 2 horas à 37°C e monitoramos a endocitose dessa molécula na presença de Dynasore ou veículo (DMSO). Para os fibroblastos, utilizamos a Transferrina-GFP, incubando a transferrina nas células por 15 minutos na presença ou na ausência de 80 µM de Dynasore.

#### 4.7 Western Blotting

Verificamos a expressão proteica de ADAMTS-1 nos diferentes compartimentos celulares após os diferentes tipos de tratamentos efetuados durante o trabalho. Analisamos: meio condicionado (representando o material secretado), fração nuclear e fração citosólica. Para a precipitação do meio condicionado, o meio foi recolhido em tubos contendo inibidor de protease. A amostra foi precipitada e ressuspensa em tampão de corrida. As frações celulares foram obtidas com o kit NE-PER Reagente de extração de proteínas nucleares e citoplasmáticas de acordo com as instruções do fabricante (Pierce, Rockford, IL).

A eletroforese foi realizada seguindo o método SDS-PAGE. Foram carregadas 30 µg de proteína por poço, que foram separadas em gel de poliacrilamida 10 %. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham, GE Healthcare Life Science, Pittsburgh, USA), bloqueadas com 5 % de leite em TBS-*tween* (TTBS) e incubadas com anticorpos que reconheçam a proteína ADAMTS-1 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), ADAMTS-4 e ADAMTS-5 (Abcam, Cambridge, MA, USA). Esses anticorpos primários foram detectados por anticorpos secundários conjugados com peroxidase. Para possibilitar a marcação com mais de um anticorpo, as membranas foram "stripped" com "Restore Western Blot Stripping Buffer" (Pierce) e submetidas a novas marcações.

Como controle de carregamento, para a fração nuclear utilizamos o anticorpo primário HDAC1 ou HDAC2 (anti-histona) e para a fração citoplasmática o GAPDH.

#### 4.8 Imunofluorescência indireta

Concomitante à análise protéica por *western blotting*, analisamos também a imunolocalização de ADAMTS-1 após os diferentes tratamentos. As células foram depositadas sobre lamínulas de vidro, na concentração de 2 x  $10^5$  de células, com 1 ml de DMEM/F12 e mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após tratamento, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído em PBS 1X. As lamínulas foram lavadas 3 vezes de 5 minutos com o PBS, permeabilizadas com 0,5 % de Triton X-100 em PBS por 10 minutos e incubadas com 100  $\Box$ I de 10 % *Normal Goat Serum* (KPL, Gaithersburg, USA) por 1 hora. Logo após o bloqueio dos sítios inespecíficos, as amostras foram incubadas com 100 µI de anticorpo primário ADAMTS-1, Golgina e NF kB p65 overnight. As lamínulas foram lavadas novamente por 3 vezes de 5 minutos com PBS e incubadas com anticorpo secundário conjugado com o fluoróforo Alexa Flúor 568 (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), na concentração de 1:200, diluído em 10 % *Normal Goat Serum* (KPL, Gaithersburg, USA), por 1 hora no escuro. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS, e incubadas com Faloidina-Alexa 488 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), na concentração de 1:100, diluída em PBS, por 15 minutos no escuro. As lâminas foram então montadas em lâminas de vidro com *Prolong Gold antifade reagent with DAPI* (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA). A substituição do anticorpo primário por PBS foi utilizado como controle negativo.

#### 4.9 Digestão de substratos

Os ensaios de digestão de todas as proteínas foram realizados em 100 µl de tampão contendo 50 mM de Tris-HCI (pH 7.5), 100 mM de NaCI e 10 mM de CaCl<sub>2</sub>. 500 nM de agrecam (proveniente da cartilagem articular de bovino; A 1960, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) foi incubado com 30 µg de proteínas da fração nuclear da linhagem MCF-10A e MDA-MB-231. Todas os grupos examinados (agrecam, agrecam + fração nuclear ou fração nuclear), foram mantidos na temperatura de 37°C *overnight*. A reação de digestão foi encerrada com a adição de 10 µl de EDTA 0,5M nas amostras. As amostras foram enzimaticamente deglicosiladas com condroitinase ABC (0,01 unidade /10 µg de agrecam), por 1 hora a 37 °C, em 100 µl de tampão contendo 50 mM de acetato de sódio e 100 mM de Tris-HCI (pH 6.5). Após a digestão e a deglicosilação, as amostras foram analisadas por Western Blot em um gel de gradiente de 5 a 15 %, com o anticorpo primário Anti-agrecam (SAB 4500662, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) e também com o anti-agrecam (Ab3778, Abcam) na concentração 1:500 em TBS 1X.

#### 4.10 Análise da interação ADAMTS-1 e cromatina

Nesse experimento pretendíamos analisar quão forte é a interação de ADAMTS-1 com a cromatina. Para tanto, antes de realizarmos a imunofluorescência as células foram tratadas com tampões que fizeram a extração controlada de alguns componentes celulares.

Um experimento de fracionamento subcelular sobre lamínulas de vidro foi efetuado, baseado nos estudos de Yoshimura e colaboradores (Yoshimura et.al, 2003). As linhagens celulares MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231, foram depositadas sobre lamínulas de vidro, na concentração de 2 x 10<sup>5</sup> de células, com 1 ml de DMEM/F12 e mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Passadas 24 horas, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído em PBS 1X.

As células então foram tratadas com um Tampão A (10 mM de PIPES pH 6,8; 100 mM de NaCl; 300 mM de sucrose; 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de EGTA; 0,5 % de Triton X-100; 1 mM de PMSF), a 4°C por 10 minutos, tratamento esse que resultará na remoção da membrana plasmática, proteínas solúveis no citoplasma e no nucleoplasma. As proteínas nucleares foram extraídas por um breve tratamento com o tampão B (10 mM de PIPES pH 6,8; 250 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 300 mM de sucrose, 3 mM de MgCl<sup>2</sup>; 1 mM de EGTA; 0,5 % de Triton X-100; 1 mM de PMSF), a 4°C por 5 minutos. A cromatina remanescente foi digerida com DNase I (deoxyribonuclease I) em um tampão de digestão (10 mM de PIPES pH 6,8; ;50 mM de NaCl; 300 mM de sucrose; 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de EGTA; 0,5 % de Triton X-100; 1 mM de PMSF), a 4°C por 1 hora, e então foi lavado com o tampão B. As estruturas remanescentes após o tratamento individual com cada tampão foram então fixadas com 3% de paraformaldeído em PBS a 25 °C por 15 minutos, e então incubados com o anticorpo primário. A ligação específica foi detectada utilizando o anticorpo secundário conjugado com o fluoróforo Alexa Flúor (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA). Foram feitas observações com o microscópio convencional de fluorescência.

## 4.11 Transfecção celular

Células MDA-MB-231 foram transfectadas usando ADAMTS-1-siRNA ("small interfering RNA" - siRNA, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) levando à diminuição da expressão do RNA mensageiro e consequentemente da proteína ADAMTS-1 nessas células. siRNA foi obtido comercialmente, bem como o siRNA-controle, o meio de transfecção (Opti-MEM, Gibco®, Life Technologies) e o reagente de transfecção formador de lipossomos disponíveis no mercado (Lipofectamine 2000, Life Technologies).

As células foram cultivadas em placas de 100 mm x 20 mm na concentração de 1x10<sup>7</sup>, em meio DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB, isento de antibiótico. Em seguida, de acordo com as instruções do fabricante, o meio de transfecção, o reagente de transfecção e o siRNA (10 µM) foram combinados, de modo que a concentração final do siRNA-ADAMTS-1 e o siRNA-controle fossem de 50 nM, e incubados a temperatura ambiente por 30 minutos. Essa solução foi adicionada às células, que permaneceram a 37°C por 6 horas. Após esse tempo, foram adicionados 5 ml de DMEM/F12 suplementado de 10% de SFB com antibióticos. Como controle, outro grupo de células foi transfectado com RNA de sequência "scrambled" que não induz degradação de nenhuma mensagem celular. A eficiência da transfecção foi analisada por imunofluorescência e por western blot, visando detectar se o tratamento com siRNA diminuiu a expressão da proteína em questão.

## 4.12 Imunohistoquímica

Lâminas "tissue microarray" de amostras normais e tumorais de mama humana foram obtidas da Imgenex (San Diego, CA; IMH-364). Cortes (4 µm) foram analisados. Os cortes foram desparafinados em xileno e hidratados em concentrações decrescentes de etanol. A recuperação de antígenos foi realizada com tampão citrato (ácido cítrico 10 mM, 0,05% de Tween 20, pH 6,0) por 30 minutos a 100°C. Os cortes foram bloqueados durante 1 hora com 1% de BSA (Sigma) em PBS. ADAMTS-1 foi identificada com anticorpo policlonal de coelho (1:1000 em PBS, Ab28284, Abcam) durante a noite a 4 °C. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizada durante 20 minutos, seguido do anticorpo secundário conjugado com biotina-anti-coelho (Dako) durante 30 minutos. Diaminobenzidina (Sigma) foi utilizado como cromógeno e os cortes foram contrastados com hematoxilina de Mayer (Sigma).

#### 4.13 Ensaio de "ferida"

Para avaliar a migração das células selvagens e moduladas para ADAMTS-1 e tratadas ou não com meio de cultura contendo ADAMTS-1, utilizamos o método de "ferida". As células cresceram em placas de 30 mm de diâmetro até atingirem a confluência de 80%. Em seguida, foi feita uma "ferida" na monocamada, através de delicada passagem de ponteira de pipeta de 10 µL sobre a mesma. Esta passagem determinou uma descontinuidade na monocamada, cujas células em sua margem tendem a migrar para os espaços vazios. Pontos de referência foram demarcados no fundo de cada placa, a fim de permitir obtenção de fotomicrografias das mesmas regiões das "feridas" em diferentes tempos (0 e 24 horas). A migração celular foi avaliada como área livre (arbitrariamente marcada como região com ausência de células) e foi medida com auxílio do programa Image J (software de domínio público desenvolvido por Wayne Rasband, NIMH, NIH, USA), sendo que o decréscimo percentual da área da "ferida" caracterizou o índice de migração celular.

#### 4.14 Análises estatísticas

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

#### 5. RESULTADOS

#### 5.1 ADAMTS-1 é a única agrecanase nuclear

Para verificar se outras agrecanases estariam presentes no núcleo das células de mama normal e tumoral, analisamos a localização e a expressão das agrecanases ADAMTS-4 e ADAMTS-5. Após o período de 24 horas de cultura com meios adequados e suplementação, observamos que somente ADAMTS-1 (canal vermelho) apresenta expressão proteica no núcleo das três linhagens celulares de mama estudadas que apresentam diferentes graus de malignidade. O contrário foi observado com as outras agrecanases ADAMTS-4 e ADAMTS-5 (canal vermelho), onde a distribuição dessas proteases é dispersa por todo o citoplasma nas três linhagens celulares MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231, sem apresentarem localização nuclear pontual como foi observado com ADAMTS-1. O mesmo foi observado ao avaliarmos a distribuição dessa agrecanases por imunofluorescência na figura 9, comprovando que somente ADAMTS-1 está inserida no núcleo das células estudadas.

A fim de confirmarmos a localização não nuclear dessas agrecanases, fizemos experimentos de Western blot, onde fomos capazes de observar que as proteínas das agrecanases ADAMTS-4 e ADAMTS-5 estão predominantemente localizadas no citoplasma das células, nas três linhagens (Figura 10A, 10B e 10C), tendo como controle de fracionamento citoplasmático utilizado a proteína GAPDH, predominantemente expressa no citoplasma celular. **Figura 9. ADAMTS-1 é a única agrecanase nuclear**. Imunolocalização de ADAMTS-1, ADAMTS-4 e ADAMTS-5 nas células MCF-10A (A), MCF-7 (C) e MDA-MB-231 (D). As imagens mostram a localização não nuclear das agrecanases (em vermelho) ADAMTS-4 e ADAMTS-5 em comparação com ADAMTS-1. B) projeção ortogonal de MCF-10A, evidenciando a protease no compartimento nuclear (setas pretas). Azul-Núcleo, Verde- F-actina e Vermelho-ADAMTS-1, ADAMTS-4 e ADAMTS-5. Barra de escala: 5 µm. Fonte: (Silva *et al.*, 2016).



В

D



MCF-10A

MDA-MB-231

С

MCF-7





Figura 10: ADAMTS-4 e ADAMTS-5 estão predominantemente expressas no citoplasma. Expressão proteica de ADAMTS-4 e ADAMTS-5 mantidas por 24 horas em meio de cultura sem soro, mostrando que ADAMTS-4 e ADAMTS-5 estão predominantemente expressas no compartimento citoplasmático das células (A) MCF-10A, (B) MCF-7 e (C) MDA-MB-231. Marcação para ADAMTS-4 e ADAMTS-5, e como controle de carregamento e pureza das frações utilizamos a  $\beta$ -actina, a histona (fração nuclear) e o GAPDH (fração citoplasmática). Fonte: (Silva *et al.*, 2016).

