



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Renata Machado Brandão Costa

**Efeito das interações célula-matriz extracelular na transição epitélio-  
mesênquima do carcinoma de mama:  
papel de integrinas**

Rio de Janeiro

2018

Renata Machado Brandão Costa

**Efeito das interações célula-matriz extracelular na transição epitélio-mesênquima do carcinoma de mama: papel de integrinas**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C837 Costa, Renata Machado Brandão.  
Efeito das interações célula-matriz extracelular na transição epitélio-  
mesênquima do carcinoma de mama: papel de integrinas / Renata Machado  
Brandão Costa. – 2018.  
128 f.

Orientadora: Thereza Christina Barja Fidalgo.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto  
de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Mamas - Câncer – Teses. 2. Matriz extracelular - Teses. 3. Metástase  
- Teses. 4. Integrinas. I. Fidalgo, Thereza Christina Barja. II. Universidade  
do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara  
Gomes. III. Título.

CDU 618.19-006.6

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta  
tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Renata Machado Brandão Costa

**Efeito das interações célula-matriz extracelular na transição epitélio-mesênquima do carcinoma de mama: Papel de integrinas**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 20 de março de 2018.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek

Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Roger Chammas

Universidade de São Paulo

Rio de Janeiro

2018

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades, pelas pessoas que fazem parte da minha vida e por sempre me guiar e me manter no caminho certo.

À minha família pelos bons exemplos de perseverança, esperança, respeito, caráter e humildade, além do amor, carinho e apoio em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, por terem me deixado um exemplo de vida a ser seguido, além de todo o incentivo, investimento, empenho e preocupação com a minha formação profissional e pessoal. Tenho certeza que vocês estariam comemorando, fortemente, mais essa conquista.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thereza Christina Barja-Fidalgo pela oportunidade de desenvolver esse trabalho em seu laboratório, pelos ensinamentos, paciência e atenção.

Ao Prof. Dr Edward Helal por me co-orientar, sempre com muita paciência, dedicação, conselhos, incentivos e com boa vontade em me ensinar.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sheila Coelho por aceitar revisar a minha tese.

Ao Genilson e Gabi pela participação fundamental nesse trabalho, para o bom andamento dos experimentos.

A todos os amigos do laboratório pela boa convivência, pelos momentos de alegria e descontração.

Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir  
entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque  
descobri, no caminho incerto da vida, que o mais  
importante é o decidir.

*Cora Coralina*

## RESUMO

COSTA, Renata Machado Brandão. *Efeito das interações célula-matriz extracelular na transição epitélio-mesênquima do carcinoma de mama: papel de integrinas*. 2018. 128 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Alterações na composição e arquitetura da matriz extracelular (MEC) podem influenciar no crescimento e disseminação tumoral. A MEC se comporta como uma barreira física que precisa ser atravessada pelas células tumorais, permitindo que estas células saiam do sítio primário e invadam outros tecidos durante o processo de metástase. A transição epitélio-mesênquima (TEM) é um processo que permite a polarização das células epiteliais para assumir um fenótipo mesenquimal, contribuindo para a metástase. Durante a TEM, as células epiteliais modificam o seu fenótipo, passando da adesão célula-célula para interações célula-matriz. Os tumores de mama frequentemente apresentam células em diferentes estágios de diferenciação que, por sua vez, produzem MEC distintas. Porém, a possível contribuição da MEC derivada de células tumorais metastáticas para a TEM ainda não foi investigada. Neste trabalho, investigamos os mecanismos envolvidos no efeito da interação de células MCF-7, uma linhagem celular de câncer de mama com baixo potencial metastático, com a MEC produzida pelas células MDAMB-231, uma linhagem celular de câncer de mama com alto potencial metastático. Nossos dados mostraram que a MEC produzida pelas células MDAMB-231 (MDA-MEC) tem composição glicoproteica diferente da MEC derivada das células MCF-7 (MCF-MEC), apresentando maior expressão de tenascina-C, laminina, osteopontina e vitronectina e menor quantidade de fibronectina. A interação das células MCF-7 com a MDA-MEC induziu mudanças morfológicas nas células MCF-7, características de células mesenquimais. Ocorreu uma diminuição dos níveis do marcador epitelial E-caderina e aumento de marcadores mesenquimais, contribuindo para o aumento da sua capacidade migratória. A indução de TEM ocorreu independente da presença de TGF- $\beta$ , sendo dependente do contato direto das células MCF-7 com a MDA-MEC. Estas interações levaram à ativação de integrinas e suas vias de sinalização, aumentando a fosforilação de FAK, ERK e AKT e ativando SMAD2 e a translocação de SMAD4 para o núcleo nas células MCF-7. O bloqueio das integrinas impediu a TEM induzida pela MDA-MEC, mantendo a morfologia epitelial e adesões célula-célula mediadas por E-caderina, além de inibir a fosforilação de SMAD2. A análise preliminar por microarray de células MCF-7 que interagiram com a MDA-MEC mostrou a modificação de genes envolvidos em processos de adesão célula-MEC, migração, TEM e progressão tumoral. Nossos resultados revelam que a MEC extraída de tumores de mama metastáticos pode desencadear a TEM em células de tumor de mama com características epiteliais, através da ativação de integrinas e de vias de sinalização associadas, levando a um fenótipo mesenquimal. Esse trabalho contribui para o melhor entendimento das interações de adesão célula-célula durante a progressão do câncer de mama e pode ajudar no desenvolvimento de terapias anti-metastáticas.

Palavras-chave: Câncer de mama. Matriz extracelular. Transição epitélio-mesênquima.

Sinalização de integrinas.

## ABSTRACT

COSTA, Renata Machado Brandão. *Effects of cell-matrix interactions in epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells: role of integrins*. 2018. 128 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Alterations in the composition and architecture of the extracellular matrix (ECM) can influence cancer growth and dissemination. ECM is a complex physical barrier that must be overcome by tumor cells to allow their escape from primary sites and invasion of tissues during metastasis. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a cellular process that allows a polarized epithelial cell to assume a mesenchymal cell phenotype, contributing to metastasis. During EMT, epithelial cells change their profile from cell-cell contacts to mostly cell-matrix interactions. Breast tumors usually present cells at different stages of differentiation that are able to produce distinct extracellular matrices. However, the contribution of ECM derived from metastatic tumor cells to EMT has not yet been investigated. Here, we have investigated the mechanisms involved in the effects resulting from the interaction of MCF-7, a low-metastatic epithelial breast cancer cell line, with the ECM produced by MDAMB-231, a high-metastatic breast tumor cell line. Our data show that compared to the ECM derived from MCF-7 (MCF-ECM), the ECM produced by MDAMB-231 cells (MDA-ECM) has considerably different composition, with higher expression of tenascin-C, laminin, osteopontin, and vitronectin contents and lower expression of fibronectin. The interaction of MCF-7 cells with MDA-ECM induced morphological changes in MCF-7 cells, characteristics of mesenchymal cells. There was a decrease in expression of the epithelial marker E-cadherin and up-regulated mesenchymal markers, contributing to the increase in their migration capability. Induction of EMT was independent of the presence of TGF- $\beta$  and dependent on the direct contact of MCF-7 cells with MDA-ECM. These interactions triggered the activation of integrin-associated signaling, increasing the phosphorylation of FAK, ERK, and AKT and activating SMAD2 and SMAD4 nuclear translocation in MCF-7 cells. Blockage of integrins impaired the shift to the EMT profile induced by MDA-ECM, maintaining epithelial morphology and E-cadherin-mediated adhesions, and inhibited SMAD2 phosphorylation. Preliminary analysis, by microarray, of MCF-7 cells that interacted with the MDA-ECM showed modification of genes involved in cell-ECM adhesion, migration, EMT and tumor progression. Our findings revealed ECM derived from metastatic tumors may act as a trigger of EMT in breast cancer epithelial cells, mediated by integrin-associated signaling, leading to a mesenchymal cell transition. These data contribute to the understanding of adhesion-related interactions during breast cancer progression and may aid in the development of antimetastatic therapies.

Keywords: Breast cancer. Extracellular matrix. Epithelial-mesenchymal transition. Integrin signaling.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	As principais características do câncer.....	17
Figura 2 -	Esquema da heterogeneidade no câncer de mama.....	21
Figura 3 -	Anatomia aplicada da mama.....	23
Figura 4 -	Sítios de metástase do câncer de mama por idade.....	23
Figura 5 -	Principais eventos durante a transição epitélio-mesênquima (TEM).....	25
Figura 6 -	O envolvimento da transição epitélio-mesênquima (TEM) e transição mesênquima-epitélio (TME) na metástase de tumores de mama.....	27
Figura 7 -	Complexo do TGF- $\beta$ latente.....	29
Figura 8 -	Vias de sinalização ativadas por TGF- $\beta$ .....	31
Figura 9 -	Representação esquemática da estrutura das integrinas.....	33
Figura 10 -	Sinalização mediada por integrinas.....	36
Figura 11 -	<i>Crosstalk</i> de integrinas e receptor de TGF- $\beta$ .....	38
Figura 12 -	Ivasão e Intravasão.....	40
Figura 13 -	Desenho esquemático do processo de obtenção da matriz extracelular.....	47
Figura 14 -	Esquema do Transwell.....	52
Figura 15 -	Diferenças na expressão de proteínas entre as MECs produzidas pelas células MCF-7 e MDAMB-231.....	56
Figura 16 -	Morfologia das células MCF-7 cultivadas sobre a própria MEC na presença ou ausência de TGF- $\beta$ ou sobre a MDA-MEC.....	57
Figura 17 -	Expressão de marcadores epiteliais e mesênquimais nas células MCF-7 sobre a sua própria MEC, na presença ou ausência de TGF- $\beta$ ou sobre a MDA-MEC.....	59
Figura 18 -	Envolvimento de TGF- $\beta$ na transição epitélio-mesênquima induzida pela MDA-MEC.....	62
Figura 19 -	Migração das células MCF-7 estimuladas pela MCF-MEC na presença ou ausência de TGF- $\beta$ ou pela MDA-MEC.....	63
Figura 20 -	Participação de integrinas e suas principais vias de sinalização nas células MCF-7 estimuladas pela MCF-MEC na presença ou	

	ausência de TGF- $\beta$ ou pela MDA-MEC.....	65
Figura 21 –	Análise da participação de integrinas na transição epitélio- mesênquima das células MCF-7 cultivadas sobre a MDA-MEC.....	68
Figura 22 –	Mecanismo proposto nas células MCF-7 cultivadas sobre a MDA- MEC.....	83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma, Brasil, 2018.....	19
Tabela 2 – Classificação de integrinas de acordo com a subunidade $\beta$ .....	34
Tabela 3 – Genes mais super-expressos nas células MCF-7 sobre MDA-MEC em relação à MCF-MEC.....	71
Tabela 4 - Genes mais sub-expressos nas células MCF-7 sobre MDA-MEC em relação à MCF-MEC.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$ -SMA	Actina de músculo liso $\alpha$
AKT	<i>Serine/threonine-specific protein kinase</i>
BCA	Ácido bicinconínico
bFGF	Fator básico de crescimento de fibroblasto
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
cRNA	RNA complementar
DEPDC5	Do inglês <i>DEP domain containing 5</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGTA	Do inglês <i>egtazic acid</i>
ERK	Quinase regulada por estímulo extracelular
ERM	Do inglês <i>ezzrin, radixin and moesin</i>
FAK	Quinase de adesão focal
FBS	<i>Fetal serum buffer</i>
bFGF	Fator de crescimento de fibroblato básico
FITC	Isotiocianeto fluoresceína
FN	Fibronectina
GATOR1	Do inglês <i>GAP activity toward RAGs 1</i>
GTPases	Guanosina trifosfatase
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
HEPES	Ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico)
IL	Interleucina
ILK	Quinase ligante de integrina, do inglês <i>integrin-linked kinase</i>
LAP	peptídio latente associado, do inglês <i>latency-associated peptide</i>
LN	Laminina
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA-MEC	Matriz extracelular produzida pelas células MDAMB-231
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloprotease

MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiazol-zil)-2-5-difeniltetrazolio
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PI3K	Fosfatidil inositol-3 quinase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PVDF	Polivinilideno difluorido
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RGD	Sequência arginina-glicina-ácido aspártico
RIN	Medida de integridade de RNA (software Bioanalyzer)
RMA	Do inglês " <i>Robust Multi-array Average</i> "
RNA	Ácido ribonucleico
miRNA	microRNA
SDS	Dodecilssulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
Src	Do inglês <i>steroid receptor coactivator</i>
STR	Do inglês <i>short tandem repeat</i>
ssDNA	Do inglês <i>Single strand DNA</i> , fita simples de DNA
TEM	Transição epitélio-mesênquima
TGF- $\beta$	Fator de crescimento de transformação $\beta$
TGF- $\beta$ R	Receptor do fator de crescimento de transformação $\beta$
TME	Transição mesênquima-epitélio
TN-C	Tenascina-C
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
mTORC1	Do inglês <i>mammalian target of rapamycin complex 1</i>
T-TBS	<i>Tween Tris-buffered saline</i>
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
WNT	Via de sinalização da Wnt

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	14
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	16
1.1	<b>O câncer.....</b>	16
1.2	<b>Câncer de mama.....</b>	18
1.2.1	<u>Heterogeneidade no câncer de mama.....</u>	20
1.2.2	<u>Câncer de mama e metástase.....</u>	22
1.3	<b>Transição epitélio-mesênquima.....</b>	25
1.3.1	<u>TGF-beta e transição epitélio-mesênquima.....</u>	28
1.4	<b>Integrinas e sinalização intracelular ligadas à transição epitélio-mesênquima.....</b>	32
1.5	<b>Matriz extracelular e transição epitélio-mesênquima.....</b>	40
1.6	<b>Justificativa do projeto.....</b>	43
2	<b>OBJETIVOS.....</b>	45
2.1	<b>Objetivo geral.....</b>	45
2.2	<b>Objetivos específicos.....</b>	45
3	<b>METODOLOGIA.....</b>	46
3.1	<b>Linhagens celulares.....</b>	46
3.2	<b>Cultura de células.....</b>	46
3.3	<b>Contagem de células.....</b>	47
3.4	<b>Obtenção da matriz extracelular.....</b>	47
3.5	<b>Análise da composição da matriz extracelular.....</b>	48
3.6	<b>Análise do perfil mesênquimal das MCF-7 na presença dos diferentes tratamentos.....</b>	48
3.7	<b>MTT das células MCF-7 tratadas com RGD.....</b>	49
3.8	<b>Imunofluorescência de E-caderina.....</b>	49
3.9	<b>Eletroforese e <i>western blot</i>.....</b>	50
3.10	<b>Ensaio de migração celular.....</b>	51
3.11	<b>Microscópio confocal.....</b>	52
3.12	<b>Extrato nuclear.....</b>	53
3.13	<b>Expressão de mRNA (qRT-PCR) .....</b>	53
3.14	<b>Análise de expressão gênica em larga escala por microarranjo de</b>	

	<b>DNA.....</b>	54
3.15	<b>Tratamento estatístico.....</b>	55
4	<b>RESULTADOS.....</b>	56
4.1	<b>Caracterização das matrizes obtidas das células MCF-7 e MDAMB-231.....</b>	56
4.2	<b>MDA-MEC induz transição epitélio-mesênquima nas células MCF-7.....</b>	57
4.3	<b>MDA-MEC induz a migração das células MCF-7.....</b>	63
4.4	<b>Efeito da MDA-MEC sobre a ativação de integrinas nas MCF-7.....</b>	64
4.5	<b>Integrinas modulam a expressão de E-caderina nas células MCF-7 cultivadas sobre a MDA-MEC.....</b>	67
4.6	<b>Diferenças na expressão global por microarranjo de DNA nas células MCF-7 em contato com a MDA-MEC.....</b>	70
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	72
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	84
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	85
	<b>APÊNDICE - Extracellular matrix derived from human metastatic breast câncer mediates epithelial-mesenchymal transition in a low metastatic epithelial breast câncer cell through integrin activation (Artigo científico).....</b>	99

## INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o tipo mais comum de neoplasia entre as mulheres, excetuando-se os casos de câncer de pele não melanoma. No Brasil, foram estimados 59.700 casos novos para o ano de 2018 e 2019 (INCA, 2018).

A metástase é o processo no qual as células de um tumor primário conseguem colonizar sítios secundários. Para tanto, as células do tumor primário devem invadir a matriz extracelular (MEC) e a vasculatura, intravasalar para o sistema vascular ou linfático e se infiltrar em órgãos secundários, onde precisam continuar a proliferar (Vanharanta e Massague, 2013; Kimbung e col., 2015). Dessa forma, a metástase se mostra um processo bastante complexo e arriscado para as células tumorais. Estudos pré-clínicos mostram que menos de 0,02% das células que se desprendem do tumor primário para o sítio metastático podem sobreviver e colonizar outros órgãos (Chambers e col., 2002; Kimbung e col., 2015). Para dar início a esse processo, alterações genéticas e epigenéticas são necessárias para desencadear a transição epitélio-mesênquima (TEM) nas células tumorais (Nguyen e Massague, 2007; Nguyen e col., 2009; Kimbung e col., 2015).

Nesse processo, as células epiteliais do tumor perdem gradualmente suas características fenotípicas de células estáticas, desmontam suas ligações célula-célula e adquirem um fenótipo mais migratório. O fator de crescimento de transformação- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) é considerada como a principal citocina para a indução da TEM, podendo ser produzida pelas células tumorais e pelas células não tumorais presentes no microambiente tumoral (Bill e Christofori, 2015).

As células tumorais são capazes de secretar metaloproteases de matriz que remodelam a matriz extracelular (MEC), modificando sua composição para facilitar eventos celulares que favoreçam o crescimento tumoral (Marastoni e col., 2008). Durante a progressão tumoral, as células em diferentes estágios de TEM são capazes de remodelar a sua MEC, aumentando a expressão de proteínas de matriz que contribuem para a sua migração (Peranzoni e col., 2013; Bill e Christofori, 2015). A sinalização intracelular dependente de integrina (responsáveis pelas interações célula-matriz) regula a forma, sobrevivência e proliferação das células tumorais e do microambiente, desempenhando um papel importante no desenvolvimento de metástases (Oliva e col., 2007; Brandão-Costa e col., 2016). Os efeitos da MEC sintetizada



pelas células tumorais mesenquimais sobre as células tumorais epiteliais ainda é pouco conhecido.

Por esse motivo, a investigação sobre mecanismos moleculares e celulares que são afetados a partir das interações célula-matriz e a identificação de moléculas que sejam ligantes seletivos de integrinas capazes de interferir nestes processos são estudos importantes que podem contribuir para o desenvolvimento de moléculas anti-câncer.

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 O câncer

O termo câncer é utilizado genericamente para representar um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento celular desordenado, podendo invadir diferentes tecidos (INCA, 2018). Até a segunda metade do século XX acreditava-se que os tumores eram “ilhas”, dando importância apenas para as células tumorais e suas alterações genéticas, levando à proliferação celular desordenada (Stratton e col., 2009; Hanahan e Weinberg, 2011). Hoje, sabe-se que o câncer é muito mais complexo, porque envolve a participação de diversas células que atuam em conjunto para o crescimento tumoral. Nesse contexto surgiu o termo “microambiente tumoral”, dando suporte à hipótese de Paget em 1889: “Semente e solo”, do inglês *“Seed and Soil”* (Kenny e col., 2007; Hanahan e Weinberg, 2011).

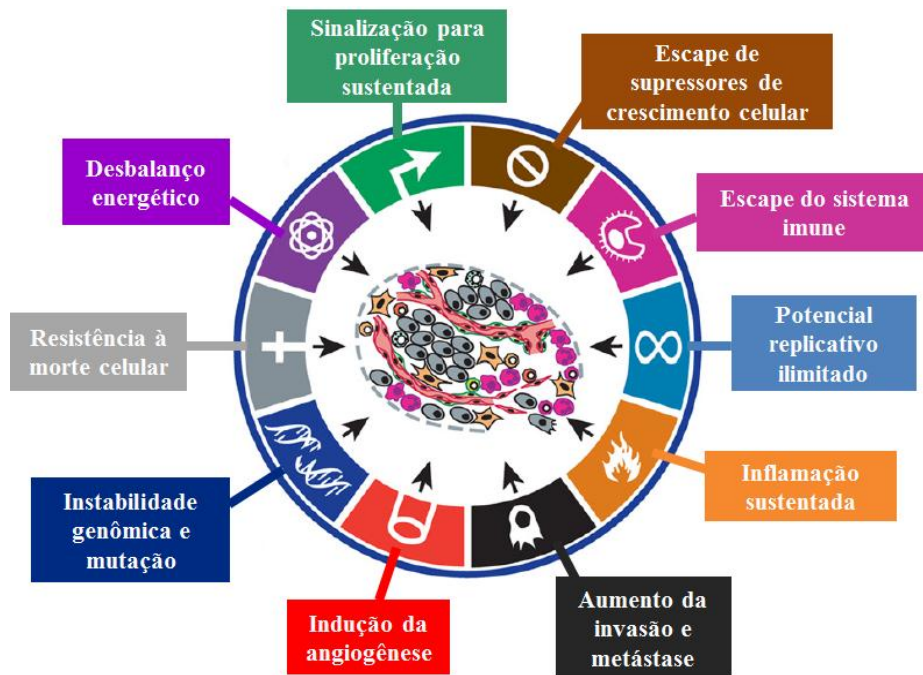
No Brasil, a partir de 1960, seguindo uma tendência mundial, as doenças infecciosas deixaram de ser a principal causa de morte, sendo substituídas pelas doenças do aparelho circulatório e neoplasias. Essa progressiva ascensão da incidência e da mortalidade por doenças crônico-degenerativas tem como principal fator o envelhecimento da população, resultante do intenso processo de urbanização e das ações de promoção e recuperação da saúde (INCA, 2018). Atualmente, as neoplasias malignas constituem importante causa de doença e morte no Brasil. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou, para o ano 2030, 27 milhões de casos incidentes e 17 milhões de mortes por câncer. Por isso, nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial (INCA, 2018).

As causas do câncer estão relacionadas a fatores de risco, que podem ser externos, como o tabagismo, alcoolismo, hábitos alimentares e exposição à radiação solar ou radioatividade, e podem ser fatores intrínsecos, como mutações herdadas e condições imunes. Esses fatores podem agir associados ou não para iniciar o processo de carcinogênese (Jemal e col., 2007).

A elevada proliferação das células tumorais leva à formação de uma massa anormal de tecido (tumor) que excede os limites anatômicos do tecido normal. Os tumores podem ser benignos, geralmente autolimitados em seu crescimento e não invasivos; ou malignos, quando

são capazes de invadir outros tecidos (El-Bacha e col., 2003). A invasão, em tumores malignos, está ligada a um conjunto de alterações que são essenciais para o desenvolvimento da célula tumoral (Figura 1), como a insensibilidade a sinais que interrompam o crescimento celular, aumento da resistência à morte celular, potencial de replicação ilimitado, angiogênese sustentada, escape das células imunes, invasão e metástase, entre outros (Hanahan e Weinberg, 2011). Dessa forma, a progressão tumoral também pode modificar o microambiente no entorno para um “estado ativado” por meio da liberação de diversos fatores que ativam vias de sinalização nas células adjacentes que contribuem com o crescimento tumoral (Pietras e Ostman, 2010).

Figura 1 – As principais características do câncer



Legenda: As dez principais características do câncer propostas por Hanahan e Weinberg (2011). Essa ilustração engloba as seis habilidades do câncer, propostas originalmente por Hanahan e Weinberg (2000), no qual os pesquisadores sugeriram que a maioria dos cânceres adquirem habilidades como resistência à morte celular, sinalização para proliferação sustentada, escape de supressores tumorais, aumento de invasão e metástase, potencial replicativo ilimitado e angiogênese sustentada, durante o seu desenvolvimento através da indução de vários mecanismos. Em 2011, Hanahan e Weinberg acrescentaram a capacidade de desbalanço energético e escape do sistema imune (particularmente macrófagos, linfócitos T e B e células NK) e inflamação sustentada, promovendo a proliferação tumoral. Em adição, a instabilidade genômica e mutação, que promovem alterações genéticas nas células tumorais que desencadeiam a progressão tumoral.


Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011, f. 647.

O desenvolvimento tumoral inclui três etapas: iniciação, promoção e progressão. A iniciação consiste em alterações permanentes no genótipo celular, ocasionadas por mutações pontuais, amplificações, translocações ou deleções de genes (Black, 1993). Essas modificações genéticas podem levar à perda da proteção contra transformações celulares, aumentando a susceptibilidade de formação do câncer. A fase de promoção é um processo de amplificação das células que tiveram seu genótipo alterado (Martín de Civetta e Civetta, 2011). A progressão tumoral envolve, além da expansão clonal das células mutadas, dependendo da agressividade das células, a ocorrência de metástase. Isso porque, nessa etapa, as células diminuem a sua adesão às células vizinhas e à matriz extracelular (MEC), deixando o tecido de origem para invadir outros tecidos, através de vasos sanguíneos ou linfáticos, aonde irão se estabelecer e proliferar (Mareel e Leroy, 2003; Martín de Civetta e Civetta, 2011).

## **1.2 Câncer de mama**

O câncer de mama é o tipo de neoplasia mais comum entre as mulheres, excetuando-se os casos de câncer de pele não melanoma. É a causa mais frequente de morte por câncer em mulheres, e uma das menos frequentes em homens, responsável por apenas 1% dos casos de câncer (Cecilio AP e col., 2015). No Brasil, em 2018 foram estimados 59.700 casos novos em mulheres para o ano de 2018 e 2019 (Tabela 1), que representam uma taxa de incidência de 56,33 casos por 100.000 mulheres e a maior taxa de mortalidade comparada a qualquer outro câncer (12,9/100 mil habitantes) (INCA, 2018).

Tabela 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma, Brasil, 2018

	Localização Primária	Casos	%
<b>Mulheres</b> 	Mama Feminina	59.700	29,5%
	Cólon e Reto	18.980	9,4%
	Colo do Útero	16.370	8,1%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
	Glândula Tireoide	8.040	4,0%
	Estômago	7.750	3,8%
	Corpo do Útero	6.600	3,3%
	Ovário	6.150	3,0%
	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
	Leucemias	4.860	2,4%

Fonte: MS/INCA/ Estimativa de Câncer no Brasil, 2018.

Diversos fatores estão relacionados ao aumento do risco de desenvolver o câncer de mama, como a idade – mulheres acima dos 50 anos de idade, devido a fatores endócrinos ou história reprodutiva, que estão relacionados ao aumento da exposição ao estrogênio – menarca precoce (antes dos 12 anos), menopausa tardia (após os 55 anos), primeira gravidez após os 30 anos, nuliparidade, uso de anticoncepcionais e terapia de reposição hormonal. Outros fatores comportamentais e ambientais, que não estão relacionados à reprodução, também aumentam o risco de incidência da doença, como a ingestão de bebidas alcoólicas, sedentarismo, sobrepeso e obesidade (INCA, 2018; IARC, 2018). Com um percentual de 5 a 10% do total de casos, os fatores genéticos e hereditários também contribuem para o câncer de mama. Mulheres que tenham casos de câncer de mama ou de ovário em parentes de primeiro grau, sobretudo em idade jovem, ou ainda no caso de câncer de mama em homem na família, têm maior predisposição genética, especialmente quando relacionada a mutações em genes como *BRCA1* e *BRCA2*, e são consideradas de risco elevado para a doença (INCA, 2018; IARC, 2018).

O sintoma mais comum do câncer de mama é o aparecimento de nódulo na mama, mas outros sinais como edema cutâneo, retração cutânea, hiperemia, descamação ou ulceração do mamilo, secreção papilar, especialmente quando é unilateral, e surgimento de linfonodos palpáveis na axila, também podem ser sintomas desse tipo de câncer (INCA, 2018; IARC, 2018).

Quando diagnosticado em estágios iniciais, o câncer de mama possui um bom prognóstico. A análise das características histopatológicas, além do tamanho do tumor, acometimento de linfonodos axilares, idade inferior a 35 anos e presença de invasão linfovascular, são utilizados como fatores prognósticos (Looning, 2007). No Brasil, diversas campanhas são lançadas anualmente na tentativa de controlar o número de novos casos a partir da detecção precoce do câncer de mama. Nessas campanhas, mulheres e homens são estimulados a realizar o autoexame das mamas e comunicar ao seu médico qualquer alteração. Mulheres acima de 40 anos de idade também devem fazer anualmente a mamografia e a ultrassonografia de mama, que poderá ser seguida ou não de punção ou biópsia. Esses exames complementam o exame clínico feito pelo médico, uma vez que com as imagens é possível ver lesões ainda menores (INCA, 2018).

O tratamento para esse tipo de câncer varia de acordo com o estadiamento da doença, marcadores clínicos, e condições do paciente, como idade, comorbidades e menopausa. A cirurgia para retirada total ou parcial da mama ainda é o tratamento mais utilizado nesses casos, seguido de radioterapia, quimioterapia e hormonioterapia (Cecilio AP e col., 2015).

### 1.2.1 Heterogeneidade no câncer de mama

O câncer de mama é altamente heterogêneo, no que diz respeito aos padrões de expressão gênica, e se desenvolve a partir de uma série de alterações genéticas que afetam oncogenes e genes supressores de tumor (Curtis e col., 2012), refletindo, portanto, diversas manifestações clínicas e morfológicas, com diferentes respostas terapêuticas para esse tipo de câncer (INCA, 2018).

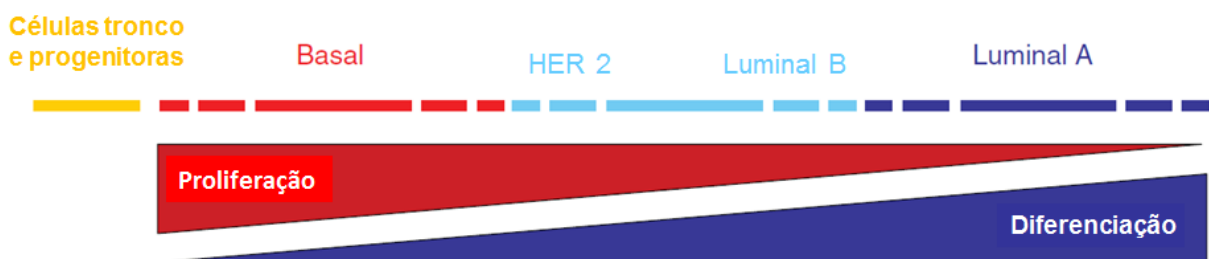
A análise do perfil de expressão gênica por técnicas de microarranjo de DNA permitiu a classificação molecular dos tumores de mama. Foram descritos quatro grandes subtipos de carcinomas mamários invasivos: luminal A, luminal B, HER2 e basal. O subtipo luminal A possui receptores de estrogênio (ER) e progesterona (PR), enquanto o subtipo luminal B além dos receptores hormonais pode apresentar expressão do receptor de fator de crescimento de epiderme humana (HER2) e de Ki67- marcador de proliferação celular- apresentando uma maior taxa proliferativa. Juntos, eles representam 60% dos casos de carcinoma mamário, e são subtipos responsivos a terapias hormonais. O subtipo molecular HER2 representa 10-15% dos

casos de carcinoma mamário, não expressa receptores hormonais e possui elevada expressão de HER2, também conhecido como *ErbB2*, um oncogene que codifica um membro da família do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR). Esse receptor atua se ligando a outros receptores de EGF, formando heterodímeros, aumentando a ativação desses receptores. As células HER2 positivas são responsivas à terapia anti-HER2. O subtipo basal é conhecido por triplo negativo, pelo fato de não apresentar os receptores hormonais e o HER2, e representa 15-20% dos casos de carcinoma mamário. É o subtipo de tumor de mama mais agressivo, e ainda não possui terapia específica (Perou e col., 2000; Parker e col., 2009; Prat e col., 2015).

A heterogeneidade celular no câncer de mama pode ser explicada pela hipótese das células iniciadoras de câncer, ou células-tronco tumorais. Neste caso, a prole dessas células precursoras pode continuar em um crescente processo de diferenciação (célula luminal A - com ER e PR - e HER2), ou pode parar sua diferenciação, apresentando características mais migratórias (célula basal) (Figura 2) (Blenkiron e col., 2007; Bertucci e Birnbaum, 2008).

Dessa forma, o conhecimento da assinatura molecular do tumor auxilia tanto no prognóstico quanto na decisão terapêutica. A expressão de determinados receptores nas células tumorais de mama influencia na resposta à terapia hormonal adjuvante, como o tamoxifeno (inibidor de ER e PR) e/ou na terapia-alvo com o trastuzumabe (anticorpo monoclonal que inibe HER2). Além disso, esse conhecimento permite a busca por estratégias mais direcionadas na pesquisa por novas drogas de combate ao câncer de mama (Pritchard KI, 2013).

Figura 2 – Esquema da heterogeneidade no câncer de mama



Legenda: De acordo com a hipótese das células-tronco tumorais, o câncer de mama se inicia a partir de um número limitado de células iniciadoras de tumor (células tronco progenitoras). A prole dessas células pode tanto aumentar sua diferenciação, quanto estacionar em um estado mais proliferativo, formando as células basais, HER2 e luminais. A heterogeneidade no câncer de mama pode acontecer devido a alterações genéticas e epigenéticas e a presença de miRNAs.

Fonte: Adaptado de Bertucci e Birnbaum, 2008, f. 63.

### 1.2.2 Câncer de mama e metástase

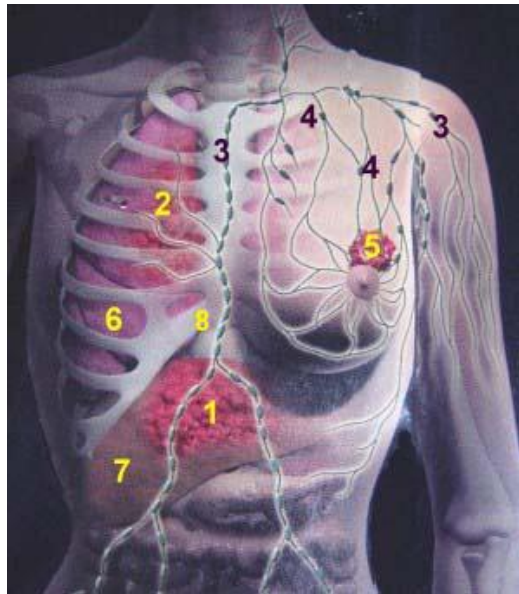
A metástase é o processo no qual as células de um tumor primário conseguem colonizar sítios secundários. As células do tumor primário devem invadir e escapar de barreiras físicas, como a matriz extracelular e a vasculatura, e, depois, devem intravasalar para o sistema vascular ou linfático e se infiltrar em órgãos secundários, onde elas precisam continuar a proliferar (Vanharanta e Massague, 2013; Kimbung e col., 2015). Dessa forma, a metástase se mostra um processo bastante complexo e ao mesmo tempo muito arriscado para as células tumorais. Estudos pré-clínicos mostram que menos de 0,02% das células que se despreendem do tumor primário para metastizarem- geralmente as mais resistentes- podem sobreviver a todas essas barreiras e colonizar outros órgãos (Chambers e col., 2002; Kimbung e col., 2015).

Para dar início a esse processo, alterações genéticas e epigenéticas são necessárias. Nas primeiras etapas da metástase, como na invasão da matriz extracelular adjacente, é necessária a expressão de fatores de transcrição envolvidos no processo de transição epitélio-mesênquima (TEM), como o *TWIST*, *SNAIL1* e *SNAIL2* (Nguyen e Massague, 2007; Nguyen e col., 2009; Kimbung e col., 2015). A expressão desses fatores iniciadores de metástase em tumores primários está ligada a um prognóstico desfavorável para o paciente (Wan e col., 2013; Kimbung e col., 2015).

O câncer de mama tem um alto potencial metastático, porque, anatomicamente, as estruturas mamárias estão próximas ao sistema linfático, e ao esterno (Figura 3), o que aumenta a chance de metástase para o pulmão e para os ossos, respectivamente. Mulheres abaixo de 50 anos apresentam maior propensão a ter metástase pulmonar (Figura 3) e, eventualmente, também pode ocorrer metástase no cérebro e fígado (Figuras 3 e 4) (Mc Guire e col., 2015).



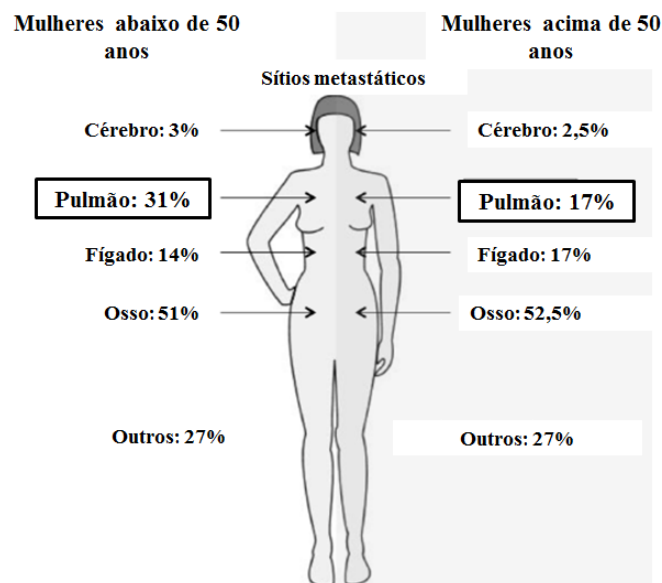
Figura 3 – Anatomia aplicada da mama



Legenda: A imagem destaca os principais sítios de metástase de tumores de mama: 1- Metástase hepática; 2- Metástase pulmonar; 3- Gânglios linfáticos; 4- Linfonodos; 5- Tumor; 6- Pulmão; 7- Fígado; 8- Osso esterno

Fonte: Adaptado de [www.oncogineco.com.br/og/visualizarMaterial.php?idMaterial=32](http://www.oncogineco.com.br/og/visualizarMaterial.php?idMaterial=32) [Internet]. Rio de Janeiro; 2018 [acesso em 2018 fevereiro 08].