#### MCF-10A



В

MCF-7

С

#### MDA-MB-231



#### 5.2 Localização de ADAMTS-1 em tecidos mamários

Analisamos através de imunohistoquímica a presença e a localização de ADAMTS-1 em tecidos mamários. Observamos na figura 11 A que ADAMTS-1 estava presente no núcleo de células de carcinoma ductal invasivo, com as mesmas características observadas nas células *in vitro*. Já no tecido normal de mama (figura 11 B), a protease mostrou-se presente no núcleo e citoplasma das células mioepiteliais, mas em células luminais o mesmo não foi observado.

#### 5.3 Localização de ADAMTS-1 em diferentes tipos celulares

Ao avaliarmos a localização de ADAMTS-1 em diferentes tipos celulares com origem e fenótipo mesenquimal/epitelial, observamos que dependendo da origem das células, ADAMTS-1 está distribuída diferentemente.

Com base nos resultados mostrados na figura 12, podemos observar uma clara localização de ADAMTS-1 nuclear/nucleolar em células HTR-8, MDAH-2774 e NIH-OVCAR 3. Em contrapartida, nas células HT-1080, U251 e fibroblastos, ADAMTS-1 está presente dispersa pelo citoplasma sem marcação nuclear/nucleolar.

Vimos que a presença de ADAMTS-1 no núcleo não é um fenômeno que ocorre de maneira igual em todos os tipos de células. A presença de ADAMTS-1 nuclear acontece em células de origem epitelial, enquanto que em células de origem mesenquimal a protease está predominantemente localizada no citoplasma.

Figura 11. ADAMTS-1 está presente no núcleo de células de carcinoma ductal invasivo, mas não em células luminais do tecido mamário normal. Imunohistoquímica de (A) tecido mamário de carcinoma ductal invasivo, mostrando que ADAMTS-1 está no núcleo das células (setas brancas), e que células em processo de divisão celular não expressam a protease nuclear (cabeças de setas brancas), e (B) tecido mamário normal, mostrando que a expressão de ADAMTS-1 é diferente entre células basais e luminais. Barra de escala: 100 µm.Fonte: (Silva *et al.*, 2016).



А

В

Figura 12. ADAMTS-1 está localizada no núcleo de células de origem epitelial, mas em células de origem mesenquimal sua distribuição é citoplasmática. Imunofluorescência de células (A) com origem e fenótipo epitelial e também (B) mesenquimal, mostrando a diferente compartimentalização de ADAMTS-1 (em vermelho) entre as diferentes linhagens. Azul-Núcleo, Verde- F-actina e Vermelho- ADAMTS-1. Barra de escala: 20 µm.





#### 5.4 ADAMTS-1 está localizada no núcleo assim como o agrecam

Tendo em vista que a localização de ADAMTS-1 é nuclear, e que na literatura já está amplamente descrito que ela trata-se de uma agrecanase que tem como um dos substratos de interação o agrecam, nós investigamos como esse proteoglicano estaria distribuído entre os compartimentos das três linhagens celulares estudadas.

Inesperadamente, agrecam está também presente no núcleo, colocalizando com ADAMTS-1 (figura 13). Ao analisarmos a expressão proteica de agrecam, vimos que há maior expressão da proteína no núcleo das células, corroborando com os dados vistos por imunofluorescência. Figura 13. Agrecam, o substrato de ADAMTS-1 está também distribuído pelo núcleo das células. (A) Imunofluorescência de MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231, mostra a proteína agrecam (em verde) colocalizando com ADAMTS-1 (em vermelho) no núcleo. (B) A expressão proteica de agrecam mostrando sua localização. Marcação para Agrecam, e como controle de carregamento e pureza das frações utilizamos a  $\beta$ -actina, a histona (fração nuclear) e o GAPDH (fração citoplasmática). Azul-Núcleo, Verde- Agrecam e Vermelho- ADAMTS-1, Barra de escala: 5 µm. Fonte: (Silva *et al.*, 2016).



MDA-MB-231

А

В



#### 5.5 ADAMTS-1 tem função enzimática ativa no núcleo

A fim de verificarmos se a protease presente no núcleo poderia desempenhar sua função proteolítica como a que acontece na matriz extracelular, nós procedemos com o ensaio de digestão do agrecam, uma vez que nós observamos que assim como ADAMTS-1 o agrecam está presente no núcleo. Para isso, primeiro fizemos o silenciamento da protease presente na fração nuclear.

Avaliando eficiência do silenciamento. а observamos na imunofluorescência da figura 14 A, que após o silenciamento das células MDA-MB-231 a imunolocalização de ADAMTS-1 não foi exatamente pontual como observamos na amostra controle, mostrando-se muito menos intensa na amostra silenciada. Para ilustrarmos melhor este dado, foi realizada uma análise no software Image J utilizando a ferramenta análise de partículas, gerando um gráfico que ilustra a porcentagem da razão da área ocupada por ADAMTS-1/núcleo. Através dessa análise observamos que com o silenciamento da proteína houve uma diminuição estatisticamente significante da expressão de sua localização no núcleo da célula (Figura 14 B).

Ao analisarmos a expressão proteica da protease na mesma célula, observamos que ADAMTS-1 não está presente na fração citoplasmática, enquanto que na fração nuclear controle há maior expressão de ADAMTS-1 quando comparada à amostra silenciada (banda de 87 kDa). O mesmo resultado foi observado no meio condicionado, na amostra silenciada houve diminuição da expressão da metaloproteinase comparada à amostra controle.

Uma vez confirmada a eficácia do silenciamento, avaliamos a capacidade proteolítica de ADAMTS-1 nuclear, incubando agrecam comercial com a fração nuclear *"wild type"* e também com a fração nuclear silenciada. Conforme observamos na figura 14 D e E, temos que quando a fração nuclear está silenciada para ADAMTS-1 não são gerados fragmentos de agrecam, diferente do que vemos na situação controle.

ADAMTS-1 atividade Figura 14. nuclear tem proteolítica. (A) Imunofluorescência mostrando a eficiência no silenciamento de ADAMTS-1 (em vermelho) em células MDA-MB-231. (B) Gráfico representativo de guantificação da presença de ADAMTS-1 nuclear (a análise foi realizada utilizando o software Image J), demonstrando que o número de partículas de ADAMTS-1 no núcleo de células silenciadas para a protease é menor do que do grupo controle. (C) Análise de proteínas mostrando a diminuição da expressão de ADAMTS-1 na fração nuclear e no meio condicionado das células silenciadas (caixas pretas). (D) Análise proteica da clivagem do agrecam proporcionada pela fração nuclear de MCF-7. Linha 1: 500 nM de agrecam derivado de cartilagem articular bovina; Linha 2: 500 nM de agrecam derivado de cartilagem articular bovina, incubado com 30 µg de fração nuclear; Linha 3: 30 µg de fração nuclear. Todas as amostras foram submetidas ao ensaio de digestão (overnight 37 °C) e deglicosilação (1 hora a 37 °C). As setas vermelhas (e as caixas) representam a proteólise do agrecam feita pelas proteases nucleares. Scale bar, 5µm. Vermelho: ADAMTS-1; Verde: F-actina; Azul: núcleo. A expressão proteica de Agrecam foi avaliada utilizando dois anticorpos que reconhecem fragmentos distintos de agrecam, o Anti-agrecam (SAB 4500662, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) e também o anti-agrecam (Ab3778, Abcam). Fonte: (Silva et *al.*, 2016).





С



SiRNA Nucleo \* Nucleo

D



#### 5.6 ADAMTS-1 está fortemente associada a estruturas nucleares

Como nossa protease está no núcleo com função proteolítica, nós decidimos investigar se ela estaria associada a alguma estrutura presente neste compartimento. Para isso, procedemos com o experimento de fracionamento subcelular sobre lamínulas. Nesse experimento as células cultivadas sobre lamínulas foram primeiro tratadas com um tampão contendo 0,5% de Triton X-100 (denominado tampão A). O tratamento com tal tampão resulta na remoção da membrana plasmática, proteínas solúveis no citoplasma e o nucleoplasma. Os filamentos de actina (β-actina) foram parcialmente removidos nessa etapa conforme podemos observar na figura 15 A, 15 B e 15 C, a partir da diminuição da intensidade de marcação dos filamentos de actina e consequente diminuição dos microtúbulos do citoesqueleto destas células, e isto continua a ser observado à medida que os outros tampões são adicionados.

O subsequente tratamento com uma solução de alta concentração de sal (denominado de tampão B) resultou na redução de histona H1 em aproximadamente 50 % na célula MDA-MB-231 (figura 15 C). O sucessivo tratamento com o tampão C + Dnase I removeu quase completamente o sinal das histonas, conforme podemos observar também na figura 15 A, 15 B e 15 C, em todas as linhagens celulares estudadas. Sobre estas condições, algumas poucas células ainda apresentaram alguma coloração de histona.

Temos então, que mesmo depois dessas sucessivas lavagens a protease permanece no núcleo das células, o que nos possibilita especular que ADAMTS-1 é uma proteína fortemente ligada a algumas estruturas nucleares (que não é o DNA). Figura 15. ADAMTS-1 é uma protease ligada a estruturas nucleares. Fracionamento subcelular realizado sobre lamínulas que após a incubação das células com diferentes tampões (diferentes concentrações de sais) e DNAse avaliamos a presença de ADAMTS-1 e histona (que foi usada como controle positivo para a ação da DNAse). Imunolocalização de ADAMTS-1 e HISTONA H1 nas células MCF-10A (A) MCF-7 (B) e MDA-MB-231 (C) mostrando que ADAMTS-1 é uma proteína fortemente associada a estruturas nucleares. Azul: Núcleo; Verde: F-actina; Vermelho: ADAMTS-1 e Histona. Barra de escala: 5µm.






# 5.7 O aparelho de Golgi está envolvido na compartimentalização da protease nuclear

A fim de investigarmos qual seria o mecanismo de internalização nuclear de ADAMTS-1, nós iniciamos uma série de experimentos que interferem a endocitose e secreção. Verificamos qual seria a localização da protease quando pré-tratamos as células com Monensina, que desestabiliza o aparelho de Golgi e consequentemente afeta a secreção de moléculas para a MEC.

Na imunofluorescência da figura 16, observamos que a incubação das células MDA-MB-231 com 2 µM de monensina, resultou na alteração da compartimentalização de ADAMTS-1. Podemos observar uma predominante e difusa distribuição de ADAMTS-1 por todo o citoplasma celular, sem nenhum sinal de compartimentalização nuclear. Esta diferente localização fica muito evidente quando comparamos as células tratadas com as células do grupo controle (figura 16 A). A fim de comprovarmos a eficiência de Monensina, nós procedemos com a imunofluorescência evidenciando uma proteína envolvida na manutenção da estrutura do aparelho de Golgi. Podemos observar que após o tratamento, o corpo celular apresenta-se dilatado, e ao observamos a imunolocalização da Golgina 97 temos que a arquitetura do Aparelho de Golgi de fato foi afetada pela presença de Monensina (figura 16 B) uma vez que ao compararmos com a amostra controle que apresenta a proteína na região perinuclear, vemos que a Golgina 97 nas células tratadas está dispersa pelo citoplasma das células sem a sua localização habitual.

As mesmas observações podem ser feitas em relação à expressão proteica de ADAMTS-1. Ao compararmos as células controle com as células submetidas ao tratamento com Monensina, evidenciamos que as células tratadas apresentam maior expressão proteica no citoplasma, e no compartimento nuclear não é observada expressão da protease (figura 16 C). Em relação ao meio condicionado, vimos que células tratadas não são capazes de secretar a protease para o meio extracelular. Figura 16. O aparelho de Golgi está envolvido na compartimentalização da protease nuclear. Células MDA-MB-23 foram tratadas com 2  $\mu$ M de Monensina por 24 horas em meio de cultura com 10% de SFB, e a localização da protease avaliada por Imunofluorescência e Western Blot (frações celulares). (A) A imunofluorescência mostra que a distribuição de ADAMTS-1 foi alterada em células mantidas na presença de monensina. (B) A análise proteica mostrou que há um aumento na ADAMTS-1 citoplasmática quando as células foram tratadas, e que há a diminuição da secreção da protease. Azul-Núcleo, Verde- F-actina e Vermelho- ADAMTS-1. Barra de escala: 5 $\mu$ m. Marcação para ADAMTS-1 e como controle de carregamento pureza das frações utilizamos a  $\beta$ -actina, a histona (fração nuclear) e o GAPDH (fração citoplasmática).

A	
ADAMTS-1 F-ACTINA NÚCLEO MERGE	
CONTROLE	5 µm
	5μm







### 5.8 A importação de ADAMTS-1 nuclear não é realizado por importinas

A fim de verificarmos se a protease poderia ser transportada para o núcleo utilizando-se da via de transporte ativo mediado pelas importinas, nós realizamos experimentos tratando as células com o Importazole, que impede o transporte núcleo citoplasmático.