Figura 4 - Sítios de metástase do câncer de mama por idade



Fonte: McGuire e col., 2015, f. 916.

Estudos mostram que os subtipos celulares presentes na massa do tumor de mama podem servir como biomarcadores, determinando, assim, os principais órgãos-alvos de metástase. Dessa forma, o conhecimento do subtipo celular que forma o tumor de um determinado paciente é uma importante ferramenta para direcionar o tratamento contra o câncer de mama (Kimbung e col., 2015). Por exemplo, estudos mostraram que pacientes que possuíam células basais, ou positivas para HER2, em maior quantidade na massa tumoral de mama apresentavam um aumento do risco de desenvolver metástases cerebrais (Tham e col., 2006; Nam e col., 2008; Kimbung e col., 2015). Além disso, os subtipos dos tumores de mama também influenciam no tempo de estabelecimento de metástases (Leone e Leone, 2015). Um estudo mostrou que células basais e HER2 positivas levam um menor tempo para gerar metástase cerebral, quando comparadas às células que apresentam receptor de estrogênio (Sperduto e col., 2013).

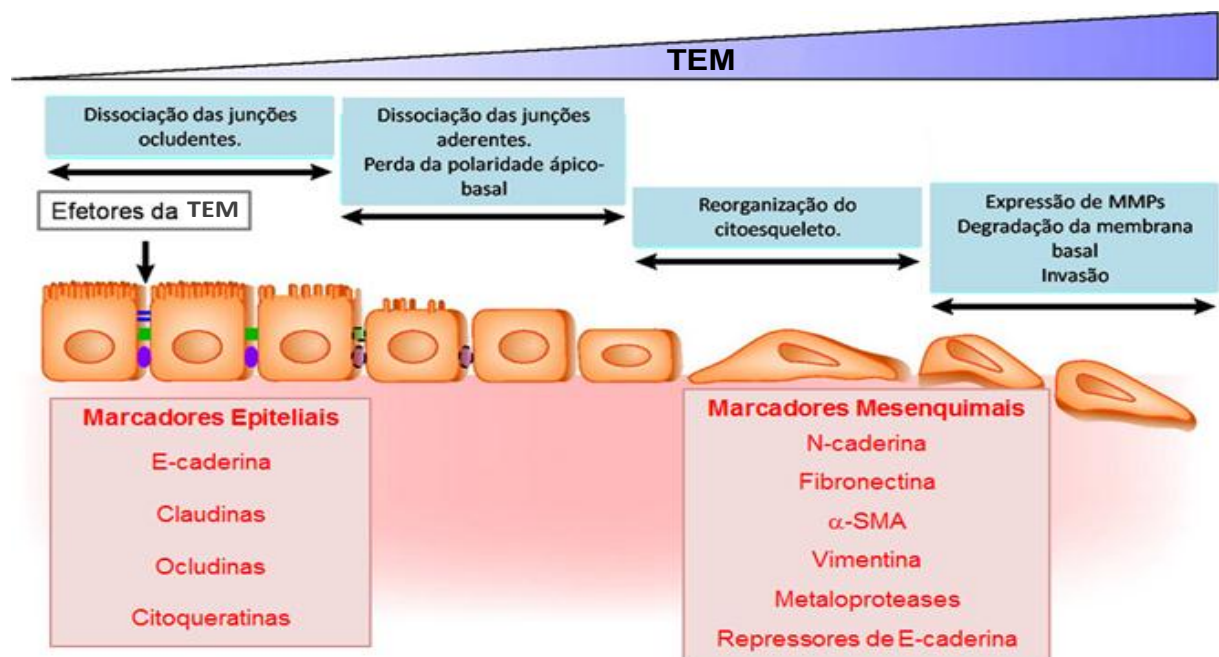
Outra explicação para a metástase tumoral de mama é a hipótese “Semente e Solo”, do inglês “Seed and Soil”, proposta por Paget em 1889, no qual células de câncer (sementes) podem formar metástases assim que elas acharem um microambiente (solo) propício para a sua sobrevivência e proliferação. Apesar da hipótese de “solo” e “semente” ainda não esclarecer o que determina a “semente” ter afinidade por um “solo” particular, a biologia da célula tumoral de mama pode exemplificar essa teoria, uma vez que o tecido ósseo, que é um dos sítios secundários de células tumorais de mama que apresentam receptor de estrogênio, apresenta níveis basais de estrogênio, que é necessário para a homeostase e remodelamento ósseo. A presença de estrogênio no tecido ósseo, então, facilitaria a proliferação das células tumorais de mama que apresentam receptor de estrogênio (Kimbung e col., 2015).

Apesar de existir na literatura diversos estudos que tentam entender os diferentes comportamentos das células tumorais de mama, as terapias disponíveis hoje ainda não são eficazes para exterminar essas células, as quais acabam, na maioria das vezes, se tornando resistentes ao tratamento. Nesse contexto, é preciso entender melhor os mecanismos que levam à resistência das células tumorais de mama, aumentando as chances de metástase. Os mecanismos que conferem resistência à célula tumoral incluem: alteração em sistemas de transporte da droga para as células, ativação de vias anti-apoptóticas e de sobrevivência, presença de células iniciadoras de câncer e transição epitélio-mesênquima (Chuthapisith e col., 2010; Wang e col., 2015).

### 1.3 Transição epitélio-mesênquima

A mudança progressiva de um fenótipo epitelial para um fenótipo mesenquimal foi denominada, primeiramente, como transformação epitelial-mesenquimal por Elizabeth Hay, em 1995. Posteriormente, o termo “transformação” foi trocado por “transição”, com o intuito de ressaltar que esse processo é reversível (Kalluri e Neilson, 2003). A transição epitélio-mesênquima (TEM) ocorre durante processos biológicos e patológicos, como em diversos estágios do desenvolvimento embrionário, além de estar muito presente na cicatrização, fibrose e progressão tumoral (Savagner e col., 1994; Kalluri e Weinberg, 2009; Chapman, 2011; Adhikary e col., 2014; Voutsadakis, 2015). Por esse motivo, em 2007, a TEM foi dividida em três tipos: tipo 1- contempla a TEM que ocorre durante a implantação, embriogênese e desenvolvimento dos órgãos; tipo 2- TEM relacionada à regeneração tecidual e fibrose; tipo 3- TEM associada à progressão tumoral e metástase (Kalluri e Weinberg, 2009; Adhikary e col., 2014). Em vários estudos, as moléculas envolvidas em cada etapa dessa transição são usadas como marcadores, provando a passagem de uma célula de um perfil epitelial para um perfil mesenquimal (Figura 5) (Aroeira e col., 2007; Kalluri e Weinberg, 2009).

Figura 5 – Principais eventos durante a transição epitélio-mesênquima (TEM)



Legenda: O diagrama mostra quatro etapas que são essenciais para a transição epitélio-mesênquima (desde a célula mais epitelial à esquerda até a célula mais mesenquimal à direita) e os marcadores mais utilizados para a determinação do estado da célula.

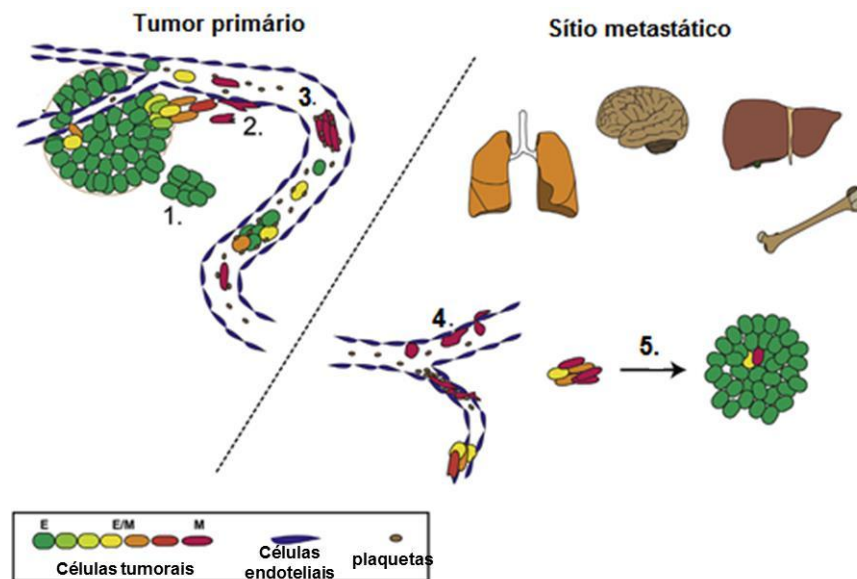
Fonte: Adaptado de Aroeira e col., 2007.

Basicamente, a TEM é um processo, no qual uma célula epitelial, que interage com outras células e com uma membrana basal, sofre várias mudanças bioquímicas, genéticas e epigenéticas, permitindo que essa célula assuma um fenótipo mesenquimal. Essa transição faz com que a célula com fenótipo epitelial passe a expressar outras moléculas, estabeleça outras ligações célula-célula e célula matriz, uma vez que há uma troca das junções intercelulares, e mude sua morfologia - as células ficam mais alongadas e flexíveis. Todas essas características conferem às células mesenquimais um aumento na migração, invasão, resistência a apoptose, secreção de fatores pró-angiogênicos, além de um importante aumento na produção de componentes de matriz extracelular. Esse processo ocorre em eventos iniciais da metástase tumoral (Kalluri e Neilson, 2003; Thiery e Sleeman, 2006; Kalluri e Weinberg, 2009; Fantozzi e col., 2014; Bill e Christofori, 2015).

Apesar das células tumorais sofrerem a TEM para migrarem e colonizar sítios secundários, as células presentes nesses nichos secundários apresentam, em sua maioria, marcadores epiteliais. Em 2002, Their propôs uma explicação para essa observação, descrevendo uma transição reversível, chamada transição mesênquima-epitélio, que acontece quando as células tumorais com características mesenquimais chegam ao órgão alvo e retomam as características epiteliais e estáticas, formando uma nova massa tumoral (metástase) (Pasquier e col., 2015).

O mais importante marcador da TEM é a perda de expressão de E-caderina, que é uma molécula de adesão chave para formar as junções célula-célula e célula-matriz, mantendo a estrutura do epitélio. Durante o desenvolvimento tumoral a perda dessa molécula é observada, o que contribui para a migração e invasão tumoral (Kalluri e Neilson, 2003; Thiery e Sleeman, 2006; Kalluri e Weinberg, 2009; Bill e Christofori, 2015). Esse evento é conhecido como “*switch*” (troca) de caderinas, porque com a diminuição de E-caderina ocorre o aumento progressivo da expressão de N-caderina. Essa mudança garante ligações mais frouxas com outras células, com a membrana basal e com a parede do endotélio, garantindo o sucesso na migração celular (Gumbiner, 2005; Bill e Christofori, 2015). Porém, existem casos, como no câncer de mama, em que não perder completamente a expressão de E-caderina também auxilia na migração. Para as células tumorais de mama, manter uma expressão mínima de E-caderina é vantajoso, porque essas células realizam o tipo de migração coletiva. Dessa forma, conservar parte do contato célula-célula, via E-caderina, auxilia no processo de migração pela corrente sanguínea (Figura 6) (Micalizzi e col., 2010; Voutsadakis, 2015).

Figura 6 – O envolvimento da transição epitélio-mesênquima (TEM) e transição mesênquima-epitélio (TME) na metástase de tumores de mama



Legenda: Células tumorais de mama com fenótipo epitélio migram coletivamente (1), ao passo que as células com características mesenquimais, que sofreram TEM, migram sem se associar a outras células (2). Ambas migram em direção aos vasos sanguíneos. Células tumorais circulantes apresentam marcadores epitélio (E), expressam marcadores epitélio e mesênquimais (E/M) ou expressam marcadores mesenquimais (M). Essas células são frequentemente cobertas por plaquetas, facilitando a sua migração (3). Extravasamento para o sítio secundário (4). As células tumorais de mama sofrem TME (5), formando macrometástases, principalmente no pulmão, ossos, cérebro e fígado.

Fonte: Bill e Christofori, 2015.

A expressão de E-caderina na superfície celular é regulada por genes, como *Slug* – também conhecido como *SNAIL2* – além de *TWIST*, *SNAIL1*, *ZEB1* e miR-200s, que atuam no promotor do gene *CDH1*, que codifica E-caderina, reprimindo a expressão da mesma, levando à TEM. Estudos *in vivo* mostraram que, no câncer de mama, a expressão de *Slug* tem sido associada com a perda de E-caderina (Hajra e col., 2002; Adhikary e col., 2014; Jin e Mu, 2015).

Outros importantes marcadores positivos da TEM são:  $\alpha$ -SMA, Fibronectina (contribui para o crescimento e migração celular), além das metaloproteases (MMP), que são produzidas pelas células mesenquimais, que garantem a migração e invasão das mesmas através da matriz extracelular dos tecidos e da parede do endotélio. No caso do câncer de mama, as mais comumente expressas são MMP-2 e MMP-9 (Kalluri e Weinberg, 2009; Jin e Mu, 2015).

As moléculas repressoras da expressão de E-caderina, que também contribuem com o aumento de expressão de N-caderina e de marcadores mesênquimais, são reguladas por estímulos externos, principalmente o TGF- $\beta$ , além de IL-8, TNF- $\alpha$ , EGF, a ativação da via da

WNT/ $\beta$ -catenina e a hipóxia (Palena e col., 2012; Al Moustafa e col., 2012; Gort e col., 2008; Jin e Mu, 2015).

### 1.3.1 TGF-beta e transição epitélio-mesênquima

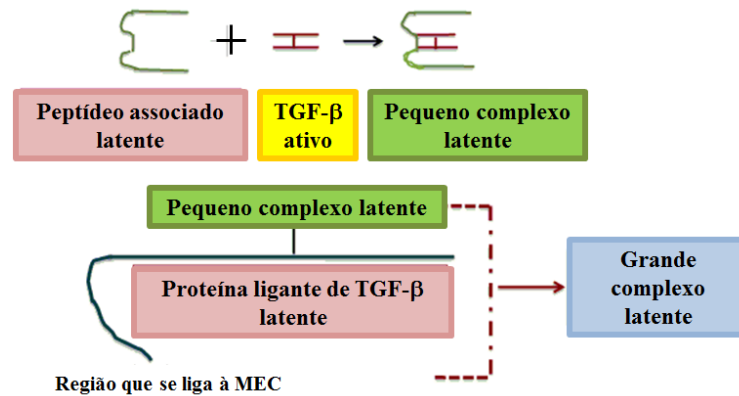
O microambiente tumoral é extremamente complexo, constituído, além das células tumorais, pela presença de uma grande população de células heterogêneas, como fibroblastos, pericitos, células musculares lisas, células imunes e células endoteliais (Zhang e Liu, 2013), além de componentes da matriz extracelular tumoral, mediadores solúveis como fatores de crescimento (como bFGF, VEGF, EGF, TGF- $\beta$ ), citocinas, quimiocinas, e concentrações variáveis de oxigênio (Allen e Louise, 2011). A presença de tais fatores modificam a homeostase tecidual e o comportamento celular.

Dados da literatura mostraram que diversos componentes do estroma de tumores primários são importantes para promover a transição epitélio-mesênquima, aumentando seu potencial migratório e invasivo. Fibroblastos e macrófagos secretam fatores que mantem características de células-tronco nas células de câncer de mama (Joyce e Pollard, 2009; Hanahan e Coussens, 2012). Diversos trabalhos mostraram que os fibroblastos associados ao câncer contribuem para o crescimento e disseminação tumoral, através da liberação de alguns fatores de crescimento, como o TGF- $\beta$ , e na liberação de outros mediadores, como o fator derivado do estroma  $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ) e a proteína quimioatraente de monócito 1 (MCP-1), capazes de recrutar células endoteliais e células imunes para a massa tumoral e promover angiogênese (Allen e Louise, 2011; Zhang e Liu, 2013). Da mesma forma, macrófagos associados ao tumor produzem fatores que promovem a tumorigênese, como VEGF e EGF, secreção de citocinas, como o TGF- $\beta$  e enzimas que promovem a invasão, angiogênese e metástase (Allen e Louise, 2011; Spano e Zollo, 2012).

O TGF- $\beta$  é produzido pelas células tumorais e pelas células presentes no microambiente tumoral (Bill e Christofori, 2015), sendo o mediador mais comumente utilizado para induzir a TEM experimentalmente. O TGF- $\beta$  é sintetizado pelas células como uma pré-pró-proteína, que sofre degradação proteolítica, formando o pró-TGF- $\beta$ , que também é clivado, formando o pequeno TGF- $\beta$  latente, que é um complexo formado por LAP e pelo peptídeo ativo, ligados não-covalentemente (Gentry e Nash, 1990; Ten Dijke e Arthur, 2007).

A esse pequeno complexo latente, é associada uma proteína ligante do TGF- $\beta$  latente, que tem um sítio de ligação às proteínas de matriz extracelular (Figura 7).

Figura 7 - Complexo do TGF- $\beta$  latente



Legenda: TGF- $\beta$  se associa com um peptídeo associado latente e forma o pequeno complexo latente. A proteína ligante de TGF- $\beta$  latente, se liga ao pequeno complexo latente, formando o grande complexo latente. Essa proteína apresenta uma região ligante de proteínas de matriz extracelular, permitindo o transporte de TGF- $\beta$  latente para a MEC.

Fonte: Adaptado de <http://www.omicsonline.org/articles-images/2155-6156-S9-008-g001.html>. [Internet]. Rio de Janeiro; 2018 [acesso em 2018 fevereiro 08].

O TGF- $\beta$  faz parte de uma família de citocinas que regula a proliferação celular, diferenciação, apoptose e produção de matriz extracelular. Em mamíferos, essa citocina apresenta três isoformas: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 (Feng e Derynck ,2005). A maioria dos sistemas onde a TEM é observada, incluindo câncer e fibrose, é regulada por TGF- $\beta$ 1. Por sua vez, as outras isoformas de TGF- $\beta$  são vistas participar mais comumente durante o desenvolvimento, com o TGF- $\beta$ 2 controlando a transição endotelial-mesenquimal durante o desenvolvimento do coração e TGF- $\beta$ 3 mediando a TEM no desenvolvimento do palato (Feng e Derynck ,2005; Akhurst, 2017).

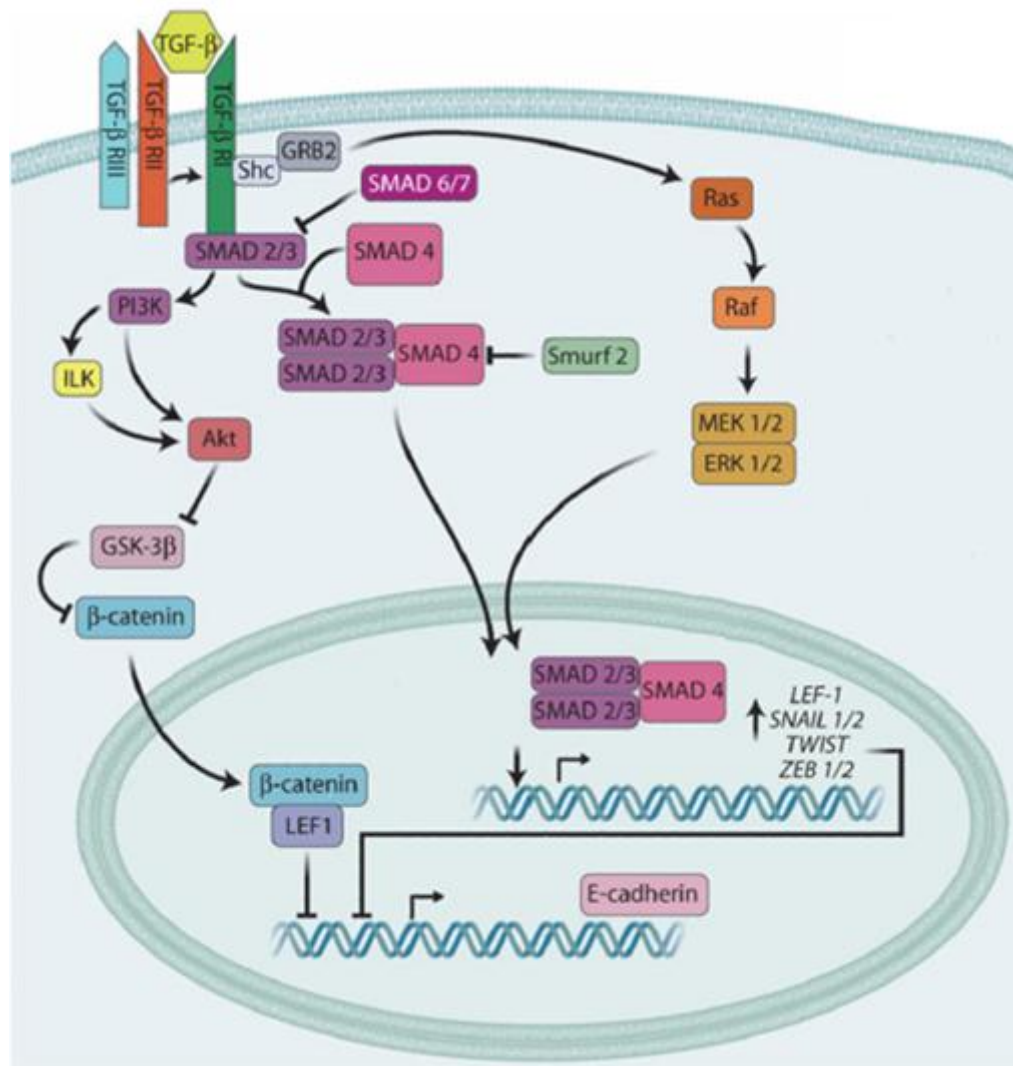
O papel do TGF- $\beta$ 1 na progressão tumoral é ambivalente. Em estágios iniciais da carcinogênese, ele atua como supressor de tumor, inibindo a proliferação através do bloqueio do ciclo celular. Já em estágios avançados, ele atua como promotor da metástase, induzindo a TEM, resultando no aumento da motilidade e da capacidade de invasão celular (Singh e col., 2010; Chan e col., 2015). Dessa forma, a expressão de TGF- $\beta$ 1 durante a metástase tumoral é transiente, ou seja: assim que a metástase é estabelecida em um sítio secundário, a atividade de TGF- $\beta$ 1 retorna a níveis basais, evitando qualquer inibição no crescimento celular (Giampieri e col., 2009; Chan e col., 2015).

A sinalização mediada pelo TGF- $\beta$  envolve três receptores transmembrana, TGF- $\beta$ RI, TGF- $\beta$ RII e TGF- $\beta$ RIII (Gonzalez e Medici, 2014). A ligação de TGF- $\beta$ 1 ao seu receptor ativa a via das SMADs, ou vias não canônicas independentes de SMADs, regulando a TEM (Gonzalez e Medici, 2014; Bill e Christofori, 2015). Na via canônica, O TGF- $\beta$ 1 se liga primeiro ao TGF $\beta$ -RIII para poder ser apresentado ao TGF- $\beta$ RII, que é fosforilado em resíduos de serina/treonina, ativando também TGF- $\beta$ RI, formando um heterodímero que possui atividade quinase. Em seguida, há o recrutamento e a ativação dos fatores de transcrição R-SMAD (SMAD 3 e 2), que se associam à SMAD4, através do domínio MH2 (Domínio homólogo de MAD 2-encontrado em proteínas SMAD). SMAD4 também possui um domínio MH1 (Domínio homólogo de MAD 1), que tem afinidade por DNA. Esse complexo, então, é translocado para o núcleo, induzindo a expressão de *SNAIL1*. Ao ser produzido, *SNAIL1* se associa ao complexo de SMADs e se liga ao promotor do gene *CDH1*, suprimindo a expressão de E-caderina. O complexo de SMADs também aumenta a expressão de *ZEB 1* e *2*, *SLUG* e *TWIST*, que também atuam como repressores de E-caderina e aumentam marcadores mesênquimais (Figura 8) (Massagué, 2012; Gonzalez e Medici, 2014).

A via de sinalização do TGF- $\beta$ 1 possui dois pontos de regulação: através da fosforilação de SMAD 6 e 7, o que impede a associação de SMAD 2 e 3, e através do fator regulador de ubiquitina SMAD (Smurf), que encaminha o complexo de SMADs para o proteossoma (Figura 8) (Massagué, 2012; Chan e col., 2015; Gonzalez e Medici, 2014).



Figura 8 - Vias de sinalização ativadas por TGF- $\beta$



Legenda: A TEM é iniciada por fatores de transcrição que se ligam e inibem a expressão de genes que codificam moléculas ligadas às junções aderentes e junções *tight*, como a E-caderina, ZO-1, claudinas e ocludinas. Esses fatores de transcrição incluem *SNAIL* 1 e 2, *ZEB* 1 e 2, *TWIST* e *LEF-1*. A expressão de cada fator é induzida por várias sinalizações intracelulares. Várias moléculas regulatórias podem inibir a função desses fatores de transcrição.

Fonte: Gonzalez e Medici, 2014.

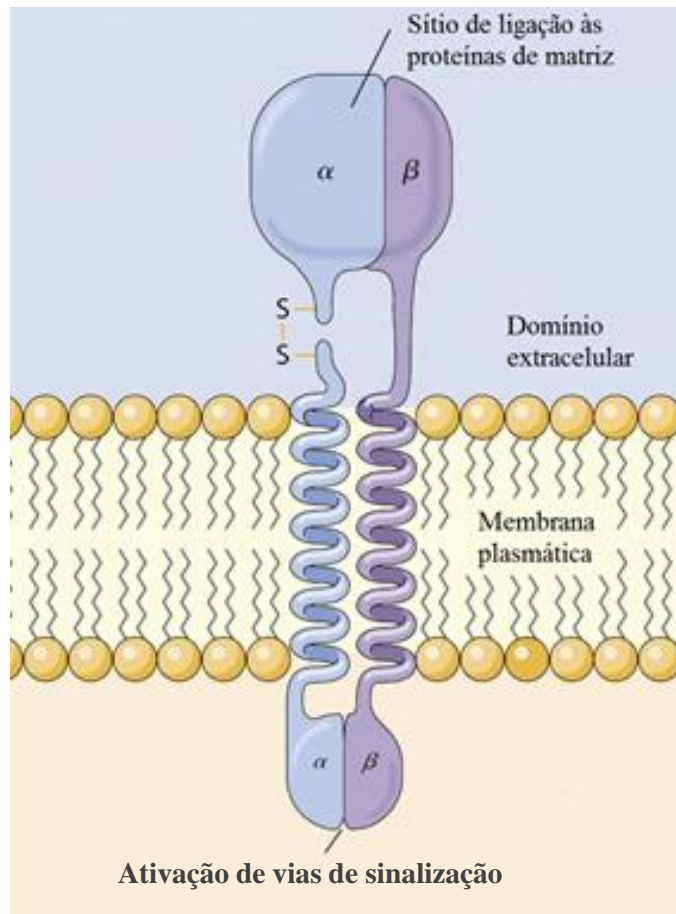
A sinalização do receptor do TGF- $\beta$ 1 também envolve algumas vias independentes de SMADs. Alguns trabalhos mostram que TGF- $\beta$ RI e integrinas podem ativar diretamente ILK, levando à TEM (McDonald e col., 2008; Gonzalez e Medici, 2014). O receptor de TGF- $\beta$ 1 também pode ativar a via MAPK/ERK e PI3K/AKT (Bakin e col., 2000; Yu e col., 2002; Gonzalez e Medici, 2014), que também estão envolvidas na ativação da TEM, através de um *crosstalk* de integrinas com a via clássica das SMADs (Chan e col., 2015; Gonzalez e Medici, 2014).

Dessa forma, é indiscutível a importância da sinalização de TGF- $\beta$ 1 na progressão tumoral, e por esse motivo, essa citocina tem sido alvo de vários estudos que visam a descoberta de terapias anti-metastáticas. Várias ferramentas nesse sentido estão sendo testadas em estudos clínicos ou pré-clínicos, como por exemplo, bloqueadores da ativação de TGF- $\beta$ 1, anticorpos neutralizantes da interação TGF- $\beta$ 1 com seu receptor, oligonucleotídeos antisense e inibidores da atividade cinásica do receptor de TGF- $\beta$ 1 (Akhurst, 2017). Porém, sabendo que essa citocina apresenta funções extremamente complexas, agindo tanto como supressor tumoral quanto como indutor da metástase, dependendo do contexto celular, a inibição dessa molécula deve ser planejada com muita cautela, considerando seus efeitos nas células normais, nas células tumorais e nas células presentes no microambiente. Por esse motivo, é de extrema importância estudos que visem outros alvos para o desenvolvimento de terapias anti-metastáticas (Papageorgis, 2015).

#### **1.4 Integrinas e sinalização intracelular ligadas à transição epitélio-mesênquima**

As integrinas são proteínas transmembrana heterodiméricas formadas por uma subunidade  $\alpha$  e uma subunidade  $\beta$ , associadas não covalentemente entre si (Figura 9). As subunidades  $\alpha$  possuem em seus domínios citoplasmáticos sequências de aminoácidos altamente conservadas que estão relacionadas a mecanismos de transdução de sinal (Hynes, 2002). Existem 18 tipos de subunidades  $\alpha$  e oito tipos de subunidade  $\beta$ , que podem se combinar e formar 24 heterodímeros já descritos (Baker e Hagg, 2007, Marelli e col., 2013). A associação de diferentes subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  pode formar receptores com distintas especificidades de ligação às proteínas da MEC e, conseqüentemente, com diversas atividades biológicas (Baker e Hagg, 2007). A relação entre algumas integrinas e seus respectivos ligantes na MEC está ilustrada na Tabela 2. Essa interação com a MEC é tão importante para a célula que a perda da adesão celular, mediada pela integrina, ocasiona um tipo específico de apoptose, conhecida como *anoiks* (Frisch e Francis e col., 1994; Marastoni e col., 2008).

Figura 9 - Representação esquemática da estrutura das integrinas



Legenda: As integrinas são constituídas por uma subunidade  $\alpha$  e uma subunidade  $\beta$ . Cada subunidade possui um grande domínio extracelular responsável por reconhecer proteínas de matriz, uma região transmembrana e um pequeno domínio citoplasmático que interage com moléculas acessórias, ativando diversas vias de sinalização.

Fonte: [www.myvisiontest.com/img/integrin.jpg](http://www.myvisiontest.com/img/integrin.jpg) [Internet]. Rio de Janeiro; 2018 [acesso em 2018 fevereiro 08].

Tabela 2 - Classificação de integrinas de acordo com a subunidade  $\beta$ 

INTEGRINA	LIGANTE
<b>Integrinas <math>\beta_1</math></b>	
$\alpha_1\beta_1$ (VLA-1)	Colágeno I, Colágeno IV, Laminina
$\alpha_2\beta_1$ (VLA-2)	Colágeno I, Laminina
$\alpha_3\beta_1$ (VLA-3)	Laminina, Entactina, Fibronectina
$\alpha_4\beta_1$ (VLA-4)	Fibronectina, VCAM-1
$\alpha_5\beta_1$ (VLA-5)	Fibronectina
$\alpha_6\beta_1$ (VLA-6)	Laminina
$\alpha_7\beta_1$ (VLA-7)	Laminina
$\alpha_8\beta_1$ (VLA-8)	Fibronectina
$\alpha_9\beta_1$ (VLA-9)	VCAM-1, Tenascina, Osteopontina
$\alpha_{10}\beta_1$	Colágeno
$\alpha_{11}\beta_1$	Colágeno
$\alpha_v\beta_1$	Fibronectina, Vitronectina
<b>Integrinas <math>\beta_2</math></b>	
$\alpha_D\beta_2$	VCAM-1, ICAMs
$\alpha_L\beta_2$ (LFA-1)	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
$\alpha_M\beta_2$ (Mac-1)	ICAM-1, Fator X, C3bi, Fibrinogênio
$\alpha_X\beta_2$ (gp150/95)	C3bi, Fibrinogênio
<b>Integrinas <math>\beta_3</math></b>	
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibrinogênio, Fibronectina, Fator de von Willebrand, Vitronectina
$\alpha_v\beta_3$	Entactina, Vitronectina
<b>Integrinas <math>\beta_4</math></b>	
$\alpha_6\beta_4$	Laminina
<b>Integrinas <math>\beta_5</math></b>	
$\alpha_v\beta_5$	Vitronectina
<b>Integrinas <math>\beta_6</math></b>	
$\alpha_v\beta_6$	Tenascina, Vitronectina
<b>Integrinas <math>\beta_7</math></b>	
$\alpha_4\beta_7$	Fibronectina, MadCAM, VCAM
$\alpha_E\beta_7$	E-caderina
<b>Integrinas <math>\beta_8</math></b>	
$\alpha_v\beta_8$	Colágeno, Fibronectina, Laminina

Fonte: Adaptada de [www.integrins.hipermat.net](http://www.integrins.hipermat.net) [Internet]. Rio de Janeiro; 2018 [acesso em 2018 fevereiro 08].

O termo integrina ressalta o papel destes receptores na integração do citoesqueleto celular com a MEC (Hynes, 2002). Estas interações levam à reorientação do citoesqueleto de actina, modificando o comportamento e morfologia celulares, sendo essencial em processos biológicos como adesão, migração, proliferação e sobrevivência celular (Giancotti e Ruoslatti, 1999; Bolós e col., 2010; Guan, 2010). Por exemplo, já foi visto que a ativação de  $\alpha\beta3$ , juntamente com o aumento da expressão de MMP9, auxilia a migração das células MDAMB-231 através de fibronectina e vitronectina (Rolli e col., 2003; Maity e col., 2011). Da mesma forma,  $\alpha9\beta1$  também contribui para a mudança para um perfil mesenquimal de células de câncer de pulmão, aumentando sua migração e metástase *in vivo* (Gupta e col., 2013).

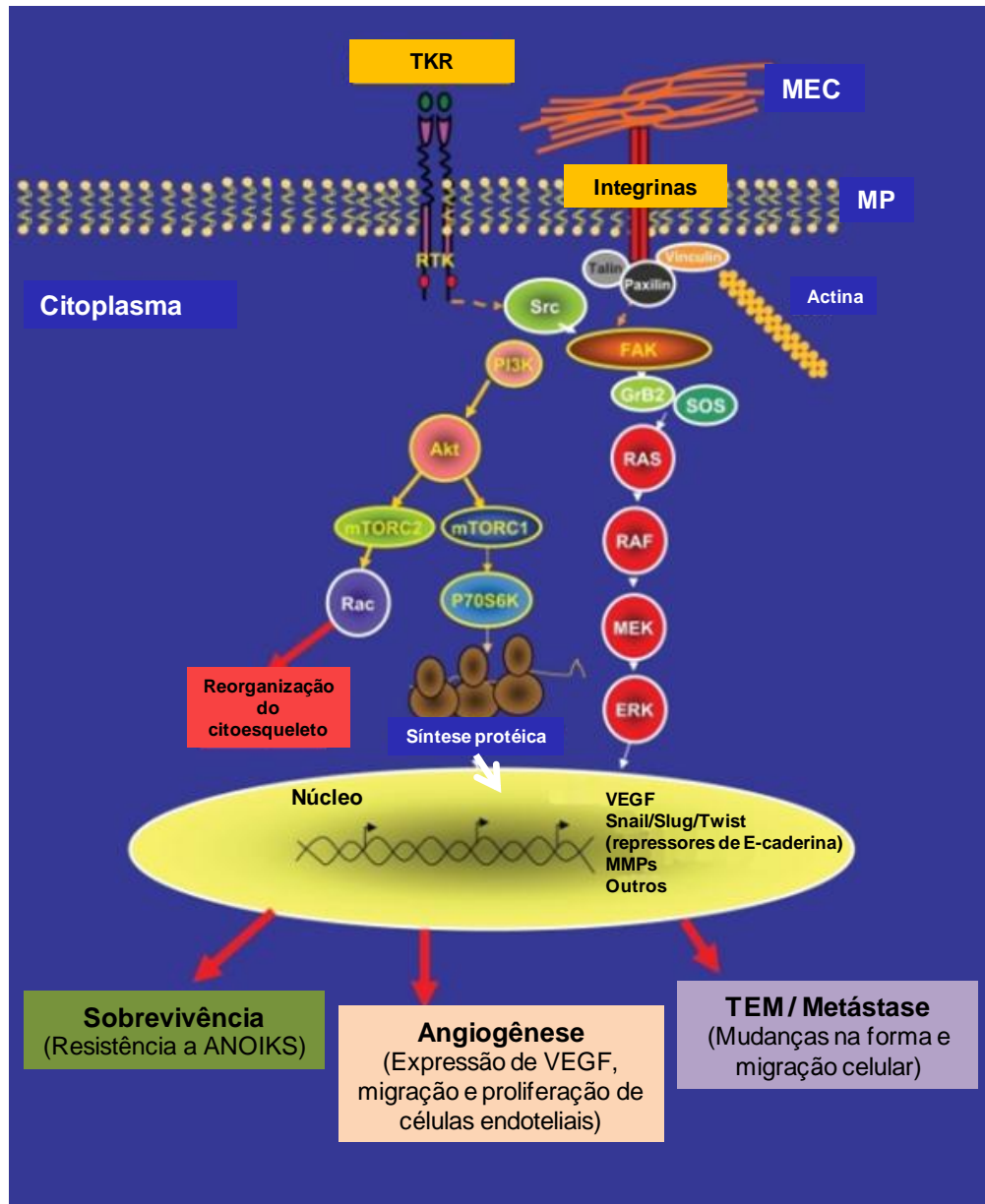
As proteínas de matriz extracelular, embora estruturalmente diferentes, podem apresentar sequências de reconhecimento semelhantes para se ligarem às integrinas. A mais comum é a sequência RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), também conhecida como sítio universal de reconhecimento. O tripeptídeo RGD está presente em alguns componentes da matriz como fibronectina, vitronectina, laminina e colágeno (Giancotti e Tarone, 2003; Marelli e col., 2013).