Após o tratamento com 100 µM de Importazole, observamos que a localização da protease continuou nuclear (figura 17 A). Quando comparamos as células tratadas às células controle, vemos que há uma alteração no padrão de expressão de ADAMTS-1 nuclear, onde os pontos de acúmulo apresentamse mais dispersos. Para testarmos a eficácia do bloqueio da importação ocasionada por Importazole, as células foram submetidas ao tratamento com LPS, que tem como característica induzir o transporte núcleo citoplasmático do fator de transcrição NFkB p65. Na figura 17 B, o tratamento com LPS induziu a translocação de NFkB p65, e as células não tratadas com Importazole apresentaram forte imunolocalização de NFkB p65. Já as células submetidas ao tratamento de importazole +LPS, não apresentaram localização nuclear. Figura 17. A importação de ADAMTS-1 para o núcleo não utiliza a Importina

β. Células MDA-MB-231 foram tratadas por 5 horas com 50 μM de Importazole, e em seguida submetidas ao tratamento com 1ug/ml de LPS por 1 hora e analisada (A) e (B) por Imunofluorescência Os experimentos foram realizados em triplicata. Azul-Núcleo, Verde- F-actina e Vermelho- ADAMTS-1. Barra de escala: 5μm.



# 5.9 Heparina altera o perfil de secreção de ADAMTS-1, mas não a quantidade de ADAMTS-1 nuclear

A nossa próxima abordagem foi utilizar a Heparina para verificar se o tratamento seria capaz de alterar a localização nuclear de ADAMTS-1.

Ao avaliarmos alterações ocorridas nos níveis de expressão proteica de ADAMTS-1, observamos que o tratamento das células MDA-MB-231 resulta no aumento estatisticamente significante da expressão das proteínas secretadas para a MEC (figura 18 A e C). No compartimento citoplasmático e nuclear, o tratamento não proporcionou nenhuma alteração nos níveis proteicos da protease, bem como não houve alterações da localização de ADAMTS-1 (figura 18 B e D).

Ao avaliarmos os efeitos do tratamento com Heparina por imunofluorescência, observamos que não houve alterações na distribuição da protease entre os compartimentos citoplasmático/nuclear, porém ocorre uma diferença na distribuição da protease que passa a ser mais difusa e menos pontual (18 E e F) que na amostra controle. Figura 18. Heparina altera o perfil de secreção de ADAMTS-1, mas não a quantidade de ADAMTS-1 nuclear. Western blot mostrando (A) o meio condicionado, (B) e as frações citoplasmáticas e nucleares de células MDA-MB-231, tratadas com 5 µg/ml por 24 horas. (C) Gráfico representativo do meio condicionado e (D) citoplasma e núcleo, onde as diferenças entre os grupos foi considerado estatisticamente significante quando  $p \le 0.05$ . Os experimentos foram realizados em triplicata. (E) Imunofluorescência mostrando o padrão de distribuição de ADAMTS-1 em células tratadas com Heparina, comparadas à amostra controle. (F) Inserto mostrando que a distribuição de ADAMTS-1 é diferente nas células submetidas ao tratamento, com um padrão mais difuso de localização. Azul-Núcleo, Verde- F-actina e Vermelho- ADAMTS-1. Barra de escala: 5µm. Marcação para ADAMTS-1 e como controle de carregamento pureza das frações utilizamos a  $\beta$ -actina, a histona (fração nuclear) e o GAPDH fração citoplasmática).



# 5.10 ADAMTS-1 solúvel é internalizada por células que não expressam a protease nuclear, que passam a apresentar ADAMTS-1 nuclear

Para observarmos se ADAMTS-1 nuclear seria endocitada após ser secretada, nós utilizamos células HT-1080 que apresentam a protease apenas no compartimento citoplasmático (figura 11 B), e mantivemos essa células em meio contendo ADAMTS-1 solúvel. Para isso, usamos meio condicionado de MDA-MB-231, que são células que apresentam ADAMTS-1 nuclear (figura 9 D).

Observamos que as células controle, sem meio condicionado, apresentam ADAMTS-1 predominantemente dispersa por todo o citoplasma. Ao mantermos as mesmas células em meio condicionado proveniente das células MDA-MB-231, observamos alterações no perfil de distribuição e de compartimentalização da protease. Após o tratamento temos mais pontos de acúmulo de ADAMTS-1 na região nucleolar, semelhante a apresentada pelas células MDA-MB-231. Essas diferenças se mostraram estatisticamente significantes (Figura 19 A e D).

Para avaliarmos se a habitual localização da protease em células HT-1080 poderia ser restabelecida (localização citoplasmática), nós utilizamos o Dynasore, que é um inibidor da endocitose, pois inibe a ação da proteína dinâmica no ato da endocitose. Conforme podemos observar na figura 19 C e D, o tratamento com 80 µM do inibidor não foi capaz de inibir a endocitose da protease e não ocorreu diminuição da localização nucleolar da protease. Porém, podemos observar mais uma vez a protease nuclear mais difusa neste compartimento (figura 19 C).

Para confirmarmos a eficiência de Dynasore e descartarmos sua inespecificidade de inibição, fizemos o ensaio de endocitose utilizando um anticorpo anti  $\beta$ -integrina conjugado a um fluoróforo vermelho, e monitoramos se a internalização aconteceria ao utilizarmos o Dynasore como inibidor. Na figura 19 B, temos que no controle (sem o tratamento com Dynasore), o anticorpo foi endocitado e pode ser visualizado com um padrão difuso dentro das células. Na presença do inibidor, a internalização da  $\beta$ -integrina não aconteceu, e a molécula apresentou-se circundando as células no meio extracelular.

Utilizamos também, para avaliar a endocitose de ADAMTS-1 o meio condicionado de células HEK-293T que apresentam superexpressão de ADAMTS-1 (HEK-MPA), além de apresentarem a protease no compartimento nuclear. Da mesma forma, as células HT-1080 foram mantidas em meio condicionado secretado pelas células: HEK 293-T controle e HEK293-T MPA (<u>mcherry puromycin ADAMTS-1</u>).

Conforme observamos na figura 20 A, ocorre a internalização da protease para o compartimento nuclear nas células mantidas em meio secretado pelas células HEK-293T e HEK293-T MPA. A quantidade de células que apresentaram a protease nuclear após serem incubadas com os meios condicionados foi maior, e estatisticamente significante (figura 20 B).

Fizemos o mesmo experimento utilizando os fibroblastos, e observamos os mesmos resultados vistos nas células HT-1080, e células mantidas em meios secretados pela HEK-293T MPC e HEK-293T MPA. Para confirmarmos a eficiência da inibição de Dynasore nesse ensaio com os fibroblastos, utilizamos a transferrina GFP e monitoramos se a internalização aconteceria ao utilizarmos o Dynasore como inibidor. Na figura 21 A, observamos que na ausência de Dynasore, a transferrina GFP foi endocitada, sendo visualizada através do padrão de distribuição difuso dentro das células. Na presença do inibidor, a endocitose não aconteceu, e a molécula apresentou-se circundando as células no meio extracelular.

Figura 19. ADAMTS-1 é internalizada por células de origem mesenquimal e passam a apresentar ADAMTS-1 nuclear, e o bloqueio da endocitose previne parcialmente a presença da protease no núcleo. As células HT1080 foram tratadas por 24 horas com o meio condicionado secretado pelas células MDA-MB-231 e depois analisadas por imunofluorescência (A) células controle (painel superior) e com meio condicionado de MDA-MB-231 (painel inferior). (B) células HT1080 foram incubadas com integrina β1 conjugada com Alexa fluor 568 sem Dynasore (painel esquerdo) e com Dynasore (painel direito). (C) células HT1080 mantidas em meio condicionado secretado pelas células MDA-MB-231 + 80 μM de Dynasore. (D) Gráfico representativo do experimento apresentado em A e C, ilustrando a quantidade de células que apresentam a protease localizada na região nucleolar (pontos); as diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando \*p≥ 0,05, \*\*p≥0,005 e \*\*\*\*p≥0,0005. Os experimentos foram realizados em triplicata Azul-Núcleo e Vermelho- ADAMTS-1 e β-integrina. Barra de escala: 5μm.

# HT-1080



Figura 20. ADAMTS-1 secretada pelas células HEK293T é internalizada pelas células HT-1080. (A) As células HT1080 foram tratadas por 24 horas com o meio condicionado secretado pelas células HEK293-T e HEK293-T MPA e depois analisadas por imunofluorescência. (B) Gráfico representativo do experimento apresentado em A, ilustrando a quantidade de células que apresentam a protease localizada na região nucleolar (pontos); as diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando \*p $\geq$  0,05, \*\*p $\geq$ 0,005 e \*\*\*p $\geq$ 0,0005. Azul-Núcleo, Vermelho-  $\alpha$ -tubulina/ADAMTS-1 e verde- ADAMTS-1. Azul-Núcleo e Vermelho- ADAMTS-1. Barra de escala: 5µm.

# HT-1080



В

А



**Figura 21. ADAMTS-1 é internalizada por fibroblastos.** Fibroblastos foram tratados por 1 hora com os meios condicionados secretados pelas células HEK 293-T MPC e HEK293-T MPA, pré-tratadas com Dynasore por 45 minutos e depois analisadas por imunofluorescência. (A) células mantidas em meio de cultura sem soro por 45 minutos, e incubadas por 15 minutos com transferrina GFP (painel esquerdo); células tratadas por 45 minutos com 80 μM de Dynasore seguidas da incubação com transferrina GFP por 15 minutos (painel direito). (B) células controle (painel esquerdo), células com meio HEK-293T MPC (painel direito), (C) células com meio HEK-293T MPA (painel esquerdo) e células tratadas com Dynasore e meio HEK-293T MPA. As setas brancas em A mostram a localização de Transferrina GFP antes (painel esquerdo) e depois (painel direito) do tratamento com Dynasore. Azul-Núcleo, Vermelho- ADAMTS-1/ F-actina, Verde F-actina. Barra de escala: 5 μm.





В

А

CONTROLE





COM MEIO HEK-293T MPC

С

ADAMTS-

NÚCLEO

¥.

COM MEIO HEK-293T MPA





### 5.11 A disponibilidade de ADAMTS-1 altera o perfil migratório das células

Depois de observamos que ADAMTS-1 é possivelmente translocada para o núcleo/nucléolo ao condicionarmos as células HT1080 e os fibroblastos com meios secretados pelas células MDA-MB-231 e HEK293-T MPA, avaliamos se essa nova localização poderia ter alguma influência na função de motilidade dessas células.

As células HT1080 (22 A) e fibroblastos (22 B) foram mantidas por 24 horas em meios condicionados provenientes das células HEK-293T MPC e HEK-293T MPA. A figura 22 A e C mostra que o tratamento com os meios condicionados das células HEK-293T MPA (suplementados com 1% de soro fetal bovino) fez com que as células apresentassem alteração no perfil migratório, guando comparadas ao controle (também suplementados com 1% de soro fetal bovino), com diminuição estatisticamente significativamente da capacidade migratória das células (figura 22 B e D). Através da análise do perfil migratório dos fibroblastos utilizando o método de câmara bipartite (figura 22 E), constatamos novamente a influência da disponibilidade da protease sobre o perfil migratório, onde as células mantidas em meio condicionado de HEK-293T MPA apresentaram uma redução estatisticamente significante na migração dos fibroblastos (figura 22 F). Como podemos observar na figura 22 G, as alterações ocorridas na migração das células não foram ocasionadas por aumento na proliferação ou morte das células, uma vez que não houve diferença estatisticamente significante entre a quantidade de células vivas e mortas nos grupos tratados em relação ao controle no ensaio de viabilidade por azul de tripan. Com isso, podemos concluir que no ensaio de ferida o que está sendo visto é o processo de migração celular e não proliferação e/ou morte celular.

Figura 22. A maior disponibilidade de ADAMTS-1 diminui a motilidade celular. A) HT1080 e C) fibroblastos foram tratadas com os meios de cultura de HEK293-T e HEK293-T MPA e posteriormente avaliamos o comportamento migratório dessas células pelo método "ferida" e também E) o comportamento migratório de fibroblastos foi avaliado pelo método "câmara bipartite". B) Gráfico representativo do experimento apresentado em A. D) Gráfico representativo do experimento apresentado em C. F) Gráfico representativo do experimento apresentado de exclusão Azul de Tripan. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando \*p $\geq$  0,05, \*\*p $\geq$ 0,005 e \*\*\*p $\geq$ 0,005.







### 6. DISCUSSÃO

Observamos através de experimentos de imunofluorescência e western blot que somente ADAMTS-1 está presente no núcleo de linhagens celulares de mama que apresentam diferentes graus de malignidade (Silva *et al.*, 2016).

Nesse estudo, constatamos que ADAMTS-4 e ADAMTS-5 encontram-se dispersas por todo o citoplasma celular nas três linhagens celulares MCF-10A, MCF-7 E MDA-MB-231, não apresentando o padrão de localização nuclear pontual como foi observado com ADAMTS-1. Esses resultados observados são compatíveis com os vistos na literatura. Um estudo publicado em 2014 por Obika e seus colaboradores demonstrou que em células HUVECs a distribuição espacial de ADAMTS-4 é totalmente periférica ao núcleo das células sendo predominantemente no citoplasma celular, sem nenhum sinal de localização nuclear (Obika *et al.*, 2014). No que diz respeito aos dados de ADAMTS-5, em 2015 Li e seus colaboradores reportaram que em tecidos de câncer de fígado ADAMTS-5 está unicamente presente no citoplasma e meio extracelular dessas células (Li *et al.*, 2015).

Assim como temos observado com ADAMTS-1, algumas proteases tem sido encontradas no núcleo. Um estudo publicado em 2004 demonstrou que a MMP-2 (metaloproteinase de matriz 2) está presente no núcleo de células cardíacas e hepatócitos (Kwan *et al.*, 2004). Em adição, estudos reportam a presença de MMP-3 (metaloprotease de matriz 3) e TIMP-1 (inibidor de metaloproteinase 1) também no núcleo de células de fígado (Si-Yayeb *et al.*, 2003) envolvidas no processo de apoptose (Si-Tayeb *et al.*, 2006). Uma serina protease, a HtrA1 também foi descrita no núcleo das células de mama normais MCF-10A, e também no tecido mamário (Wang *et al.*, 2012).

A translocação de diferentes macromoléculas pode acontecer também através da transferência do citoplasma para o núcleo. Vimos que a protease pode estar diferentemente localizada dependendo da origem da linhagem celular. Nossos dados mostram que as células com fenótipo mesenquimal apresentam a protease no compartimento citoplasmático, enquanto que células com fenótipos epiteliais apresentam a protease nuclear. Um estudo publicado por Sinha e seus colaboradores em 2014, demonstrou MMP2 presente no núcleo das células com fenótipo epitelial (Sinha *et al.*, 2014).

ADAMTS-1 é uma proteína secretada encontrada na MEC. A presença da protease no núcleo despertou o nosso interesse em tentar entender qual a sua função nesse compartimento. Porém, a função das proteases quando no núcleo celular é assunto não muito esclarecido na literatura. As proteases podem agir como remodeladores de cromatina, responsáveis pela estrutura da matriz nuclear, podem estar implicadas na apoptose e na regulação da proliferação celular (Sinha *et al.*, 2014). Há um estudo que relata que proteínas presentes na matriz nuclear tem as mesmas características funcionais de quando estão na MEC, agindo no ancoramento de diversas moléculas (Kwan *et al.*, 2004).

A nossa caracterização nuclear de ADAMTS-1, junto com a caracterização de outras proteases no mesmo compartimento, sugerem possíveis papéis biológicos para essa metaloproteases nucleares. Uma publicação feita em 2016, descreve algumas possíveis explicações para a presença de proteínas de MEC dentro do citoplasma ou do núcleo, incluindo 1) splicing alternativo de mRNA resultando na omissão do peptídeo sinal (responsável pela secreção das proteínas); 2) as proteínas da MEC podem escapar do sistema endolisossomal e entrar no citoplasma ou núcleo; 3) algumas proteínas de MEC possuem sinal de localização nuclear (NLS), que auxiliam na translocação usando uma via de degradação associada ao ER (Hellewell and Adams, 2016).

A identificação de específicos substratos das proteases presentes no núcleo se faz necessária, uma vez que podem apresentar as mesmas características funcionais de quando estão na MEC agindo na clivagem de seus substratos específicos, indicando as MMPs não estão limitadas aos substratos da MEC.

O agrecam é um proteoglicanos presente na MEC, que é reconhecido por ser substrato da ADAMTS-1. De acordo com os dados demonstrados no presente estudo, agrecam, assim como ADAMTS-1, está localizado no núcleo das células. Chen e seus colaboradores também descreveram agrecam presente no núcleo das células (Chen *et al.*, 2001), assim como um estudo publicado por Lima e seus colaboradores em 2016, que observaram a presença de agrecam no núcleo das células tumorais de ovário (Lima *et al.*, 2016). Nossos resultados mostrando que a fração nuclear de células mamárias tumorais são capazes de gerar fragmentos de agrecam suportam a ideia de que ADAMTS-1 nuclear desempenha atividade proteolítica ativa neste compartimento, uma vez que quando a fração nuclear foi silenciada para ADAMTS-1, os fragmentos não foram observados, fortalecendo a ideia de que a protease presente nesse compartimento nuclear tem atividade enzimática.

Demonstramos nesse trabalho que ADAMTS-1 é uma proteína associada à estruturas nucleares, porém não à cromatina. Um estudo publicado por Marchant e colaboradores demonstrou que a MMP-12 está localizada no núcleo de células do miocárdio, e que apresentam função como reguladores da transcrição de genes importantes para a resposta imune ao ligarem-se (já no núcleo) através do seu domínio catalítico à sequências específicas de promotores de NFKBIA durante a infecção viral, e esta ligação leva ao aumento da transcrição do gene e também dos níveis proteicos de IkBα, que são necessários para a liberação de citocinas durante a infecção viral (Marchant *et al.*, 2014). Existe outro relato na literatura de que proteases apresentam atividade como mediadoras do processo inflamatório ao modularem a expressão de fatores de transcrição, como por exemplo o trabalho publicado por Solan e colaboradores, que caracterizaram a MMP-8 como um ativador direto da expressão do fator de transcrição NF-κB, que tem função pró-inflamatória (Solan *et al.*, 2012).

Ao impedirmos a secreção de vesículas com Monensina, a localização da protease foi alterada. A monensina tem o potencial de alterar funcional e morfologicamente as mitocôndrias, através da fragmentação da organela, causando uma interrupção transitória das atividades de produção de ATP. O aparelho de Golgi também é perturbado pela fragmentação das mitocôndrias e suas funções também são diretamente prejudicadas (Souza *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 2015; Charvat and Arrizabalaga, 2016). Apesar do tratamento com a monensina provocar alterações morfológicas nas mitocôndrias, este fenótipo é totalmente reversível após 24 horas de tratamento (Lavine and Arrizabalaga, 2012). Nossos resultados demonstram que o aparelho de Golgi foi afetado pelo

tratamento com Monensina, e a ADAMTS-1 não foi secretada para o meio extracelular, e também não estava presente no núcleo celular. Estas alterações foram causadas pelo desequilíbrio ocasionado na via de secreção de vesículas. A monensina altera o equilíbrio do gradiente de íons, o que causa o aumento das cisternas do aparelho de golgi através do influxo de sódio e a saída de hidrogênio, e esse fenômeno desestabiliza as suas funções secretórias (Mollenhauer *et al.*, 1990). A monensina causa a vacuolização das cisternas do aparelho de golgi, alterando ou inibindo inúmeros fenômenos que ocorrem na membrana, como por exemplo reciclagem de receptores de lipoproteínas de baixa densidade, pinocitose, transferência de moléculas que ocorre do retículo endoplasmático em direção ao aparelho de golgi, inibição da secreção de fibronectina realizada por fibroblastos humanos e também a inibição do processamento, compartimentalização de moléculas e secreção celular (Mollenhauer *et al.*, 1990).

Tentamos analisar a translocação núcleo/citoplasma de ADAMTS-1 utilizando um inibidor seletivo do transporte nuclear via importina  $\beta$  (Soderholm *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2018), e constatamos que mesmo após a incubação das células com o importazole, a localização de ADAMTS-1 permanecia nuclear. A localização era nuclear, mas o padrão de organização da protease era difuso no núcleo.

O complexo nuclear de poros (NPC), controla a troca de macromoléculas entre o citoplasma e o núcleo. Existem proteínas que compõem as fibrilas nucleares, conhecidas com nucleoporinas (Nups). Existe um grupo de aproximadamente 10 proteínas nucleares conhecidas como FG-Nups (fenilalanina-glicina), que possuem repetições de FG que tem propriedades hidrofóbicas, mantendo a permeabilidade seletiva no envelope nuclear. Nup 358 é o maior componente dos filamentos que se originam a partir do NPC para o citoplasma, e desempenha importantes funções na (Wälde *et al.*, 2012). A importina  $\beta$  é uma proteína adaptadora que auxilia na importação de proteínas para o núcleo, através da interação com o complexo de poros nuclear (NPC) presente no envelope nuclear (Zhu *et al.*, 2015). Tecidos ativamente proliferativos como linfócitos, células-tronco e células tumorais, tem a necessidade do aumento da importação nuclear, apresentando altos níveis de

expressão de importina  $\beta$  (Yan *et al.*, 2015). As células tumorais utilizam-se deste processo de transporte citoplasma-núcleo para efetivamente manterem sua proliferação e evadirem-se de mecanismos anti-câncer (Turner *et al.*, 2012).

Como controle positivo desse experimento utilizamos o LPS. O LPS (lipopolissacarídeo) (Kublun *et al.*, 2014; Mahipal and Malafa, 2016), é um componente essencial da superfície de bactérias gram-negativas, que exerce um potencial efeito na ativação de macrófagos e células endoteliais, e induz a expressão de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral α (TNFα), (IL6) interleucina 6 (Kaisho *et al.*, 2001) e o fator de transcrição NF-kB (Andreakos *et al.*, 2004). O NF-kB é um fator nuclear que é ativado por agentes lipopolissacarídeos. Quando não estimulado, o fator NF-kB encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória chamada IkB, que impede a translocação do NF-kB para o núcleo (Kublun *et al.*, 2014; Mahipal and Malafa, 2016). Quando ocorre o estímulo proveniente do LPS, por exemplo, ocorre a fosforilação e a degradação do IkB, necessárias para que ocorra a translocação do NF-kB para o núcleo (Siebenlist, 1997).

Apesar de o potencial inibitório de Importazole ter sido atestado, vimos que ele não se mostrou eficaz em alterar o padrão de localização nuclear de ADAMTS-1 nas células. Isso nos leva a pensar na hipótese de que a ADAMTS-1 não utiliza a via da importina  $\beta$  para ser translocada para o núcleo, mas que um possível ligante de ADAMTS-1 possa depender deste transporte mediado pela importina  $\beta$ . Outra hipótese, é o fato de que o tempo em que as células foram mantidas em tratamento não tenha sido suficiente para que a ADAMTS-1 já existente no núcleo dessas células antes do tratamento fosse degradada.

Na literatura não há relatos da ADAMTS-1 possuir o sinal de localização nuclear clássico. Através de pesquisas em bancos de dados, constatamos que ADAMTS-1 realmente não possui o NSL clássico. O sinal de localização nuclear (Chook and Blobel, 2001) é uma pequena sequência de aminoácidos que medeia o transporte de proteínas para o núcleo (Cokol *et al.*, 2000), através de receptores conhecidos como importinas (ou karioferinas) (Lange *et al.*, 2007). O melhor sinal de transporte de proteínas nucleares, consiste em uma (monopartite) ou duas (bipartite) sequências de aminoácidos básicos (Kalderon, Richardson, *et al.*, 1984; Kalderon, Roberts, *et al.*, 1984). Os clássicos NSL são

exemplificados por SV40 antígeno T (<sup>126</sup>PKKKRRV<sup>132</sup>), e os bipartites são exemplificados pelo NSL de nucleoplasmina (<sup>155</sup>KRPAATKKAGQAKKKK<sup>170</sup>) (Lange *et al.*, 2007). ADAMTS-1 não contém esse NSL, o que corrobora o resultado do experimento efetuado com Importazole, uma vez que o transporte de proteínas que possuem o NSL não clássico utilizam-se de outras importinas.

Nossos resultados demonstram que а heparina altera а compartimentalização de ADAMTS-1. Ela mostrou-se capaz de aumentar a expressão de ADAMTS-1 no meio extracelular, enquanto dentro das células não visualizamos nenhuma alteração na expressão da protease. Há descrições na literatura de que heparina se liga a ADAMTS-4 e ADAMTS-5 (Flannery et al., 2002; Zeng et al., 2006) e essa ligação inibe a endocitose dessas moléculas. No caso de MMP13 a heparina impede que a protease seja endocitada através da inibição da interação entre o MMP13 e o receptor LRP1 (receptor-related protein 1), que medeia a endocitose da molécula (Yamamoto et al., 2016).

A heparina é uma molécula sulfatada e carregada negativamente, e essas características contribuem para sua interação com vários resíduos de aminoácidos presentes nas proteínas, tendo afinidade por múltiplas proteínas ao mesmo tempo (González-Iglesias *et al.*, 2002; Meneghetti *et al.*, 2015), e a esse conjunto de proteínas que são unidas pela heparina dá-se o nome de "interactoma" (Chiodelli *et al.*, 2015). Os grupos sulfatados se ligam especificamente aos domínios básicos presentes dentro da sequência de aminoácidos das proteínas, e esses domínios básicos apresentam uma forte correlação entre a afinidade dessa proteína (com o arranjo espacial das cargas positivas) e a heparina (Rullo and Nitz, 2010).

Constatamos nesse trabalho que células com origem mesenquimal não apresentam ADAMTS-1 nuclear. Por isso, incubamos HT-1080 e fibroblastos com meio condicionado secretado pelas células MDA-MB-231 e HEK-23T que apresentam a protease nuclear. Tanto os fibroblastos como a HT1080 passaram a apresentar a protease no núcleo. A partir dos resultados obtidos, especulamos que a protease solúvel presente nesse meio condicionado é endocitada pelas células de origem mesenquimal. Existe na literatura estudos que revelam que células tumorais podem assumir fenótipos epitelial *–like.* Um estudo feito com células HT-1080 (de fibrossarcoma), demonstrou que a expressão aumentada de ADAMTS-1 em células de origem mesenquimal contribui para a plasticidade do tumor, e que essas células adquirem a capacidade de adquirirem características epiteliais (Casal *et al.*, 2010).