As integrinas estão presentes na superfície celular na conformação inativa, onde a sua região N-terminal do domínio extracelular encontra-se voltada para a membrana (Xiong e col., 2002). Ao serem ativadas, as integrinas mudam sua conformação de modo a permitir a interação com uma série de moléculas sinalizadoras (Liu e col., 2000; Guan, 2010). Como a sinalização das integrinas é propagada desde a porção extracelular da proteína até o domínio citoplasmático e vice-versa, as integrinas são conhecidas como canais de integração de informação entre o meio externo e interno (Liddington e Ginsberg, 2002; Yue e col., 2012). Por esse motivo, além de serem importantes componentes estruturais e de participarem da arquitetura tecidual, as integrinas desempenham um papel central na sinalização celular para diversos processos biológicos.

Quando as integrinas se ligam às proteínas da MEC, ocorre a ativação e o agrupamento de integrinas na base da membrana celular (*clustering* de integrinas), formando um complexo sinalizador que promove a reorganização dos filamentos de actina. Essa organização reforça a ligação com a MEC e forma os pontos de adesões focais (Hynes, 2002; Bolós e col., 2010). Posteriormente, há a ativação de FAK, que se autofosforila, e passa a servir de plataforma para o recrutamento de proteínas acessórias, como talina e paxilina, levando a mudanças na organização do citoesqueleto de actina, e a ativação de vias como a da

PI3K, da MAPK, da Src e de fosfatases e fatores de transcrição, podendo também afetar a transcrição gênica (Giancotti e Ruoslatti, 1999; Oliva e col., 2007; Guan, 2010; Bolós e col., 2010; Xiong e col., 2013) (Figura 10).

Figura 10 - Sinalização mediada por integrinas



Legenda: A ativação de integrinas induz o recrutamento de moléculas acessórias que fosforilam proteínas sinalizadoras envolvidas em importantes processos celulares (sinalização “de fora para dentro”). Fatores de crescimento podem levar à ativação de integrinas e aumentar a afinidade destas proteínas pelos componentes de matriz, induzindo vias de sinalização mencionadas anteriormente (sinalização “de dentro para fora”). Abreviaturas: TEM-transição epitélio-mesênquima; MEC- matriz extracelular; MP-membrana plasmática.

Fonte: Bolós e col., 2010, f. 85.

Quando ativada, a PI3K gera fosfoinositol trisfosfato na membrana plasmática, que se liga a AKT através do seu domínio de homologia da pleckstrina, resultando na translocação de AKT para a membrana. A AKT é ativada através de um mecanismo de fosforilação dupla, tanto através da PDK1, que também é trazida para a membrana e também se liga ao domínio PH da AKT (fosforilação no resíduo AKT<sup>Thr308</sup>), como através da fosforilação no resíduo AKT<sup>Ser473</sup> induzida pelo complexo mTOR-ricitor, ou mTORC2 (Hers e col., 2011). A ativação da AKT leva à fosforilação de um grande número de substratos “downstream”, envolvidos na modulação de diferentes funções celulares que vão desde a migração celular-atraves da ativação de pequenas GTPases, como a Rac, que modificam o citoesqueleto de actina, como também no controle do metabolismo celular e da apoptose (Cantley, 2002; Liu e col., 2009). Esta via está frequentemente alterada durante a progressão tumoral, contribuindo para o crescimento, invasão e metástase tumoral (Martini e col., 2013).

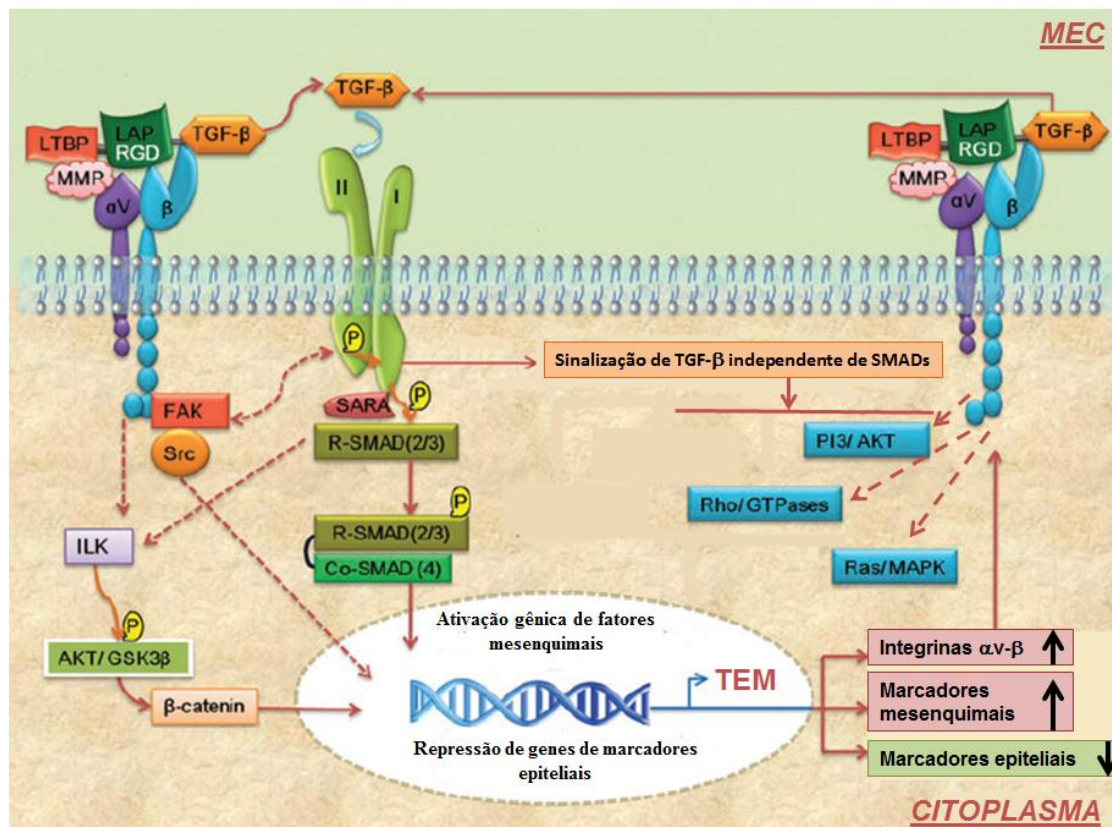
A via MAPK/ERK começa com a ativação de Ras (uma GTPase), que fosforila Raf, e em seguida fosforila MEK1/2, ativando MAPK (ERK), que atua como fator de transcrição, promovendo crescimento, proliferação e sobrevivência celular (Calvo e col., 2010). Além da ativação dessas vias, a autofosforilação de FAK no resíduo de tirosina 397 (Tyr<sup>397</sup>) induz a ativação de outras vias de sinalização intracelulares envolvidas em importantes processos biológicos como sobrevivência, adesão, migração, divisão celular e expressão gênica (Giancotti e Ruoslatti, 1999; Hunttenlocher e Horwitz, 2011). A FAK tem sua expressão frequentemente aumentada em vários tipos de câncer, iniciando diversas respostas nas células tumorais, como aumento de proliferação, por degradar a proteína supressora de tumor (p53), além de regular as junções aderentes, principalmente E-caderina, contribuindo para o aumento da migração tumoral (Lim e col., 2008; Bolós e col., 2010; Canel e col., 2013). Além disso, a ativação de FAK pode gerar um sítio de alta afinidade para a ligação de membros da família Src de tirosinas quinases. A formação do complexo FAK-Src pode levar à fosforilação de outros resíduos de tirosina da FAK, como Tyr<sup>576</sup> e Tyr<sup>577</sup>, potencializando a sua ativação (Hynes, 2002; Brunton e col., 2005; Bolós e col., 2010) e gerando novos sítios de ligação para outras moléculas de sinalização, podendo, dessa forma, amplificar a sinalização intracelular. Estudos mostram que a associação de FAK com Src promove a migração, regulando a expressão de E-caderina e a TEM, em processos tumorais (Avizienyte e Frame, 2005; Serrels e col., 2011).

Alguns trabalhos têm mostrado que a TEM além de ser controlada pela sinalização do TGF- $\beta$  e pela ativação das vias como Wnt e Notch, poderia também ser controlada por vias de

sinalização associadas a integrinas (Huber e col., 2005; Yang e Weinberg, 2008; Thiery e col., 2009). A importância da interação entre integrinas e proteínas de MEC, específicas para desencadear o processo de TEM, foi mostrada por Katoh e colaboradores, 2013. Esse grupo mostrou a importância da ligação das integrinas  $\alpha\beta6$  e  $\alpha\beta1$  à tenascina-C para induzir a TEM em células de carcinoma de mama, como MCF-7 e T-47D. Trabalhos do mesmo grupo mostraram também que a adesão à tenascina-C ativa a via FAK-Src em células MCF-7, induzindo a TEM (Nagaharu e col., 2011).

Apesar da ativação da via das SMADs pelo TGF- $\beta$  ser a mais descrita na literatura, o TGF- $\beta$  também modula respostas celulares através da ativação de MAPK, ERK, p38 e PI3K. Alguns estudos mostram que a habilidade de TGF- $\beta$  promover a tumorigênese e TEM se dá através da integração de sinais provenientes da ativação de SMAD 2/3 e de integrinas, através das vias MAPK, ERK, p38 e PI3K (Figura 11) (Bakin e col., 2000; Xie e col., 2004; Mamuya e Duncan , 2012).

Figura 11 – *Crosstalk* de integrinas e receptor de TGF- $\beta$



Legenda: Integrinas  $\alpha v$  reconhecem o domínio RGD presente no TGF- $\beta$  latente. Essa ligação aproxima o TGF- $\beta$  latente às MMPs, que levam à liberação e ativação de TGF- $\beta$ . Após isso, o TGF- $\beta$  livre se liga ao seu



receptor II, iniciando a sinalização dependente de SMADs, que culmina no aumento da expressão de integrinas  $\alpha v$  e de marcadores mesenquimais. Essa nova integrina formada pode liberar mais TGF- $\beta$ , reforçando a sinalização dessa citocina ao seu receptor, que pode também ativar vias independentes de SMADs, que são comuns às vias da ativação de integrinas. Abreviaturas: TEM-transição epitélio-mesênquima; MEC- matriz extracelular.

Fonte: Adaptado de Mamuya e Duncan, 2012, f. 451.

Já é descrito na literatura que a ativação de integrinas pode modular a atividade de receptores associados à tirosina quinase (*tyrosine kinase receptor*, TKR), como o VEGFR ou GPCRs (Koch e col., 2011; Brandão-Costa e col., 2016). Estudo recente do nosso grupo mostrou que a angiogênese de células endoteliais tratadas com VEGFA e em contato com a MEC derivada de células de melanoma humano é reduzida na presença de ligantes de  $\alpha v\beta 3$  (a desintegrina Kistrina), evidenciando uma transativação entre integrinas  $\alpha v\beta 3$  com VEGFR2 nas células endoteliais (Brandão-Costa e col., 2016). Da mesma forma, outros estudos mostraram que a TEM estimulada por TGF- $\beta$  é diminuída na presença de tratamentos que inibem a adesão célula-MEC, mostrando a importância da sinalização de integrinas mediando a sinalização de TGF- $\beta$  (Bhowmick e col., 2001; Thannickal e col., 2003; Galliher e Schiemann, 2006). Por exemplo, Galliher e Schiemann, em 2006, mostraram que a integrina  $\alpha v\beta 3$ , através da ativação da via da Src, facilitava a fosforilação de TGF- $\beta$ RII, ativando ERK e levando à TEM. Posteriormente foi mostrado que também a ativação de FAK é importante para mediar esse crosstalk (Wendt e Schiemann, 2009).

Além disso, a ativação de integrinas pode levar diretamente à ativação da quinase ligada à integrina (ILK), que ativa AKT ou GSK-3 $\beta$ , levando à fosforilação de  $\beta$ -catenina e a sua posterior internalização, atuando dentro do núcleo como um fator de transcrição repressor da expressão de E-caderina (Figura 11) (McDonald e col., 2008; Gil e col., 2011; Mamuya e Duncan, 2012; Gonzalez e Medici, 2014).

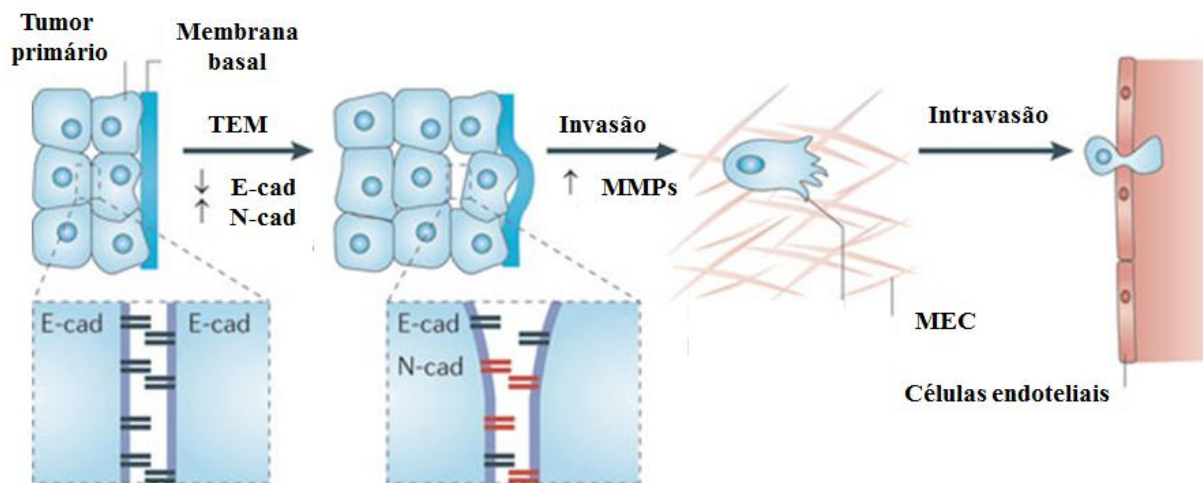
As transformações malignas e o desenvolvimento do processo metastático estão intimamente ligados às alterações na expressão de integrinas e de TGF- $\beta$ , assim como à sinalização intracelular mediada por essas proteínas (Kuphal e col., 2005; Galliher e Schiemann, 2006). Sabendo-se que as integrinas desempenham um papel importante não só na resposta imune-inflamatória, como também na embriogênese, angiogênese e no desenvolvimento de metástases (Yonekawa e Harlan, 2005), estes receptores de adesão são considerados alvos potenciais no desenvolvimento de terapias anti-cancer.

### 1.5 Matriz extracelular e transição epitélio-mesênquima

A membrana basal é uma camada de 50 a 200 nm de espessura, constituída de um conjunto de proteínas, glicoproteínas, polissacarídeos e proteoglicanas, que se organizam em redes (Alberts, 2010). As membranas basais fornecem suporte mecânico às células aderidas; servem como substrato para a migração e desenvolvimento celular; separam tecidos adjacentes no interior de um órgão e atuam como uma barreira à passagem de macromoléculas (Lu e col., 2012). A MEC está presente além da vizinhança imediata da membrana plasmática, circundando diversas células e alinhando-se abaixo do revestimento epitelial interno de vasos sanguíneos (Alberts, 2010). Dessa forma, a MEC está presente em etapas iniciais da metástase tumoral, como na adesão das células tumorais à MEC e na migração através da MEC dos tecidos até chegar ao endotélio (Figura 12) (Pal e col., 2014).

As interações entre a célula e a MEC auxiliam a percepção da localização tridimensional, orientação e polaridade celular, contribuindo para a homeostase tecidual, funcionamento dos órgãos e migração celular (Cox e Erler, 2011; Pickup e col., 2014).

Figura 12 – Ivasão e Intravasão



Legenda: A transição epitélio-mesênquima é associada com a perda da adesão através da diminuição da expressão de E-caderina (E-cad) e mudança morfológica. A invasão do tecido adjacente pelas células tumorais é ditada pelas características físico-químicas da MEC. As células tumorais, então passam pela barreira endotelial e chegam aos vasos. Todos esses processos dependem da adesão e interação das células tumorais com o microambiente. Abreviaturas: TEM-transição epitélio-mesênquima; MEC-matriz extracelular.

Fonte: Adaptado de Wirtz e col., 2011.

Por muito tempo a MEC foi vista apenas como uma estrutura inerte, importante para manter a morfologia tecidual. Atualmente, sabe-se que a MEC também tem um papel regulatório chave na determinação da forma e das atividades da célula (Marastoni e col., 2008; Soucy e Romer, 2009; Alves e col., 2011). Seus componentes podem modular, por exemplo, o crescimento, diferenciação, proliferação, migração e a TEM das células tumorais e de células do microambiente (Davis e Senger, 2005; Cichon e Radisky, 2015; Brandão-Costa e col., 2016). As células tumorais respondem às mudanças da MEC, modificando sua adesão, mudando sua forma e a organização do citoesqueleto de actina (Ingber, 2008). Dependendo da origem do tecido e do contexto, como em processos inflamatórios e durante o crescimento tumoral, a arquitetura tridimensional da matriz pode sofrer um remodelamento estrutural e bioquímico. Durante a progressão tumoral há uma forte deposição e proteólise de matriz extracelular, modificando as propriedades biomecânicas da MEC (Peranzoni e col., 2013; Van Dijk e col., 2013). As células tumorais são capazes de secretar metaloproteases (MMP), que clivam a matriz, facilitando a migração celular, e também remodelam a MEC tumoral, tornando-a rica em proteínas que facilitam o seu desenvolvimento (Li e col., 2012). Como por exemplo, células de carcinoma de mama humano (MCF-7) aumentam a expressão de MMP9 quando cultivadas sobre laminina, facilitando a migração celular (Pal e col., 2014). A degradação da MEC também libera citocinas, como o TGF- $\beta$ , metaloproteases e fatores de crescimento, que são encontrados imobilizados e aprisionados na MEC, auxiliando na migração e invasão (Davis e Senger, 2005). Dessa forma, a MEC pode regular a presença de diversas moléculas no microambiente, através do aprisionamento e secreção dessas moléculas (Cichon e Radisky, 2015). Por esse motivo, diferentes vias de sinalização induzidas por proteínas de MEC podem ser ativadas quando o tecido normal se torna neoplásico (Oskarsson e col., 2011; Pal e col., 2014).

Chen e colaboradores (2012) mostraram que as células MCF-7 cultivadas sobre uma matriz tridimensional de colágeno adquirem um perfil mesênquimal, mudando sua morfologia e aumentando a expressão de marcadores mesenquimais.

Crescentes evidências mostram que a interação entre células tumorais, através de integrinas, com diferentes proteínas de matriz influencia a mudança para um estado metastático, fazendo com que a MEC tenha um papel ativo na metástase (Marastoni e col., 2008; Barkan e col., 2010). Por exemplo, Katoh e colaboradores, 2013, mostraram que células de carcinoma de mama MCF-7 e T47D mudaram para um perfil mesenquimal na presença de tenascina-C (TNC) através das integrinas  $\alpha v \beta 1$  e  $\alpha v \beta 6$ .

Diversos estudos têm apontado a MEC como um componente chave do microambiente tumoral por estar em contato direto com células tumorais e células do estroma tumoral (Hynes e col., 2002; Soucy e Romer, 2009; Barkan e col., 2010; Pickup e col., 2014), transformando os eventos do microambiente em sinais que regulam o comportamento celular nos sítios de adesão célula-matriz, mediados por integrinas (Hynes e col., 2002; Soucy e Romer, 2009; Pickup e col., 2014).

A diversidade de componentes da matriz extracelular e de mecanismos que controlam a síntese e degradação da MEC mostra a complexidade de mecanismos pelos quais a matriz pode controlar diversos eventos, através da ligação com integrinas (Davis e Senger, 2005, Gonzalez e Médici, 2014). A composição da MEC tumoral muda de acordo com o crescimento do tumor de mama e durante a carcinogênese. Já foi observado que a interação de células MCF-7 e MDAMB-231 com as proteínas colágeno tipo IV, fibronectina e laminina-1 altera a motilidade dessas células (Sisci e col., 2004; Neubauer e col., 2009; Pal e col., 2014). A laminina-1 também foi descrita por preservar as ligações célula-célula via E-caderina, nas células MCF-7, MCF-10 e MDAMB-231 (Benton e col., 2009). Além disso, estudos utilizando células epiteliais mamárias de camundongo mostram que a laminina-111 modificou a morfologia para um perfil mesenquimal (Streuli e col., 1995). A laminina-511 também foi descrita por aumentar a migração das células MCF-7 e MDAMB-231 através da integrina  $\alpha 3 \beta 1$  (Chia e col., 2007; Kusuma e col., 2012). O colágeno I também tem função pró-tumorigênica nas células MCF-7 (Barcus e col., 2015). A osteopontina também está associada a um mau prognóstico em pacientes com câncer de mama (Rudland e col., 2002), da mesma forma que a trombospondina-1, que promove as propriedades invasivas no câncer de mama (Wang e col., 1996). Estudos em pacientes mostraram uma relação entre a expressão de tenascina-C (TN-C) (Ishihara e col., 1995; Yoshida e col., 1997; Jahkola e col., 1998; Oskarsson e col., 2011) e fibronectina, promovendo a metástase e piorando o prognóstico dos pacientes com câncer de mama (Ishihara e col., 1995; Jahkola e col., 1998). Outros estudos mostram que a MDAMB-231 aumenta seu potencial invasivo e migratório na presença de TN-C (Ilunga e col., 2004; Yoshida e col., 2015). Além disso, TN-C é capaz de promover a invasão e crescimento de células de carcinoma de mama, como MCF-7 e MDAMB-231 (Hancox e col., 2009; Nagaharu e col., 2011). Kalembeiy e colaboradores, 2003, mostraram que TN-C aumenta expressão de MMP9, mesmo na ausência de TGF- $\beta$ , aumentando o potencial invasivo das MDAMB-231. Chiquet-Ehrismann e Kalla, 1989 mostraram que a adição de TN-C solúvel ao meio de MCF-7 diminuiu a adesão célula-célula, modificando

estas células para um perfil mesênquimal. Outro trabalho mostrou que células de tumor de mama humano produzem TNC, criando um nicho necessário para a formação de metástases no pulmão (Oskarsson e col., 2011).

Assim como no câncer de mama, outros tipos de câncer também sofrem influências das proteínas de MEC, como no carcinoma pancreático, em que a presença de colágeno tipo I leva a diminuição de E-caderina durante a TEM (Koenig e col., 2006). No câncer de pulmão, a presença de TNC cria um microambiente que potencializa vias relacionadas à TEM (Oskarsson e col., 2011) e aumenta a migração e proliferação de células de tumor de laringe (Yoshida e col., 1999). A laminina também é capaz de auxiliar a TEM mediada por TGF- $\beta$  no carcinoma hepático (Giannelli e col., 2005).

Apesar dos estudos apresentados acima, o papel da MEC tumoral na biologia do tumor, incluindo a transição para um fenótipo mesenquimal, ainda é pouco conhecido. A elucidação dos sinais moleculares que modulam as interações entre as células tumorais e a matriz extracelular tumoral podem levar a uma melhor definição de abordagens terapêuticas em terapias anti-metastáticas.

## 1.6 Justificativa do projeto

Diante do exposto, o microambiente tumoral tornou-se um novo alvo terapêutico de estudo, aliado a tratamentos tradicionais como radioterapia, quimioterapia e cirurgia (Hanahan e Weinberg, 2011; Allen e Louise, 2011).

A ligação de uma célula epitelial tumoral à própria MEC produzida inicia sinalizações intracelulares específicas que, além de resultar no remodelamento da MEC tumoral através da secreção de enzimas proteolíticas, dispara outras vias de sinalização, que favorecem a migração celular, criando um ambiente pró-migratório e pró-invasivo (Lin e Karin, 2007; Gonzalez e Médici, 2014). A partir dos primeiros estudos sobre TEM em células epiteliais embrionárias cultivadas sobre gel tridimensional de colágeno tipo I (Greenburg e Hay, 1988), vários outros trabalhos vêm sugerindo a sinalização mediada pela MEC como um importante regulador do fenótipo epitelial da célula (Gonzalez e Médici, 2014).

Contudo, pouco se sabe sobre quais seriam os efeitos exercidos pela MEC produzida pelas células tumorais de mama com características mesenquimais, sobre outras células tumorais com características epiteliais também presentes no microambiente tumoral.

Trabalhos anteriores que mostraram a influência de proteínas de matriz extracelular sobre a TEM de células tumorais utilizam uma matriz comercial bidimensional ou proteínas de matriz solúveis (Nyga e col., 2011; Foroni e col., 2013; Lü e col., 2014). Existem ainda outros trabalhos em modelos de matriz 3D para estudar a progressão do câncer de mama, utilizando géis ricos em colágeno I ou laminina (Bissel e col., 1999). Porém, a MEC presente no microambiente tumoral *in vivo* é muito mais complexa, contendo diversas outras proteínas de matriz (Xiong e col., 2015). Trabalhos mais recentes, como Soucy e colaboradores (2009), Alves e colaboradores (2011) e Brandão-Costa e colaboradores (2016), vêm utilizando uma matriz tridimensional produzida pelas células tumorais como modelo para estudos de eventos celulares relacionados à angiogênese. Estas matrizes tumorais são tridimensionais e mimetizam mais eficientemente o microambiente tumoral *in vivo*, diferenciando-a das matrizes comercialmente vendidas.

Sabendo-se que o câncer de mama apresenta populações celulares bastante heterogêneas e em diferentes estágios de TEM e que cada célula, com suas particularidades, são capazes de formar uma MEC específica, a compreensão das interações entre as células tumorais presentes na massa tumoral que conservam características epiteliais e a MEC tumoral são de extrema relevância para o desenvolvimento de terapias antimetastáticas.

Desta maneira, neste trabalho utilizamos um modelo em que uma célula tumoral com características epiteliais pudesse interagir com a MEC de uma célula vizinha, presente na mesma massa tumoral, que possua mais características mesênquimais, observando se esta interação acarretava mudanças no perfil da célula epitelial. Assim, investigamos se a interação de uma célula de carcinoma de mama de perfil epitelial com a matriz extracelular extraída de outra célula de câncer de mama com maior potencial metastático e características mesenquimais afetaria seu fenótipo, tornando-a mesenquimal.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O presente trabalho visou investigar o efeito da matriz extracelular de tumor de mama altamente metastático (MDA-MEC) sobre a mudança para um perfil mesenquimal das células de tumor de mama com menor potencial metastático e características epiteliais (MCF-7).

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar e comparar a constituição proteica da MEC produzida pelas duas linhagens de carcinoma de mama;
- b) Avaliar as alterações fenotípicas e moleculares relacionadas à TEM nas células MCF-7 semeadas sobre MEC produzida pelas células MDAMB-231, utilizando a própria MEC produzida pelas MCF-7 como controle;
- c) Investigar os mecanismos moleculares e celulares dependentes de integrina envolvidos no processo da transição epitélio-mesênquima disparados pela interação com a matriz da MDAMB-231;
- d) Interferir nesse modelo experimental utilizando inibidores de integrinas, identificando o papel das integrinas envolvidas nesses eventos.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas duas linhagens celulares de adenocarcinoma de mama humano: MCF-7 (ATCC<sup>®</sup>HTB-22<sup>TM</sup>), com morfologia epitelial (negativa para vimentina) e menor potencial invasivo, e MDAMB-231 (ATCC<sup>®</sup>HTB-26<sup>TM</sup>) com morfologia mesenquimal e maior potencial invasivo – ambas provenientes de efusão pleural. As células da linhagem MDAMB-231 não possuem receptores de estrogênio, progesterona e HER2, ao contrário das células MCF-7 que são hormônio responsivas (Schiemann e col., 1997; Sisci e col., 2004). As células MCF-7 e MDAMB-231 foram certificadas (STR) pelo Laboratório de Diagnósticos por DNA (UERJ, RJ, Brasil).

#### 3.2 Cultura de células

As células MCF-7 e MDAMB-231 foram mantidas na presença do meio de cultura DMEM-Hi glucose (Gibco Invitrogen Corporation), suplementado com 3,7 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 5,2 g/L de HEPES, 0,5 U/mL de penicilina, 0,5 mg/mL de estreptomicina e com 10% de soro fetal bovino (FBS - Cultilab) em pH 7,2. Todas as linhagens foram mantidas em atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura constante de 37°C. As células foram armazenadas em garrafas de cultura (Corning). O meio de cultura foi renovado ou as células foram repicadas, quando confluentes, a cada 2-3 dias. Para repicar as células foi utilizado o HANK's EDTA (5 mM) para lavar as células, desfazendo as ligações adesivas dependentes de cátions (Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>), e em seguida a tripsina (0,1%)/EDTA (0,01%). Posteriormente, as células foram centrifugadas a 300 x g durante 10 minutos. Para a obtenção do meio condicionado das células MDAMB-231, as células foram cultivadas em DMEM 10% até atingirem 90-100% de confluência (4x10<sup>6</sup> células) em garrafas de 75 cm<sup>2</sup>.



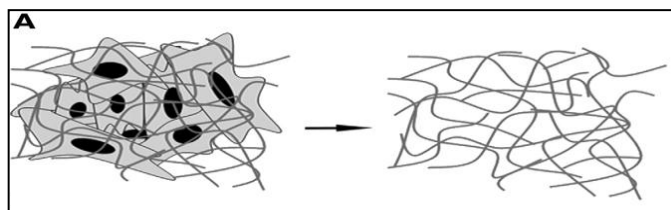
### 3.3 Contagem de células

O número de células presentes na suspensão celular foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão por Azul de Tripán (Gibco Invitrogen Corporation) 0,2% em PBS.

### 3.4 Obtenção da matriz extracelular

As células MCF-7 ( $1 \times 10^6$  células/poço) e MDAMB-231 ( $5 \times 10^5$  células/poço) foram semeadas, em meio DMEM-Hi glucose suplementado com 10% de FBS e incubadas por 72 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, para a formação de uma matriz extracelular uniforme. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e extraídas, com um tampão de extração, contendo 0,1% de Triton X-100, NH<sub>4</sub>OH (0,1 M), 1 µL/mL de coquetel de inibidores de proteases (10 µg/µL de aprotinina, 10 µg/µL de leupeptina, 2 µg/µL de pepstatina e 1 mM de PMSF), para a retirada do material celular, formando uma matriz decelularizada (Figura 13). Posteriormente, os poços contendo a matriz extracelular foram lavados, suavemente, três vezes com uma solução de PBS + Ca<sup>2+</sup>, contendo KCl (2,7 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,4 mM), NaCl (68,3 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (8 mM), MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (1 mM) e CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (1 mM), para eliminar restos celulares. Então, as matrizes foram bloqueadas com BSA 0,1% em PBS + Ca<sup>2+</sup>, 1 µL/mL de coquetel de inibidores e 1 µL/mL de PMSF, como descrito por Brandão-Costa e colaboradores (2016). As matrizes foram imediatamente utilizadas para os experimentos.

Figura 13 - Desenho esquemático do processo de obtenção da matriz extracelular



Legenda: A esquerda, a matriz extracelular está representada como linhas envolvidas com células, e, à direita a matriz extracelular após o procedimento de extração.

Fonte: Soucy e Romer, 2009, f. 274.

### 3.5 Análise da composição da matriz extracelular

A composição das matrizes nativas foi analisada por ELISA indireto, como descrito anteriormente (Brandão-Costa e col., 2016). As células MCF-7 ( $2 \times 10^3$  células/poço) e as células MDAMB-231 ( $1 \times 10^3$  células/poço) foram plaqueadas em sextuplicata, em placas de 96 poços, por 72 horas. Depois, as MECs produzidas pelas células MCF-7 (MCF-MEC) e MDAMB-231 (MDA-MEC) foram obtidas, conforme no item 3.4, bloqueadas com PBS-Ca<sup>2+</sup>/BSA 0,1% durante 2 h e incubadas com anticorpos primários específicos diluídos em PBS-Ca<sup>2+</sup>/Tween 0,05% durante 1 h em temperatura ambiente. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-Fibronectina (1:400- Dako cód.:A024502), anti-vitronectina (1:400-Santa Cruz cód.: sc15332), anti-osteopontina (1:400- Santa Cruz cód.: sc73631), anti-laminina (Sigma cód.: L9393) e anti-tenascina-C (1:400- Invitrogen cód.: MA1-26778). Depois, as matrizes foram lavadas com PBS-Ca<sup>2+</sup>/Tween 0,05% e incubadas com anticorpos secundários específicos. Após 1 h de incubação, a reação colorimétrica foi desencadeada pela adição de tampão citrato 0,1 M pH 4,5 contendo 0,002% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 1 mg/mL de OPD. A reação foi parada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3 M). A absorbância foi medida a 490 nm em leitor de ELISA (Thermo Scientific).

### 3.6 Análise do perfil mesenquimal das células MCF-7 na presença dos diferentes tratamentos

A MEC foi obtida como descrito no item 3.4, e, em seguida as MCF-7 ( $2 \times 10^5$  células/poço) foram semeadas sobre a MEC da MDAMB-231 ou sobre a sua própria MEC na presença ou ausência de 10 ng/mL de TGF- $\beta$  em meio 5% de FBS, durante 48 e 72 horas. A mudança morfológica das MCF-7 foi analisada em microscópio invertido (Olympus IX71) por contraste de fase em aumento de 10 vezes.

### 3.7 MTT das células MCF-7 tratadas com RGD

As células MCF-7 ( $2 \times 10^4$  células/poço) e MDAMB-231 ( $10^4$  células/poço) foram mantidas em placas de 96 poços a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  durante 72 horas para obtenção das MECs, conforme o item 3.4. Em seguida, as células MCF-7 ( $10^3$  células/poço) foram plaqueadas em quintuplicata sobre as matrizes na presença de RGD (0,1, 0,5 e 1  $\mu\text{M}$ ) e incubadas por 72 horas a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após esse tempo, o número de células viáveis foi determinado através do ensaio de redução do MTT (Sigma) a formazan. Para analisarmos a proliferação celular, realizamos uma curva de células no tempo de 1h (tempo necessário para as células MCF-7 aderirem à placa) e comparamos com o número de células viáveis em 72h em cada condição experimental.

### 3.8 Imunofluorescência de E-caderina

As células MCF-7 ( $2 \times 10^5$  células/poço) e MDAMB-231 ( $1 \times 10^5$  células/poço) foram distribuídas em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro e mantidas a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$  durante 72 horas. Depois, a MEC foi obtida, como descrito no item 3.4, e as MCF-7 ( $7 \times 10^4$  células) foram semeadas sobre essas matrizes durante 72 horas na presença ou ausência de TGF- $\beta$  (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em meio 5% de FBS. Para a inibição da ativação de integrinas, as células MCF-7 também foram tratadas com RGD (Arg-Gly-Asp; 1  $\mu\text{M}$ ), durante 72 h. Em seguida, as células foram lavadas e fixadas em paraformaldeído com 4% de sacarose por 20 minutos. Posteriormente, foram lavadas, permeabilizadas com Triton X-100 0,2% em PBS por 5 minutos, e bloqueadas com 5% de BSA por 30 minutos. As células foram incubadas com anticorpo primário para E-caderina (1:400) overnight a  $4^\circ\text{C}$ , seguido da incubação com o anticorpo secundário apropriado por 1 h e Alexa Fluor 555 a  $4^\circ\text{C}$  por 1 h. Finalmente, as lâminas foram montadas, usando DAPI ProLong Gold para a marcação nuclear. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência (Olympus BX40) em aumento de 60x.

### 3.9 Eletroforese e *western blot*

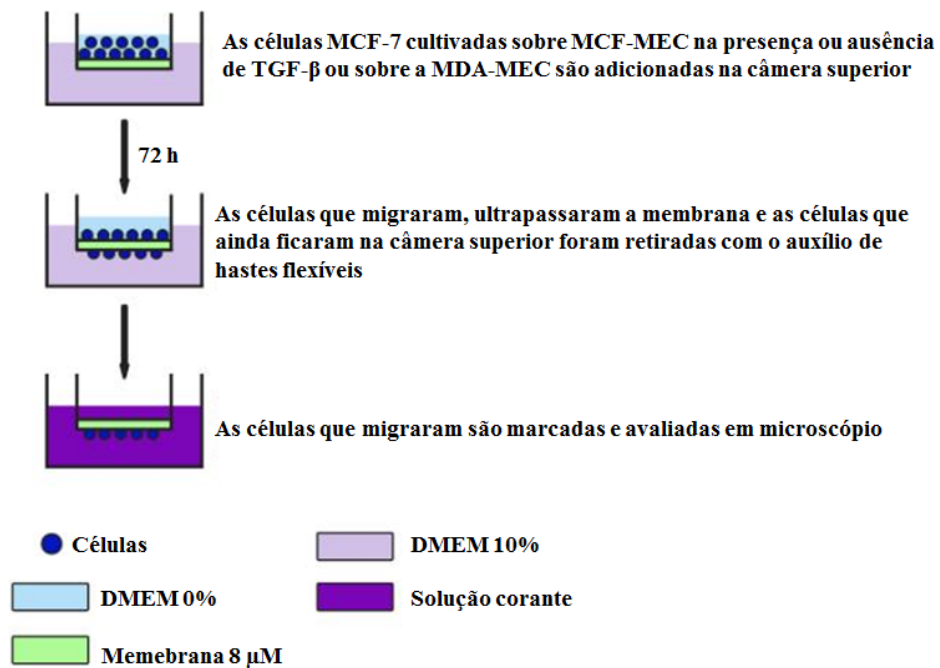
A MEC foi obtida, como descrito no ítem 3.4, e as MCF-7 ( $2 \times 10^5$  células/poço) foram semeadas sobre a MDA-MEC ou sobre a MCF-MEC, na presença ou ausência de 10 ng/mL de TGF- $\beta$ ; meio condicionado extraído das células MDAMB-231; RGD; e SB431542 (inibidor do receptor do TGF- $\beta$  - ALK1), durante 72 horas. Em seguida, as células foram lisadas em tampão de lise RIPA (Tris (50 mM), pH 8, NaCl (150 mM), 1% de Triton X-100, 0,1% de SDS, EDTA (5 mM), NaF (50 mM),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (30 mM),  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (100 mM), PMSF (1 mM) e coquetel de inibidores). O conteúdo de proteínas do extrato total foi determinado pelo método de BCA (Thermo Scientific). Às amostras, foram adicionados 20% do seu volume de tampão de amostra 5 vezes concentrado (Tris-HCl (50 mM) com pH 6,8, 1% de SDS, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol e 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol), desnaturando-as, e, posteriormente, as amostras foram fervidas por 5 minutos. O volume dos extratos celulares correspondentes a 10  $\mu\text{g}$  de proteína foram fracionados por eletroforese em gel desnaturante com 10% de poliacrilamida (SDS-PAGE). Após 120 minutos de eletroforese a 150 V e 25 mA, as proteínas no gel foram transferidas para membranas de PVDF (Amersham Biosciences) por eletrotransferência *semi dry* (Trans-Blot Turbo System- Bio-Rad) durante 30 minutos. A eficiência da transferência foi avaliada pela coloração da membrana com o vermelho de Ponceau. Após a lavagem em água destilada, para retirada do corante, a membrana foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação, e *overnight* a 4°C com solução de bloqueio contendo BSA 5%, Tween-20 0,5% em PBS (T-PBS). Em seguida, as membranas foram incubadas 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação, e *overnight* a 4°C com anticorpo primário anti-E-caderina (1:800- Cell Signalling cód.:24E10), anti-Fibronectina (1:1000- Dako cód.:A024502), anti-N-caderina (1:1000- Cell Signaling cód.:4061S), anti- $\alpha$ SMA (1: 800- Santa Cruz cód.:sc1306), anti-pAKT<sup>ser 488</sup> (1:1000-Cell Signaling cód.:4058), anti-pERK 1/2 (1:1000- Cell Signaling cód.:D13144E), anti-AKT (1:5000- Santa Cruz cód.:7126), anti-ERK 1/2 (1:1000- Cell Signaling cód.:9102), anti-Tubulina (1:5000- Sigma cód.:TS168), anti-vimentina (1:500- Sigma cód.:V6389), anti-pSMAD 2 (1:1000- Cell Signalling cód.:138D4), anti-SMAD 2 (1:1000- Cell Signalling cód.:D43B4), anti-SMAD 4 (1:1000- Cell Signalling cód.:9515P), anti-actina (1:1000-Millipore cód.:MAB1501), anti-histona 3 (1:1000- Millipore cód.:05928), anti-pFAK<sup>Tyr397</sup> (1:1000- Santa Cruz cód.:11765) e anti-FAK (1:1000- Abcam cód.:ab40794) diluídos em T-

PBS contendo BSA 5%. Após a incubação, as membranas foram lavadas com T-PBS (3 vezes por 5 minutos) e incubadas com anticorpos secundários específicos conjugados à biotina (diluído 1:5.000 em T-PBS) por 1 hora, sob agitação. As membranas foram então lavadas (3 vezes por 5 minutos) e incubadas com streptavidina conjugada à peroxidase (1:5.000- Cell Signalling cód.: 3999), durante 1 hora, sob agitação. As membranas foram, então, lavadas, secadas e incubadas com solução de quimioluminescência (kit ECL Prime Western Blotting Detection Reagent- GE Healthcare). As bandas imunorreativas foram visualizadas por ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). As imagens foram analisadas com o software ImageJ.

### 3.10 Ensaio de migração celular

Os ensaios de migração foram feitos em câmaras de transwell (Becton Dickinson). Estas câmaras são constituídas de membranas de policarbonato, que são colocadas no interior de poços de placa de cultura de 24 poços (Figura 14). Para este ensaio, utilizamos insertos com membrana de porosidade de 8  $\mu\text{m}$ , devido ao tipo celular estudado. MCF-7 ( $7 \times 10^4$  células/poço) foram previamente tratadas por 72h sobre a MDA-MEC ou sobre a MCF-MEC na presença ou ausência de TGF- $\beta$ . Posteriormente, foram tripsinizadas e adicionadas à parte superior da câmara com meio DMEM 0% de FBS. Fora do inserto, adicionamos o meio de cultura DMEM com 10% de FBS. Deixamos que a migração ocorresse durante 72 horas. Após esse tempo, limpamos a parte de dentro do inserto com o auxílio de hastes flexíveis para retirar as células contidas na parte de cima da membrana. As células que migraram através da membrana foram fixadas e coradas com o kit panótico (Interlab). A contagem das células que migraram foi realizada em microscópio invertido (Olympus IX71), contando 10 campos aleatórios em um aumento de 40x.

Figura 14 – Esquema do Transwell



Fonte: Adaptado de <http://www.biocat.com/cell-biology/cell-migration/haptotaxis-assays>. [Internet]. Rio de Janeiro; 2018 [acesso em 2018 janeiro 20].

### 3.11 Microscópio confocal

As matrizes MCF-MEC e MDA-MEC foram obtidas em lamínulas, através do protocolo descrito (item 3.4). Células MCF-7 ( $7 \times 10^4$  células/poço) foram cultivadas sobre essas matrizes na presença e na ausência de TGF- $\beta$ 1 durante 72 h. Depois de lavar, as células MCF-7 foram fixadas em paraformaldeído 4% sacarose por 20 minutos, permeabilizadas com Triton X-100 (0.1%)/PBS por 5 minutos e marcadas com Faloidina conjugada à Rodamina (1:400- Life Technologies cód.: R415) *overnight* a 4°C. Depois, as lamínulas foram bloqueadas com BSA 5% por 30 minutos e incubadas com anticorpo primário anti-vinculina (1:200- Sigma cód.:V4505) *overnight* a 4°C. As células foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário correspondente durante 1 h, seguido de uma incubação de 1 h com Alexa Fluor 488. Finalmente, as lâminas foram montadas, usando DAPI ProLong Gold (Thermo) para a marcação do núcleo celular. As lâminas foram examinadas em microscópio confocal (Olympus FV1000 Inverted Confocal IX81) em aumento de 60x.

### 3.12 Extrato nuclear

A translocação de SMAD4 para o núcleo foi analisada por *western blot*. Células MCF-7 ( $2 \times 10^5$  células/poço) foram semeadas durante 72h sobre a MDA-MEC ou a sua própria MEC na presença ou ausência de TGF- $\beta$ 1. Depois, as células foram lisadas em Tampão A (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 M EDTA, 0.1 M EGTA, 1 mM DTT e 0.5 mM PMSF), e o NP-40 foi adicionado (concentração final 0.5% (v/v)). A fração nuclear foi coletada por centrifugação (1,810 x g por 5 minutos a 4°C). O *pellet* foi ressuscitado em Tampão C (20 mM HEPES, pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/mL pepstatin, 1  $\mu$ g/mL leupeptin e 20% (v/v) glicerol) e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. As proteínas nucleares foram coletadas no sobrenadante depois da centrifugação (12.000 x g por 10 minutos a 4°C). Os extratos nucleares foram desnaturados em tampão de amostra (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% 2-ME, 10% glicerol e 0.001% de azul de bromofenol) e foram submetidos à fervura por 3 minutos. Os extratos foram resolvidos por eletroforese e *western blot*.

### 3.13 Expressão de mRNA (qRT-PCR)

As células MCF-7 ( $2 \times 10^5$  células/poço) foram cultivadas por 48h sobre a MDA-MEC ou sobre a MCF-MEC na presença ou ausência de TGF- $\beta$ 1. Posteriormente, o RNA total foi isolado de células MCF-7 utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen). As amostras de RNA foram estocadas em freezer -80°C até o uso. A qualidade e a quantidade de RNA nas amostras foram analisadas por absorbância em NanoVue Plus (GE Healthcare). As amostras de RNA, foram retro-transcritas em DNA complementar utilizando-se o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). A condição da reação para o cDNA foi: 25°C por 10 minutos, seguido de 2 ciclos a 37°C (60 segundos), 85°C (5 minutos) e 4°C (30 segundos). As amostras de DNA complementar foram estocadas em freezer -20°C até o momento de uso. O cDNA foi amplificado com o uso de *primers* baseados na sequência do gene *TWIST* (Forward 5'-GGCACCATCCTCACACCTCT-3'; reverse 3'-TGGCTGATTGGCACGACCT-5') e na sequência do gene  $\beta$ -actina (Forward 5'-TACAATGAGCTGCGTGTGG-3'; reverse 3'-TAGCACAGCCTGGATAGCAA-5'), ambos da IDT technologies. O nível de expressão de cada gene analisado foi normatizado contra a  $\beta$ -

actina. A expressão relativa foi determinada pelo método do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , que representa o valor da expressão de genes analisados com os mesmos calibradores (Rao e col., 2013).

O qPCR foi realizado com auxílio do termociclador 7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e os *amplicons* foram quantificados pelo sistema de fluorescência SYBR® Green PCR Master Mix kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A condição padrão da reação de PCR foi: 95°C por 5 minutos, seguido de 45 ciclos a 94°C (30 segundos), 60°C (30 segundos) e 72°C (30 segundos), seguido por uma curva de desnaturação para avaliar a pureza das amostras.

### 3.14 Análise de expressão gênica em larga escala por microarranjo de DNA

Para a realização desse experimento as células MCF-7 foram semeadas sobre a MDA-MEC ou MCF-MEC, durante 48 h. O isolamento do RNA total das amostras foi realizado utilizando o Kit RNeasy (QIAGEN). Em seguida, fizemos um pool de 3 experimentos diferentes para cada grupo (3 µL de RNA a 33,3 ng/µL de cada experimento). A concentração de RNA nas amostras foi determinada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop (Uniscience). Para determinar a integridade do RNA, utilizamos o equipamento *Bioanalyzer* (Agilent). A preparação das amostras para a análise de microarranjo de DNA foi realizada com a utilização do *WT Expression Kit* (Ambion), conforme recomendação da *Affymetrix*, produtora dos chips para microarranjo utilizados nessa tese (*Gene Chip Human Gene 1.0 ST Array* – *Affymetrix Inc.*, Santa Clara, CA, USA).

O RNA total extraído de cada amostra foi convertido em cDNA dupla-fita utilizando o Termociclador Veriti (*Applied Biosystems*) seguindo o programa: sequencialmente, 1 hora a 25°C; 1 hora a 42°C e 2 minutos a 4°C. A síntese da segunda fita de cDNA foi feita imediatamente em seguida, formando um cDNA dupla-fita, seguindo o programa: sequencialmente, 1 hora a 16°C; 10 min a 65°C; 2 min a 4°C.

Para a síntese do cRNA biotilado, o cDNA sintetizado foi utilizado em uma reação de transcrição *in vitro*. A reação foi realizada incubando a mistura por 16 horas a 40°C no Termociclador Veriti (*Applied Biosystems*). Após esse processo, o cRNA foi purificado utilizando *beads magnéticas* (Nucleic Acid Binding Beads, Ambion®, Life Technologies™, USA), de acordo com o protocolo do fabricante do kit. A solução foi armazenada em gelo e seguiu-se a nova síntese de cDNA.



Antes de proceder com a nova síntese de cDNA, a eficiência da reação foi verificada no NanoDrop (*Uniscience*). As reações foram consideradas eficientes quando a concentração de cRNA obtida era maior ou igual a 455 ng/ $\mu$ L, conforme recomendação do fabricante. O segundo ciclo de síntese de cDNA foi realizado e o produto foi purificado utilizando *beads* magnéticas da mesma forma descrita anteriormente. A eficiência da reação foi novamente quantificada no espectrofotômetro NanoDrop (*Uniscience*). As reações foram consideradas eficientes quando a concentração de ssDNA obtida era maior ou igual a 185,0 ng/ $\mu$ L, conforme recomendação do fabricante.

Para a hibridação no *Chip Human 1.0 ST Array*, o cDNA de cada amostra foi fragmentado e o tamanho dos fragmentos foi verificado por eletroforese em gel de agarose (1,5%). Para cada uma das 2 amostras analisadas foi utilizado um chip de microarranjo *Human Gene 1.0 ST* (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA). Uma mistura de reação para cada amostra foi preparada, conforme especificação da Affymetrix. Para a leitura óptica dos *chips Human Gene 1.0 ST Array* os arranjos de sonda foram lidos em um scanner GeneArray® Scanner 7G (Affymetrix). A captura das imagens e normalização das hibridações foram feitas com o software Affymetrix® Expression Console™, utilizando o algoritmo RMA (Robust Multi-array Average), que gerou uma matriz formada pelas sondas nas linhas e amostras nas colunas. Após a normalização, analisamos as diferenças na expressão gênica nos grupos MCF-MEC e MDA-MEC através do software Transcriptome Analysis Console (Affymetrix), observando aumento ou diminuição de expressão gênica das células MCF-7 semeadas sobre a MCF-MEC, em relação à MDA-MEC.

### 3.15 Tratamento estatístico

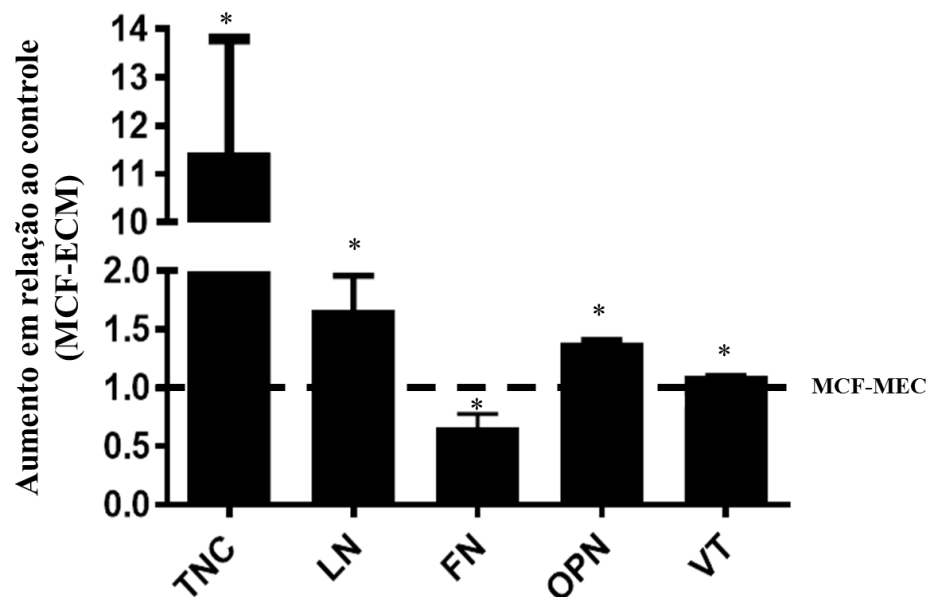
Os resultados obtidos são expressos como média e desvio padrão da média. Os dados, que obedecem à distribuição normal, foram analisados por teste t de Student, com auxílio do programa Microsoft Excel 2007, Graphpad Prism 6.0. Foram consideradas significativas diferenças onde  $P < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização das matrizes obtidas das células MCF-7 e MDAMB-231.

Durante a progressão tumoral, a MEC sofre remodelamento, através da deposição e proteólise de proteínas da matriz, modificando as propriedades biomecânicas e a resposta das células que estão em contato com a mesma (Peranzoni e col., 2013; Van Dijk e col., 2013). Dessa forma, investigamos se haveria diferenças na composição protéica entre as matrizes produzidas pelas duas linhagens de adenocarcinoma de mama (MCF-7 e MDAMB-231). Para isso, analisamos a expressão de algumas proteínas de MEC nas matrizes obtidas a partir de culturas das células MCF-7 e MDAMB-231 por 72 horas (Figura 15). Observamos que a MEC produzida pelas células MDAMB-231 tem uma maior expressão de tenascina-C (11,2x), laminina (1,6x), osteopontina (1,4x) e vitronectina (1,2x), e significativamente menos fibronectina (0,6x), quando comparada à MEC produzida pelas células MCF-7.

Figura 15 – Diferenças na expressão de proteínas entre as MECs produzidas pelas células MCF-7 e MDAMB-231



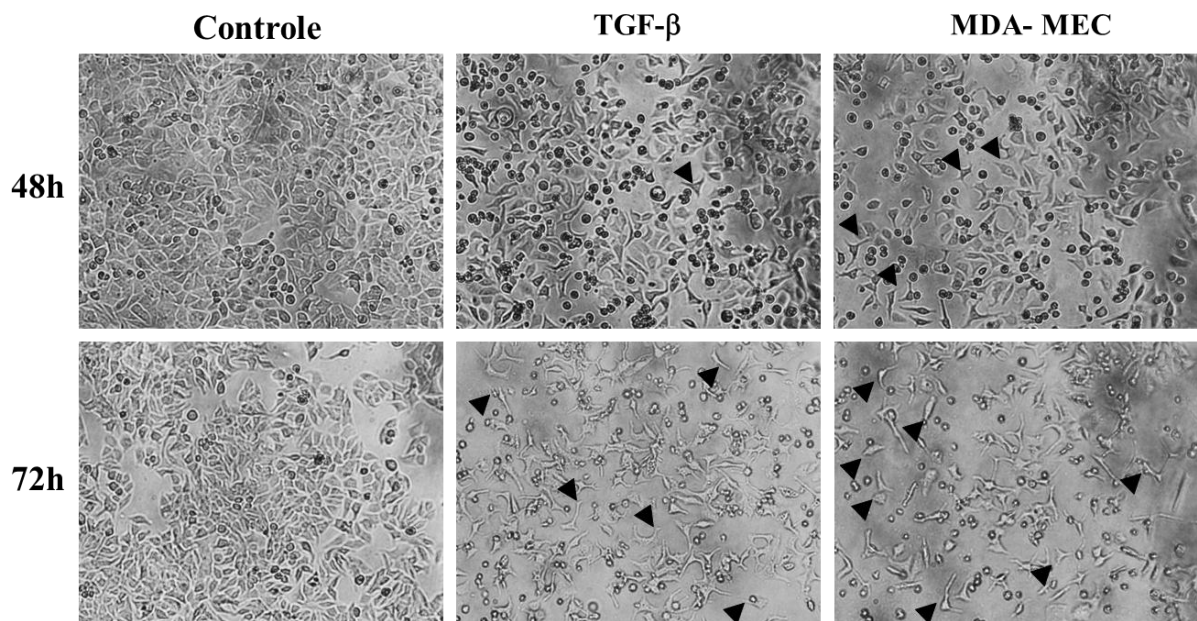
Legenda: MCF-7 ( $2 \times 10^3$  células/poço) ou MDAMB-231 ( $1 \times 10^3$  células/poço) foram cultivadas por 72h a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ . As MECs foram obtidas como descrito na metodologia. O conteúdo de tenascina-C (TNC), laminina (LN), fibronectina (FN), osteopontina (OPN) e vitronectina (VT) foram determinados por

ELISA indireto. A quantidade das proteínas de matriz presentes na MDA-MEC está representada como aumento em relação ao controle MCF-ECM. O gráfico é representativo de 3 experimentos independentes (\* $p < 0.05$ ).

#### 4.2 MDA-MEC induz transição epitélio-mesênquima nas células MCF-7.

A MEC tumoral e seus componentes regulam a forma e o comportamento celular, modulando o crescimento, diferenciação, proliferação, migração de células do microambiente tumoral (Marastoni e col., 2008; Alves e col., 2011; Brandão-Costa e col., 2016), podendo ainda ser fator determinante para a TEM (Cichon e Radisky, 2015). Por esse motivo, avaliamos se a MDA-MEC, apresentando diferenças na sua composição em relação à MCF-MEC, poderia modificar a morfologia das células MCF-7. A análise sob microscopia ótica, mostrou que, após 48 horas em cultura, as células tratadas com TGF- $\beta$  ou cultivadas sobre a MDA-MEC apresentaram formato fusiforme e perda de contato célula-célula (sinalizadas pelas setas pretas), quando comparadas às células controle MCF-7 cultivadas sobre a sua própria MEC. Esse efeito foi mais acentuado no tempo de 72 horas, como mostrado na Figura 16.

Figura 16 – Morfologia das células MCF-7 cultivadas sobre a própria MEC na presença ou ausência de TGF- $\beta$  ou sobre a MDA-MEC



Legenda: MCF-7 ( $1 \times 10^6$  células/poço) e MDAMB-231 ( $5 \times 10^5$  células/poço) foram cultivadas por 72h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Depois, a MEC foi extraída, como descrito na metodologia, e as células MCF-7 ( $2 \times 10^5$  células/poço) foram semeadas sobre a MDA-MEC ou da sua própria MEC com ou sem 10 ng/mL de TGF- $\beta$ , durante 48 e 72 horas. A morfologia das células MCF-7 foi analisada e as imagens

representativas foram obtidas em microscópio invertido (Olympus IX71) por contraste de fase em aumento de 40 vezes. As setas mostram as células com morfologia fusiforme e que perderam o contato célula-célula.

A aquisição de um fenótipo mesênquimal está associada ao aumento na expressão de marcadores moleculares mesenquimais e ao estabelecimento de novas interações célula-célula e célula-matriz. A perda das junções intercelulares, principalmente pela diminuição da expressão de E-caderina, permite que as células adquiram uma morfologia mais alongada e flexível (Kalluri e Neilson, 2003; Thiery e Sleeman, 2006; Kalluri e Weinberg, 2009; Fantozzi e col., 2014; Bill e Christofori, 2015). Por esse motivo, analisamos por *immunoblotting* a expressão de marcadores epiteliais e mesenquimais nas células MCF-7 semeadas por 48 (Figura 17, painel A, C, E e G) e 72 horas (Figura 17, painel B, D, F, H e I) sobre a sua própria MEC na presença ou ausência de TGF- $\beta$  ou sobre a MDA-MEC.

Observamos que após 48h há uma diminuição significativa da expressão de E-caderina nas células MCF-7 tratadas com TGF- $\beta$  ou cultivadas sobre a MDA-MEC, que se mantém até 72 horas (Figura 17, painel A e B). A diminuição da expressão de E-caderina foi mais expressiva em 72 horas, com uma redução de 61% nas células MCF-7 cultivadas sobre a MDA-MEC, contra uma redução de apenas 16% nas células MCF-7 tratadas por 48 horas com a MDA-MEC (Figura 17, painel A e B).

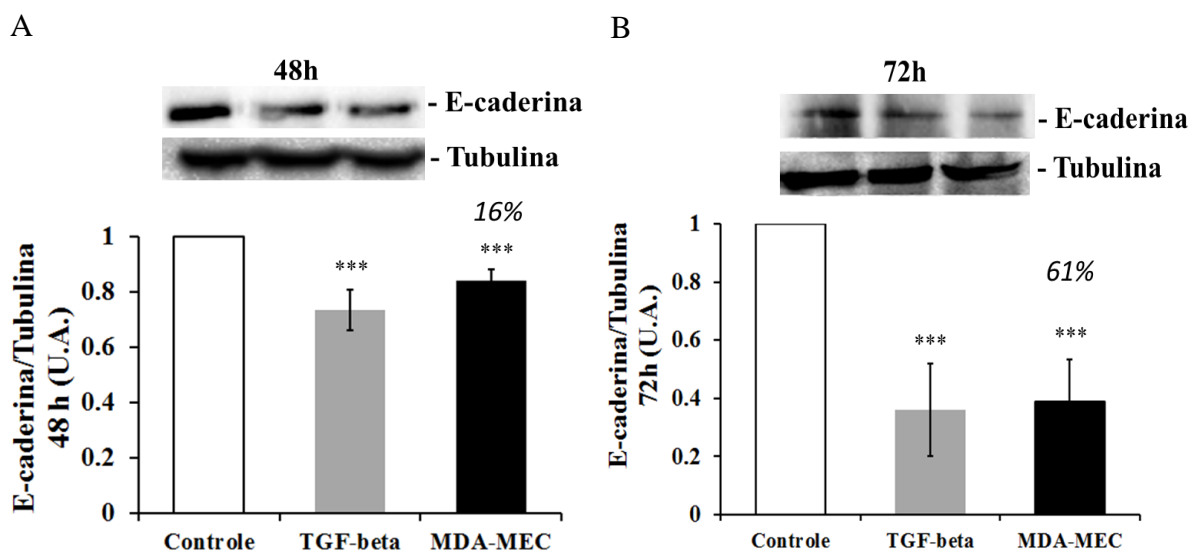
A diminuição na expressão de E-caderina durante a TEM leva ao aumento progressivo da expressão de N-caderina, garantindo assim ligações mais frouxas com outras células, com a membrana basal e com a parede do endotélio, promovendo o sucesso na migração celular (Gumbiner, 2005; Bill e Christofori, 2015). Observamos por *immunoblotting* um aumento significativo da expressão de N-caderina nas células MCF-7 quando estimuladas por 48 horas, com TGF- $\beta$  e quando cultivadas sobre a MDA-MEC (75%) (Figura 17, painel C). Após 72 horas, o aumento de N-caderina se manteve significativo apenas nas células MCF-7 tratadas sobre a MDA-MEC (Figura 17, painel D).

A expressão de outros marcadores mesenquimais, como a  $\alpha$ -SMA, fibronectina e vimentina também foi avaliada por *immunoblotting*. Observamos que após 48 horas, as células MCF-7 cultivadas sobre a MDA-MEC apresentavam um aumento significativo da expressão de  $\alpha$ -SMA (32%), assim como o tratamento com TGF- $\beta$  (77%), utilizado como controle positivo da TEM (Figura 17, painel E). Após 72 horas, um aumento significativo na expressão de  $\alpha$ -SMA (55%) foi observado apenas nas células MCF-7 cultivadas sobre a MDA-MEC (Figura 17, painel F).

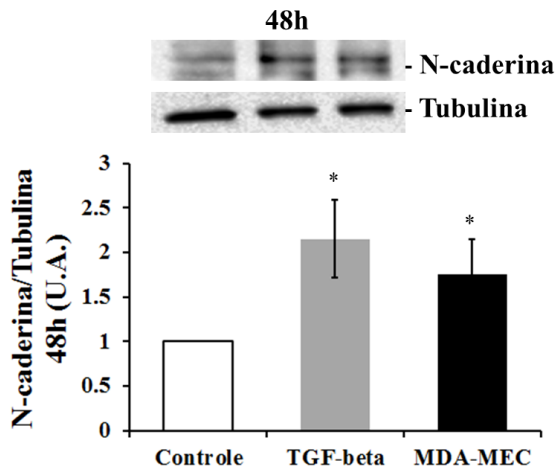
A expressão de fibronectina aumentou significativamente, após 48 horas, apenas no grupo das células MCF-7 tratadas com TGF- $\beta$ , porém, em 72 horas, houve aumento significativo na expressão de fibronectina apenas nas células MCF-7 cultivadas sobre a MDA-MEC (50%). Além disso, em 72h também observamos um aumento significativo da expressão de vimentina nas células MCF-7 tratadas com TGF- $\beta$  ou cultivadas sobre a MDA-MEC (Figura 17, painel I). Finalmente, também observamos que a MDA-MEC, assim como o tratamento com TGF- $\beta$ , induziu nas células MCF-7 um aumento na expressão gênica do fator de transcrição *TWIST*, que atua reprimindo a expressão de E-caderina (Figure 17, painel J).

Em conjunto, esses dados mostram que a interação das células MCF-7 com a MDA-MEC induz um aumento na expressão dos marcadores mesenquimais e diminui os marcadores epiteliais, sugerindo que essas células estejam no processo de transição epitélio-mesenquimal. Diante dos resultados mais expressivos obtidos desses experimentos, escolhemos o tempo de 72 horas de interação das células MCF-7 com a MDA-MEC para as análises posteriores.

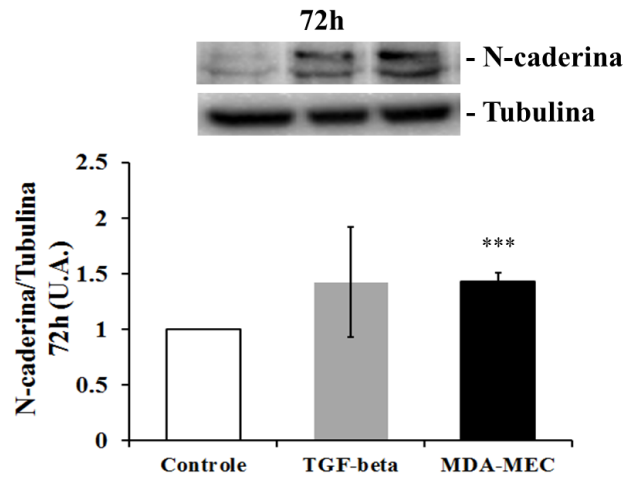
Figura 17 – Expressão de marcadores epiteliais e mesênquimais nas células MCF-7 sobre a sua própria MEC, na presença ou ausência de TGF- $\beta$  ou sobre a MDA-MEC



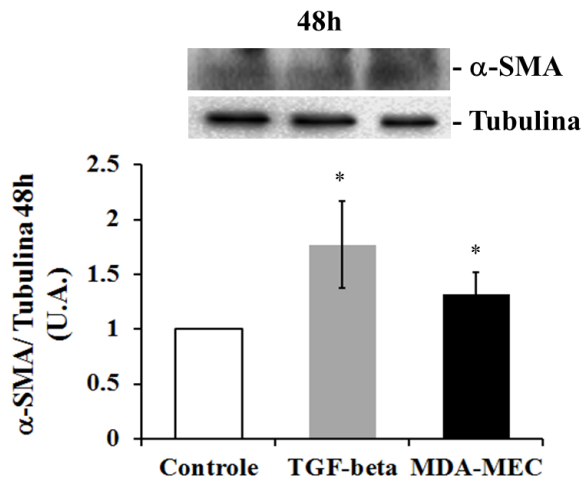
C



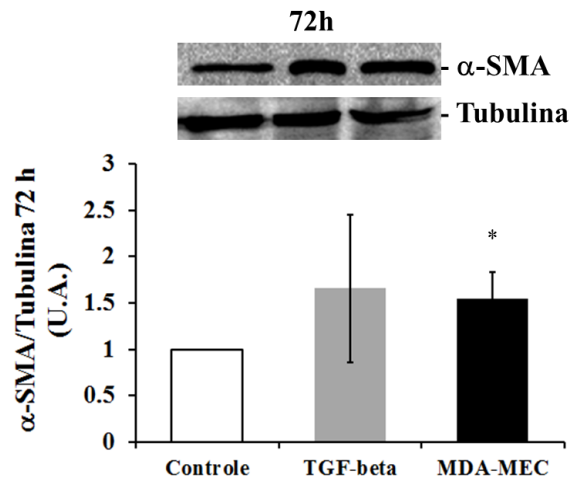
D



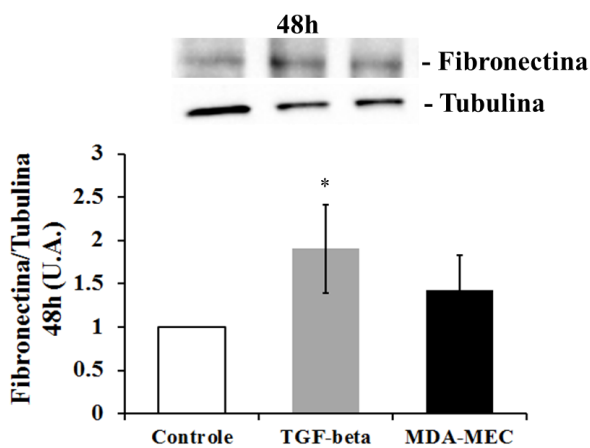
E



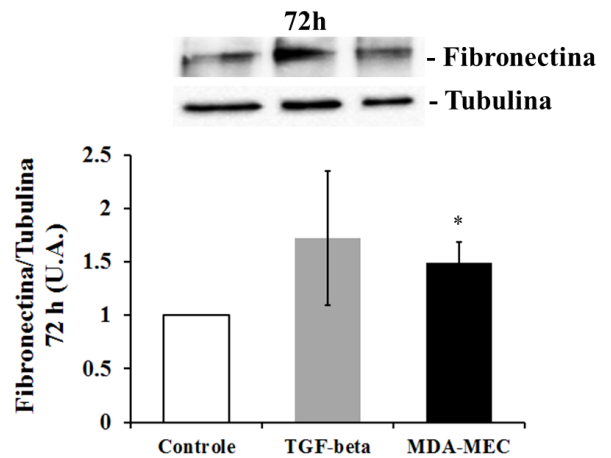
F

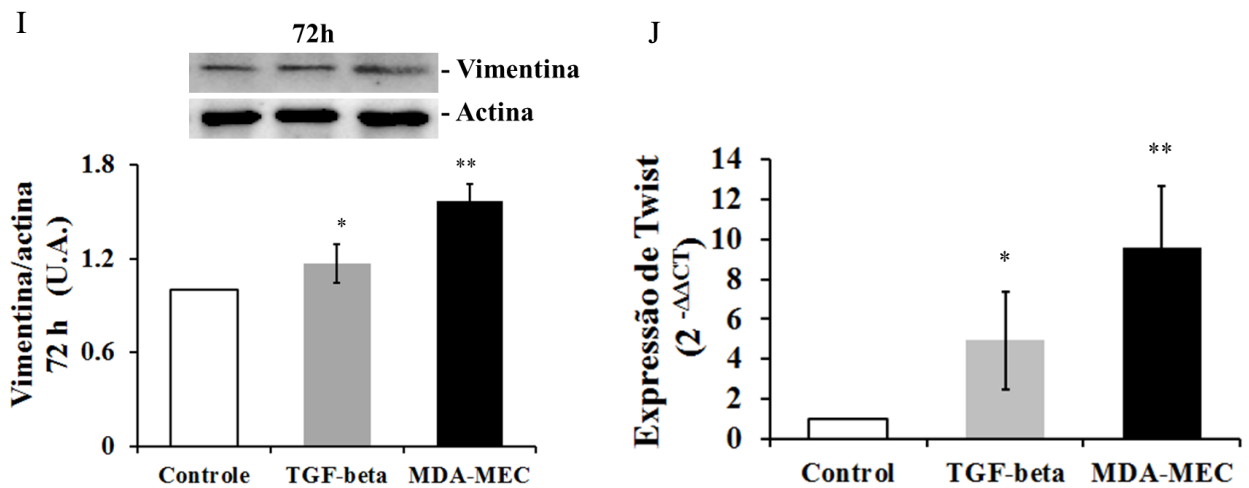


G



H





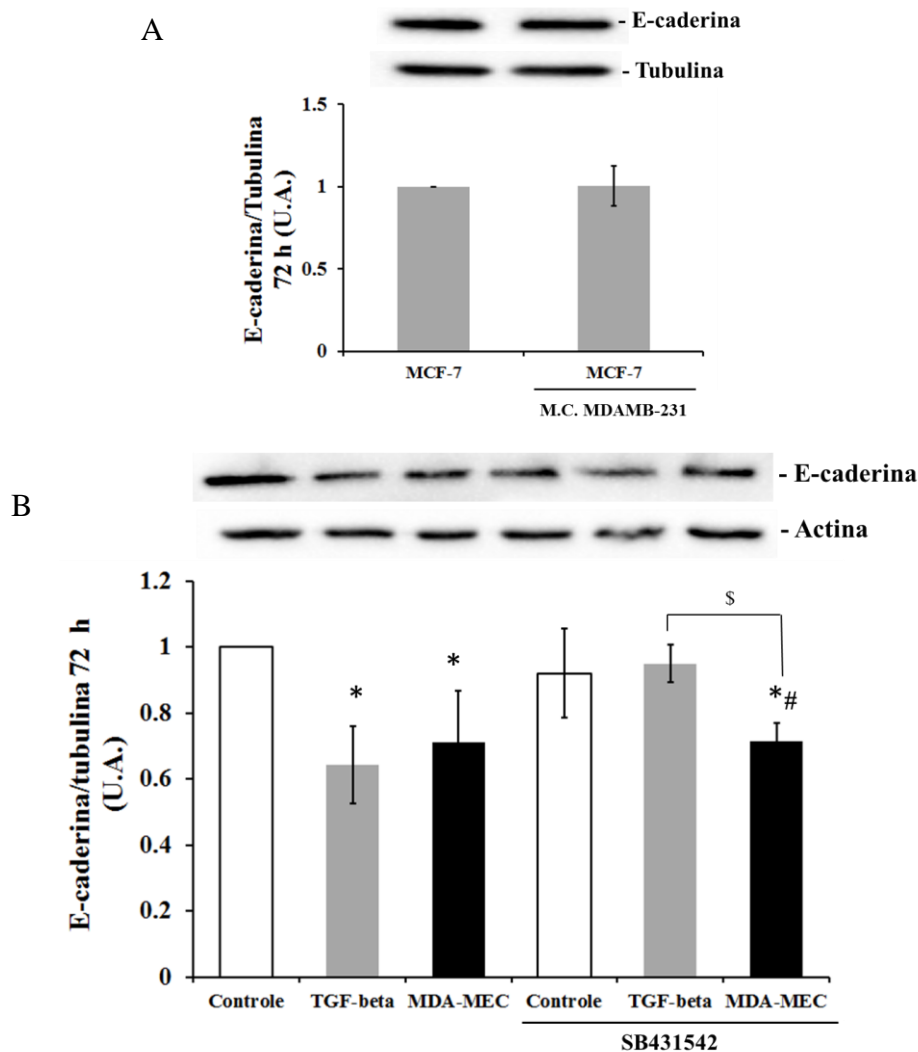
Legenda: MCF-7 ( $1 \times 10^6$  células/poço) e MDAMB-231 ( $5 \times 10^5$  células/poço) foram cultivadas por 72h a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ . Depois, a MEC foi extraída, como descrito na metodologia, e as células MCF-7 ( $2 \times 10^5$  células/poço) foram semeadas sobre a MDA-MEC ou sobre a sua própria MEC com ou sem 10 ng/mL de TGF- $\beta$ , durante 48 e 72 horas. As células foram lisadas e a expressão de E-caderina (A,B), N-caderina (C,D),  $\alpha$ -sma (E,F), fibronectina (G,H) e vimentina (I) foram determinadas por *western blotting*. A expressão de tubulina e actina foi utilizada como load. A imagem é representativa e os gráficos mostram o aumento em relação ao controle (MCF-MEC) de 3 experimentos independentes. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,005$ . (J) MCF-7 ( $2 \times 10^5$  células/poço) foram cultivadas por 48h sobre a sua própria MEC com ou sem TGF- $\beta$  ou sobre MDA-MEC e o conteúdo de mRNA para *TWIST* foi analisado.  $\beta$ -actina foi utilizada como normalizador. O gráfico mostra a média  $\pm$  DP de 3 experimentos independentes (\* $p < 0.05$ ).