As células com fenótipo mesenquimal apresentaram a particularidade de endocitar ADAMTS-1, e além disso, a protease internalizada assumia o padrão nucleolar na maioria das células. Temos também, que essa internalização não ocorreu por via clássica de endocitose mediada pela fusão de proteínas a partir da membrana plasmática, uma vez que o inibidor de dinamina foi ineficaz em evitar a entrada da protease. A inibição da dinamina, assim como a de outros reguladores de tráfego celular, são ferramentas potentes para efetivamente bloquear a endocitose (Ivanov, 2014; Basagiannis *et al.*, 2017).

Dada a importância da internalização de moléculas via endocitose nos processos celulares, entendermos o papel da internalização de ADAMTS-1 é de suma importância também. Observamos que células de origem mesenguimal passam a apresentar ADAMTS-1 nuclear após serem mantidas em meios enriquecidos com ADAMTS-1 (proveniente de células com a protease nuclear). Ao assumir esse compartimento nuclear, ADAMTS-1 pode modular o perfil funcional dessas células. Dados consolidados na literatura demonstram que ADAMTS-1 afeta a migração das células, e quanto maior a disponibilidade da protease no meio extracelular, menor é o potencial migratório delas (Freitas et al., 2013; Noriega-Guerra et al., 2018). Ao compararmos tais informações com os nossos achados, temos que ADAMTS-1 ao ser translocada para o núcleo também possa agir influenciando nos processos de motilidade celular. Em células de câncer de mama invasivo (MDA-MB-231) a ausência de ADAMTS-1 estimula a atividade migratória da linhagem (Freitas et al., 2013), e fomos capazes de observar que tais células apresentam ADAMTS-1 muito bem caracterizada no núcleo (Silva et al., 2016). Tendo como base os resultados obtidos do perfil migratório de HT1080 e de fibroblastos após os tratamentos com os meios, podemos especular que a protease presente no meio condicionado pode agir como um fator anti-migratório, pois atua como uma "esponja" de fatores

de crescimento importantes para a motilidade celular, antes mesmo de ser translocada para o núcleo, função essa que já está bem descrita na literatura (Freitas et al., 2013; Noriega-Guerra *et al.*, 2018).

## 7. CONCLUSÃO

Baseado nos nossos resultados, concluímos que:

- ADAMTS-1 é a única agrecanase presente no compartimento nuclear de diversas células;
- Agrecam também está presente no núcleo e é processado por ADAMTS-1 nuclear;
- ADAMTS-1 apresentou função enzimática no núcleo, processando o agrecam;
- A expressão de ADAMTS-1 nuclear é diferente entre células de origem epitelial e mesenquimal;
- A localização de ADAMTS-1 foi alterada quando perturbamos a secreção funcional das células feita pelo Aparelho de Golgi;
- Células mantidas em meio enriquecido por ADAMTS-1 adotam a localização nuclear da protease;
- A internalização de ADAMTS-1 não ocorre através da endocitose mediada por clatrina;
- O transporte núcleo-citoplasmático da protease não é dependente da clássica proteína importina-β;
- A maior disponibilidade de ADAMTS-1 diminui o perfil migratório das células;

### 8. REFERÊNCIAS

CHARVAT, R. A.; ARRIZABALAGA, G. Oxidative stress generated during monensin treatment contributes to altered Toxoplasma gondii mitochondrial function. **Sci Rep,** v. 6, p. 22997, 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26976749</u> >.

FREITAS, V. M. et al. Decreased expression of ADAMTS-1 in human breast tumors stimulates migration and invasion. **Mol Cancer,** v. 12, p. 2, 2013. ISSN 1476-4598. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23289900</u> >.

GÜNEŞ, M. F. et al. The Investigation of a Disintegrin and Metalloproteinase with ThromboSpondin Motifs (ADAMTS) 1, 5 and 16 in Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections. **Clin Lab**, v. 62, n. 3, p. 425-33, 2016. ISSN 1433-6510. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27156333</u> >.

HSU, P. D.; LANDER, E. S.; ZHANG, F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1262-78, Jun 2014. ISSN 1097-4172. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24906146 >.

JINEK, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science,** v. 337, n. 6096, p. 816-21, Aug 2012. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22745249</u> >.

KATO, S. et al. The Golgi apparatus regulates cGMP-dependent protein kinase I compartmentation and proteolysis. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 308, n. 11, p. C944-58, Jun 2015. ISSN 1522-1563. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25855081</u> >.

KONERMANN, S. et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. **Nature,** v. 517, n. 7536, p. 583-8, Jan 2015. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25494202">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25494202</a> >.

KUBLUN, I. et al. Efficacious inhibition of Importin α/β-mediated nuclear import of human inositol phosphate multikinase. **Biochimie,** v. 102, p. 117-23, Jul 2014. ISSN 1638-6183. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24632208</u> >. KUNO, K. et al. ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan. **FEBS** Lett, v. 478, n. 3, p. 241-5, Aug 2000. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10930576</u> >.

LAVINE, M. D.; ARRIZABALAGA, G. Analysis of monensin sensitivity in Toxoplasma gondii reveals autophagy as a mechanism for drug induced death. **PLoS One,** v. 7, n. 7, p. e42107, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22848721</u> >.

LI, C. et al. Lost expression of ADAMTS5 protein associates with progression and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. **Drug Des Devel Ther,** v. 9, p. 1773-83, 2015. ISSN 1177-8881. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25848214</u> >.

MAHIPAL, A.; MALAFA, M. Importins and exportins as therapeutic targets in cancer. **Pharmacol Ther**, Apr 2016. ISSN 1879-016X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27113410</u> >.

MALI, P. et al. Barcoding cells using cell-surface programmable DNA-binding domains. **Nat Methods,** v. 10, n. 5, p. 403-6, May 2013. ISSN 1548-7105. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23503053</u> >.

OBIKA, M. et al. ADAMTS-4 and biglycan are expressed at high levels and colocalize to podosomes during endothelial cell tubulogenesis in vitro. **J Histochem Cytochem,** v. 62, n. 1, p. 34-49, Jan 2014. ISSN 1551-5044. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24051360</u> >.

REN, P. et al. ADAMTS-1 and ADAMTS-4 levels are elevated in thoracic aortic aneurysms and dissections. **Ann Thorac Surg,** v. 95, n. 2, p. 570-7, Feb 2013. ISSN 1552-6259. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23245439</u> >.

SCHOKRPUR, S. et al. CRISPR-Mediated VHL Knockout Generates an Improved Model for Metastatic Renal Cell Carcinoma. **Sci Rep,** v. 6, p. 29032, 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27358011 >.

SHALEM, O.; SANJANA, N. E.; ZHANG, F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. **Nat Rev Genet**, v. 16, n. 5, p. 299-311, May

2015. ISSN 1471-0064. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25854182 >.

SILVA, S. V. et al. ADAMTS-1 Is Found in the Nuclei of Normal and Tumoral Breast Cells. **PLoS One,** v. 11, n. 10, p. e0165061, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27764205</u> >.

SODERHOLM, J. F. et al. Importazole, a small molecule inhibitor of the transport receptor importin-β. **ACS Chem Biol**, v. 6, n. 7, p. 700-8, Jul 2011. ISSN 1554-8937. Disponível em: < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21469738">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21469738</a> >.

SOUZA, A. C. et al. Mitochondrial damage as an early event of monensininduced cell injury in cultured fibroblasts L929. **J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med,** v. 52, n. 5, p. 230-7, Jun 2005. ISSN 0931-184X. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15943607</u> >.

TURNER, J. G.; DAWSON, J.; SULLIVAN, D. M. Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer. **Biochem Pharmacol**, v. 83, n. 8, p. 1021-32, Apr 2012. ISSN 1873-2968. Disponível em: < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22209898">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22209898</a> >.

WANG, T. et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. **Science,** v. 343, n. 6166, p. 80-4, Jan 2014. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24336569</u> >.

YAMAMOTO, K. et al. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)-mediated endocytic clearance of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-4 (ADAMTS-4): functional differences of non-catalytic domains of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in LRP1 binding. **J Biol Chem**, v. 289, n. 10, p. 6462-74, Mar 2014. ISSN 1083-351X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24474687 >.

YAN, W. et al. Importin  $\beta$ 1 mediates nuclear factor- $\kappa$ B signal transduction into the nuclei of myeloma cells and affects their proliferation and apoptosis. **Cell Signal**, v. 27, n. 4, p. 851-9, Apr 2015. ISSN 1873-3913. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25643631</u> >.

ZHU, J.; CYNADER, M. S.; JIA, W. TDP-43 Inhibits NF-κB Activity by Blocking p65 Nuclear Translocation. **PLoS One,** v. 10, n. 11, p. e0142296, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26571498</u> >.

AMĂLINEI, C. et al. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. **Rom J Morphol Embryol,** v. 51, n. 2, p. 215-28, 2010. ISSN 1220-0522. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20495735</u> >.

ANDREAKOS, E. et al. Distinct pathways of LPS-induced NF-kappa B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP. **Blood**, v. 103, n. 6, p. 2229-37, Mar 2004. ISSN 0006-4971. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14630816</u> >.

APTE, S. S. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 6, p. 981-5, Jun 2004. ISSN 1357-2725. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15094112 >.

\_\_\_\_\_. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. **J Biol Chem**, v. 284, n. 46, p. 31493-7, Nov 2009. ISSN 1083-351X. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19734141</u> >.

ARRIBAS, J.; BECH-SERRA, J. J.; SANTIAGO-JOSEFAT, B. ADAMs, cell migration and cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 25, n. 1, p. 57-68, Mar 2006. ISSN 0167-7659. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16680572</u> >.

BASAGIANNIS, D. et al. Dynasore impairs VEGFR2 signalling in an endocytosis-independent manner. **Sci Rep,** v. 7, p. 45035, 03 2017. ISSN 2045-2322. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28327657</u> >.

BERX, G.; VAN ROY, F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol,** v. 1, n. 6, p. a003129, Dec 2009. ISSN 1943-0264. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20457567</u> >.

BHOWMICK, N. A.; NEILSON, E. G.; MOSES, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 332-7, Nov 2004. ISSN 1476-4687. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15549095</u> >.

BOUCK, N.; STELLMACH, V.; HSU, S. C. How tumors become angiogenic. **Adv Cancer Res,** v. 69, p. 135-74, 1996. ISSN 0065-230X. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8791681</u> >.
BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin,** v. 68, n. 6, p. 394-424, 11 2018. ISSN 1542-4863. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30207593</u> >.

BROWN, H. M. et al. ADAMTS1 cleavage of versican mediates essential structural remodeling of the ovarian follicle and cumulus-oocyte matrix during ovulation in mice. **Biol Reprod**, v. 83, n. 4, p. 549-57, Oct 2010. ISSN 1529-7268. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20592310</u> >.

\_\_\_\_\_. Requirement for ADAMTS-1 in extracellular matrix remodeling during ovarian folliculogenesis and lymphangiogenesis. **Dev Biol**, v. 300, n. 2, p. 699-709, Dec 2006. ISSN 0012-1606. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17097630</u> >.

BURKHART, D. L.; SAGE, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. **Nat Rev Cancer,** v. 8, n. 9, p. 671-82, Sep 2008. ISSN 1474-1768. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650841</u> >.

BUSCH, S. et al. TGF-beta receptor type-2 expression in cancer-associated fibroblasts regulates breast cancer cell growth and survival and is a prognostic marker in pre-menopausal breast cancer. **Oncogene**, v. 34, n. 1, p. 27-38, Jan 2015. ISSN 1476-5594. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24336330 >.

CANALS, F. et al. Identification of substrates of the extracellular protease ADAMTS1 by DIGE proteomic analysis. **Proteomics**, v. 6 Suppl 1, p. S28-35, Apr 2006. ISSN 1615-9861. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16511810 >.

CAO, H. et al. Stromal fibroblasts facilitate cancer cell invasion by a novel invadopodia-independent matrix degradation process. **Oncogene**, v. 35, n. 9, p. 1099-1110, Mar 2016. ISSN 1476-5594. Available at: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25982272">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25982272</a> >.

CASAL, C. et al. ADAMTS1 contributes to the acquisition of an endothelial-like phenotype in plastic tumor cells. **Cancer Res,** v. 70, n. 11, p. 4676-86, Jun 2010. ISSN 1538-7445. Available at: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20484033">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20484033</a> >.

CASTRO-CASTRO, A. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of MT1-MMP-Dependent Cancer Cell Invasion. **Annu Rev Cell Dev Biol,** v. 32, p. 555-576, 10 2016. ISSN 1530-8995. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27501444</u> >. CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 2, p. 118-32, Feb 2004. ISSN 1474-175X. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14964308</u> >.

CHANG, C. W. et al. The distribution of different classes of nuclear localization signals (NLSs) in diverse organisms and the utilization of the minor NLS-binding site inplantnuclear import factor importin-α. **Plant Signal Behav**, v. 8, n. 10, Oct 2013. ISSN 1559-2324. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24270630 >.

CHANG, T. T.; THAKAR, D.; WEAVER, V. M. Force-dependent breaching of the basement membrane. **Matrix Biol,** v. 57-58, p. 178-189, 01 2017. ISSN 1569-1802. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28025167</u> >.

CHARVAT, R. A.; ARRIZABALAGA, G. Oxidative stress generated during monensin treatment contributes to altered Toxoplasma gondii mitochondrial function. **Sci Rep,** v. 6, p. 22997, 2016. ISSN 2045-2322. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26976749</u> >.

CHEN, L. et al. MT2-MMP expression associates with tumor progression and angiogenesis in human lung cancer. **Int J Clin Exp Pathol,** v. 7, n. 6, p. 3469-77, 2014. ISSN 1936-2625. Available at: < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25031779">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25031779</a> >.

CHEN, Q. et al. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. **Mediators Inflamm,** v. 2013, p. 928315, 2013. ISSN 1466-1861. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23840100</u> >.

CHEN, T. L. et al. Aggrecan domains expected to traffic through the exocytic pathway are misdirected to the nucleus. **Exp Cell Res**, v. 263, n. 2, p. 224-35, Feb 2001. ISSN 0014-4827. Available at: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11161721">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11161721</a> >.

CHENG, N. et al. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. **Mol Cancer Res**, v. 6, n. 10, p. 1521-33, Oct 2008. ISSN 1541-7786. Available at: < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18922968">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18922968</a> >.

CHIODELLI, P. et al. Heparin/Heparan sulfate proteoglycans glycomic interactome in angiogenesis: biological implications and therapeutical use. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6342-88, Apr 2015. ISSN 1420-3049. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25867824</u> >.

CHOOK, Y. M.; BLOBEL, G. Karyopherins and nuclear import. **Curr Opin Struct Biol,** v. 11, n. 6, p. 703-15, Dec 2001. ISSN 0959-440X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751052</u> >.

CHRISTIAN, L. M. The ADAM family: Insights into Notch proteolysis. **Fly** (Austin), v. 6, n. 1, p. 30-4, 2012 Jan-Mar 2012. ISSN 1933-6942. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22513479</u> >.

COKOL, M.; NAIR, R.; ROST, B. Finding nuclear localization signals. **EMBO Rep,** v. 1, n. 5, p. 411-5, Nov 2000. ISSN 1469-221X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11258480</u> >.

COUSSENS, L. M.; FINGLETON, B.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. **Science,** v. 295, n. 5564, p. 2387-92, Mar 2002. ISSN 1095-9203. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11923519</u> >.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature,** v. 420, n. 6917, p. 860-7, 2002 Dec 19-26 2002. ISSN 0028-0836. Available at: < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12490959">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12490959</a> >.

DE VISSER, K. E.; KORETS, L. V.; COUSSENS, L. M. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. **Cancer Cell,** v. 7, n. 5, p. 411-23, May 2005. ISSN 1535-6108. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15894262</u> >.

DE WEVER, O. et al. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. **Int J Cancer,** v. 123, n. 10, p. 2229-38, Nov 2008. ISSN 1097-0215. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18777559</u> >.

DENTON, A. E.; ROBERTS, E. W.; FEARON, D. T. Stromal Cells in the Tumor Microenvironment. **Adv Exp Med Biol,** v. 1060, p. 99-114, 2018 2018. ISSN 0065-2598. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30155624</u> >.

DERYUGINA, E. I. et al. Prointegrin maturation follows rapid trafficking and processing of MT1-MMP in Furin-Negative Colon Carcinoma LoVo Cells. **Traffic,** v. 5, n. 8, p. 627-41, Aug 2004. ISSN 1398-9219. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15260832</u> >.

DEVY, L. et al. The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. **FASEB J,** v. 16, n. 2, p. 147-54, Feb 2002. ISSN 1530-6860. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11818362</u> >.

DUBAIL, J.; APTE, S. S. Insights on ADAMTS proteases and ADAMTS-like proteins from mammalian genetics. **Matrix Biol**, v. 44-46, p. 24-37, 2015 May-Jul 2015. ISSN 1569-1802. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25770910 >.

EBLE, J. A.; NILAND, S. The extracellular matrix in tumor progression and metastasis. **Clin Exp Metastasis**, Apr 2019. ISSN 1573-7276. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30972526</u> >.

EDWARDS, D. R.; HANDSLEY, M. M.; PENNINGTON, C. J. The ADAM metalloproteinases. **Mol Aspects Med,** v. 29, n. 5, p. 258-89, Oct 2008. ISSN 0098-2997. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18762209</u> >.

FATA, J. E. et al. Cellular turnover and extracellular matrix remodeling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors. **Cell Mol Life Sci**, v. 57, n. 1, p. 77-95, Jan 2000. ISSN 1420-682X. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10949582</u> >.

FERNANDES, R. J. et al. Procollagen II amino propeptide processing by ADAMTS-3. Insights on dermatosparaxis. **J Biol Chem,** v. 276, n. 34, p. 31502-9, Aug 2001. ISSN 0021-9258. Available at: < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11408482">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11408482</a> >.

FINICLE, B. T.; JAYASHANKAR, V.; EDINGER, A. L. Nutrient scavenging in cancer. **Nat Rev Cancer,** v. 18, n. 10, p. 619-633, Oct 2018. ISSN 1474-1768. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30097614</u> >.

FLANNERY, C. R. et al. Autocatalytic cleavage of ADAMTS-4 (Aggrecanase-1) reveals multiple glycosaminoglycan-binding sites. **J Biol Chem**, v. 277, n. 45, p. 42775-80, Nov 2002. ISSN 0021-9258. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12202483</u> >.

FLUHRER, R.; HAASS, C. Signal peptide peptidases and gamma-secretase: cousins of the same protease family? **Neurodegener Dis,** v. 4, n. 2-3, p. 112-6, 2007. ISSN 1660-2854. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17596705</u> >.

FOULDS, L. The experimental study of tumor progression: a review. **Cancer Res,** v. 14, n. 5, p. 327-39, Jun 1954. ISSN 0008-5472. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13160960</u> >.

FREITAS, V. M. et al. Decreased expression of ADAMTS-1 in human breast tumors stimulates migration and invasion. **Mol Cancer,** v. 12, p. 2, 2013. ISSN 1476-4598. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23289900</u> >.

\_\_\_\_\_. SIKVAV, a laminin alpha1-derived peptide, interacts with integrins and increases protease activity of a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line through the ERK 1/2 signaling pathway. **Am J Pathol**, v. 171, n. 1, p. 124-38, Jul 2007. ISSN 0002-9440. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17591960</u> >.

FUSHIMI, K. et al. Functional differences of the catalytic and non-catalytic domains in human ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in aggrecanolytic activity. **J Biol Chem,** v. 283, n. 11, p. 6706-16, Mar 2008. ISSN 0021-9258. Available at: < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18156631">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18156631</a> >.

GENDRON, C. et al. Proteolytic activities of human ADAMTS-5: comparative studies with ADAMTS-4. **J Biol Chem,** v. 282, n. 25, p. 18294-306, Jun 2007. ISSN 0021-9258. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17430884</u> >.

GERHARDT, S. et al. Crystal structures of human ADAMTS-1 reveal a conserved catalytic domain and a disintegrin-like domain with a fold homologous to cysteine-rich domains. **J Mol Biol,** v. 373, n. 4, p. 891-902, Nov 2007. ISSN 0022-2836. Available at: < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17897672">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17897672</a> >.

GHEBRANIOUS, N.; DONEHOWER, L. A. Mouse models in tumor suppression. **Oncogene**, v. 17, n. 25, p. 3385-400, Dec 1998. ISSN 0950-9232. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9917000</u> >.

GOMIS-RÜTH, F. X. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. **J Biol Chem,** v. 284, n. 23, p. 15353-7, Jun 2009. ISSN 0021-9258. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19201757</u> >.

GONZÁLEZ-IGLESIAS, R. et al. Prion protein interaction with glycosaminoglycan occurs with the formation of oligomeric complexes stabilized by Cu(II) bridges. **J Mol Biol**, v. 319, n. 2, p. 527-40, May 2002. ISSN 0022-2836. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12051926</u> >.

GOUIRAND, V.; GUILLAUMOND, F.; VASSEUR, S. Influence of the Tumor Microenvironment on Cancer Cells Metabolic Reprogramming. **Front Oncol**, v. 8, p. 117, 2018. ISSN 2234-943X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29725585</u> >.

GRASSO, G.; BONNET, S. Metal complexes and metalloproteases: targeting conformational diseases. **Metallomics,** v. 6, n. 8, p. 1346-57, Jul 2014. ISSN 1756-591X. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24870829</u> >.

GROTENDORST, G. R.; RAHMANIE, H.; DUNCAN, M. R. Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. **FASEB J,** v. 18, n. 3, p. 469-79, Mar 2004. ISSN 1530-6860. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003992</u> >.

GUO, B. H. et al. Bmi-1 promotes invasion and metastasis, and its elevated expression is correlated with an advanced stage of breast cancer. **Mol Cancer**, v. 10, n. 1, p. 10, 2011. ISSN 1476-4598. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21276221</u> >.

GUSTAVSSON, H. et al. ADAMTS1 alters blood vessel morphology and TSP1 levels in LNCaP and LNCaP-19 prostate tumors. **BMC Cancer,** v. 10, p. 288, 2010. ISSN 1471-2407. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20546609</u> >.

GÜNTHER, W. et al. Distribution patterns of the anti-angiogenic protein ADAMTS-1 during rat development. **Acta Histochem,** v. 107, n. 2, p. 121-31, 2005. ISSN 0065-1281. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15878613</u> >.

HALPER, J.; KJAER, M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. **Adv Exp Med Biol**, v. 802, p. 31-47, 2014. ISSN 0065-2598. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24443019 >.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell,** v. 86, n. 3, p. 353-64, Aug 1996. ISSN 0092-8674. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8756718</u> >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 2000. ISSN 0092-8674. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931</u> >.

\_\_\_\_\_. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell,** v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011. ISSN 1097-4172. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230</u> >.

HANDSLEY, M. M.; EDWARDS, D. R. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. **Int J Cancer,** v. 115, n. 6, p. 849-60, Jul 2005. ISSN 0020-7136. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15729716</u> >.

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

p. 95-113, Jun 2000. ISSN 1351-0088. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10903527 >.

HARRIS, C. C. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. **Carcinogenesis,** v. 17, n. 6, p. 1187-98, Jun 1996. ISSN 0143-3334. Available at: < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8681432">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8681432</a> >.

HATIPOGLU, O. F. et al. ADAMTS1 is a unique hypoxic early response gene expressed by endothelial cells. **J Biol Chem,** v. 284, n. 24, p. 16325-33, Jun 2009. ISSN 0021-9258. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19349275</u> >.

HAYFLICK, L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. **Biochemistry (Mosc),** v. 62, n. 11, p. 1180-90, Nov 1997. ISSN 0006-2979. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9467840</u> >.

HELLEWELL, A. L.; ADAMS, J. C. Insider trading: Extracellular matrix proteins and their non-canonical intracellular roles. **Bioessays**, v. 38, n. 1, p. 77-88, Jan 2016. ISSN 1521-1878. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26735930 >.

HU, L. et al. Over-expression of Adamts1 in mice alters bone mineral density. **J Bone Miner Metab,** v. 30, n. 3, p. 304-11, May 2012. ISSN 1435-5604. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22002813</u> >.

HUA, H. et al. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 23, p. 3853-68, Dec 2011. ISSN 1420-9071. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21744247</u> >.

HUET, E. et al. Stroma in normal and cancer wound healing. **FEBS J**, Apr 2019. ISSN 1742-4658. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30958920 >.

HUTTEN, S. et al. The Nup358-RanGAP complex is required for efficient importin alpha/beta-dependent nuclear import. **Mol Biol Cell,** v. 19, n. 5, p. 2300-10, May 2008. ISSN 1939-4586. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18305100</u> >.

\_\_\_\_\_. The nuclear pore component Nup358 promotes transportin-dependent nuclear import. **J Cell Sci**, v. 122, n. Pt 8, p. 1100-10, Apr 2009. ISSN 0021-9533. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19299463</u> >.

II, M. et al. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 231, n. 1, p. 20-7, Jan 2006. ISSN 1535-3702. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16380641</u> >.

## INCA. Incidência de Câncer no Brasil 2014.

IVANOV, A. I. Pharmacological inhibitors of exocytosis and endocytosis: novel bullets for old targets. **Methods Mol Biol**, v. 1174, p. 3-18, 2014. ISSN 1940-6029. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24947371</u> >.

JABŁOŃSKA-TRYPUĆ, A.; MATEJCZYK, M.; ROSOCHACKI, S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. **J Enzyme Inhib Med Chem,** v. 31, n. sup1, p. 177-183, 2016. ISSN 1475-6374. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27028474</u> >.

KAISHO, T. et al. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. **J Immunol**, v. 166, n. 9, p. 5688-94, May 2001. ISSN 0022-1767. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11313410</u> >.

KALDERON, D. et al. Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. **Nature**, v. 311, n. 5981, p. 33-8, 1984 Sep 6-11 1984. ISSN 0028-0836. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6088992</u> >.

\_\_\_\_\_. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. **Cell**, v. 39, n. 3 Pt 2, p. 499-509, Dec 1984. ISSN 0092-8674. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6096007</u> >.

KALLURI, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. **Nat Rev Cancer,** v. 3, n. 6, p. 422-33, Jun 2003. ISSN 1474-175X. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778132</u> >.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 5, p. 392-401, May 2006. ISSN 1474-175X. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16572188</u> >.