A matriz extracelular pode ancorar várias moléculas, incluindo fatores de crescimento como o TGF- $\beta$  (Cichon e Radisky 2014) que, por sua vez, pode induzir a TEM em células tumorais (Nagaharu e col., 2011). Uma vez que as células MDAMB-231 poderiam estar secretando TGF- $\beta$ , especulamos se este TGF- $\beta$  produzido e secretado poderia estar ancorado à MEC que foi extraída dessas células e assim regular a TEM nas células MCF-7.

Para investigar essa possibilidade, as células MCF-7 foram primeiramente cultivadas em meio condicionado coletado das culturas (72 h) de MDAMB-231. A Figura18 (painel A) mostra que não houve diferenças significativas na expressão de E-caderina entre as células MCF-7 cultivadas sobre a MCF-MEC na presença ou ausência do meio condicionado das células MDAMB-231. Para avaliar ainda se o TGF- $\beta$  poderia estar participando, ancorado nas matrizes utilizadas em nosso modelo experimental, as células MCF-7 foram cultivadas por 72 h sobre a MDA-MEC e MCF-MEC, com ou sem TGF- $\beta$ , na presença de um inibidor do receptor do TGF- $\beta$  (SB431542). Observamos que o inibidor do receptor do TGF- $\beta$  não interferiu na diminuição da expressão de E-caderina nas células sobre a MDA-MEC,

comparado ao controle (Figura 18, painel B), indicando que não há participação do TGF- $\beta$  neste efeito. Como esperado, o SB431542 reverteu o efeito do TGF- $\beta$  em células cultivadas sobre a MCF-MEC, impedindo a diminuição da expressão de E-caderina (Figura 18, painel B).

Figura 18 – Envolvimento de TGF- $\beta$  na transição epitélio-mesênquima induzida pela MDA-MEC



Legenda: (A) MCF-7 ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram cultivadas por 72h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Depois, as células MCF-7 foram semeadas sobre a sua própria MEC na presença ou ausência do meio condicionado das células MDAMB-231, durante 72h. As células foram lisadas e a expressão de E-caderina foi avaliada por western blot. O gráfico foi desenhado a partir de 3 experimentos independentes, e representa o aumento em relação ao controle (células MCF-7). A expressão de tubulina foi utilizada como load. (B) MCF-7 ( $2 \times 10^5$  células/poço) foram semeadas sobre a MDA-MEC ou sua própria MEC com ou sem 10 ng/mL de TGF- $\beta$  e na presença ou ausência do inibidor do receptor de TGF- $\beta$  SB431542 (1 mM), durante 72 h. As células foram lisadas e a expressão de E-caderina foi analisada por *western blot*. A expressão de Actina foi utilizada como load. Os resultados mostram o aumento em relação: ao controle (MCF-MEC) (\* $p < 0.05$ ); a MCF-MEC tratada com SB431542 (# $p < 0.05$ ); e a MDA-MEC com o inibidor ( $\$p < 0.05$ ). O gráfico foi desenhado a partir de 3 experimento independentes.

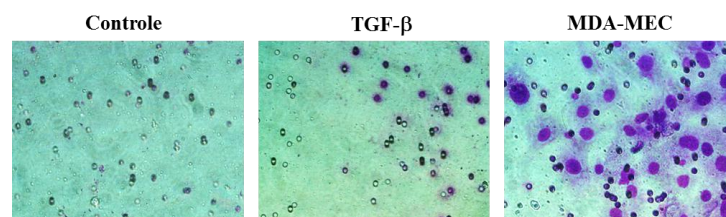


#### 4.3 MDA-MEC induz a migração das células MCF-7

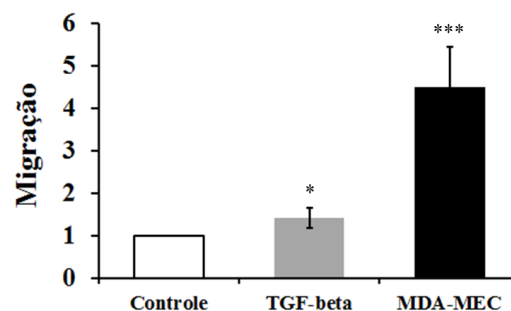
Todos os parâmetros analisados anteriormente, como a mudança morfológica, a diminuição de marcadores epiteliais e o aumento de marcadores mesenquimais, conferem às células tumorais um fenótipo mesenquimal, propiciando um aumento na sua capacidade de migração e invasão (Kalluri e Neilson, 2003; Thiery e Sleeman, 2006; Kalluri e Weinberg, 2009; Fantozzi e col., 2014; Bill e Christofori, 2015). Por esse motivo, analisamos, através do ensaio de transwell, a migração das MCF-7 cultivadas sobre a MDA-MEC ou sobre sua própria MEC, na presença ou ausência de TGF- $\beta$ . O ensaio de migração correu por 72 horas e observamos que as células MCF-7 que entraram em contato com a MDA-MEC, assim como aquelas semeadas sobre a MCF-MEC e tratadas com TGF- $\beta$ , aumentaram significativamente a migração em direção ao quimioatratante (meio com 10% FBS). Observa-se, porém, que o contato com a MDA-MEC aumentou 4 vezes mais a migração das MCF-7, comparado ao controle, contra um aumento de 1,5 vezes das células tratadas com TGF- $\beta$  (Figura 19).

Figura 19 – Migração das células MCF-7 estimuladas pela MCF-MEC na presença ou ausência de TGF- $\beta$  ou pela MDA-MEC

A



B



Legenda: MCF-7 ( $1 \times 10^6$  células/poço) e MDAMB-231 ( $5 \times 10^5$  células/poço) foram cultivadas por 72h a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ . Depois, a MEC foi extraída, como descrito na metodologia, e as células MCF-7 ( $2 \times 10^5$  células/poço) foram semeadas sobre a MDA-MEC ou da sua própria MEC com ou sem 10 ng/mL de TGF- $\beta$ , durante 72 horas. Em seguida, as células MCF-7 foram tripsinizadas, semeadas em insertos, e a migração em direção ao FBS ocorreu durante 72h. (A) Fotos representativas da migração. (B) As

células que migraram foram contadas, em microscópio invertido, contando 10 campos no aumento de 40x, e o resultado mostra o aumento em relação ao controle (MCF-MEC). O gráfico foi calculado a partir de 3 experimento independentes (\* $p < 0.05$ ).

#### 4.4 Efeito da MDA-MEC sobre a ativação de integrinas nas MCF-7

A ativação de integrinas e a ativação subsequente de FAK promove a reorganização dos filamentos de actina, formando pontos de adesão focal e ativando vias de sinalização, como PI3K/AKT e MAPK/ERK, que levam ao aumento da proliferação e migração celular (Hynes, 2002; Bolós e col., 2010; Guan, 2010; Martini e col., 2013; Brandão-Costa e col., 2016). Uma vez que a interação com a MDA-MEC promove um aumento na capacidade de migração das células MCF-7 (Figura 19), avaliamos se este contato levaria a ativação de integrinas e de vias de sinalização associadas.

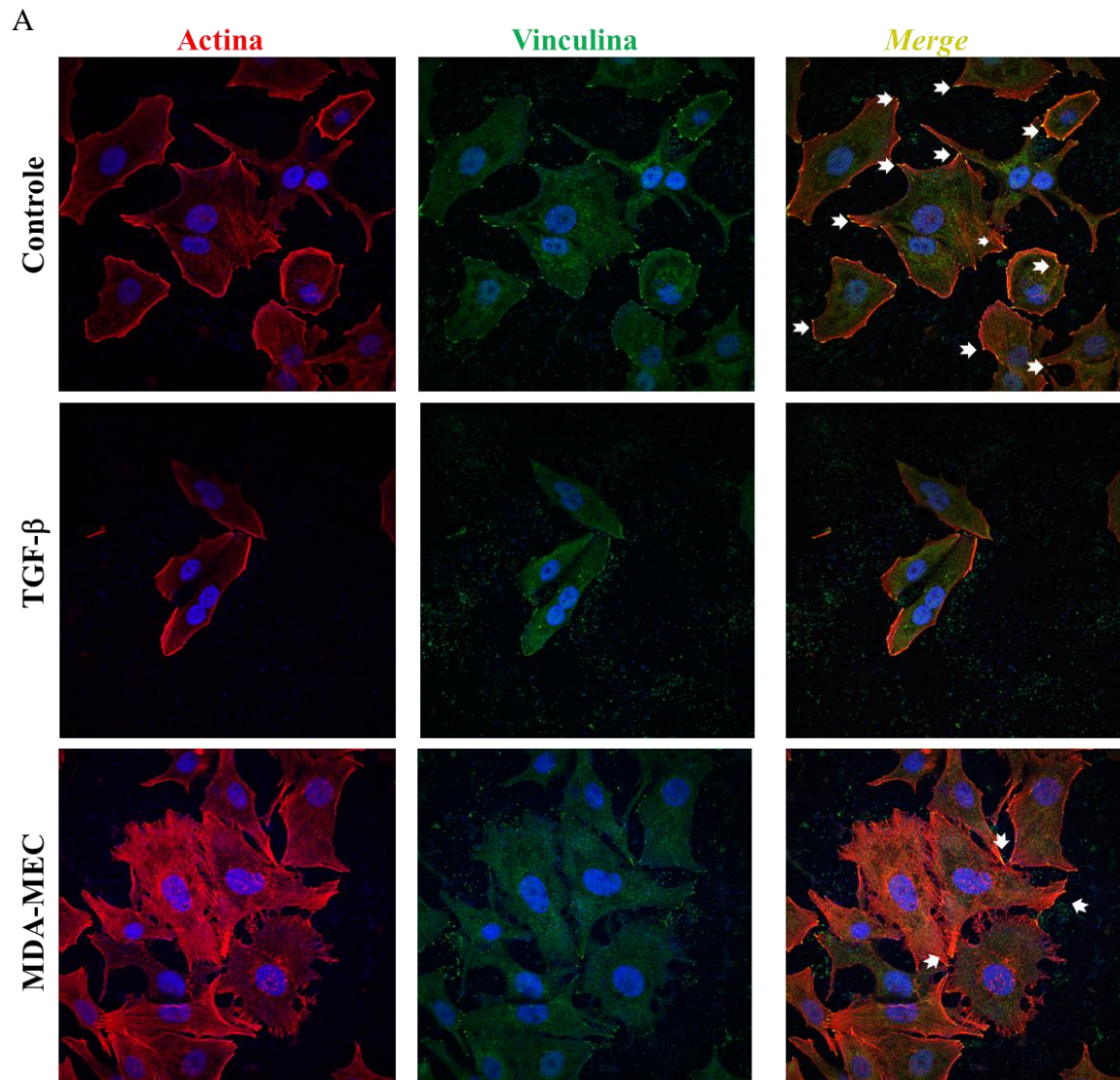
Primeiramente, avaliamos as alterações no citoesqueleto de actina através da imunocitoquímica, marcando actina e vinculina nas células MCF-7. Observamos que as células MCF-7 semeadas sobre a MDA-MEC apresentaram uma morfologia fusiforme, além de pontos de colocalização de vinculina e actina, com formação de fibras de estresse, características de um perfil mais migratório, diferente das células controle cultivadas sobre a MCF-MEC, que apresentaram distribuição cortical de pontos de adesão focal, característicos de um perfil celular mais adesivo e menos migratório. O grupo tratado com TGF- $\beta$  apresentou uma morfologia fusiforme, mas com uma distribuição cortical de F-actina (Figura 20, painel A).

A análise por *immunoblotting* das células MCF-7 semeadas por 72h sobre a MDA-MEC mostrou também que essa interação foi capaz de ativar as vias de sinalização dependentes de integrinas, como PI3K/AKT, MAPK/ERK e FAK. Observamos que apenas as células em contato com a MDA-MEC apresentaram um aumento na fosforilação da FAK (22%), quando comparadas ao controle (Figura 20, painel B). Observamos, porém, aumento significativo de pERK (Figura 20, painel C) e pAKT (Figura 20, painel D) tanto nas células MCF-7 cultivadas sobre a MDA-MEC como sobre a própria MEC na presença de TGF- $\beta$  (Figura 20).

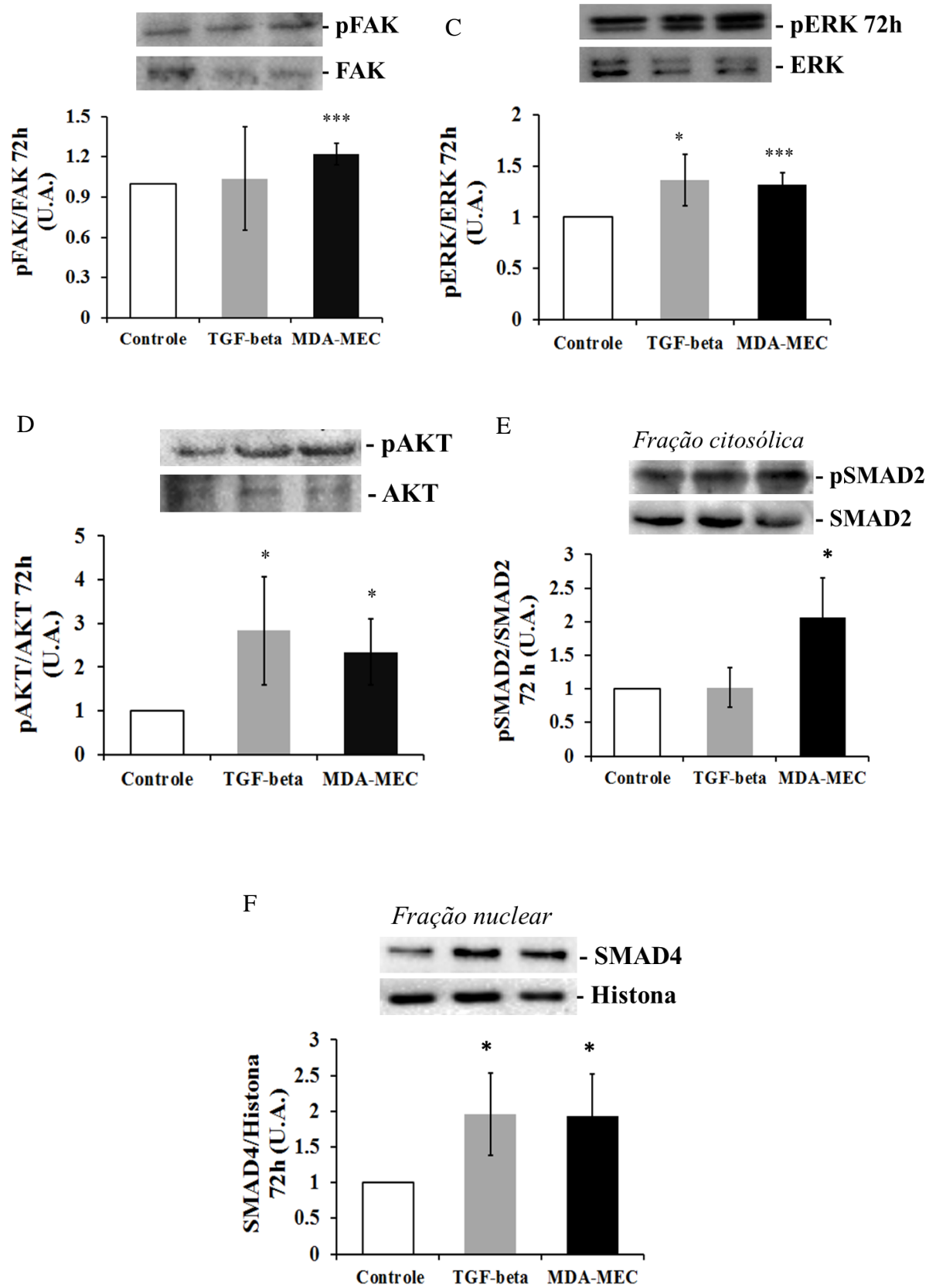
Interações das vias de sinalização ativadas por integrina como FAK, ERK e AKT com a ativação do receptor do TGF- $\beta$  modulando a TEM já foi reportada (Gonzalez e Medici, 2014). Com o intuito de investigar um possível *crossstalk* entre esses receptores no nosso modelo experimental, avaliamos também a via de sinalização canônica do receptor do TGF- $\beta$

nas células MCF-7 sobre a MDA-MEC. Observamos que a interação com a MDA-MEC aumentou significativamente a fosforilação de SMAD2 (Figural 20, painel E) e induziu a translocação de SMAD4 para o núcleo (Figura 20, painel F) nas células MCF-7.

Figura 20 – Participação de integrinas e suas principais vias de sinalização nas células MCF-7 estimuladas pela MCF-MEC na presença ou ausência de TGF- $\beta$  ou pela MDA-MEC



B



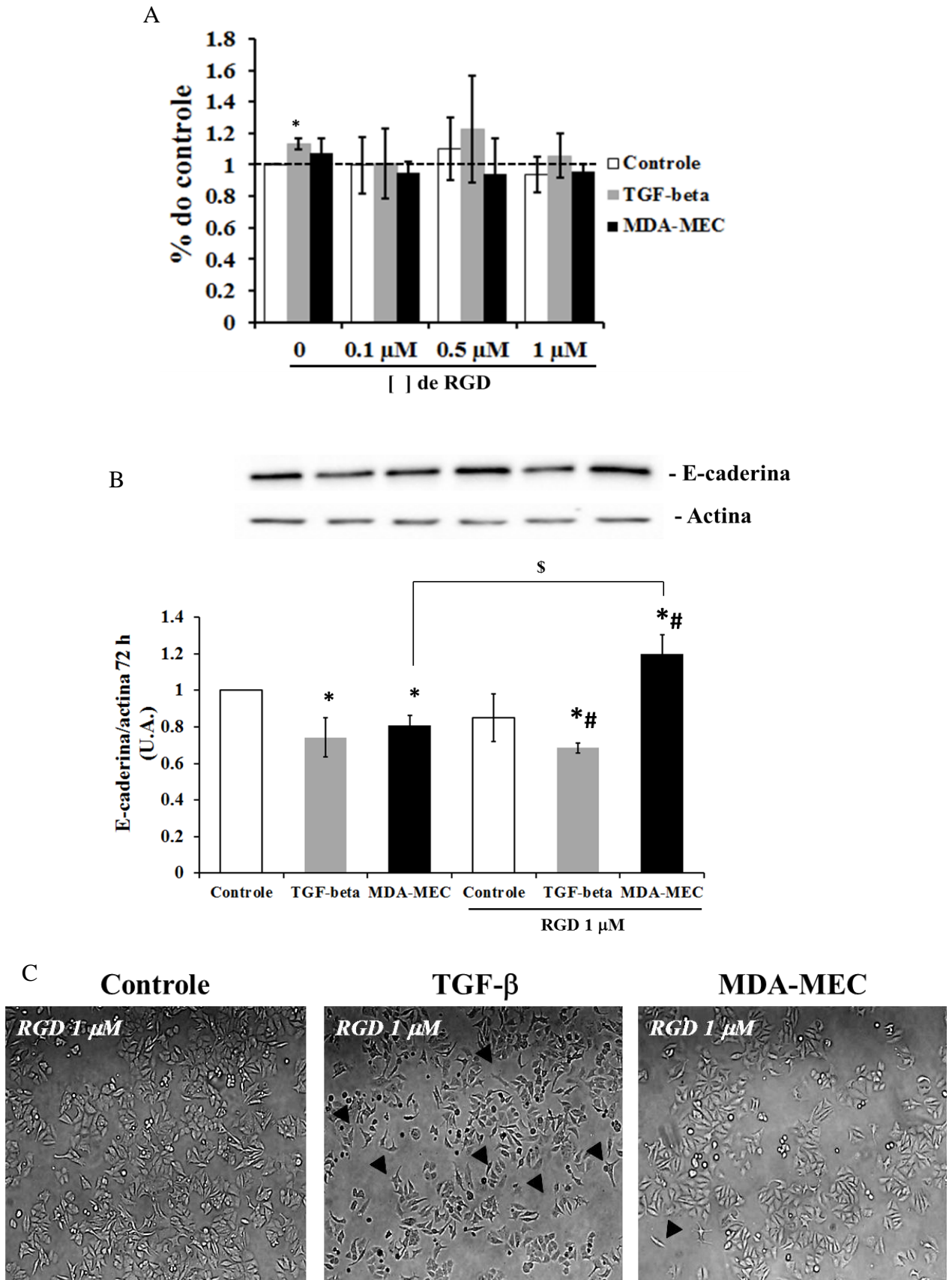
Legenda: MCF-7 ( $1 \times 10^6$  células/poço) e MDAMB-231 ( $5 \times 10^5$  células/poço) foram semeadas por 72h a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Depois, as matrizes foram extraídas e: (A) células MCF-7 ( $7 \times 10^4$  células/poço) foram semeadas sobre lamínulas contendo MDA-MEC e MCF-MEC na presença e ausência de TGF- $\beta$ , e

foram marcadas para F-actina (vermelha), vinculina (verde) e DAPI (azul). As setas mostram a sobreposição da marcação de vinculina e F-actina. As imagens são representativas de 3 experimentos e foram capturadas em microscópio confocal no aumento de 60x. **(B-D)** As células MCF-7 ( $2 \times 10^5$  células/poço) foram semeadas sobre a MDA-MEC ou MCF-MEC na presença e ausência de TGF- $\beta$  e a expressão de p-FAK<sup>tyr398</sup> e FAK **(B)**, p-ERK1/2 e ERK1/2 **(C)**, p-AKT<sup>ser473</sup> e AKT **(D)**, p-SMAD2 e SMAD2 (fração citosólica) **(E)** e SMAD 4 e histona 3 (fração nuclear) **(F)** foi determinada por *western blot*. Os resultados mostram o aumento em relação ao controle MCF-MEC, calculado a partir de 3 experimentos independentes (\* $p < 0.05$ ).

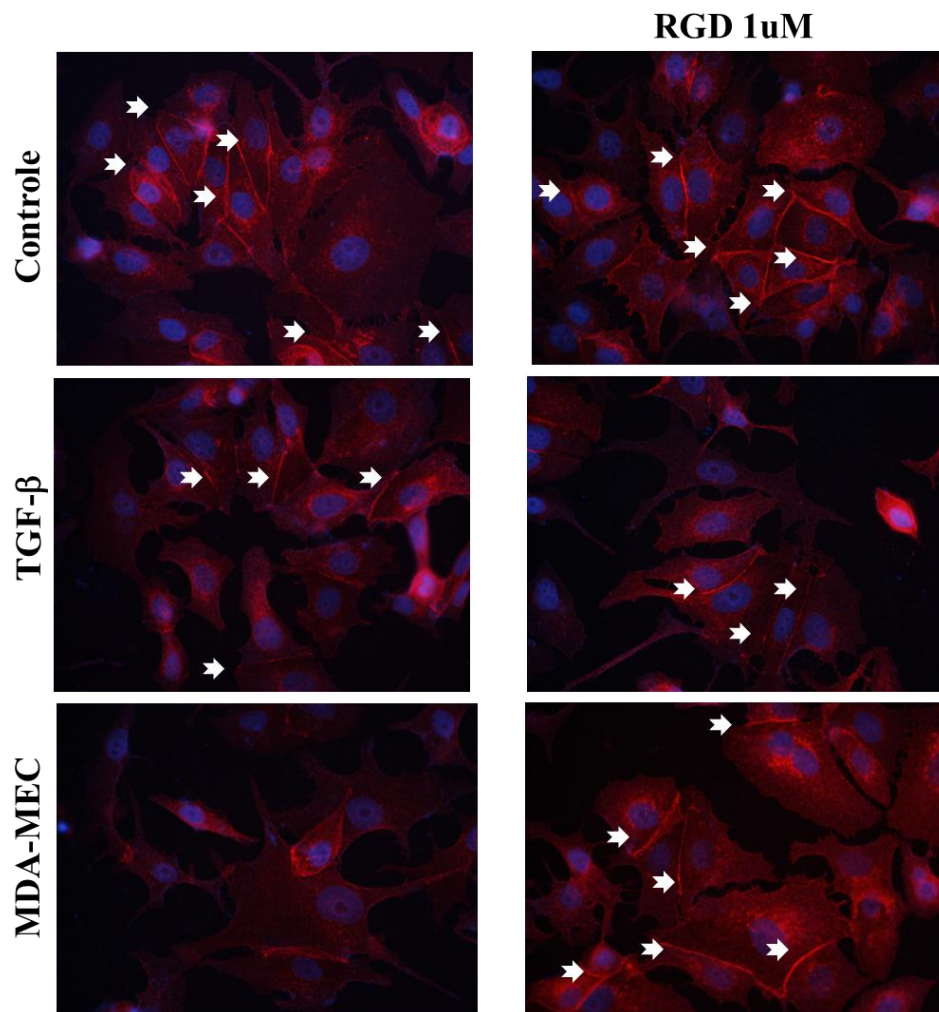
#### 4.5 MDA-MEC induz a expressão de E-caderina dependente de integrina nas células MCF-7

Para confirmar a contribuição das integrinas como mediadores da TEM no nosso modelo, as células MCF-7 cultivadas sobre a sua própria MEC, na presença ou ausência de TGF- $\beta$  ou sobre a MDA-MEC foram tratadas com o tripeptídeo RGD (1 mM), um bloqueador da interação de proteínas da MEC com integrinas e, conseqüentemente, capaz de inibir ativação destes receptores (Nieberler e col., 2017). O tratamento com o RGD em diferentes concentrações (0,1, 0,5 e 1  $\mu$ M) não modificou a viabilidade das células MCF-7 cultivadas sobre as matrizes (Figura 21, painel A). Por outro lado, o tratamento com RGD impediu a diminuição da expressão de E-caderina nas células MCF-7 semeadas sobre a MDA-MEC (Figura 21, painel B), sem interferir com o efeito do TGF- $\beta$  em diminuir a expressão de E-caderina (Figura 21, painel B). Confirmando esses resultados, observamos, através de microscopia ótica, que as células MCF-7 cultivadas 72h sobre a MDA-MEC e tratadas com RGD apresentavam um maior contato célula-célula, com morfologia distinta das células MCF-7 em contato com a MDA-MEC, visto anteriormente na Figura 16 (Figura 21, painel C). Além disso, como observado por imunofluorescência, nas células MCF-7 tratadas com RGD e semeadas sobre a MDA-MEC detecta-se clara expressão E-caderina nos contatos celulares entre as células, em contraste com as células que não foram tratadas com o RGD (Figura 21, painel D). Adicionalmente, observamos ainda que o tratamento com RGD diminuiu significativamente a fosforilação de SMAD2 nas células MCF-7 semeadas sobre a MDA-MEC, em comparação ao controle e ao grupo MDA-MEC sem tratamento com RGD (Figura 21, painel E). Em conjunto estes dados se mostram como um forte indicativo de que a TEM induzida pela interação das células MCF-7 com a MDA-MEC pode estar sendo desencadeado pela ativação de integrinas.

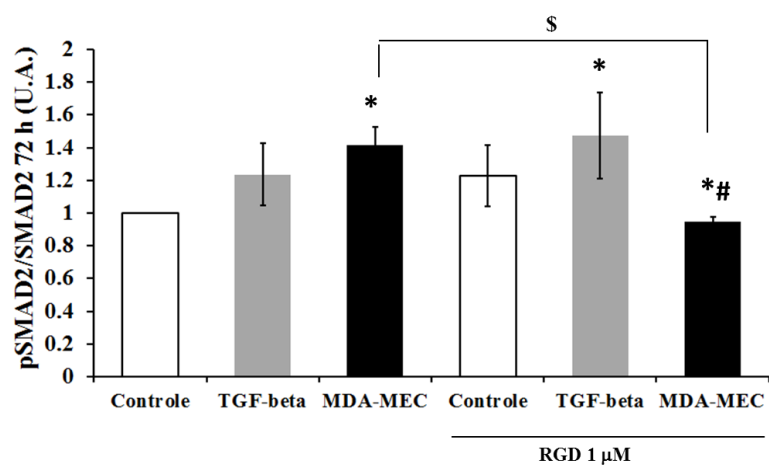
Figura 21 – Análise da participação de integrinas na transição epitélio-mesênquima das células MCF-7 cultivadas sobre a MDA-MEC



D



E



Legenda: MCF-MEC e MDA-MEC foram obtidas, como descrito na metodologia. As células MCF-7 foram cultivadas na sua própria MEC com ou sem TGF- $\beta$ 1 ou sobre a MDA-MEC, na presença ou ausência de RGD (1  $\mu$ M) durante 72 h. (A) A viabilidade celular foi determinada por MTT. O gráfico representa a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) do valor de densidade óptica lido a 570 nm. O

controle sem tratamento com RGD foi utilizado como controle. As células foram lisadas e a expressão de **(B)** E-caderina e **(E)** p-SMAD2 foi analisada por *western blot*. Os resultados mostram o aumento em relação: ao controle (MCF-MEC) (\* $p < 0.05$ ); a MCF-MEC + RGD (# $p < 0.05$ ); e a MDA-MEC (\$ $p < 0.05$ ), calculados a partir de 3 experimentos independentes. **(C)** Imagens representativas das células MCF-7 cultivadas em cada condição experimental, tratadas ou não com RGD. Imagens em aumento de 40x. Setas mostram células com formato fusiforme **(D)** células MCF-7 ( $7 \times 10^4$  células/poço) foram semeadas sobre lamínulas contendo MDA-MEC e MCF-MEC na presença e ausência de TGF- $\beta$  e RGD, e foram marcadas para E-caderina (vermelha) e DAPI (azul). As setas mostram o contato célula-célula mediado por E-caderina. As imagens são representativas de 3 experimentos e foram capturadas em microscópio de fluorescência no aumento de 60x.

*Os dados apresentados até esse momento já estão em forma de artigo submetido para a publicação na revista Neoplasia, que é indexada, qualis A. O artigo encontra-se como apêndice ao final dessa tese.*

#### **4.6 Diferenças na expressão global por microarranjo de DNA nas células MCF-7 em contato com a MDA-MEC**

Buscando uma melhor compreensão de quais seriam os mecanismos moleculares disparados no contato das células MCF-7 com as MECs MCF-MEC e MDA-MEC, avaliamos o perfil de expressão genica global por microarranjo de DNA das células MCF-7 após 48h em contato com essas MECs. Após a normalização feita pelo software Expression Console (Affymetrix), observamos genes diferencialmente expressos entre os grupos de células MCF-7 tratadas sobre a MDA-MEC em relação às células MCF-7 tratadas sobre a MCF-MEC. Foram identificados 20 genes diferencialmente expressos, sendo 9 genes super-expressos (Tabela 3) e 11 genes sub-expressos nas células MCF-7 semeadas sobre a MDA-MEC (Tabela 4). Dentre os 20 genes diferencialmente expressos, encontramos 5 genes relacionados com a adesão célula-MEC e com a TEM nas células MCF-7 cultivadas sobre a MDA-MEC. Quatro genes estão super-expressos nas células MCF-7 sobre a MDA-MEC, como a integrina  $\beta 6$  (*ITGB6*- 2,78x) e a vimentina (*VIM*- 2,82x), importantes para adesão célula-MEC (Kalluri e Weinberg, 2009), além da moesina (*MSN*- 2,72x), que já foi considerada marcador de TEM em câncer de mama (Clucas e Valderrama, 2014) e a lactato desidrogenase (*LDHB*- 2,12x), envolvida no metabolismo celular, importante para a progressão tumoral (Dennison e col., 2013). Dentre os genes com menor expressão nas células MCF-7 sobre MDA-MEC, comparado com o controle, um gene (*DEPDC5*- 2,14x), que está relacionado à inibição do complexo mTORC1 (Deng e col., 2015).



Tabela 3 - Genes super-expressos nas células MCF-7 sobre MDA-MEC em relação à MCF-MEC

<b>Genes Super-Expressos – MDA-MEC/MCF-MEC</b>		
<b>Símbolo do gene</b>	<b>Nome do gene, do inglês</b>	<b>Variação na expressão</b>
<i>ITGB6</i>	<i>integrin subunit beta 6</i>	2,78
<i>LDHB</i>	<i>lactate dehydrogenase B</i>	2,12
<i>MSMB</i>	<i>microseminoprotein beta</i>	2,40
<i>MSN</i>	<i>moesin</i>	2,72
<i>RNA5SP191</i>	<i>RNA, 5S ribosomal pseudogene 191</i>	2,08
<i>RNU6-994P</i>	<i>RNA, U6 small nuclear 994 pseudogene</i>	2,29
<i>SEPT14</i>	<i>septin 14</i>	3,21
<i>SNORA73A</i>	<i>small nucleolar RNA, H/ACA box 73A</i>	2,65
<i>VIM</i>	<i>vimentina</i>	2,82

Legenda: Lista dos 9 genes super-expressos nas células MCF-7 semeadas sobre a MDA-MEC, em relação ao controle (MCF-MEC).

Tabela 4 - Genes sub-expressos nas células MCF-7 sobre MDA-MEC em relação à MCF-MEC

<b>Genes Sub-Expressos – MDA-MEC/MCF-MEC</b>		
<b>Símbolo do gene</b>	<b>Nome do gene, do inglês</b>	<b>Variação na expressão</b>
<i>RNA5SP55</i>	<i>RNA, 5S ribosomal pseudogene 55</i>	-2,52
<i>RNU6-263P</i>	<i>RNA, U6 small nuclear 263 pseudogene</i>	-2,11
<i>RNU6-1124P</i>	<i>RNA, U6 small nuclear 1124 pseudogene</i>	-2,19
<i>BTBD11</i>	<i>BTB domain containing 11</i>	-2,02
<i>ADCY10P1</i>	<i>adenylate cyclase 10 soluble pseudogene 1</i>	-2,31
<i>FGB</i>	<i>fibrinogen beta chain</i>	-2,53
<i>FGG</i>	<i>fibrinogen gamma chain</i>	-2,48
<i>GUK1</i>	<i>guanylate kinase 1</i>	-3,46
<i>FMNI</i>	<i>formin 1</i>	-2,14
<i>CD177</i>	<i>CD177 molecule</i>	-2,56
<i>DEPDC5</i>	<i>DEP domain containing 5</i>	-2,14

Legenda: Lista dos 11 genes sub-expressos nas células MCF-7 semeadas sobre a MDA-MEC, em relação ao controle (MCF-MEC).

## 5 DISCUSSÃO

Estudos sobre o papel do microambiente tumoral têm recebido destaque nos últimos anos, uma vez que seus componentes moleculares e celulares são potenciais alvos terapêuticos para o tratamento de diferentes tipos de câncer. O melhor entendimento do desenvolvimento e progressão tumoral passa não só pelo estudo da biologia da célula tumoral em si, mas também pela caracterização funcional dos elementos que compõem o microambiente que a circunda. Neste se encontram diversos mediadores solúveis como fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, além de diferentes tipos celulares como fibroblastos, células endoteliais e células imunes, que também produzem e secretam mediadores, além dos componentes de matriz extracelular produzidos por essas células e pela própria célula tumoral (Hanahan e Weinberg, 2011). Estes elementos do microambiente tumoral convivem e interagem, podendo modular funções celulares e a homeostase da própria célula tumoral. No presente estudo, buscamos caracterizar e elucidar o papel da MEC produzida pelas células tumorais invasivas na progressão do câncer de mama. Nossos dados deixam claro que esta MEC tumoral com alto potencial metastático, além de poder interferir com o fenótipo das células do microambiente (Brandão-Costa e col., 2016), pode também modular a transição epitélio-mesenquimal em células do tumor, tornando-as mais migratórias e invasivas, o que facilitaria a atividade metastática.

A MEC tumoral, remodelada por metaloproteases secretadas pelas células tumorais, apresenta componentes estruturais que podem ser explorados pelas células neoplásicas para criar um ambiente pró-tumor e pró-invasivo (Campbell e col., 2010; Li e col., 2012; Peranzoni e col., 2013; Van Dijk e col., 2013). A MEC que compõe o microambiente tumoral *in vivo* é complexa, sendo produzida não só pelos fibroblastos, mas também pela própria célula tumoral e é constituída por diferentes elementos como proteoglicanos e proteínas, como mostrado pelo *Matrissoma*, o proteoma desenvolvido por Naba e colaboradores (2012) a partir da MEC de tumores. Evidências mostram que as interações célula-célula e célula-matriz encontradas *in vivo* podem ser diferentes das observadas *in vitro* e, portanto, podem deflagrar respostas celulares diferentes (Cox e Erler, 2011; Lu e col., 2012; Baker e Chen, 2012; Lü e col., 2014). Contudo, apesar da estrutura complexa da MEC no tumor, a maioria dos estudos sobre o papel da MEC no câncer foi realizada usando um único tipo de proteína isolada de MECs ou matrizes artificiais (Bissel e col., 1999; Nagaharu e col., 2011; Foroni e col., 2013;

Yoshida e col., 2015). Essas matrizes bidimensionais não têm a mesma estrutura e composição encontrada nas MEC formadas *in vivo*, o que torna limitadas as interpretações de dados obtidos nesses experimentos. Por esse motivo, diferentes autores vêm utilizando as MECs tridimensionais, como a produzida por fibroblastos associados a tumores, (Soucy e Romer, 2009; Castelló-Cros, 2009), ou em modelos de cultura tridimensionais sobre géis ricos em determinadas proteínas de MEC para investigar a morfogênese do tecido mamário e a progressão do câncer de mama, por exemplo (Howlett e col., 1995; Bissel e col., 1999; Park e col., 2006; Nam e col., 2010; Chen e col., 2012). A obtenção de matrizes tridimensionais, especialmente MECs produzidas por células, tem se mostrado uma boa ferramenta na área biomédica e engenharia médica (Hoshiba e col., 2010; Baker e Chen, 2012; Lü e col., 2014; Kim e Zhao, 2015; Xiong e col., 2015). Em nosso trabalho, usamos uma matriz natural tridimensional produzida por células tumorais de mama com alto potencial metastático (MDAMB-231) para investigar como essa MEC afetaria o fenótipo das células epiteliais de câncer de mama, MCF-7, que têm baixo potencial metastático, focando na capacidade desta interação em induzir a TEM. As MECs tridimensionais obtidas a partir de cultura de células tumorais vêm sendo bem aceitas como a matriz que, *in vitro*, mais se aproximariam da MEC encontrada no tecido tumoral, como em gliomas e melanomas (Alves e col., 2011; Brandão-Costa e col., 2016). Dados anteriores mostraram que a matriz tumoral modifica o perfil morfo-funcional de células endoteliais que, no caso da MEC de melanoma, assumiam fenótipo pró-angiogênico (Brandão-Costa e col., 2016).

O câncer de mama é um tipo de tumor extremamente heterogêneo, constituído por células com diferentes níveis de diferenciação (Bertucci e Birnbaum, 2008; Polyak e col., 2011). Por esse motivo, é esperado que a composição das MECs produzidas por cada tipo celular seja distinta e que influencie o fenótipo de células vizinhas presentes na massa tumoral. Estudos anteriores mostraram que diferentes proteínas isoladas de matriz extracelular podem influenciar a TEM de células tumorais, incluindo as de câncer de mama (Gonzalez e Medici, 2014; Nagaharu e col., 2011; Cichon e Radisky, 2014; Hancox e col., 2009; Oskarsson e col., 2011; Sisci e col., 2004; Pal e col., 2014; Kalembeiy e col., 2003; Ilunga e col., 2004; Neubauer e col., 2009). Nossos resultados mostraram que a interação das células MCF-7 com a matriz extracelular produzida *in vitro* pelas células MDAMB-231 foi capaz de induzir a TEM, aumentando a expressão dos marcadores mesenquimais, modificando o fenótipo celular e estimulando a migração das células MCF-7.

A análise qualitativa de proteínas da MDA-MEC, comparada à MEC produzida pela própria MCF-7, mostrou conteúdos proteicos distintos para proteínas entre as duas matrizes. A MDA-MEC apresentou níveis mais altos de tenascina-C e também maior expressão de laminina, osteopontina e vitronectina, porém uma menor expressão de fibronectina em relação à MCF-MEC. Cabe ressaltar que as proteínas de MEC detectadas neste estudo já foram descritas por contribuir para o desenvolvimento do tumor de mama (Nagaharu e col., 2011; Chia e col., 2007; Rudland e col., 2002; Hao e col., 2016). Contudo, outras proteínas, proteoglicanas, glicosaminoglicanas e toda a diversidade de componentes que compõem essa matriz e que ainda não foram analisadas, também podem contribuir para os efeitos da MDA-MEC sobre as células MCF-7.

A expressão de tenascina-C é normalmente escassa em tecidos humanos saudáveis, mas sua expressão é rapidamente induzida em situações como reparo tecidual e em tecidos tumorais humanos. O aumento de sua expressão na MEC tumoral é, em geral, associada a um pior prognóstico, com aumento de agressividade e malignidade (Kadar e col., 2002; Midwood e Orend, 2009; Midwood e col., 2016), o que vai ao encontro do perfil das células MDAMB-231, que são altamente metastáticas e invasivas (Chia e col., 2007). Corroborando esse perfil, foi anteriormente demonstrado que a tenascina-C solúvel propicia a perda de adesão intracelular e aumenta a migração de células de câncer de mama (Nagaharu e col., 2011).

As lamininas são os maiores componentes das membranas basais de diversos tecidos. Estudos mostraram que a sinalização disparada, em contato com laminina, pode ter efeitos promotores e supressores tumorais, dependendo do tipo de integrina com a qual interage (Ramovs e col., 2017). A laminina tem sido descrita como um potente substrato para adesão e migração das células de tumor de mama *in vitro* e o aumento da sua expressão *in vivo* é correlacionado com o aumento do potencial metastático (Kusuma e col., 2012). Chia e colaboradores (2007) mostraram que a laminina induz aumento da migração das células MCF-7 e MDAMB-231 através de mecanismo modulado por integrinas. Além disso, a adesão sobre laminina dispara a ativação de vias de sinalização associadas à integrinas e induz aumento da expressão de MMP-9, aumenta a migração e invasão de células MCF-7 (Pal e col., 2014). A maior expressão de laminina na MEC produzida pelas células MDAMB-231 corrobora com o perfil mais invasivo dessas células.

A osteopontina (OPN), que também tem sua expressão aumentada na MDA-MEC, já foi associada com um pior prognóstico em pacientes com câncer de mama (Rudland e col., 2002; Saitoh e col., 1995) e relacionada com um alto potencial metastático em modelos

experimentais com roedores (Su e col., 1995). Um estudo recente mostrou que a OPN contribui para o aumento da proliferação e tumorigenicidade do câncer de mama, porém o papel da OPN no câncer de mama ainda não está claro (Gu e Zheng, 2017). Portanto, é justificável encontrarmos maiores níveis de OPN na MEC extraída das células MDAMB-231, que possuem um maior potencial metastático, em comparação com a MEC extraída das MCF-7.

Outra proteína de MEC analisada nesse estudo foi a vitronectina (VT), que também se apresenta mais expressa na MDA-MEC. A VT já foi reportada como moduladora da proliferação e migração tumoral (Niu e col., 2016). Um estudo com pacientes mostrou que a VT pode ser um potencial biomarcador de prognóstico para o câncer de mama (Hao e col., 2016). Por esse motivo, a presença de altos níveis dessa proteína na MDA-MEC pode contribuir para proliferação e migração mais intensa, característica das células MDAMB-231 (Chia e col., 2007). Em adição, a ligação de VT ao seu principal ligante  $\alpha\beta 3$  também está envolvida com processos angiogênicos no microambiente tumoral (Brandão-Costa e col., 2016). Portanto, a presença dessa proteína de MEC também pode estimular o processo de angiogênese que, aliado à localização anatômica das mamas, que estão próximas ao sistema linfático, aumentam a chance de metástase pelas vias arteriais e linfáticas, colonizando, principalmente, o pulmão e os ossos (Mc Guire e col., 2015).

Diferenças na expressão de proteínas de MEC sugerem que a MEC de cada tipo celular tenha uma organização distinta capaz de disparar respostas celulares diferentes. A organização na distribuição e no posicionamento de cada proteína na estrutura da MEC pode expor diferentes sítios de ligação, tornando-se um fator determinante na sua interação com uma integrina específica (Soucy e col., 2009). Assim sendo, podemos sugerir que as diferenças na composição da MDA-MEC, em comparação com a MCF-MEC, seriam as responsáveis por induzir a TEM nas células MCF-7.

Após sua interação com a MDA-MEC, observa-se que as células MCF-7 assumem um perfil morfo-funcional mais mesenquimal a partir de 48 horas, que é acentuado após 72h, com diminuição da expressão de E-caderina e aumento de N-caderina,  $\alpha$ -SMA, fibronectina e vimentina, além do aumento da expressão de *TWIST*. A interação com MDA-MEC também aumentou a migração das MCF-7, em contraste com a baixa capacidade de migração dessas células quando cultivadas sobre sua própria MEC. A transição de um fenótipo epitelial para mesenquimal é um dos principais mecanismos na progressão do câncer, no qual as células tumorais diminuem os marcadores epiteliais e aumentam os marcadores mesenquimais, se

tornando mais migratórias e adquirindo um comportamento mais agressivo. Essas mudanças frequentemente estão correlacionadas com um maior potencial invasivo, aumento da incidência de metástase e pior prognóstico (Thiery e col., 2009).

O TGF- $\beta$  é uma citocina comumente expressa pela maioria das células tumorais, durante o desenvolvimento do câncer, incluindo as células tumorais de mama (Mamuya e Duncan, 2012). No caso das células MDAMB-231, aparentemente, não produzem TGF- $\beta$  suficiente para desencadear a TEM em células MCF-7, visto que a incubação dessas células com o meio condicionado obtido de culturas de MDAMB-231, não foi capaz de mudar a expressão de E-caderina nas MCF-7. Porém, sabe-se que as MECs têm a capacidade de regular a disponibilidade e a atividade de várias citocinas e fatores de crescimento, sequestrando e retendo esses mediadores, incluindo o TGF- $\beta$  (Cichon e Radisky, 2014). Assim, a MEC poderia secretar TGF- $\beta$  e as células MCF-7 responderiam a este fator. Contudo, descartando esta hipótese, nossos dados mostram que os efeitos da MDA-MEC sobre a expressão de marcadores de TEM em células MCF-7 parecem ser independentes da presença de TGF- $\beta$ , uma vez que o antagonista do receptor desta citocina não interferiu na TEM as células MCF-7, que mantiveram a diminuição de E-caderina.

Uma vez que as diferenças estruturais e de composição entre as duas matrizes tumorais poderiam estar levando à ativação de diferentes integrinas e vias de sinalização, interferindo na resposta celular relacionada à TEM (Xiong e col., 2013), investigamos se a MDA-MEC induziria uma mudança na sinalização dependente de integrinas nas células MCF-7. As integrinas são as principais moléculas de adesão que conectam a célula à matriz extracelular e a elas tem sido atribuído um papel importante na TEM de células tumorais (Levental e col., 2009; Kusuma e col., 2012; Pal e col., 2014; Cichon e Radisky, 2014). A ativação de integrinas leva à ativação de FAK, e o posterior recrutamento de proteínas adaptadoras, promovendo a polimerização de F-actina e de pontos de adesão focal (Mitra e col., 2005; Burridge e Guilluy, 2015). As células MCF-7 em contato com sua própria MEC apresentaram marcação cortical de actina com formação de pontos de adesão de co-localização de actina-vinculina. A adesão forte à MEC, caracterizada pela organização de F-actina na borda celular e pontos de adesão focal detectados nas células MCF-7 controles, estabiliza o movimento celular aumentando a tração entre as células, mantendo um fenótipo mais epitelial (Haass e col., 2005; Burridge e Guilluy, 2015). Observamos que o contato das células MCF-7 com a MDA-MEC aumentou a formação de fibras de estresse e induziu uma morfologia fusiforme com presença de lamelipódios com pontos de adesão focal, que estariam

envolvidos com o aumento da mobilidade celular (Haass e col., 2005; Burridge e Guilluy, 2015). A maior formação de fibras de estresse induzida pela interação com a MDA-MEC caracteriza a alteração para um perfil mais migratório das células MCF-7, contribuindo para o aumento de sua capacidade invasiva e migratória (como demonstrado nos ensaios de migração em *transwell*) e bem diferente do perfil basal das células MCF-7 (Gaggiolli e col., 2007; Burridge e Guilluy, 2015). Este efeito foi acompanhado por um aumento na expressão de FAK fosforilada nas células MCF-7 que foram semeadas sobre a MDA-MEC. A ativação da FAK em diferentes resíduos de tirosina modula a atividade mecano-receptora das integrinas, associada à mobilização do citoesqueleto de actina e a ativação de outras vias de sinalização envolvidas com diferentes funções celulares. A fosforilação de FAK especificamente no resíduo Tyr397 leva à ativação de vias canônicas como a da PI3K/AKT e a das MAPK/ERK, que regulam desde a migração celular, à produção de fatores de crescimento, diferenciação e a sobrevivência celular (Cantley, 2002; Liu e col., 2009). Nas células tumorais, algumas dessas vias apresentam-se constitutivamente ativadas, podendo aumentar a capacidade de invasão e metástase (Martini e col., 2013).

Trabalhos recentes mostram que a indução da TEM pode ocorrer por vias independentes da via clássica de ativação o do receptor do TGF- $\beta$ , que incluem a ativação de ERK e AKT, levando à TEM através de um *crosstalk* entre integrinas e receptores do TGF- $\beta$  (Chan e col., 2015; Gonzalez e Medici, 2014). Mostramos que as células MCF-7 estimuladas pela MDA-MEC e pela MCF-MEC na presença de TGF- $\beta$  aumentaram significativamente a fosforilação de AKT e de ERK, em comparação ao grupo das células MCF-7 cultivadas sobre a sua própria MEC. Esses dados mostram que o contato das células MCF-7 com a MDA-MEC induz vias de sinalização intracelulares que estão constantemente aumentadas em tumores e que estão envolvidas com aumento de migração e sobrevivência das células tumorais.

Em paralelo, analisamos também a expressão de mediadores da via canônica do receptor do TGF- $\beta$  nas células MCF-7 semeadas sobre a MDA-MEC. O TGF- $\beta$  não aumentou a fosforilação de SMAD2 em 72h, porque essa provavelmente ocorre em tempos anteriores ao analisado (72h), na presença de TGF- $\beta$ . O fato de observarmos um aumento nos níveis de SMAD4 nuclear no grupo TGF- $\beta$ , no mesmo tempo, corrobora com essa hipótese. A fosforilação de SMAD2 em 72h foi observada apenas nas células MCF-7 cultivadas sobre a MDA-MEC, aumentando também a expressão de SMAD4 nuclear. Quando SMAD4 é translocada para o núcleo, induz a expressão de SNAIL1, que se liga ao promotor do gene da E-caderina (*CDH1*), suprimindo a expressão de E-caderina. SMAD4 também aumenta a

expressão de outros fatores repressores de E-caderina, como *ZEB 1 e 2*, *SLUG* e *TWIST* (Massagué, 2012; Gonzalez e Medici, 2014). O aumento da expressão de *TWIST* nas células MCF-7 sobre a MDA-MEC foi observado nesse trabalho. Esses dados sugerem um possível mecanismo de transativação entre os receptores de integrinas e o receptor de TGF- $\beta$  que irão culminar na diminuição da expressão de E-caderina e, conseqüentemente, a TEM. Para confirmarmos a importância da ativação das vias ERK e AKT para a TEM e o *crosstalk* com o receptor TGF- $\beta$ , podemos ainda futuramente tratar as células MCF-7 semeadas sobre a MDA-MEC com inibidores dessas vias canônicas de integrinas e observar a expressão de E-caderina e SMAD2 fosforilada. Caso a expressão de E-caderina aumente e SMAD2 fosforilada diminua, está confirmada a participação dessas vias. Apesar de não termos utilizado inibidores das vias ERK e AKT, utilizamos um bloqueador da atividade das integrinas, que, possui como via canônica a ativação de diversas proteínas, dentre elas FAK, ERK e AKT.

Portanto, para investigar a relevância das integrinas na modulação dos efeitos induzidos pelas matrizes derivadas de células tumorais, nós tratamos as células MCF-7 com RGD, um tripeptídeo sintético reconhecido pela maioria das integrinas presentes nas células tumorais, sendo capazes de bloquear a ativação desses receptores (Marelli e col., 2013). Esses ligantes de integrina são considerados promissores para novos tratamentos que visam atacar diretamente as células tumorais e as células do microambiente tumoral (Nieberler e col., 2017). Na Figura 21, painel A, observamos que as células MCF-7 semeadas sobre a MCF-MEC na presença do TGF- $\beta$  (controle positivo) apresentam um esperado aumento na proliferação, uma vez que essa é uma consequência das células que sofrem TEM, que aumentam o seu potencial proliferativo e migratório (Kalluri e Weinberg, 2009). Ainda nessa figura, vimos que o tratamento das células MCF-7 semeadas sobre a MDA-MEC com RGD não interferiu na adesão dessas células e também impediu a diminuição da expressão de E-caderina, mantendo os contatos célula-célula. Além disso, o tratamento com RGD também diminuiu a fosforilação de SMAD2 nas células MCF-7 sobre a MDA-MEC, revelando uma transativação entre integrinas e o receptor do TGF- $\beta$ , desencadeando a TEM.

Ainda com relação ao tratamento com RGD também é possível que esse tripeptídeo induza a clivagem do complexo de latência do TGF- $\beta$ , ativando o TGF- $\beta$  que estava ancorado na MEC ou presente no meio condicionado em nosso modelo (Nieberler e col., 2017). Esse fato pode justificar o aumento significativo da fosforilação de SMAD2 nas células MCF-7 tratadas com TGF- $\beta$  sobre a MCF-MEC, diferente da resposta vista na ausência do RGD. É



importante frisar que apesar de o RGD favorecer a ativação de TGF- $\beta$ , que pode estar ancorado à MDA-MEC, podendo levar a uma ativação de seus receptores, observamos diminuição significativa de SMAD2 fosforilada nas células MCF-7 cultivadas sobre a MDA-MEC na presença de RGD.

Oito tipos diferentes de integrinas reconhecem o tripeptídeo RGD em contato com proteínas de MEC, são elas:  $\alpha\beta1$ ,  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$ ,  $\alpha\beta6$ ,  $\alpha\beta8$ ,  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha8\beta1$  e  $\alpha\text{IIb}\beta3$ . A participação da integrina  $\alpha\beta6$  já foi reportada como mau prognóstico para câncer de mama (Moore e col., 2014). Katoh e colaboradores (2013) observaram aumento da expressão da integrina  $\alpha\beta6$  em células MCF-7 em contato com TN-C solúvel, que é a proteína de MEC mais aumentada na MDA-MEC. A ligação da integrina com o sítio RGD presente nas proteínas de MEC depende da conformação estrutural e espacial de cada proteína presente em uma MEC de tecido. A organização das proteínas na MEC expõe e também esconde esses resíduos RGD, modulando dessa forma a resposta nas células que estão em contato com essa MEC (Nieberler e col., 2017). A sequência Arg-Gly-Asp é descrita por ser altamente conservada e presente nas proteínas de MEC fibronectina, vitronectina, osteopontina, laminina e tenascina-C (Nieberler e col., 2017). Dessa forma, quando adicionamos o RGD no nosso modelo, modificamos as respostas nas células MCF-7 que seriam disparadas no contato com as proteínas de MEC VT, OPN, LN e TN-C, que possuem expressão aumentada na MDA-MEC, além de outras proteínas que não analisamos. É importante salientar também que existem integrinas que reconhecem outros sítios de ligação, diferentes ao do RGD (Bazan-Socha e col., 2004). Esse fato pode justificar o motivo pelo qual a adição de RGD não modificou a adesão das células MCF-7 à MDA-MEC. Coletivamente, toda essa diversidade de proteínas de MEC e de receptores de integrina envolvidos nessa relação entre a célula MCF-7 e a MDA-MEC são os responsáveis pelas mudanças nas vias de sinalização celular, culminando na TEM dessas células e contribuindo para o aumento da metástase.

É importante lembrar que o câncer de mama é o que mais mata as mulheres. Existem terapias na clínica que apresentam uma boa resposta, dependendo do subtipo celular predominante presente na massa tumoral. Hoje, apenas o subtipo basal não possui uma terapia eficiente (Bertucci e Birnbaum, 2008). Porém, a massa tumoral não é homogênea. Sendo assim, mesmo em tumores que apresentam a predominância de células luminais ou HER2, pode existir uma porção de células com características basais. Essas células basais podem influenciar o comportamento das células menos agressivas, podendo ser as responsáveis por uma resposta não eficaz aos tratamentos convencionais ou até por recidivas. Neste trabalho

procuramos entender mais profundamente o efeito da interação da MDA-MEC em contato com as células MCF-7, analisando a expressão gênica global dessa célula. Dessa forma, pretendíamos fazer uma varredura de todos os processos biológicos modificados relacionados ou não com a TEM com o intuito de identificar possíveis novos marcadores moleculares relacionados ao prognóstico dos pacientes, buscando resultados clínicos mais precisos e mais opções de tratamento para o câncer de mama. A metodologia de avaliação de expressão gênica global mais empregada em pesquisa em câncer é o microarranjo de DNA (Amaratunga e col., 2007).

Dados preliminares do *microarray* mostram genes diferencialmente expressos nas células MCF-7 em contato com a MDA-MEC, em comparação com a MCF-MEC. Encontramos aumentados alguns importantes para a adesão célula-MEC e TEM, como a integrina  $\beta 6$ , a moesina, a vimentina e a lactato desidrogenase B.

A subunidade  $\beta 6$  da integrina geralmente se associa à subunidade  $\alpha V$ , e se liga preferencialmente à vitronectina e tenascina-C, duas proteínas de MEC que estão aumentadas na MDA-MEC em comparação com a MCF-MEC, sendo que a tenascina-C é a proteína de MEC mais aumentada na MDA-MEC, dentre as proteínas estudadas. Além disso, um estudo utilizando proteína de MEC TN-C mostrou que a TEM é induzida nas MCF-7 através das integrinas  $\alpha\beta 6$  (Katoh e col., 2013; Moore e col., 2014), o que aumenta a evidência da participação dessa integrina, dentre outras, no nosso modelo. Provavelmente essa integrina deve ser a que mais tem a sua expressão aumentada nas células MCF-7 em contato com a MDA-MEC.

A moesina faz parte da família de proteínas ERM, que funcionam como link entre a membrana celular e o citoesqueleto de actina. A moesina está localizada nos filopódios e outras protusões celulares, tendo um papel importante no reconhecimento célula-célula, adesão e migração celular (Clucas e Valderrama, 2014). O aumento da expressão da moesina já foi descrita como um marcador de TEM em câncer de mama e pancreático (Wang e col., 2012; Clucas e Valderrama, 2014) e já foi descrito que o subtipo basal de câncer de mama apresenta uma alta expressão de moesina, podendo ser um marcador de mau prognóstico (Charafe-Jauffret e col., 2007). Esse marcador é interessante uma vez que a MCF-7 é uma célula positiva para os receptores de estrogênio e progesterona, portanto é uma célula luminal. Porém, em contato com a MDA-MEC essa célula passa a expressar moesina que além de ser um marcador mesenquimal, ainda é um marcador de célula basal, mostrando que essa célula adquire características mais invasivas e pode até mudar sua diferenciação.

A vimentina é um componente do citoesqueleto envolvida em processos migratórios, muito encontrada em células mesenquimais que sofreram TEM durante o processo metastático, por esse motivo é utilizada como marcador de células mesenquimais (Liu e col., 2015). A expressão de vimentina também foi avaliada nessa tese através de *western blot*, aonde também foi constatado o aumento dessa proteína nas células MCF-7 cultivadas sobre a MDA-MEC, em comparação com a MCF-MEC. Curiosamente as células MCF-7 são negativas para essa proteína, segundo o datasheet da ATCC<sup>®</sup>HTB-22<sup>™</sup>, mostrando que o contato com a MDA-MEC contribui para a malignidade e aumento do potencial metastático das células MCF-7.

Outro gene aumentado nas MCF-7 semeadas sobre a MDA-MEC foi a lactato desidrogenase B (*LDHB*), sua superexpressão já foi correlacionada com a progressão tumoral. Células tumorais aumentam a expressão de LDHB para produzir energia de forma mais eficiente e independente da fosforilação oxidativa, produzindo lactato a partir da molécula de piruvato, e assim conseguindo aumento de migração e metástase (Vander e col., 2009). Um estudo mostrou uma alta expressão de LDHB nos subtipos basais no câncer de mama (Dennison e col., 2013). Esse resultado sugere que as células MCF-7 cultivadas sobre a MDA-MEC também estão sofrendo uma reprogramação metabólica que é necessária para o aumento do potencial invasivo e migratório dessas células.

Quando observamos os genes que estão com baixa expressão nas células MCF-7 sobre a MDA-MEC, em comparação com a MCF-MEC, focamos no gene *DEPDC5*. Esse gene também está envolvido no metabolismo energético, como um componente do complexo GATOR1, que está envolvido com a inibição da sinalização da via mTORC1 em resposta a baixa concentração de aminoácidos. O complexo GATOR1 hidrolisa uma molécula de GTP, desacoplando RagA de mTORC1, que perde a sua atividade, desacelerando o crescimento celular (Deng e col., 2015). A baixa expressão da subunidade *DEPDC5* pode levar a uma inativação do inibidor GATOR1 e, portanto, uma ativação de mTORC1, levando ao aumento da via glicolítica e da síntese de proteínas e lipídeos, que corroboram para o crescimento e proliferação celular. A via de sinalização de mTORC1 está comumente ativada em diversos tipos de câncer (Vander e col., 2009). Portanto, o contato com a MDA-MEC também contribui para o crescimento e proliferação das células MCF-7, importante para a progressão tumoral.

A análise de expressão gênica global, apesar de ser preliminar, fornece um panorama de possibilidades e de novos alvos a serem estudados. Porém, uma análise mais detalhada

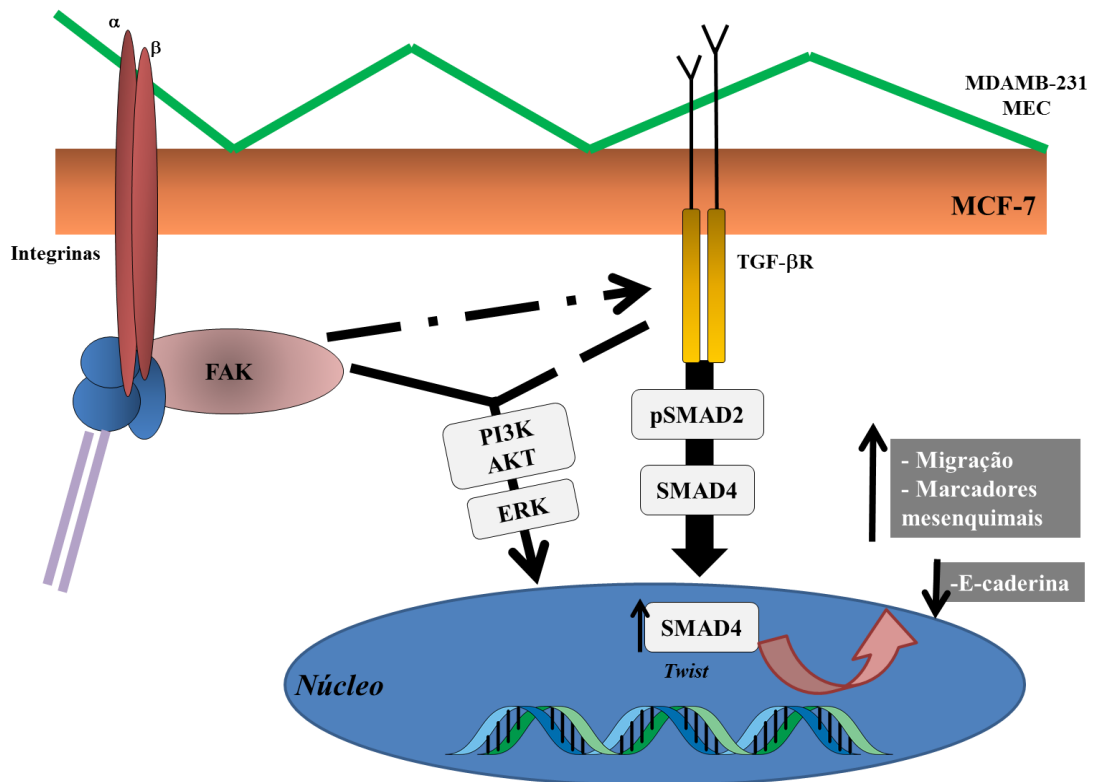
sobre os genes citados e as vias de sinalização envolvidas ainda precisa ser feita. Muitos pseudogenes e miRNAs são marcadores tumorais e a expressão deles também controla finamente todas as etapas do desenvolvimento tumoral. Alguns miRNAs e pseudogenes já são considerados biomarcadores para câncer de pulmão, por exemplo (Poliseno e col., 2015; Tutar e col., 2016). Para confirmar a participação de todos esses genes e conseguirmos diferenças estatísticas entre os grupos é necessário técnicas complementares, como o qRT-PCR de cada gene.

Os dados apresentados nessa tese representam uma importante contribuição para o entendimento dos mecanismos relacionados à adesão célula-célula e célula-MEC, através de integrinas, envolvidos durante o processo de TEM, necessário para o desenvolvimento de metástase no câncer de mama. A presença das proteínas de MEC, TN-C, OPN, LN e VT, além de outras que não foram analisadas nessa tese e que compõem a MEC da célula mais metastática (MDAMB-231) ressalta a importância de todas essas proteínas em quantidades e estruturas distintas, disparando vias de sinalização que desencadeiam o processo de TEM. Dentre as integrinas que se ligam ao RGD, destacamos a participação da integrina  $\alpha\beta6$ , cujo envolvimento já foi reportado em estudos anteriores com células MCF-7, além de observarmos um aumento na expressão gênica dessa subunidade de integrina ( $\beta6$ ) nos dados do *microarray*. Porém, a participação especificamente dessa integrina no nosso modelo ainda precisa ser confirmada.

Como conclusão, a MEC produzida por uma linhagem de câncer de mama humana com alto potencial metastático induz, através da ativação de integrinas, a TEM, aumentando o potencial migratório das células MCF-7, favorecendo a metástase (Figura 22). A MDA-MEC ativa integrinas na superfície das células MCF-7, recrutando FAK e mobilizando o citoesqueleto de actina, aumentando o número de fibras de estresse e ativando as vias PI3K/AKT e MAPK/ERK. A ativação de integrinas também ativa *inside out* os receptores de TGF- $\beta$ . Essas vias de sinalização levam à translocação de SMAD4 para o núcleo, aonde também há um aumento na expressão do fator de transcrição *TWIST*, diminuindo a expressão de E-caderina, aumentando os marcadores mesenquimais e promovendo a migração e metástase das células MCF-7 (Figura 22).

O estudo pode ajudar na identificação de novos biomarcadores para prognóstico do câncer de mama ou ajudar ainda na procura por novas ferramentas para terapias antimetastáticas e desenho de drogas anticâncer.

Figura 22 – Mecanismo proposto nas células MCF-7 cultivadas sobre a MDA-MEC



Legenda: MDA-MEC ativa integrinas na superfície das células MCF-7, recrutando FAK e promovendo a reorganização do citoesqueleto de actina, aumentando o número de fibras de estresse. FAK pode também ativar as vias PI3K/AKT e MAPK/ERK nessas células. Além disso, FAK pode ativar receptores de TGF- $\beta$ , ativando vias canônicas e não-canônicas desses receptores. Essas vias de sinalização levam à translocação de SMAD4 para o núcleo e estão associados com um aumento na expressão do fator de transcrição *Twist*, diminuindo a expressão de E-caderina e desencadeando o aumento de marcadores mesenquimais, promovendo a migração das células MCF-7.

## CONCLUSÃO

- a) A MEC obtida das células MDAMB-231 apresenta composição proteica diferente da MEC obtida das células MCF-7, rica em tenascina-C, laminina, vitronectina e osteopontina;
- b) A MEC obtida das células MDAMB-231 é capaz de desencadear a TEM nas células MCF-7;
- c) A MEC obtida das células MDAMB-231 aumenta a capacidade migratória das células MCF-7;
- d) A MDA-MEC induz a ativação de integrinas nas células MCF-7, ocasionando o recrutando FAK, aumentando o número de fibras de estresse e ativando as vias PI3K/AKT e MAPK/ERK. A ativação de integrinas nas células MCF-7 também leva a uma ativação *inside out* dos receptores de TGF- $\beta$ . Essas vias de sinalização levam à translocação de SMAD4 para o núcleo, aonde também há um aumento na expressão do fator de transcrição *TWIST*, diminuindo a expressão de E-caderina e aumentando marcadores mesenquimais nas células MCF-7;
- e) O contato das células MCF-7 com a MDA-MEC modificou a expressão de genes relacionados à adesão célula-MEC, migração, TEM e progressão tumoral.

## REFERÊNCIAS

- Adhikary A, Chakraborty S, Mazumdar M, Ghosh S, Mukherjee S. *et al.* Inhibition of epithelial to mesenchymal transition by E-cadherin up-regulation via repression of slug transcription and inhibition of E-cadherin degradation: dual role of scaffold/matrix attachment region-binding protein 1 (SMAR1) in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2014; 289(37):25431-44.
- Akhurst RJ. Targeting TGF- $\beta$  Signaling for Therapeutic Gain. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2017. pii: a022301.
- Al Moustafa AE, Achkhar A, Yasmeeen A. EGF-receptor signaling and epithelial-mesenchymal transition in human carcinomas. *Frontiers in bioscience.* 2012;4:671-84
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula.* 5. ed. Brasil: Artmed; 2010.
- Allen M, Louise JJ. Jekyll and Hyde: The role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Phatol.* 2011;223(2):162-76
- Alves TR, da Fonseca AC, Nunes SS, da Silva AO, Dubois LG. *et al.* Tenascin-C in the extracellular matrix promotes the selection of highly proliferative and tubulogenesis-defective endothelial cells. *Experimental Cell Res.* 2011;317(15):2073-85.
- Amaratunga D, Cabrera J, Kovtun V. Microarray learning with ABC. *Biostatistics.* 2008 ;9(1):128-36.
- Avizienyte E, Frame MC. Src and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17(5):542-7.
- Baker KA, Hagg T. Developmental and injury-induced expression of alpha1beta1 and alpha6beta1 integrins in the rat spinal cord. *Brain Research.* 2007; 1130(1):54-66.
- Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 13):3015-24.
- Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor  $\beta$ -mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:36803–36810.
- Barcus CE, Holt EC, Keely PJ, Elicieri KW, Shuler LA. Dense collagen-I matrices enhance pro-tumorigenic estrogen-prolactin crosstalk in MCF-7 and T47D breast cancer cells. *PLoS One.* 2015; 10(1):e0116891.
- Bazan-Socha S, Kisiel DG, Young B, Theakston RD, Calvete JJ. Structural requirements of MLD-containing disintegrins for functional interaction with alpha 4 beta 1 and alpha 9 beta1 integrins. *Biochemistry.* 2004. 43(6):1639-47.