KARVONEN, H. M. et al. Lung cancer-associated myofibroblasts reveal distinctive ultrastructure and function. **J Thorac Oncol**, v. 9, n. 5, p. 664-74, May 2014. ISSN 1556-1380. Available at: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24662457">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24662457</a> >.

KATO, S. et al. The Golgi apparatus regulates cGMP-dependent protein kinase I compartmentation and proteolysis. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 308, n. 11, p. C944-58, Jun 2015. ISSN 1522-1563. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25855081</u> >.

KELLER, K. E.; BRADLEY, J. M.; ACOTT, T. S. Differential effects of ADAMTS-1, -4, and -5 in the trabecular meshwork. **Invest Ophthalmol Vis Sci,** v. 50, n. 12, p. 5769-77, Dec 2009. ISSN 1552-5783. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19553617</u> >.

KELWICK, R. et al. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. **Genome Biol**, v. 16, p. 113, 2015. ISSN 1474-760X. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26025392</u> >.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell,** v. 141, n. 1, p. 52-67, Apr 2010. ISSN 1097-4172. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371345</u> >.

KIM, D.; RHEE, S. Matrix metalloproteinase-2 regulates MDA-MB-231 breast cancer cell invasion induced by active mammalian diaphanous-related formin 1. **Mol Med Rep,** v. 14, n. 1, p. 277-82, Jul 2016. ISSN 1791-3004. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27177153</u> >.

KIM, Y. S.; JOH, T. H. Matrix metalloproteinases, new insights into the understanding of neurodegenerative disorders. **Biomol Ther (Seoul),** v. 20, n. 2, p. 133-43, Mar 2012. ISSN 1976-9148. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24116286</u> >.

KUBLUN, I. et al. Efficacious inhibition of Importin  $\alpha/\beta$ -mediated nuclear import of human inositol phosphate multikinase. **Biochimie**, v. 102, p. 117-23, Jul 2014. ISSN 1638-6183. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24632208</u> >.

KUNO, K. et al. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. **J Biol Chem,** v. 272, n. 1, p. 556-62, Jan 1997. ISSN 0021-9258. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8995297</u> >.

\_\_\_\_\_. ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan. **FEBS Lett**, v. 478, n. 3, p. 241-5, Aug 2000. ISSN 0014-5793. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10930576</u> >.

KURZEPA, J. et al. The significance of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in the ischemic stroke. **Int J Neurosci**, v. 124, n. 10, p. 707-16, Oct 2014. ISSN 1563-5279. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24304146 >.

KWAN, J. A. et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. **FASEB J,** v. 18, n. 6, p. 690-2, Apr 2004. ISSN 1530-6860. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14766804</u> >.

LANGE, A. et al. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. **J Biol Chem,** v. 282, n. 8, p. 5101-5, Feb 2007. ISSN 0021-9258. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17170104 >.

LAVINE, M. D.; ARRIZABALAGA, G. Analysis of monensin sensitivity in Toxoplasma gondii reveals autophagy as a mechanism for drug induced death. **PLoS One,** v. 7, n. 7, p. e42107, 2012. ISSN 1932-6203. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22848721</u> >.

LE GOFF, C.; CORMIER-DAIRE, V. The ADAMTS(L) family and human genetic disorders. **Hum Mol Genet,** v. 20, n. R2, p. R163-7, Oct 2011. ISSN 1460-2083. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21880666</u> >.

LE GOFF, C. et al. Regulation of procollagen amino-propeptide processing during mouse embryogenesis by specialization of homologous ADAMTS proteases: insights on collagen biosynthesis and dermatosparaxis. **Development,** v. 133, n. 8, p. 1587-96, Apr 2006. ISSN 0950-1991. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16556917</u> >.

LECA, J. et al. Cancer-associated fibroblast-derived annexin A6+ extracellular vesicles support pancreatic cancer aggressiveness. **J Clin Invest**, v. 126, n. 11, p. 4140-4156, 11 2016. ISSN 1558-8238. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27701147</u> >.

LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell,** v. 141, n. 7, p. 1117-34, Jun 2010. ISSN 1097-4172. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20602996</u> >.

LI, C. et al. Lost expression of ADAMTS5 protein associates with progression and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. **Drug Des Devel Ther,** v. 9, p. 1773-83, 2015. ISSN 1177-8881. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25848214</u> >. LIGI, D.; MANNELLO, F. Do matrix metalloproteinases represent reliable circulating biomarkers in colorectal cancer? **Br J Cancer,** v. 115, n. 6, p. 633-4, 09 2016. ISSN 1532-1827. Available at: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27529515">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27529515</a> >.

LIM, B. et al. Inflammatory breast cancer biology: the tumour microenvironment is key. **Nat Rev Cancer**, v. 18, n. 8, p. 485-499, Aug 2018. ISSN 1474-1768. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29703913</u> >.

LIMA, M. A. et al. Prognostic Value of ADAMTS Proteases and Their Substrates in Epithelial Ovarian Cancer. **Pathobiology,** v. 83, n. 6, p. 316-26, 2016. ISSN 1423-0291. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27359117</u> >.

LIPINSKI, M. M.; JACKS, T. The retinoblastoma gene family in differentiation and development. **Oncogene**, v. 18, n. 55, p. 7873-82, Dec 1999. ISSN 0950-9232. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10630640</u> >.

LIU, Y. J.; XU, Y.; YU, Q. Full-length ADAMTS-1 and the ADAMTS-1 fragments display pro- and antimetastatic activity, respectively. **Oncogene**, v. 25, n. 17, p. 2452-67, Apr 2006. ISSN 0950-9232. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16314835</u> >.

LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. **J Cell Biol**, v. 196, n. 4, p. 395-406, Feb 2012. ISSN 1540-8140. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22351925</u> >.

LUM, L.; REID, M. S.; BLOBEL, C. P. Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. **J Biol Chem,** v. 273, n. 40, p. 26236-47, Oct 1998. ISSN 0021-9258. Available at: < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9748307">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9748307</a> >.

LUQUE, A.; CARPIZO, D. R.; IRUELA-ARISPE, M. L. ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165. **J Biol Chem,** v. 278, n. 26, p. 23656-65, Jun 2003. ISSN 0021-9258. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12716911</u> >.

MADSEN, D. H. et al. Extracellular collagenases and the endocytic receptor, urokinase plasminogen activator receptor-associated protein/Endo180, cooperate in fibroblast-mediated collagen degradation. **J Biol Chem,** v. 282, n. 37, p. 27037-45, Sep 2007. ISSN 0021-9258. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17623673</u> >.

MAHIPAL, A.; MALAFA, M. Importins and exportins as therapeutic targets in cancer. **Pharmacol Ther**, Apr 2016. ISSN 1879-016X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27113410</u> >.

MARADNI, A. et al. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) and MMP inhibitors on intracranial aneurysms: a review article. **Med J Islam Repub Iran**, v. 27, n. 4, p. 249-54, Nov 2013. ISSN 1016-1430. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24926188</u> >.

MARCHANT, D. J. et al. A new transcriptional role for matrix metalloproteinase-12 in antiviral immunity. **Nat Med,** v. 20, n. 5, p. 493-502, May 2014. ISSN 1546-170X. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24784232</u> >.

MASUI, T. et al. Expression of METH-1 and METH-2 in pancreatic cancer. **Clin Cancer Res,** v. 7, n. 11, p. 3437-43, Nov 2001. ISSN 1078-0432. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11705860</u> >.

MBEUNKUI, F.; JOHANN, D. J. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. **Cancer Chemother Pharmacol,** v. 63, n. 4, p. 571-82, Mar 2009. ISSN 1432-0843. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19083000</u> >.

MENEGHETTI, M. C. et al. Heparan sulfate and heparin interactions with proteins. **J R Soc Interface,** v. 12, n. 110, p. 0589, Sep 2015. ISSN 1742-5662. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26289657</u> >.

MILES, F. L.; SIKES, R. A. Insidious changes in stromal matrix fuel cancer progression. **Mol Cancer Res,** v. 12, n. 3, p. 297-312, Mar 2014. ISSN 1557-3125. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24452359</u> >.

MILLER, R. T. Mechanical properties of basement membrane in health and disease. **Matrix Biol**, v. 57-58, p. 366-373, 01 2017. ISSN 1569-1802. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27435904</u> >.

MINN, A. J. et al. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. **J Clin Invest**, v. 115, n. 1, p. 44-55, Jan 2005. ISSN 0021-9738. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15630443</u> >.

MITTAL, R. et al. Intricate Functions of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological Conditions. **J Cell Physiol**, v. 231, n. 12, p. 2599-621, 12 2016. ISSN 1097-4652. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27187048</u> >. MOLLENHAUER, H. H.; MORRÉ, D. J.; ROWE, L. D. Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1031, n. 2, p. 225-46, May 1990. ISSN 0006-3002. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2160275</u> >.

MOSYAK, L. et al. Crystal structures of the two major aggrecan degrading enzymes, ADAMTS4 and ADAMTS5. **Protein Sci**, v. 17, n. 1, p. 16-21, Jan 2008. ISSN 0961-8368. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18042673 >.

MUELLER, M. M.; FUSENIG, N. E. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 11, p. 839-49, Nov 2004. ISSN 1474-175X. Available at: < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15516957">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15516957</a> >.

NAKAMURA, M. et al. Expression of versican and ADAMTS1, 4, and 5 during bone development in the rat mandible and hind limb. **J Histochem Cytochem**, v. 53, n. 12, p. 1553-62, Dec 2005. ISSN 0022-1554. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15983115</u> >.

NAM, D. H.; LEE, K. B.; GE, X. Functional Production of Catalytic Domains of Human MMPs in Escherichia coli Periplasm. **Methods Mol Biol**, v. 1731, p. 65-72, 2018. ISSN 1940-6029. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29318544</u> >.

NIEWIAROWSKI, S. et al. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Semin Hematol,** v. 31, n. 4, p. 289-300, Oct 1994. ISSN 0037-1963. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7831574</u> >.

NORIEGA-GUERRA, H. et al. ADAMTS-1 disrupts HGF/c-MET signaling and HGF-stimulated cellular processes in fibrosarcoma. **Exp Cell Res**, v. 363, n. 2, p. 271-282, 02 2018. ISSN 1090-2422. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29355494</u> >.

NORTHCOTT, J. M. et al. Feeling Stress: The Mechanics of Cancer Progression and Aggression. **Front Cell Dev Biol**, v. 6, p. 17, 2018. ISSN 2296-634X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29541636</u> >.

OBIKA, M. et al. ADAMTS-4 and biglycan are expressed at high levels and colocalize to podosomes during endothelial cell tubulogenesis in vitro. **J Histochem Cytochem,** v. 62, n. 1, p. 34-49, Jan 2014. ISSN 1551-5044. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24051360</u> >. ORIMO, A. et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. **Cell**, v. 121, n. 3, p. 335-48, May 2005. ISSN 0092-8674. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15882617</u> >.

OSKARSSON, T. Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. **Breast,** v. 22 Suppl 2, p. S66-72, Aug 2013. ISSN 1532-3080. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24074795</u> >.

OVERALL, C. M. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. **Mol Biotechnol,** v. 22, n. 1, p. 51-86, Sep 2002. ISSN 1073-6085. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12353914</u> >.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 8, n. 3, p. 221-33, Mar 2007. ISSN 1471-0072. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17318226</u> >.

PENG, W. J. et al. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in systemic sclerosis. **J Clin Immunol**, v. 32, n. 6, p. 1409-14, Dec 2012. ISSN 1573-2592. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22767184</u> >.

PORLAN, E. et al. MT5-MMP regulates adult neural stem cell functional quiescence through the cleavage of N-cadherin. **Nat Cell Biol**, v. 16, n. 7, p. 629-38, Jul 2014. ISSN 1476-4679. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24952463</u> >.

PORTER, S. et al. The ADAMTS metalloproteinases. **Biochem J,** v. 386, n. Pt 1, p. 15-27, Feb 2005. ISSN 1470-8728. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15554875</u> >.

\_\_\_\_\_. Dysregulated expression of adamalysin-thrombospondin genes in human breast carcinoma. **Clin Cancer Res,** v. 10, n. 7, p. 2429-40, Apr 2004. ISSN 1078-0432. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15073121</u> >.

PRZEMYSLAW, L. et al. ADAM and ADAMTS family proteins and their role in the colorectal cancer etiopathogenesis. **BMB Rep,** v. 46, n. 3, p. 139-50, Mar 2013. ISSN 1976-670X. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23527857 >.

RADENKOVIC, S. et al. Values of MMP-2 and MMP-9 in tumor tissue of basallike breast cancer patients. **Cell Biochem Biophys**, v. 68, n. 1, p. 143-52, Jan 2014. ISSN 1559-0283. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23812723 >.

RATNIKOV, B. I. et al. Basis for substrate recognition and distinction by matrix metalloproteinases. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 111, n. 40, p. E4148-55, Oct 2014. ISSN 1091-6490. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25246591 >.

REHN, A. P. et al. ADAMTS-1 increases the three-dimensional growth of osteoblasts through type I collagen processing. **Bone**, v. 41, n. 2, p. 231-8, Aug 2007. ISSN 8756-3282. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17560840</u> >.