- Benton G, Crooke E, George J. Laminin-1 induces E-cadherin expression in 3-dimensional cultured breast cancer cells by inhibiting DNAmethyltransferase 1 and reversing promoter methylation status. *FASEB J.* 2009;23(11):3884-95.
- Bertucci F, Birnbaum D. Reasons for breast cancer heterogeneity. *J Biol.* 2008;7(2):6.
- Bhowmick NA, Zent R, Ghiassi M, McDonnell M, Moses HL. Integrin beta 1 signaling is necessary for transforming growth factor-beta activation of p38MAPK and epithelial plasticity. *J Biol Chem.* 2001;276(50):46707-13.
- Bill R, Christofori G. The relevance of EMT in breast cancer metastasis: Correlation or causality? *FEBS Lett.* 2015;589(14):1577-87.
- Bissell MJ, Weaver VM, Lelièvre SA, Wang F, Petersen OW, Schmeichel KL. Tissue structure, nuclear organization, and gene expression in normal and malignant breast. *Cancer Res.* 1999 ;59(7 Suppl):1757-1763s
- Black HS. The defensive role of antioxidants in skin carcinogenesis. *Oxidative Stress in Dermatology.* 1993 243-69.
- Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin SF, Dunning MJ, *et al.* MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol* 2007, 8:R214.
- Bolós V, Gasent JM, López-Tarruella S, Grande E. The dual kinase complex FAK-Src as a promising therapeutic target in câncer. *Onco Targets Ther.* 2010;3:83-97.
- Brandão-Costa RM, Helal-Neto E, Saldanha-Gama R, Ribeiro-Pereira C, Midlej V, Benchimol M, *et al.* Priming endothelial cells with a melanoma-derived extracellular matrix triggers the activation of  $\alpha_v\alpha_3$ /VEGFR2 axis. *J. Cell Physiol.* 2016. 9999; 1-10.
- Brunton VG, Avizienyte E, Fincham VJ, Serrels B, Metcalf CA, Sawyer TK, *et al.* Identification of Src-specific phosphorylation site on focal adhesion kinase: dissection of the role of Src SH2 and catalytic functions and their consequences for tumor cell behavior. *Cancer Res.* 2005; 65(4):1335-42.
- Burrige K, Guilluy C. Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Exp Cell Res.* 2015; pii: S0014-4827(15)30131-2.
- Campbell NE, Kellenberger L, Greenaway J, Moorehead RA, Linnerth-Petrik NM. *et al.* Extracellular matrix proteins and tumor angiogenesis. *Journal of Oncology.* 2010; 53(5); 586-96.
- Canel M, Serrels A, Frame MC, Brunton VG. E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J Cell Sci.* 2013; 126 (Pt 2):393-401
- Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 2002; 296(5573):1655-7.



- Castelló-Cros R, Khan DR, Simons J, Valianou M, Cukierman E. Staged stromal extracellular 3D matrices differentially regulate breast cancer cell responses through PI3K and beta1-integrins. *BMC Cancer*. 2009;9:94.
- Cecilio AP, Takakura ET, Jumes JJ, Dos Santos JW, Herrera AC, Victorino VJ, *et al*. Breast cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2015;7:43-9.
- Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:563-72.
- Chan KK, Matchett KB, McEnhill PM, El HD, McMullin MF, El-Tanani Y. Protein deregulation associated with breast cancer metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26(4):415-23.
- Charafe-Jauffret E, Monville F, Bertucci F, Esterni B, Ginestier C. *et al*. Moesin expression is a marker of basal breast carcinomas. *Int. J. Cancer*. 2007 121, 1779-1785.
- Chen L, Xiao Z, Meng Y, Zhao Y, Han J, Su G *et al*. The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs. *Biomaterials*. 2012; 33(5):1437-44.
- Chia J, Kusuma N, Anderson R, Parker B, Bidwell B, Zamurs L, *et al*. Evidence for a role of tumor-derived laminin-511 in the metastatic progression of breast cancer. *Am J Pathol*. 2007;170(6):2135-48.
- Chiquet-Ehrismann R, Kalla P, Pearson CA. Participation of tenascin and transforming growth factor-beta in reciprocal epithelial-mesenchymal interactions of MCF7 cells and fibroblasts. *Cancer Res*. 1989;49(15):4322-5.
- Chuthapishith S, Eremin J, El-Sheemey M, Eremin O. Breast cancer chemoresistance: emerging importance of cancer stem cells. *Surg Oncol*. 2010;19(1):27-32.
- Cichon MA, Radisky DC. Extracellular matrix as a contextual determinant of transforming growth factor- $\beta$  signaling in epithelial-mesenchymal transition and in cancer. *Cell Adh Migr*. 2014;8(6):588-94.
- Clucas J, Valderrama F. ERM proteins in cancer progression. *J Cell Sci*. 2014;127(Pt 2):267-75.
- Cox TR, Ertler JT. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: Implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech*. 2011;4(2):165-78.
- Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, *et al*. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 2012; 486: 346-352.

Davis GE, Senger DR. Endothelial Extracellular Matrix Biosynthesis, Remodeling, and Functions During Vascular Morphogenesis and Neovessel Stabilization. *Circulation Research*. 2005;97(11):1093-107.

Deng L, Jiang C, Chen L, Jin J, Wei J, Zhao L. *et al*. The ubiquitination of rag A GTPase by RNF152 negatively regulates mTORC1 activation. *Mol Cell*. 2015;58(5):804-18.

Dennison JB, Molina JR, Mitra S, González-Angulo AM, Balko JM. *et al*. Lactate dehydrogenase B: a metabolic marker of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19(13):3703-13.

El-Bacha T, de Freitas MS, Sola-Penna M. Cellular distribution of phosphofructokinase activity and implications to metabolic regulation in human breast cancer. *Mol Genet Metab*. 2003; 79(4): 294-99.

Fantozzi A, Gruber DC, Pisarsky L, Heck C, Kunita A, Yilmaz M. VEGF-mediated angiogenesis links EMT-induced cancer stemness to tumor initiation. *Cancer Res*. 2014 ;74(5):1566-75.

Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annual review of cell and developmental biology*. 2005;21:659-93.

Froni L, Vasuri F, Valente S, Gualandi C, Focarete ML, Caprara G *et al*. The role of 3D microenvironmental organization in MCF-7 epithelial-mesenchymal transition after 7 culture days. *Exp Cell Res*. 2013;319(10):1515-22.

Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*. 1994;124(4):619-26.

Gallier AJ, Schiemann WP. Beta3 integrin and Src facilitate transforming growth factor-beta mediated induction of epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res*. 2006;8(4):R42.

Gentry LE, Nash BW. The pro domain of pre-pro-transforming growth factor beta 1 when independently expressed is a functional binding protein for the mature growth factor. *Biochemistry*. 1990 ;29(29):6851-7.

Giampieri S, Manning C, Hooper S, Jones L, Hill CS, Sahai E. Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol*. 2009;11(11):1287-96.

Giancotti FG, Rouslahti E. Integrin signaling. *Science*. 1999;285(5430):1028-32.

Giancotti FG, Tarone G. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003; 19:173-206.

Giannelli G, Bergamini C, Fransvea E, Sgarra C, Antonaci S. Laminin-5 with transforming growth factor-beta1 induces epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2005;129(5):1375-83.

Gil D, Ciołczyk-Wierzbicka D, Dulińska-Litewka J, Zwawa K, McCubrey JA, Laidler P. The mechanism of contribution of integrin linked kinase (ILK) to epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Adv Enzyme Regul.* 2011;51(1):195-207.

Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal.* 2014;7(344):re8.

Gort EH, Groot AJ, van der Wall E, van Diest PJ, Vooijs MA. Hypoxic regulation of metastasis via hypoxia-inducible factors. *Current Molecular Medicine.* 2008; 8 (1):60-7.

Greenburg G, Hay ED. Cytoskeleton and thyroglobulin expression. Change during transformation of ghyroid epithelium to mesenchyme-like cells. *Development.* 1988;102(3):605-22.

Gu M, Zheng X. Osteopontin and vasculogenic mimicry formation are associated with response to neoadjuvant chemotherapy in advanced breast cancer. *Onco Targets Ther.* 2017. 10:4121-4127.

Guan JL. Integrin signaling through FAK in the regulation of mammary stem cells and breast cancer. *IUBMB Life.* 2010; 62(4): 268-76.

Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(8):622-34.

Gupta SK, Oommen S, Aubry MC, Williams BP, Vlahakis NE. Integrin  $\alpha 9 \beta 1$  promotes malignant tumor growth and metastasis by potentiating epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene.* 2013; 32(2):141-50.

Haass NK, Smalley KS, Li L, Herlyn M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.* 2005; 18 (3): 150-59.

Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res.* 2002 62, 1613–1618.

Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell.* 2012;21:309–322.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011; 144(5):646-74.

Hancox RA, Allen MD, Holliday DL, Edwards DR, Pennington CJ, Guttery DS, *et al.* Tumour-associated tenascin-C isoforms promote breast cancer cell invasion and growth by matrix metalloproteinase-dependent and independent mechanisms. *Breast Cancer Res.* 2009;11(2):R24

Hao W, Zhang X, Xiu B, Yang X, Hu S. *et al.* Vitronectin: a promising breast cancer serum biomarker for early diagnosis of breast cancer in patients. *Tumour Biol.* 2016 37(7):8909-16.

Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta anatomica*. 1995; 154(1):8-20.

Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal*. 2011 23(10):1515-27.

Howlett AR, Bailey N, Damsky C, Petersen OW, Bissell MJ. Cellular growth and survival are mediated by beta 1 integrins in normal human breast epithelium but not in breast carcinoma. *J Cell Sci*. 1995;108 ( Pt 5):1945-57.

Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelialmesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 2005, 17:548–558

Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002; 110(6):673-87.

Ilunga K, Nishiura R, Inada H, El-Karef A, Imanaka-Yoshida K, Sakakura T, *et al*. Co-stimulation of human breast cancer cells with transforming growth factor-beta and tenascin-C enhances matrix metalloproteinase-9 expression and cancer cell invasion. *Int J Exp Pathol*. 2004;85(6):373-9.

Ingber DE. Tensegrity-based mechanosensing from macro to micro. *Prog Biophys Mol Biol*. 2008;97(2-3):163-79.

Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2018 [Internet]. Rio de Janeiro; 2018 [acesso em 2018 fevereiro 08]. Disponível em: [www1.inca.gov.br](http://www1.inca.gov.br)

Ishihara A, Yoshida T, Tamaki H, Sakakura T. Tenascin expression in cancer cells and stroma of human breast cancer and its prognostic significance. *Clin Cancer Res*. 1995;1(9):1035-41.

International Agency for Research on Cancer. Breast Cancer and Screening [Internet]. Rio de Janeiro; 2018 [acesso em 2018 fevereiro 08]. Disponível em: [www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/prev/handbook7/Handbook7\\_Breast-1.pdf](http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/prev/handbook7/Handbook7_Breast-1.pdf)

Jahkola T, Toivonen T, Virtanen I, von Smitten K, Nordling S, von Boguslawski K, *et al*. Tenascin-C expression in invasion border of early breast cancer: a predictor of local and distant recurrence. *Br J Cancer*. 1998;78(11):1507-13.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2007; 57(1): 43-66.

Jin X, Mu P. Targeting Breast Cancer Metastasis. *Breast Cancer (Auckl)*. 2015 Sep 1;9(Suppl 1):23-34.

Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:239–252.

Kadar A, Tőkés AM, Kulka J, Robert L. Extracellular matrix components in breast carcinomas, *Semin. Cancer Biol.*, 2002; 12 243-57.

Kalembeiyi I, Inada H, Nishiura R, Imanaka-Yoshida K, Sakakura T, Yoshida T. Tenascina-C upregulates matrix metalloproteinase-9 in breast cancer cells: direct and synergistic effects with transforming growth factor beta 1. *Int J Cancer*. 2003; 105(1):53-60.

Kalluri R, Neilson, EG. Epithelial mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest*. 2003; 112:1776–1784.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420-8.

Katoh D, Nagaharu K, Shimojo N, Hanamura N, Yamashita M, Kozuka Y *et al*. Binding of  $\alpha v \beta 1$  and  $\alpha v \beta 6$  integrins to tenascin-C induces epithelial-mesenchymal transition-like change of breast cancer cells. *Oncogenesis*. 2013;2:e65.

Kenny PA, Lee GY, Bissell MJ. Targeting the tumor microenvironment. *Front Biosci*. 2007; 1;12:3468-74.

Kim BJ, Zhao S, Bunaciu RP, Yen A, Wu M. A 3D in situ cell counter reveals that breast tumor cell (MDA-MB-231) proliferation rate is reduced by the collagen matrix density. *Biotechnol Prog*. 2015 ;31(4):990-996.

Kimbung S, Loman N, Hedenfalk I. Clinical and molecular complexity of breast cancer metastases. *Semin Cancer Biol*. 2015;35:85-95.

Koch S, Tugus S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. *Biochem J*. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. 2011; 437(2):169-83.

Koenig A, Mueller C, Hasel C, Adler G, Menke A. Collagen type I induces disruption of E-cadherin-mediated cell-cell contacts and promotes proliferation of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res*. 2006;66(9):4662-71.

Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff AK. Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2005;24(2):195-222.

Kusuma N, Denoyer D, Eble JA, Redvers RP, Parker BS, Pelzer R, *et al*. Integrin-dependent response to laminin-511 regulates breast tumor cell invasion and metastasis. *Int J Cancer*. 2012;130(3):555-66.

Leone JP, Leone BA. Breast cancer brain metastases: the last frontier. *Exp Hematol Oncol*. 2015;4:33.

Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Ertler JT, *et al*. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*. 2009;139(5):891-906.

Li X, Ma Q, Xu Q, Duan W, Lei J, Wu E. Targeting the Cancer-Stroma Interaction: A Potential Approach for Pancreatic Cancer Treatment. *Curr Pharm Des*. 2012;18(17):2404-15.

- Liddington RC, Ginsberg MH. Integrin activation takes shape. *J Cell Biol.* 2002; 158(5):833-9.
- Lim ST, Chen XL, Lim Y, Hanson DA, Vo TT, Howerton K. *et al.* Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Mol Cell.* 2008; 29(1):9-22.
- Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest.* 2007;117(5):1175-83.
- Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2009;8(8):627-44.
- Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH. Integrin cytoplasmic-domain binding proteins. *J Cell Sci.* 2000; 113 ( Pt 20):3563-71.
- Liu CY, Lin HH, Tang MJ, Wang YK. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget.* 2015;6(18):15966-83.
- Looning PE. Breast cancer prognostication and prediction: are we making progress? *Annals of oncology.* 2007;18 Suppl 8:viii3-7.
- Lü WD, Zhang L, Wu CL, Liu ZG, Lei GY, Liu *et al.* Development of an acellular tumor extracellular matrix as a three-dimensional scaffold for tumor engineering. *PLoS One.* 2014;9(7):e103672.
- Maity G, Choudhury PR, Sen T, Ganguly KK, Sil H, Chatterjee A. Culture of human breast cancer cell line (MDA-MB-231) on fibronectin-coated surface induces pro-matrix metalloproteinase-9 expression and activity. *Tumour Biol.* 2011;32(1):129-38.
- Mamuya FA, Duncan MK.  $\alpha$ V integrins and TGF- $\beta$ -induced EMT: a circle of regulation. *J Cell Mol Med.* 2012;16(3):445-55.
- Marastoni S, Ligresti G, Lorenzon E, Colombatti A, Mongiat M. Extracellular matrix: A matter of life and death. *Connective Tissue Research.* 2008; 49(3):203-06.
- Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol. Rev.* 2003; 83(2): 337-76.
- Marelli UK, Rechenmacher F, Sobahi TR, Mas-Moruno C, Kessler H. Tumor targeting via integrin ligands. *Front Oncol.* 2013;3:222.
- Martín de Civetta MT, Civetta JD. Carcinogenesis. *Salud Publica Mex.* 2011 53(5):405-14.
- Martini M, Ciruolo E, Gulluni F, Hirsch E. Targeting PI3K in cancer: any good news? *Frontiers in oncology.* 2013; 108(3): 1-9.

- McDonald PC, Fielding AB, Dedhar S. Integrin-linked kinase—Essential roles in physiology and cancer biology. *J. Cell Sci.* 2008; 121:3121–3132.
- McGuire A, Brown JA, Malone C, McLaughlin R, Kerin MJ. Effects of age on the detection and management of breast cancer. *Cancers (Basel)*. 2015 7(2):908-29.
- Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010;15(2):117–134.
- Midwood KS, Chiquet M, Tucker RP, Orend G. Tenascin-C at a glance. *J. Cell Sci.*, 2016; 129 4321-4327.
- Midwood KS, Orend G. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis, *J. Cell Commun. Signal.*, 2009; 3 287-310.
- Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: In command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005;6(1):56-68.
- Moore KM, Thomas GJ, Duffy SW, Warwick J, Gabe R. Therapeutic targeting of integrin  $\alpha v \beta 6$  in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(8).
- Nagaharu K, Zhang X, Yoshida T, Katoh D, Hanamura N, Kozuka Y, *et al.* Tenascin C induces epithelial-mesenchymal transition-like change accompanied by SRC activation and focal adhesion kinase phosphorylation in human breast cancer cells. *Am J Pathol.* 2011; 178(2):754-63.
- Nam BH, Kim SY, Han HS, Kwon Y, Lee KS, Kim TH, *et al.* Breast cancer subtypes and survival in patients with brain metastases. *Breast Cancer Res BCR.* 2008;10(1):R20.
- Nam JM, Onodera Y, Bissell MJ, Park CC. Breast cancer cells in three-dimensional culture display an enhanced radioresponse after coordinate targeting of integrin  $\alpha 5 \beta 1$  and fibronectin. *Cancer Res.* 2010;70(13):5238-48.
- Neubauer H, Ruoff A, Paessler N, Solomayer E, Wallwiener D, Fehm T. A laminin-rich basement membrane matrix influences estrogen receptor beta expression and morphology of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Oncol Rep.* 2009;21(2):475-81.
- Nguyen DX, Bos PD, Massague J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:274–84.
- Nguyen DX, Massague J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet.* 2007;8:341–52.
- Nieberler M, Reuning U, Reichart F, Notni J, Wester HJ. Exploring the Role of RGD-Recognizing Integrins in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2017;9(9). pii: E116.

- Niu Y, Zhang L, Bi X, Yuan S, Chen P. Evaluation of Vitronectin Expression in prostate cancer and the clinical significance of the association of vitronectin expression with prostate specific antigen in detecting prostate cancer, *Urol. J.*, 2016; 13 2527-32.
- Nyga A, Cheema U, Loizidou M. 3D tumour models: novel in vitro approaches to cancer studies. *J Cell Commun Signal.* 2011;5(3):239-48.
- Oliva IB, Coelho RM, Barcellos GG, Saldanha-Gama RF, Wermelinger LS, Marcinkiewicz C. *et al.* Effect of RGD-disintegrins on melanoma cell growth and metastasis: involvement of the actin cytoskeleton, FAK and c-Fos. *Toxicol.* 2007; 50(8)1053-63.
- Oskarsson T, Acharyya S, Zhang XH, Vanharanta S, Tavazoie SF, Morris PG, *et al.* Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nat Med.* 2011;17(7):867-74.
- Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* 1989;8(2):98-101.
- Pal S, Moulik S, Dutta A, Chatterjee A. Extracellular matrix protein laminin induces matrix metalloproteinase-9 in human breast cancer cell line mcf-7. *Cancer Microenviron.* 2014 ;7(1-2):71-8.
- Palena C, Hamilton DH, Fernando RI. Influence of IL-8 on the epithelial-mesenchymal transition and the tumor microenvironment. *Future oncology.* 2012;8(6):713-222012.
- Park CC, Zhang H, Pallavicini M, Gray JW, Baehner F, Park CJ, *et al.* Beta1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo. *Cancer Res.* 2006;66(3):1526-35.
- Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, *et al.* Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol.* 2009 27:1160e7.
- Pasquier J, Abu-Kaoud N, Al Thani H, Raffi A. Epithelial to Mesenchymal Transition in a Clinical Perspective. *J Oncol.* 2015 ;2015:792182.
- Peranzoni E, Rivas-Caicedo A, Bougherara H, Salmon H, Donnadieu E. Positive and negative influence of the matrix architecture on antitumor immune surveillance. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(23):4431-48.
- Perou CM, Sortie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406:747-752.
- Pietras K, Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res.* 2010;316(8):1324-31.
- Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* 2014 (12):1243-53.



- Poliseno L, Marranci A, Pandolfi PP. Pseudogenes in Human Cancer. *Front Med (Lausanne)*. 2015;2:68.
- Polyak K. Heterogeneity in breast cancer, *J. Clin. Invest.*, 2011 121 3786-3788.
- Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, *et al.* Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast Câncer. 2015;24 Suppl 2:S26-35.
- Ramovs V, Te Molder L, Sonnenberg A. The opposing roles of laminin-binding integrins in cancer. *Matrix Biol.* 2017;57-58:213-243.
- Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath.* 2013; 3(3):71-85.
- Rolli M, Fransvea E, Pilch J, Saven A, Felding-Habermann B. Activated integrin alphavbeta3 cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100 (16):9482-7
- Rudland OS, Platt-Higgins A, El-Tanani M, De Silva Rudland S, Barraclough R, Winstanley JH, *et al.* Prognostic significance of the metastasis-associated protein osteopontin in human breast cancer. *Cancer Res.* 2002; 62(12):3417-27.
- Saitoh Y, Kuratsu J, Takeshima H, Yamamoto S, Ushio Y, Expression of osteopontin in human glioma. Its correlation with the malignancy, *Lab. Invest.* 1995;72 55-63.
- Savagner P, Boyer B, Valles AM, Jouanneau J, Thiery JP. Modulations of the epithelial phenotype during embryogenesis and câncer progression. *Cancer Treat Res* 1994; 71: 229-249.
- Serrels A, Canel M, Brunton VG, Frame MC. Src/FAK-mediated regulation of E-cadherin as a mechanism for controlling collective cell movement: insights from in vivo imaging. *Cell Adh Migr.* 2011;5(4):360-5.
- Schiemann S, Schwirzke M, Br nner N, Weidle UH. Molecular analysis of two mammary carcinoma cell lines at the transcriptional level as a model system for progression of breast cancer. *Clin Exp Metastasis.* 1998; 16(2):129-39.
- Singh G, Singh SK, König A, Reutlinger K, Nye MD, Adhikary T, *et al.* Sequential activation of NFAT and c-Myc transcription factors mediates the TGF-beta switch from a suppressor to a promoter of cancer cell proliferation. *The journal of biological chemistry.* 2010; 27;285(35):27241-50.
- Sisci D, Aquila S, Middea E, Gentile M, Maggiolini M, Mastroianni F *et al.* Fibronectin and type IV collagen activate ERalpha AF-1 by c-Src pathway: effect on breast cancer cell motility. *Oncogene.* 2004;23(55):8920-30.
- Soucy PA, Romer LH. Endothelial cell adhesion, signaling and morphogenesis in fibroblast-derived matrix. *Matrix Biology.* 2009; 28(5): 273-83.

Spano D, Zollo M. Tumor microenvironment: a main actor in the metastasis process. *Clin Exp Metastasis*. 2012; 29(4):381-95.

Sperduto PW, Kased N, Roberge D, Chao ST, Shanley R, Luo X, *et al*. The effect of tumor subtype on the time from primary diagnosis to development of brain metastases and survival in patients with breast cancer. *J Neuro-Oncol*. 2013;112(3):467–72.

Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009;458(7239):719-24.

Streuli CH, Schmidhauser C, Bailey N, Yurchenco P, Skubitz AP, Roskelley C, *et al*. Laminin mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelia. *J Cell Biol*. 1995;129(3):591-603.

Su L, Mukherjee AB, Mukherjee BB. Expression of antisense osteopontin RNA inhibits tumor promoter-induced neoplastic transformation of mouse JB6 epidermal cells, *Oncogene*, 10 (1995) 2163-9.

ten Dijke P, Arthur HM. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(11):857-69.

Tham YL, Sexton K, Kramer R, Hilsenbeck S, Elledge R. Primary breast cancer phenotypes associated with propensity for central nervous system metastases. *Cancer*. 2006;107(4):696–704.

Thannickal VJ, Lee DY, White ES, Cui Z, Larios JM, Chacon R, *et al*. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta 1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem*. 2003; 278(14):12384-9.

Their JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nature Reviews Cancer*. 2002 vol. 2, no. 6, pp. 442–454.

Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2006; 7(2):131-42.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transition in development and disease. *Cell*. 2009, 139:871-890.

Tutar Y, Özgür A, Tutar E, Tutar L, Pulliero A. *et al*. Regulation of oncogenic genes by MicroRNAs and pseudogenes in human lung cancer. *Biomed Pharmacother*. 2016;83:1182-1190.

van Dijk M, Göransson SA, Strömlad S. Cell to extracellular matrix interactions and their reciprocal nature in cancer. *Exp Cell Res*. 2013 pii: S0014-4827(13)00062-1.

Vander MGH, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-33.

Vanharanta S, Massague J. Origins of metastatic traits. *Cancer Cell*. 2013;24:410–21.

Xie L, Law BK, Chytil AM, Brown KA, Aakre ME, Moses HL. Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro. *Neoplasia*. 2004 ;6(5):603-10.

Xiong JP, Stehle T, Zhang R, Joachimiak A, Frech M, Goodman SL, *et al*. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science*. 2002; 296:(5565):151-5.

Xiong J, Balcioglu HE, Danen EH. Integrin signaling in control of tumor growth and progression. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(5):1012-5.

Xiong G, Flynn TJ, Chen J, Trinkle C, Xu R. Development of an ex vivo breast cancer lung colonization model utilizing a decellularized lung matrix. *Integr Biol (Camb)*. 2015; 7(12):1518-25

Wan L, Pantel K, Kang Y. Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic. *Nat Med*. 2013;19:1450–64.

Wang J, Yang M, Li Y, Han B. The Role of MicroRNAs in the Chemoresistance of Breast Cancer. *Drug Dev Res*. 2015;76(7):368-74.

Wang TN, Qian X, Granick MS, Solomon MP, Rothman VL, Berger DH, *et al*. Thrombospondin-1 (TSP-1) promotes the invasive properties of human breast cancer. *J Surg Res*. 1996; 63(1):39-43.

Wang CC, Liau JY, Lu YS, Chen JW, Yao YT. *et al*. Differential expression of moesin in breast cancers and its implication in epithelial-mesenchymal transition. *Histopathology*. 2012; 61, 78-87

Wendt MK, Schiemann WP. Therapeutic targeting of the focal adhesion complex prevents oncogenic TGF-beta signaling and metastasis. *Breast Cancer Res*. 2009;11(5):R68.

Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson PC. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(7):512-22.

Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*. 2008;14:818-829.

Yonekawa K, Harlan JM. Targeting leukocyte integrins in human diseases. *Journal Leukocyte of Biology*. 2005; 77(2):129-40.

Yoshida T, Matsumoto E, Hanamura N, Kalembeiyi I, Katsuta K, Ishihara A, *et al*. Co-expression of tenascin and fibronectin in epithelial and stromal cells of benign lesions and ductal carcinomas in the human breast. *J Pathol*. 1997;182(4):421-8.

Yoshida T, Yoshimura E, Numata H, Sakakura Y, Sakakura T. Involvement of tenascin-C in proliferation and migration of laryngeal carcinoma cells. *Virchows Arch*. 1999;435(5):496-500.

Yoshida T, Akatsuka T, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C and integrins in cancer. *Cell Adh Migr.* 2015;9(1-2):96-104.

Yu L, Hébert MC, Zhang YE. TGF- $\beta$  receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF- $\beta$  responses. *EMBO J.* 2002; 21:3749–3759

Yue J, Zhang K, Chen J. Role of Integrins in Regulating Proteases to Mediate Extracellular Matrix Remodeling. *Cancer Microenviron.* 2012;5(3):275-83.

Zhang J, Liu J. Tumor stroma as targets for cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics.* 2013;137(2):200-15.

ANEXO - Artigo científico

***Extracellular matrix derived from human metastatic breast cancer mediates epithelial-mesenchymal transition in epithelial breast cancer cell through integrin activation***

**Renata M Brandão-Costa<sup>1</sup>, Edward Helal Neto<sup>1</sup>, Andreza Maia Vieira<sup>2</sup>, Pedro Barcellos de Souza<sup>3</sup>, José Andrez Morgado<sup>3</sup>, Christina Barja-Fidalgo<sup>1,#</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Cellular and Molecular Pharmacology, Department of Cell Biology, IBRAG, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratory of Endothelial Cell And Angiogenesis, IBRAG, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>3</sup>Laboratory of Cell Biology, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

#Corresponding author: Laboratory of Cellular and Molecular Pharmacology, Department of Cell Biology, IBRAG, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Av. 28 de Setembro 87 fundos, 5o andar. Vila Isabel – Rio de Janeiro – RJ – Brasil – 20551-030. Tel.: Tel.: 55 21 2868-8298; Fax: 55 21 2868-8629;

E-mail: barja-fidalgo@uerj.br

**Abstract**

Alterations in the composition and architecture of the extracellular matrix (ECM) can influence cancer growth and dissemination. ECM is a complex physical barrier that must be overcome by tumor cells to allow their escape from primary sites and invasion of tissues during metastasis. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a cellular process that allows a polarized epithelial cell to assume a mesenchymal cell phenotype, contributing to metastasis. During EMT, epithelial cells change their adhesion profiles from cell-cell contacts to mostly cell-matrix interactions. Breast cancer tumors usually present cells at different stages of differentiation that are able to produce distinct extracellular matrices. However, the contribution of ECM derived from metastatic tumor cells to EMT is unclear. We have evaluated the mechanisms involved in the effects resulting from the interaction of MCF-7, a low-metastatic epithelial breast cancer line, with the ECM produced by MDAMB-231, a high-metastatic breast tumor cell line. Our data show that compared to the ECM derived from MCF-7 (MCF-ECM), the matrix produced by MDAMB-231 cells (MDA-ECM) has considerably different composition, with higher tenascin-C, laminin, osteopontin, and

vitronectin contents and lower expression of fibronectin. The interaction with MDA-ECM induced morphological changes in MCF-7 cells, decreased the levels of epithelial markers, up-regulated mesenchymal markers and augmented cell migration. Induction of EMT was independent of the presence of TGF- $\beta$  and dependent on the direct contact of MCF-7 cells with MDA-ECM. These interactions triggered the activation of integrin-associated signaling, increasing the phosphorylation of FAK, ERK, and AKT and activating SMAD2 and SMAD4 nuclear translocation in MCF-7 cells. Blockage of integrins impaired the shift to the EMT profile induced by MDA-ECM, maintaining epithelial morphology and E-cadherin-mediated adhesions, and inhibited SMAD2 phosphorylation. Our findings revealed ECM derived from metastatic tumors as a trigger of EMT in breast cancer epithelial cells, mediated by integrin-associated signaling, leading to a mesenchymal cell transition. These data contribute to the understanding of adhesion-related interactions during breast cancer progression and may aid in the development of antimetastatic therapies.

### **Abbreviations**

MCF-ECM, Extracellular matrix-derived from the MCF-7 cell line; MDA-ECM, Extracellular matrix-derived from the MDAMB-231 cell line

### **Keywords**

breast cancer; extracellular matrix; epithelial-mesenchymal transition; integrin signaling

## **1. Introduction**

Breast cancer is a heterogeneous disease that exists in several clinical and histological forms, creating the need to determine the origin, molecular and cell alterations of breast cancer cells [1]. The diversity of subtypes implies that there may be different molecular targets and protocols for breast cancer therapy [2].

The major cause of death related to breast cancer is related to the high metastatic index of their tumor cells [3]. During metastasis, tumor epithelial cells must acquire a migratory profile assuming a mesenchymal phenotype. This epithelial to mesenchymal transition (EMT) encompasses a well-coordinated series of molecular changes that leads epithelial cells to lose E-cadherin expression, acquire increased vimentin and N-cadherin expression, and rearrange cortical actin structures, increasing their migratory capacity, characteristics of mesenchymal cells. [4,5]. Considered the main inductor of EMT in tumor cells, TGF- $\beta$  receptors regulate

both canonical and non-canonical pathways, including activation of focal adhesion kinase (FAK), ERK/MAPK and AKT signaling to induce the characteristic morphological and functional changes of EMT [6,7].

Crosstalk between TGF- $\beta$  receptors and other receptors, such as integrins, modulating EMT has already been reported [8]. Integrins are transmembrane adhesive receptors that are able to integrate cells into their microenvironment through their binding to extracellular matrix (ECM) [9]. Integrin activation modifies actin cytoskeleton dynamics, leading to integrin clustering in focal adhesion complexes and tyrosine phosphorylation of FAK [10]. Therefore, integrins can regulate different cell functions, including EMT, through their crosstalk with other membrane receptors [8,9]. In human breast cancer cells,  $\alpha\beta6$  and  $\alpha\beta1$  integrins mediate tenascin-C-induced EMT through a pathway that involves FAK phosphorylation and Src activation, a decrease in E-cadherin expression, and increased cell migration [11,12]. The switch from cell-cell contacts to tumor cell-ECM interactions is typical in EMT [13]. ECM is a dynamic three-dimensional combination of proteins, glycoproteins and proteoglycans [14] that acts as a scaffold, immobilizing soluble factors and coordinating signals transduced through both growth factors and integrin receptors [15]. Tumor-derived ECM can be remodeled by tumor cells that release MMPs, and modifications in its composition and architecture may influence cancer growth and dissemination [16]. Therefore, the specific association of cells with the ECM may provide contextual information that controls differentiation, migration, or survival [15]. Thus, the biochemical and biophysical properties of the ECM should be considered when examining tumor behavior and therapeutic interventions. Studies using isolated ECM components or tumor fragments have highlighted the role of individual ECM proteins on the breast tumor cell EMT-like phenotype favoring migration and metastasis [3,12,17-20].

Although it is known that certain matrix glycoproteins are up- or down-regulated in tumor matrices during cancer cell transformation [21], evidence of the direct effect of a breast cancer metastatic tumor-derived ECM on the activation of breast cancer cells with an epithelial phenotype is not available in the literature.

In the present work, we analyzed the effect of a decellularized, multi-component ECM derived from an aggressive human breast cancer cell line (MDAMB-231) on a human breast cancer cell line with an epithelial phenotype (MCF-7). Our results show that MDA-ECM triggers EMT in MCF-7 cells, decreasing cell-cell contacts and E-cadherin expression and

increasing the expression of mesenchymal cell markers and migration in MCF-7 cells. These effects were mediated by the crosstalk between integrin and TGF- $\beta$  pathways.

## 2. Results

### 2.1 Identification of ECM proteins in matrices produced by MCF-7 and MDAMB-231 cells

First, we identified some matrix glycoproteins in ECMs produced by MCF-7 and MDAMB-231 cell cultures. Data analysis showed that the two tumor cell-derived ECMs strongly differed in terms of the amounts of some ECM proteins. Relative to the content found in MCF-ECM, the matrix produced by MDAMB-231 cells presented increased levels of tenascin-C (TN-C), laminin (LN), osteopontin (OPN) and vitronectin (VT) (11.2-, 1.6-, 1.4- and 1.2-fold, respectively) and lower amounts of fibronectin (FN; 0.6-fold) (Figure 1).

### 2.2 MDA-ECM induces EMT-associated changes in MCF-7 cells

Specific ECM components have been shown to regulate morphological changes in MCF-7 cells and trigger EMT [11,12,19,23-25]. We demonstrated that after 72 h of culture on their own matrix (control), MCF-7 cells formed large clusters with tight intercellular connections (Figure 2 A). On the other hand, when cultured on their own ECM and treated with TGF- $\beta$ 1 or MDA-ECM for 72 hours, MCF-7 cells acquired a spindle-shaped morphology and lost cell-cell contacts (Figure 2 A). To further investigate whether MDA-ECM could induce EMT in MCF-7 cells, we analyzed the expression of epithelial and mesenchymal markers (Figure 2 B-G). Compared to the control group, positive control and MCF-7 cells seeded on MDA-ECM showed a decrease in E-cadherin expression (Figure 2B). Only MCF-7 cells cultured onto MDA-ECM for 72 h showed increased expression of N-cadherin,  $\alpha$ -SMA and fibronectin when compared to the control group (Figure 2 C-E). Seeding on MDA-ECM and TGF- $\beta$ 1 treatment also increased the expression of vimentin in MCF-7 cells (Figure 2 F). Notably, MDA-ECM also induced an increase in the expression of the transcriptional repressor *TWIST* in MCF7 cells (Figure 2 G), further supporting the idea that MDA-ECM induces EMT in MCF-7 cells

ECM can anchor a variety of molecules, including TGF- $\beta$  [15], which can induce EMT changes in certain breast cancer cells [12]. Thus, we considered whether the TGF- $\beta$  produced and released by MDAMB-231 cells could be, in part, sequestered by or anchored on



MDA-ECM and then regulate EMT changes observed in MCF-7 cells. To investigate this possibility, MCF-7 cells were cultured in conditioned medium harvested from MDAMB-231 cell cultures for 72 hours. This strategy did not decrease E-cadherin levels in MCF-7 cells (Figure 3 A). Furthermore, treatment with a TGF- $\beta$  receptor inhibitor (SB431542) did not interfere with the inhibitory effect of MDA-ECM on E-cadherin expression in MCF-7 cells (Figure 3 B). Consistently, in positive control SB431542 inhibited the direct effect of TGF- $\beta$ 1 on E-cadherin levels in MCF-7 cells (Figure 3 B). These results indicate that EMT was mediated by a direct effect of MDA-ECM on MCF-7 cells.

### *2.3 MDA-ECM induces migration in MCF-7 cells*

The loss of cell-cell adhesion structures and polarity leads to increasing motility and invasiveness of tumor epithelial cells [5,13,26]. We demonstrate that in addition to phenotypic alterations, the interaction with MDA-ECM induced MCF-7 cells to adopt a more migratory profile when compared to positive control (Figure 4).