REISS, K.; SAFTIG, P. The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. **Semin Cell Dev Biol**, v. 20, n. 2, p. 126-37, Apr 2009. ISSN 1084-9521. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19049889</u> >.

REMACLE, A.; MURPHY, G.; ROGHI, C. Membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 19, p. 3905-16, Oct 2003. ISSN 0021-9533. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12915589</u> >.

RICCIARDELLI, C. et al. The ADAMTS1 protease gene is required for mammary tumor growth and metastasis. **Am J Pathol**, v. 179, n. 6, p. 3075-85, Dec 2011. ISSN 1525-2191. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22001177 >.

RILEY, G. Chronic tendon pathology: molecular basis and therapeutic implications. **Expert Rev Mol Med,** v. 7, n. 5, p. 1-25, Mar 2005. ISSN 1462-3994. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15796783</u> >.

ROCKS, N. et al. Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer. **Biochimie,** v. 90, n. 2, p. 369-79, Feb 2008. ISSN 0300-9084. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17920749</u> >.

\_\_\_\_\_. ADAMTS-1 metalloproteinase promotes tumor development through the induction of a stromal reaction in vivo. **Cancer Res**, v. 68, n. 22, p. 9541-50, Nov 2008. ISSN 1538-7445. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19010931</u> >.

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

p. 800-10, Apr 2009. ISSN 1878-5875. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18775505 >.

\_\_\_\_\_. ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 293, n. 1, p. 501-8, Apr 2002. ISSN 0006-291X. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12054629</u> >.

ROZANOV, D. V. et al. Aberrant, persistent inclusion into lipid rafts limits the tumorigenic function of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignant cells. **Exp Cell Res,** v. 293, n. 1, p. 81-95, Feb 2004. ISSN 0014-4827. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14729059</u> >.

ROZARIO, T.; DESIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. **Dev Biol**, v. 341, n. 1, p. 126-40, May 2010. ISSN 1095-564X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19854168</u> >.

RULLO, A.; NITZ, M. Importance of the spatial display of charged residues in heparin-peptide interactions. **Biopolymers,** v. 93, n. 3, p. 290-8, Mar 2010. ISSN 0006-3525. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19885920 >.

RUNDHAUG, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. **J Cell Mol Med,** v. 9, n. 2, p. 267-85, 2005 Apr-Jun 2005. ISSN 1582-1838. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15963249</u> >.

RUSSELL, D. L. et al. Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation. **J Biol Chem,** v. 278, n. 43, p. 42330-9, Oct 2003. ISSN 0021-9258. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12907688</u> >.

RØNNOV-JESSEN, L.; PETERSEN, O. W.; BISSELL, M. J. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. **Physiol Rev,** v. 76, n. 1, p. 69-125, Jan 1996. ISSN 0031-9333. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8592733</u> >.

SANDY, J. D. et al. Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. **J Biol Chem,** v. 276, n. 16, p. 13372-8, Apr 2001. ISSN 0021-9258. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11278559</u> >.

SHERR, C. J.; MCCORMICK, F. The RB and p53 pathways in cancer. **Cancer Cell,** v. 2, n. 2, p. 103-12, Aug 2002. ISSN 1535-6108. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12204530</u> >. SHINDO, T. et al. ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. **J Clin Invest**, v. 105, n. 10, p. 1345-52, May 2000. ISSN 0021-9738. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10811842</u> >.

SHOZU, M. et al. ADAMTS-1 is involved in normal follicular development, ovulatory process and organization of the medullary vascular network in the ovary. **J Mol Endocrinol**, v. 35, n. 2, p. 343-55, Oct 2005. ISSN 0952-5041. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16216914</u> >.

SI-TAYEB, K. et al. Matrix metalloproteinase 3 is present in the cell nucleus and is involved in apoptosis. **Am J Pathol**, v. 169, n. 4, p. 1390-401, Oct 2006. ISSN 0002-9440. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17003494</u> >.

SI-YAYEB, K. et al. Unexpected localization of the matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) within the cell nucleus in liver cancer cells. Mechanisms and consequences: Journal of Hepatology. 38 2003.

SIEBENLIST, U. NF kappa B/I kappa B proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. Madrid, Spain, July 7-10, 1996. **Biochim Biophys Acta**, v. 1332, n. 1, p. R7-13, Feb 1997. ISSN 0006-3002. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9061013</u> >.

SILVA, S. V. et al. ADAMTS-1 Is Found in the Nuclei of Normal and Tumoral Breast Cells. **PLoS One,** v. 11, n. 10, p. e0165061, 2016. ISSN 1932-6203. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27764205</u> >.

SILVEIRA, V. S. et al. Presence of mast cells and the expression of metalloproteinase 9 in the gingiva of ovariectomized rats with periodontal disease. **J Oral Biol Craniofac Res,** v. 8, n. 1, p. 54-57, 2018 Jan-Apr 2018. ISSN 2212-4268. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29556465 >.

SINHA, S. K. et al. Nuclear localization of catalytically active MMP-2 in endothelial cells and neurons. **Am J Transl Res,** v. 6, n. 2, p. 155-62, 2014. ISSN 1943-8141. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24489995</u> >.

SODERHOLM, J. F. et al. Importazole, a small molecule inhibitor of the transport receptor importin-β. **ACS Chem Biol**, v. 6, n. 7, p. 700-8, Jul 2011. ISSN 1554-8937. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21469738</u> >.

SOLAN, P. D. et al. A novel role for matrix metalloproteinase-8 in sepsis. **Crit Care Med,** v. 40, n. 2, p. 379-87, Feb 2012. ISSN 1530-0293. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22020238</u> >.

SOLOMONOV, I. et al. Distinct biological events generated by ECM proteolysis by two homologous collagenases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 39, p. 10884-9, 09 2016. ISSN 1091-6490. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27630193</u> >.

SOUZA, A. C. et al. Mitochondrial damage as an early event of monensininduced cell injury in cultured fibroblasts L929. **J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med,** v. 52, n. 5, p. 230-7, Jun 2005. ISSN 0931-184X. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15943607</u> >.

STANIC, K. et al. Expression Patterns of Extracellular Matrix Proteins during Posterior Commissure Development. **Front Neuroanat,** v. 10, p. 89, 2016. ISSN 1662-5129. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27733818</u> >.

STANTON, H. et al. Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1812, n. 12, p. 1616-29, Dec 2011. ISSN 0006-3002. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21914474</u> >.

STERNLICHT, M. D. et al. Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. **Development**, v. 132, n. 17, p. 3923-33, Sep 2005. ISSN 0950-1991. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16079154</u> >.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 17, p. 463-516, 2001. ISSN 1081-0706. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11687497</u> >.

SZARVAS, T. et al. Matrix metalloproteinases and their clinical relevance in urinary bladder cancer. **Nat Rev Urol,** v. 8, n. 5, p. 241-54, May 2011. ISSN 1759-4820. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21487384</u> >.

TALLANT, C.; MARRERO, A.; GOMIS-RÜTH, F. X. Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. **Biochim Biophys Acta**, v. 1803, n. 1, p. 20-8, Jan 2010. ISSN 0006-3002. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19374923 >.

TALMI-FRANK, D. et al. Extracellular Matrix Proteolysis by MT1-MMP Contributes to Influenza-Related Tissue Damage and Mortality. **Cell Host**  **Microbe**, v. 20, n. 4, p. 458-470, Oct 2016. ISSN 1934-6069. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27736644</u> >.

TAN, I. E. A.; RICCIARDELLI, C.; RUSSELL, D. L. **The metalloproteinase ADAMTS1: a comprehensive review of its role in tumorigenic and metastatic pathways**. Int J Cancer. 133: 2263-76 p. 2013.

TANAKA, K. et al. miR-27 is associated with chemoresistance in esophageal cancer through transformation of normal fibroblasts to cancer-associated fibroblasts. **Carcinogenesis,** v. 36, n. 8, p. 894-903, Aug 2015. ISSN 1460-2180. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26026166</u> >.

TANG, B. L.; HONG, W. ADAMTS: a novel family of proteases with an ADAM protease domain and thrombospondin 1 repeats. **FEBS Lett,** v. 445, n. 2-3, p. 223-5, Feb 1999. ISSN 0014-5793. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10094461</u> >.

TANZER, M. L. Current concepts of extracellular matrix. **J Orthop Sci**, v. 11, n. 3, p. 326-31, May 2006. ISSN 0949-2658. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16721539</u> >.

TATTI, O. et al. Membrane-type-3 matrix metalloproteinase (MT3-MMP) functions as a matrix composition-dependent effector of melanoma cell invasion. **PLoS One,** v. 6, n. 12, p. e28325, 2011. ISSN 1932-6203. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22164270</u> >.

TETI, A. Regulation of cellular functions by extracellular matrix. **J Am Soc Nephrol**, v. 2, n. 10 Suppl, p. S83-7, Apr 1992. ISSN 1046-6673. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1318112</u> >.

THAI, S. N.; IRUELA-ARISPE, M. L. Expression of ADAMTS1 during murine development. **Mech Dev,** v. 115, n. 1-2, p. 181-5, Jul 2002. ISSN 0925-4773. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12049787</u> >.

THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular matrix structure. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 97, p. 4-27, Feb 2016. ISSN 1872-8294. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26562801</u> >.

TOKITO, A.; JOUGASAKI, M. Matrix Metalloproteinases in Non-Neoplastic Disorders. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 7, Jul 2016. ISSN 1422-0067. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27455234</u> >.

TURNER, J. G.; DAWSON, J.; SULLIVAN, D. M. Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer. **Biochem Pharmacol**, v. 83, n. 8, p. 1021-32, Apr

2012. ISSN 1873-2968. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22209898 >.

WANG, M. et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. **J Cancer**, v. 8, n. 5, p. 761-773, 2017. ISSN 1837-9664. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28382138</u> >.

WANG, N. et al. Down-regulation of HtrA1 activates the epithelialmesenchymal transition and ATM DNA damage response pathways. **PLoS One,** v. 7, n. 6, p. e39446, 2012. ISSN 1932-6203. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22761798</u> >.

WANG, W. M. et al. Transforming growth factor-beta induces secretion of activated ADAMTS-2. A procollagen III N-proteinase. **J Biol Chem,** v. 278, n. 21, p. 19549-57, May 2003. ISSN 0021-9258. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12646579</u> >.

WERB, Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 439-42, Nov 1997. ISSN 0092-8674. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9390552</u> >.

WÄLDE, S. et al. The nucleoporin Nup358/RanBP2 promotes nuclear import in a cargo- and transport receptor-specific manner. **Traffic**, v. 13, n. 2, p. 218-33, Feb 2012. ISSN 1600-0854. Available at: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21995724">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21995724</a> >.

XIE, Y. et al. Nuclear matrix metalloproteinases: functions resemble the evolution from the intracellular to the extracellular compartment. **Cell Death Discov,** v. 3, p. 17036, 2017. ISSN 2058-7716. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28811933</u> >.

YAMAMOTO, K. et al. MMP-13 is constitutively produced in human chondrocytes and co-endocytosed with ADAMTS-5 and TIMP-3 by the endocytic receptor LRP1. **Matrix Biol**, v. 56, p. 57-73, Dec 2016. ISSN 1569-1802. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27084377</u> >.

YAN, W. et al. Importin  $\beta$ 1 mediates nuclear factor- $\kappa$ B signal transduction into the nuclei of myeloma cells and affects their proliferation and apoptosis. **Cell Signal**, v. 27, n. 4, p. 851-9, Apr 2015. ISSN 1873-3913. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25643631</u> >.

YANG, C. Y.; CHANALARIS, A.; TROEBERG, L. ADAMTS and ADAM metalloproteinases in osteoarthritis - looking beyond the 'usual suspects'. **Osteoarthritis Cartilage**, Feb 2017. ISSN 1522-9653. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28216310</u> >.

YUAN, Y. et al. Role of the tumor microenvironment in tumor progression and the clinical applications (Review). **Oncol Rep,** v. 35, n. 5, p. 2499-515, May 2016. ISSN 1791-2431. Available at: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26986034">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26986034</a> >.

ZENG, W. et al. Glycosaminoglycan-binding properties and aggrecanase activities of truncated ADAMTSs: comparative analyses with ADAMTS-5, -9, -16 and -18. **Biochim Biophys Acta,** v. 1760, n. 3, p. 517-24, Mar 2006. ISSN 0006-3002. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16507336</u> >.

ZHU, J.; CYNADER, M. S.; JIA, W. TDP-43 Inhibits NF-κB Activity by Blocking p65 Nuclear Translocation. **PLoS One,** v. 10, n. 11, p. e0142296, 2015. ISSN 1932-6203. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26571498</u> >.

ZHU, Z. C. et al. KPNB1 inhibition disrupts proteostasis and triggers unfolded protein response-mediated apoptosis in glioblastoma cells. **Oncogene**, v. 37, n. 22, p. 2936-2952, 05 2018. ISSN 1476-5594. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29520102</u> >.

KUMAR, S.; RAO, N.; GE, R. Emerging Roles of ADAMTSs in Angiogenesis and Cancer. **Cancers (Basel),** v. 4, n. 4, p. 1252-99, 2012. ISSN 2072-6694. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24213506</u> >.