### *2.4 MCF-7 cell interaction with MDA-ECM triggers integrin-associated signaling pathways*

Alterations in ECM composition are reported to influence the phenotype of different cell types present in the tumor microenvironment [14]. When cultured on MDA-ECM for 72 h, MCF-7 cells showed major alterations in the cytoskeleton dynamics, presenting stress fibers with lamellipodia and filopodia formation, characteristics of a migratory profile (Figure 5 A-3). This phenotype contrasts with that of the controls; MCF-7 cells cultured on MCF-ECM, with or without TGF- $\beta$ 1 presented a more cortical distribution of F-actin (Figure 5 A-1 and 2) and an increase in focal adhesion assembly (Figure 5 A-1).

Integrins coordinate interactions between cells and ECM, triggering adhesive signaling characterized by focal adhesion kinase (FAK) activation and the recruitment of the actin cytoskeleton; this is followed by a cascade of intracellular signals that are also involved in cell migration, proliferation and survival, including PI3K/AKT and MAPK/ERK pathway activation [27,28]. The involvement of integrins is suggested when MCF-7 cells cultured on MDA-ECM showed increased phosphorylation of FAK (Y397) (Figure 5B), AKT (S473) (Figure 5C) and ERK1/2 (Figure 5D).

Canonical and non-canonical TGF- $\beta$  receptor signaling pathways are reported to regulate EMT. PI3K, FAK and AKT, which are known to participate in integrin signaling, are involved in non-canonical activation of the TGF- $\beta$  receptor [29]. We observed that, parallel to integrin signaling activation, MDA-ECM also increased SMAD2 phosphorylation (S465-467) (Figure 5 E) and induced SMAD4 translocation to the nucleus (Figure 5 E-F) in MCF-7 cells.

### *2.5 Integrins modulate E-cadherin expression in MCF-7 cells cultured on MDA-ECM*

To confirm the contribution of integrins as mediators of EMT in our model, MCF-7 cells cultured on their own matrix, with or without TGF- $\beta$ 1 and MDA-ECM, were also treated with RGD peptide. The treatment with RGD impaired the effect of MDA-ECM on MCF-7 cells, maintaining high levels of E-cadherin and supporting the cell adhesive contacts (Figure 6 A and 6C). On the other hand, the effect of TGF- $\beta$ 1 in lowering E-cadherin expression and changing the cell morphology of MCF-7 cells was not altered in cells treated with RGD (Figure 6 A and 6 B). Confirming these results, immunofluorescence analysis (Figure 6C) clearly showed the presence of E-cadherin in MCF-7 cells cultured on MDA-ECM treated with RGD, contrasting with cells not treated with the peptide or stimulated with TGF- $\beta$ 1 (Figure 6D). Interestingly, treatment with RGD decreased SMAD2 phosphorylation only in MCF-7 cells cultured on MDA-ECM and not in MCF-ECM groups, whether or not they were treated with TGF- $\beta$ 1 (Figure 6D). Together, these data showed that the EMT-related changes induced by MDA-ECM on MCF-7 cells may be driven by integrin-mediated interactions.

## **3. Discussion**

In the tumor microenvironment, ECM produced by different tumor cell types varies along cancer progression stages [30]. Evidence has shown that ECM proteins modulate the behavior of cells in the tumor niche, including the ECM produced by tumor cells themselves, providing critical signals that can contribute to cancer development [21]. Despite the complex structure of tumor ECMs, most studies on the role of matrices in cancer were performed using single ECM proteins or artificial matrices [12,31,32]. Here, we used a natural 3D matrix produced by highly metastatic breast cancer cells (MDAMB-231) to investigate how it would affect the phenotype of non-metastatic MCF-7 cells, focusing on its capacity to induce EMT.

The transition from an epithelial to a mesenchymal phenotype is a key mechanism in cancer progression whereby tumor cells down-regulate epithelial markers and increase

mesenchymal markers, becoming more migratory and acquiring a more aggressive behavior. These changes usually correlate to a higher invasive potential, increased metastasis and poor patient outcome [33]. Different studies have demonstrated that isolated matrix proteins can influence EMT in some tumors, particularly in breast cancer [8,12,15,19,20,23,25,34-36].

Breast cancers are usually highly heterogeneous, including tumor cells at different stages of differentiation [1,37]. For this reason, one expects that the composition of ECM produced by each cell type may differ and influence the phenotype of neighboring cells present in the tumor mass. We are now showing that the interaction with the extracellular matrix produced by high-metastatic breast cancer cells, MDAMB-231, is able to induce EMT in MCF-7 cells, an epithelial-type breast cancer cell, increasing mesenchymal marker expression, modifying cell phenotype and stimulating cell migration. These changes were detected when MCF-7 cells were cultured on MDA-ECM, which, in a comparative analysis, showed a distinct matrix protein composition. The ECM produced by MDAMB-231 cells presented higher amounts of tenascin-C, laminin, osteopontin and vitronectin but lower amounts of fibronectin when compared to MCF-ECM.

Tenascin-C expression is normally sparse in healthy human cells but is rapidly induced in many tissues in response to pathological stress [38]. Up-regulation of tenascin-C correlates with situations of tissue repair, and increased tenascin-C protein levels have been detected in human cancers and are associated with a poor prognosis, higher aggressiveness and malignancy [39,40]. Soluble tenascin-C was shown to enhance migration and loss of intercellular adhesion in breast cancer cells [12]. Laminin was described as a potent adhesive and migratory substrate for metastatic breast tumor cells *in vitro*, and its higher expression correlates with tumor grade and metastatic potential *in vivo* [3]. Laminin was also shown to increase the migration of MCF-7 and MDAMB-231 cells through a mechanism involving integrin modulation [17]. Osteopontin, whose expression was also augmented in MDA-ECM, has been associated with a poor prognosis in patients with breast cancer [18,41] and with higher metastatic potential in rodent models [42]. Finally, vitronectin, which along with osteopontin is a potent ligand of  $\alpha v \beta 3$  integrin, seems to modulate cancer cell adhesion and migration [43]. The presences of these proteins on MDA-ECM are consistent with increased metastatic potential of MDAMB-231 cells.

Differences in MDA-ECM composition might be responsible for inducing EMT in MCF-7 cells, which assumed morphologic, molecular and functional profiles typical of a mesenchymal phenotype. After interaction with MDA-ECM, a decrease in E-cadherin

expression and an increase in N-cadherin and other mesenchymal markers, such as  $\alpha$ -SMA, vimentin, fibronectin and Twist, occurred. These molecular changes were accompanied by loss of cell-cell contacts and increasing migration.

Extracellular matrix can regulate the availability and activity of many carcinogenic mediators, including TGF- $\beta$ , through controlled sequestration, presentation and release [15]. Growing evidence has shown that TGF- $\beta$  signaling has a fundamental role in promoting cancer progression in multiple stages of the metastatic process, including EMT [19,44]. We demonstrate that TGF- $\beta$  did not participate in the induction of EMT in MCF-7 cells seeded onto MDA-ECM because the addition of a blocking antibody against TGF- $\beta$  receptor in MCF-7 cells did not modify the EMT induced by MDA-ECM. Therefore, even if MDA-ECM contains TGF- $\beta$ , it was not able to interfere in the EMT-associated profile induced by MDA-ECM on MCF-7 cells. Together, these data showed that the mesenchymal profile induced in MCF-7 cells in contact with MDA-ECM is more dependent on the direct interaction of the cells with MDA-ECM than on the presence of TGF- $\beta$  in the matrix.

Recruitment of distinct cell integrins in response to variations in ECM composition can modify integrin-associated signaling and may interfere with cell fate [45]. Integrin-mediated cell-matrix interactions are known to modulate tumor progression, including EMT [3,11,15,25, 46]. We show that MCF-7 cells cultured on MDA-ECM assumed a more activated and migratory profile, with profound changes in cytoskeleton dynamics, characterized by the presence of stress fibers and reduction in focal adhesions. These alterations in cell morphology were accompanied by the activation of canonical integrin signaling pathways, with increasing phosphorylation of FAK, AKT and ERK in MCF-7 cells cultured on MDA-ECM.

Activated FAK acts as a scaffold protein with binding sites for several classes of signaling molecules, including PI3K/AKT and MAPK/ERK, that regulate cellular migration and survival and are involved in the non-canonical TGF- $\beta$  signaling pathway [7,47,48]. In addition, recent studies have shown that AKT and ERK are involved in EMT, participating in the crosstalk between the integrin and TGF- $\beta$  receptor pathways [7,8,49-51]. Increased amounts of type I collagen correlate with integrins switching to a high-affinity ligand-binding state, increasing FAK- and ILK- signaling activity, and promoting EMT in tumor pancreatic cells, for example [52]. Our data show that MDA-ECM induced an increase in integrin signaling activation parallel with an increase in SMAD2 phosphorylation and subsequent

translocation of SMAD4 to the nucleus in MCF-7 cells, indicating crosstalk between integrin and TGF- $\beta$  receptor signaling pathways.

To investigate the role of integrins in the modulation of the effects induced by tumor matrices, cells were treated with RGD, a synthetic tripeptide recognized by most tumor cell integrins that is able to block their activation [53]. The treatment of MCF-7 cells seeded on MDA-ECM with RGD did not interfere with adhesion but restored cell-cell contacts, impairing the decrease of E-cadherin expression and SMAD2 phosphorylation, revealing a transactivation between integrins and TGF- $\beta$  receptor to drive EMT.

Our data showed that the matrix produced by highly metastatic human breast cancer cells activates intracellular signaling pathways related to integrins and potentiates canonical TGF- $\beta$  receptor signaling, inducing an EMT-like phenotype and migration in MCF-7 cells, thus favoring breast cancer metastasis (Figure 7).

These findings represent an important contribution to the understanding of the adhesion-related mechanisms involved in EMT and may help to identify potential new prognostic biomarkers or to search for tools relevant to anti-metastatic therapies in the context of anticancer drug design.

## **4. Experimental procedures**

### *4.1 Reagents*

The culture reagents bovine serum albumin (BSA), penicillin, streptomycin, trypsin, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and trypan blue were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Recombinant human TGF-beta was from Peprotech (USA). Arg-Gly-Asp (RGD) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Cultilab (Campinas, SP, Brazil). The BCA Protein Assay Kit was purchased from Thermo Scientific. For immunocytochemistry, the TRITC-labelled phalloidin was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), DAPI ProLong<sup>®</sup> was obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA), and Alexa Fluor 555 and 488 were obtained from Invitrogen, Paisley, UK. For electrophoresis, the PVDF membranes and Rainbow<sup>™</sup> molecular weight markers were from GE Healthcare (San Francisco, CA), and the ECL system (SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate kit) was from Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA). The protease inhibitors, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), leupeptin, and ribonuclease A (RNase A) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The TGF-

$\beta$ RI inhibitor SB431542 was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The High Capacity cDNA Reverse Transcription kit was purchased from Applied Biosystems. The RNeasy Mini Kit and SYBR-green were obtained from Qiagen. Primers for Twist (Forward 5'-GGCACCATCCTCACACCTCT-3'; reverse 3'-TGGCTGATTGGCACGACCT-5') and  $\beta$ -actin (Forward 5'-TACAATGAGCTGCGTGTGG-3'; reverse 3'-TAGCACAGCCTGGATAGCAA-5') were purchased from IDT technologies. The panoptic staining kit was from LB Laborclin (PR, Brazil).

#### 4.2 Antibodies

Primary antibodies were purchased as follows: rabbit polyclonal anti-p-FAK<sup>tyr397</sup> and anti-tenascin-C (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); mouse monoclonal anti-osteopontin, anti- $\alpha$ -SMA, goat monoclonal anti-AKT1, and rabbit polyclonal anti-vitronectin (Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, USA); rabbit polyclonal anti-fibronectin (Dako, Denmark, SC, USA); rat anti-human thrombospondin-1 (5G11, provided from Dr. Chantal Legrand, INSERM, Paris, France); rabbit monoclonal anti-FAK (Abcam, Cambridge, MA, USA); rabbit polyclonal anti-laminin, mouse monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin, and anti-vinculin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA); rabbit monoclonal anti-E-cadherin, anti-Smad2, anti-p-ERK1/2<sup>Thr202/204</sup>, anti-p-Smad2<sup>Ser465/467</sup>, and polyclonal anti-Actin, anti-ERK 1/2, anti-Smad4 and anti-N-cadherin (Cell Signaling Technol., Danvers, MA, USA); mouse monoclonal anti-p-AKT<sup>Ser473</sup>, anti-Actin, and rabbit monoclonal anti-histone (Millipore, Billerica, MA, USA). Secondary biotin-conjugated antibodies against rabbit IgG, mouse IgG and goat IgG were purchased from Cell Signaling Technol. Danvers, MA, USA; Streptavidin-conjugated FITC and streptavidin-conjugated horseradish peroxidase were from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

#### 4.3 Cell cultures

Human breast cancer cell lines (MCF-7 and MDAMB-231) were a gift from Dr. V. Morandi (UERJ, RJ, Brazil) and certified (STR) by DNA Diagnostic Laboratory (UERJ, RJ, Brazil). MCF-7 and MDAMB-231 cells were routinely maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, NaHCO<sub>3</sub> (3.7 g/L), HEPES (5.2 g/L), penicillin (0.5 U/mL) and streptomycin (0.5 mg/mL) and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. For experiments,

MCF-7 and MDAMB-231 cells were grown to confluence and then detached by brief treatment with trypsin (0.1%)/EDTA (0.01%). To generate conditioned medium, MDAMB-231 cells were grown in the same medium described above to 90%-100% confluence ( $4 \times 10^6$  cells) in  $75 \text{ cm}^2$  culture flasks for 72 hours. After this time, the medium was collected for experiments.

#### *4.4 Isolation of immobilized cell-derived matrices*

Freshly deposited ECM produced by MCF-7 (MCF-ECM) or MDAMB-231 (MDA-ECM) were obtained as previously described [22]. Briefly, cells were seeded onto plastic 6-, 24- or 96-well plates and grown until they reached confluence (approximately 72 h). Monolayers were disrupted with cold lysis extraction buffer (PBS- $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7.4, containing 0.1% Triton X-100; 0.1 M  $\text{NH}_4\text{OH}$ ; 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  aprotinin; 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  leupeptin; 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  pepstatin and 1 mM of PMSF). Cell debris was washed twice with cold PBS- $\text{Ca}^{2+}$ , and the wells were saturated with 0.1% BSA/PBS- $\text{Ca}^{2+}$  for 1 h at  $37^\circ\text{C}$  immediately before use.

#### *4.5 Stimulation of MCF-7 cells to Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)*

To investigate the induction of EMT, a volume of MCF-7 cell suspension in DMEM 5% FBS medium ( $2 \times 10^5$  cells/well) was seeded onto freshly immobilized extracellular matrices derived from MCF-7 and MDAMB-231 cells. MCF-7 cells seeded onto their own matrix and stimulated with TGF- $\beta$ 1 (10 ng/mL) were used respectively as control and positive controls for EMT.

#### *4.6 Analysis of ECM composition by indirect ELISA*

The composition of deposited matrices from different cell types was analyzed by indirect ELISA as previously described [22]. Briefly, deposited matrices were blocked with 0.1% BSA/PBS- $\text{Ca}^{2+}$  for 2 h and then incubated with specific primary antibodies diluted in PBS- $\text{Ca}^{2+}$ /Tween 0.05% for 1 h at room temperature. After that, matrices were washed with 0.1% BSA/PBS- $\text{Ca}^{2+}$ /Tween 0.05% and incubated with HRP-conjugated secondary antibodies diluted in the same buffer. After 1 h incubation, the colorimetric reaction was triggered by the addition of citrate buffer 0.1 M pH 4.5 containing 0.002%  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 1 mg/mL OPD and was

stopped with 3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbance was measured at 490 nm in an automatic ELISA microplate reader (Thermo Scientific).

#### *4.7 Immunofluorescence of E-cadherin*

MCF-ECM and MDA-ECM were obtained on sterile glass coverslips, as described, and MCF-7 cells ( $7 \times 10^4$  cells/well) were then cultured onto these matrices in the presence or absence of TGF- $\beta$ 1 for 72 h. For inhibition of integrin activation, MCF-7 cells ( $7 \times 10^4$  cells/well) were also treated with 1  $\mu$ M RGD peptide (Arg-Gly-Asp) for 72 hours. After this time, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in sucrose/PBS solution for 20 min at room temperature, permeabilized with Triton X-100 (0.1%)/PBS for 5 min, and blocked with 5% BSA for 30 minutes. After that, slides were incubated with rabbit monoclonal anti-E-cadherin (1:400) overnight at 4°C, washed and then incubated with the appropriate secondary antibody for 1 h, followed by incubation with Alexa Fluor 555 at 4°C for 1 h. Finally, slides were mounted using ProLong Gold antifade reagent with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for nuclear staining. Coverslips were examined under an Olympus BX40 microscope equipped for epifluorescence at 60x magnification.

#### *4.8 Confocal Microscopy*

MCF-ECM and MDA-ECM were obtained on sterile glass coverslips, as described, and MCF-7 cells ( $7 \times 10^4$  cells/well) were then cultured onto these matrices in the presence or absence of TGF- $\beta$ 1 for 72 h. After washing, MCF-7 cells were fixed with paraformaldehyde/4% sucrose/PBS solution for 20 min at room temperature, permeabilized with Triton X-100 (0.1%)/PBS for 5 min and labeled with TRITC-phalloidin (1:400) overnight at 4°C. Then, the sections were blocked with 5% BSA for 30 minutes and incubated with mouse monoclonal anti-vinculin (1:200) overnight at 4°C. Cells were then washed and incubated with the appropriate secondary antibody for 1 h, followed by incubation with Alexa Fluor 488 at 4°C for 1 h. Finally, fixed cells were mounted using ProLong Gold antifade reagent with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for nuclear staining. Coverslips were examined under an Olympus FV1000 Inverted Confocal IX81 at 60x magnification.

#### *4.9 Migration assay*



MCF-7 ( $2 \times 10^5$  cells/well) cells previously incubated on different cell-derived matrices for 72 h in the presence or absence of TGF- $\beta$ 1 were harvested and counted in a hemocytometer after staining with trypan blue. Then,  $7 \times 10^4$  cells/well were added onto the upper membrane of each insert of Transwell<sup>®</sup> permeable supports (8- $\mu$ m pore size filter membranes; Becton Dickinson) assembled in a 24-well plate (Falcon) and allowed to migrate for 72 hours at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. As a chemoattractant, 10% FBS-serum medium (DMEM) was added to the bottom chamber. At the end of the migration period, non-migrating MCF-7 cells were removed with cotton swabs, while migrating cells on the lower surface of filters were fixed and stained with a panoptic kit for counting. Migrating cells were quantified as the number of cells that migrated through the insert, counted in 10 fields of an inverted microscope (Olympus IX71) at 40  $\times$  magnification.

#### *4.10 Nuclear extract*

The translocation of SMAD4 to the cell nucleus was analyzed by western blotting detection of SMAD4 in MCF-7 nuclear extracts. MCF-7 cells ( $2 \times 10^5$  cells/well) were seeded for 72 hours on MDA-ECM or their own matrices in the presence or absence of TGF- $\beta$ 1. Then, cells were lysed in ice-cold buffer A (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 M EDTA, 0.1 M EGTA, 1 mM DTT and 0.5 mM PMSF), and then, Nonidet P-40 was added to a final concentration of 0.5% (v/v). Nuclei were collected by centrifugation (1,810  $\times$  g for 5 min at 4°C). The nuclear pellet was suspended in ice-cold buffer C (20 mM HEPES, pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/mL pepstatin, 1  $\mu$ g/mL leupeptin and 20% (v/v) glycerol and incubated for 30 minutes. Nuclear proteins were collected in the supernatant after centrifugation (12,000  $\times$  g for 10 min at 4°C); then the nuclear extracts were denatured in sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS; 5% 2-ME; 10% glycerol and 0.001% bromophenol blue) with heating in boiling water for 3 minutes and assayed in SDS-PAGE.

#### *4.11 SDS-PAGE and western blot*

MCF-7 cells ( $2 \times 10^5$ ) were seeded for 72 hours on MDA-ECM or MCF-ECM in the presence or absence of TGF- $\beta$ 1. To block TGF- $\beta$ RI signaling, cells were incubated for 72 hours with 1 mM SB431542, a potent and selective inhibitor of TGF- $\beta$  superfamily type 1 activin receptor-

like kinase (ALK) receptors. To inhibit integrin activation, MCF-7 cells ( $2 \times 10^5$  cells/well) were seeded on MCF-ECM and MDA-ECM, and after cell adhesion, RGD peptide ( $1 \mu\text{M}$ ) was added to cultures, which were then incubated in the presence or absence of TGF- $\beta$ 1 for 72 hours. To obtain cell extracts, MCF-7 cells were suspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.5 mM EDTA, Triton X-100 (1%, v/v), glycerol (10%, v/v), and the following protease inhibitors: 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM benzamidine, and  $1 \mu\text{M}$  soybean trypsin inhibitor). The total protein concentration was determined by BCA according to the manufacturer's protocol. Cell lysates were denatured in sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue) and boiled for 5 min. Samples ( $20 \mu\text{g}$  total protein) were resolved on reducing 10% SDS-PAGE, and proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes for western blot analysis. Rainbow<sup>TM</sup> colored protein molecular weight markers were run in parallel to estimate molecular weights. Membranes were blocked with 5% BSA and Tween-20 0.5%. The following primary antibodies were used for immunoblotting: anti-p-FAK<sup>397</sup> and anti-FAK (1:1000), anti-p-AKT and anti-AKT (1:1000), anti-p-ERK and anti-ERK (1:1000), anti-p-SMAD2 and SMAD2 (1:1000), anti-SMAD4 (1:1000), anti-histone (1:1000), anti-E-cadherin (1:1000), anti-N-cadherin (1:1000), anti- $\alpha$ -SMA (1:1000), anti-tubulin (1:5000), and anti-actin (1:1000). After extensive washing in Tween-TBS, membranes were incubated for 2 h with the appropriate secondary biotin-conjugated antibody (1:5000). Immunoreactive proteins were visualized using the ECL system. The densitometry of the entire band was quantified using Photoshop software (Adobe Systems, San Jose, CA), and values obtained were expressed as arbitrary units (AU).

#### 4.12 qRT-PCR analysis

MCF-7 cells ( $2 \times 10^5$  cells/well) were incubated for 48 h onto MDA-ECM or on their own ECM in the presence or absence of TGF- $\beta$ 1. Total RNA was extracted from the cells using an RNeasy Mini Kit. cDNA was generated from  $1 \mu\text{g}$  RNA using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. cDNA was amplified with human gene-specific primers for *TWIST* and  $\beta$ -actin. Each candidate gene was internally normalized against  $\beta$ -actin. The relative quantitative value was expressed by the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method, representing the amount of candidate gene expression calibrated to the same controls. qPCR was performed using a 7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and

amplicons were quantified using a SYBR® Green PCR Master Mix kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR was performed with a program of 5 min at 95°C and then 45 cycles at 94°C (30 seconds), 60°C (30 seconds) and 72°C (30 seconds), followed by a standard curve of denaturation.

#### *4.13 Statistical analysis*

Statistical analysis, unless otherwise stated, was assessed by ANOVA and Student's t test, with  $p < 0.05$  taken as statistically significant.

#### *Funding sources*

This work was supported by: Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ E-26/201.441/2014); Fundação e Coordenação de Apoio de Pessoal de Nível Superior (CAPES, #23038.007778/2014-21); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ 301797/2013-7); PRONEX-CNPq/FAPERJ Program (Brazilian Ministry for Science and Technology—MCT) Brazil;

#### *Declarations of interests*

The author states that there is no conflict of interest to declare.

#### *Author's contributions*

R.M. Brandão-Costa, under the supervision of C. Barja-Fidalgo and E. Helal-Neto, carried out all experiments reported in this article; E. Helal-Neto participated in the study design and wrote the manuscript; A.M. Vieira carried out the western blot analyses; P.S. Barcellos performed the PCR analysis depicted in Figure 2; J.A. Morgado provided the TGF- $\beta$  inhibitor, provided guidance on experimental design and helped interpret the data; C. Barja-Fidalgo conceived of the study, participated directly in its design and coordination, helped interpret the data, and helped compose the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### *Further considerations*

Manuscript has been grammar checked by Elsevier "Language Editing Services"; Color should be used only for figure 5 in print.

## 5. References

- [1] F. Bertucci, D. Birnbaum, Reasons for breast cancer heterogeneity, *J Biol.* (2008);7(2):6. doi: 10.1186/jbiol67.
- [2] K.I. Pritchard, Endocrine therapy: is the first generation of targeted drugs the last?, *J. Int. Med.*, 274(2013)144-52.
- [3] N. Kusuma, D. Denoyer, J.A. Eble, R.P. Redvers, B.S. Parker, R. Pelzer, R.L. Anderson, N. Pouliot, Integrin-dependent response to laminin-511 regulates breast tumor cell invasion and metastasis, *Int J Cancer.* 130(2012) 555-66.
- [4] D.C. Radisky, Epithelial-mesenchymal transition, *J Cell Sci.*, 118(2005) 4325-6.
- [5] R. Kalluri, E.G. Neilson, Epithelial mesenchymal transition and its implications for fibrosis, *J. Clin. Invest.*, 112 (2009) 1776–1784.
- [6] Y.E. Zhang, Non-Smad pathways in TGFbeta signaling, *Cell Res.* 19 (2009) 128–39.
- [7] F.A. Mamuya, M.K. Duncan,  $\alpha$ V integrins and TGF- $\beta$ -induced EMT: a circle of regulation, *J Cell Mol Med*, 16(2012) 445-55. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01419.x.
- [8] D.M. Gonzalez, D. Medici, Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition, *Sci. Signal.*, 7(2014) 344.
- [9] D.D. Schlaepfer, S.K. Mitra, Multiple connections link FAK to cell motility and invasion, *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 14 (2004) 92–101.
- [10] N.J. Anthis, I.D. Campbell, The tail of integrin activation, *Trends Biochem. Sci.*, 36 (2011) 191–8.
- [11] D. Katoh, K. Nagaharu, N. Shimojo, N. Hanamura, M. Yamashita, Y. Kozuka, K. Imanaka-Yoshida, T. Yoshida, Binding of  $\alpha$ v $\beta$ 1 and  $\alpha$ v $\beta$ 6 integrins to tenascin-C induces epithelial-mesenchymal transition-like change of breast cancer cells, *Oncogenesis*, (2013);2:e65.

- [12] K. Nagaharu, X. Zhang, T. Yoshida, D. Katoh, N. Hanamura, Y. Kozuka, T. Ogawa, T. Shiraishi, K. Imanaka-Yoshida, Tenascin C induces epithelial-mesenchymal transition-like change accompanied by SRC activation and focal adhesion kinase phosphorylation in human breast cancer cells, *Am. J. Pathol.*, 178 (2011) 754-63.
- [13] D. Wirtz, K. Konstantopoulos, P.C. Searson, The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis, *Nat. Rev. Cancer*, 11 (2011) 512-22.
- [14] S.H. Kim, J. Turnbull, S. Guimond, Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor, *J. Endocrinol.*, 209 (2011) 139-51.
- [15] M.A. Cichon, D.C. Radisky, Extracellular matrix as a contextual determinant of transforming growth factor- $\beta$  signaling in epithelial-mesenchymal transition and in cancer. *Cell Adh. Migr.*, 8 (2014) 588-94.
- [16] P. Lu, K. Takai, V.M. Weaver, Z. Werb, Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* (2011); 3: pii: a005058
- [17] J. Chia, N. Kusuma, R. Anderson, B. Parker, B. Bidwell, L. Zamurs, E. Nice, N. Pouliot, Evidence for a role of tumor-derived laminin-511 in the metastatic progression of breast cancer, *Am. J. Pathol.*, 170 (2007) 2135-48.
- [18] O.S. Rudland, A. Platt-Higgins, M. El-Tanani, S. De Silva Rudland, R. Barraclough, J.H. Winstanley, R. Howitt, C.R. West, Prognostic significance of the metastasis-associated protein osteopontin in human breast cancer, *Cancer Res.* 62 (2002) 3417-27.
- [19] R.A. Hancox, M.D. Allen, D.L. Holliday, D.R. Edwards, C.J. Pennington, D.S. Guttery, J.A. Shaw, R.A. Walker, J.H. Pringle, J.L. Jones, Tumour associated tenascin-C isoforms promote breast cancer cell invasion and growth by matrix metalloproteinase-dependent and independent mechanisms, *Breast Cancer Res.*, (2009) 11:R24
- [20] T. Oskarsson, S. Acharyya, X.H. Zhang, S. Vanharanta, S.F. Tavazoie, P.G. Morris, R.J. Downey, K. Manova-Todorova, E. Brogi, J. Massagué, Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nat. Med.*, 17 (2011) 867-74.

- [21] M.W. Pickup, J.K. Mouw, V.M. Weaver, The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer, *EMBO Rep.*, 15 (2014) 1243-53.
- [22] E. Helal-Neto, R.M. Brandão-Costa, R. Saldanha-Gama, C. Ribeiro-Pereira, V. Midlej, M. Benchimol, V. Morandi, C. Barja-Fidalgo, Priming Endothelial Cells With a Melanoma-Derived Extracellular Matrix Triggers the Activation of  $\alpha\beta3$ /VEGFR2 Axis, *J. Cell. Physiol.*, 231 (2016) 2464-73. doi: 10.1002/jcp.25358.
- [23] D. Sisci, S. Aquila, E. Middea, M. Gentile, M. Maggiolini, F. Mastroianni, D. Montanaro, S. Andò, Fibronectin and type IV collagen activate ERalpha AF-1 by c-Src pathway: effect on breast cancer cell motility, *Oncogene*, 23 (2004) 8920-30.
- [24] G. Benton G, E. Crooke, J. George, Laminin-1 induces E-cadherin expression in 3-dimensional cultured breast cancer cells by inhibiting DNA methyltransferase 1 and reversing promoter methylation status. *FASEB J.*, 23 (2009) 3884-95. doi: 10.1096/fj.08-128702
- [25] S. Pal, S. Moulik, A. Dutta, A. Chatterjee. Extracellular matrix protein laminin induces matrix metalloproteinase-9 in human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer. Microenviron.* 7 (2014) 71-8.
- [26] Son. Hwajin, Moon. Aree, Epithelial-mesenchymal Transition and Cell Invasion, *Toxicol. Res.*, 26 (2010) 245–252. doi: 10.5487/TR.2010.26.4.245.
- [27] A. Huttenlocher, A.R. Horwitz, Integrins in cell migration, *Cold Spring Harb.Perspect.Biol.*, 3 (2011):a005074. doi: 10.1101/cshperspect.a005074.
- [28] R.O. Hynes, Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines, *Cell*, 110 (2002) 673-87.
- [29] R. Derynck, Y.E. Zhang. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signaling, *Nature*, 425 (2003) 577–584.
- [30] A. Naba, K.R. Clauser, C.A. Whittaker, S.A. Carr, K.K Tanabe, R.O. Hynes, Extracellular matrix signatures of human primary metastatic colon cancers and their metastases to liver, *BMC Cancer*, 14 (2014) 514-18. doi: 10.1186/1471-2407-14-518.

- [31] L. Foroni, F. Vasuri, S. Valente, C. Gualandi, M.L. Focarete, G. Caprara, M. Scandola, A. D'Errico-Grigioni, G. Pasquinelli, The role of 3D microenvironmental organization in MCF-7 epithelial-mesenchymal transition after 7 culture days, *Exp. Cell Res.*, 319 (2013) 1515-22.
- [32] M.J. Bissell, V.M. Weaver, S.A. Lelièvre, F. Wang, O.W. Petersen, K.L. Schmeichel. Tissue structure, nuclear organization, and gene expression in normal and malignant breast, *Cancer Res.*, 59 (1999) 1757-1763.
- [33] J.P. Thiery, H. Acloque, R.Y. Huang, M.A. Nieto, Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease, *Cell*, 139 (2009) 871–890.
- [34] I. Kalembeiyi, H. Inada, R. Nishiura, K. Imanaka-Yoshida, T. Sakakura, T. Yoshida, Tenascin-C upregulates matrix metalloproteinase-9 in breast cancer cells: direct and synergistic effects with transforming growth factor beta 1, *Int. J. Cancer*, 105 (2003) 53-60.
- [35] K. Ilunga, R. Nishiura, H. Inada, A. El-Karef, K. Imanaka-Yoshida, T. Sakakura, T. Yoshida, Co-stimulation of human breast cancer cells with transforming growth factor-beta and tenascin-C enhances matrix metalloproteinase-9 expression and cancer cell invasion. *Int. J. Exp. Pathol.*, 85 (2004) 373-9.
- [36] H. Neubauer, A. Ruoff, N. Paessler, E. Solomayer, D. Wallwiener, T. Fehm, A laminin-rich basement membrane matrix influences estrogen receptor beta expression and morphology of MDA-MB-231 breast cancer cells, *Oncol. Rep.*, 21 (2009) 475-81.
- [37] K. Polyak, Heterogeneity in breast cancer, *J. Clin. Invest.*, 121 (2011) 3786-3788.
- [38] K.S. Midwood, M. Chiquet, R.P. Tucker, G. Orend. Tenascin-C at a glance. *J. Cell Sci.*, 129 (2016) 4321-4327.
- [39] K.S. Midwood, G. Orend, The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis, *J. Cell Commun. Signal.*, 3 (2009) 287-310. doi: 10.1007/s12079-009-0075-1.
- [40] A. Kadar, A.M. Tökés, J. Kulka, L. Robert, Extracellular matrix components in breast carcinomas, *Semin. Cancer Biol.*, 12 (2002) 243-57.

- [41] Y. Saitoh, J. Kuratsu, H. Takeshima, S. Yamamoto, Y. Ushio, Expression of osteopontin in human glioma. Its correlation with the malignancy, *Lab. Invest.* 72 (1995) 55-63.
- [42] L. Su, A.B. Mukherjee, B.B. Mukherjee, Expression of antisense osteopontin RNA inhibits tumor promoter-induced neoplastic transformation of mouse JB6 epidermal cells, *Oncogene*, 10 (1995) 2163-9.
- [43] Y. Niu, L. Zhang, X. Bi, S. Yuan, P. Chen, Evaluation of Vitronectin Expression in prostate cancer and the clinical significance of the association of vitronectin expression with prostate specific antigen in detecting prostate cancer, *Urol. J.*, 13 (2016) 2527-32.
- [44] R.J. Akhurst. Targeting TGF- $\beta$  Signaling for Therapeutic Gain. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 9 (2017). pii: a022301. doi: 10.1101/cshperspect.a022301.
- [45] J. Xiong, H.E. Balcioğlu, E.H. Danen. Integrin signaling in control of tumor growth and progression, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 45 (2013) 1012-5. doi: 10.1016/j.biocel.2013.02.005.
- [46] K.R. Levental, H. Yu, L. Kass, J.N. Lakins, M. Egeblad, J.T. Erler, S.F. Fong, K. Csiszar, A. Giaccia, W. Weininger, M. Yamauchi, D.L. Gasser, V.M. Weaver, Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling, *Cell*, 139 (2009) 891-906.
- [47] L.C. Cantley. The phosphoinositide 3-kinase pathway, *Science*, 296 (2002) 1655-7.
- [48] P. Liu, H. Cheng, T.M. Roberts, J.J. Zhao, Targeting the phosphoinositide3-kinase pathway in cancer, *Nat.Rev.DrugDiscov.*, 8 (2009) 627-44.
- [49] A.V. Bakin, A.K. Tomlinson, N.A. Bhowmick, H.L. Moses, C.L. Arteaga, Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor  $\beta$ -mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration, *J. Biol. Chem.*, 275 (2000) 36803–36810.
- [50] L. Yu, M.C. Hébert, Y.E. Zhang, TGF- $\beta$  receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF- $\beta$  responses, *EMBO J.*, 21 (2002) 3749–3759.
- [51] K.K. Chan, K.B. Matchett, P.M. McEnhill, H.D. El, M.F. McMullin, Y. El-Tanani,. Protein deregulation associated with breast cancer metastasis, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 26 (2015) 415-23.



[52] Y. Imamichi, A. Menke, Signaling pathways involved in collagen-induced disruption of the E-cadherin complex during epithelial-mesenchymal transition, *Cells Tissues Organs*, 185 (2007) 180-90.

[53] U.K. Marelli, F. Rechenmacher, T.R. Sobahi, C. Mas-Moruno, H. Kessler, Tumor targeting via integrin ligands, *Front. Oncol.*, 30 (2013) 222.

### **Figure legends**

**Figure 1. Differences among breast cancer cell-derived matrices.** MCF-7 or MDAMB-231 cells were grown in standard conditions for 72 h, and the respective derived ECMs were obtained as described in the *Methods* section. The contents of tenascin-C (TN-C), laminin (LN), fibronectin (FN), osteopontin (OPN) and vitronectin (VT) were assayed by indirect ELISA. The matrix protein content of MDA-ECM is shown as the fold increase relative to MCF-ECM. The graph is representative of 3 independent experiments (\*p<0.05).

**Figure 2. MDAMB-231-derived ECM triggers morphological and phenotypical changes related to EMT in MCF-7 cells.** MCF-7 and MDAMB-231 cells were cultured in standard conditions for 72 h, and decellularized ECMs were obtained as described in *Methods*. MCF-7 cells were cultured onto MDA-ECM or onto their own matrix with TGF- $\beta$ 1 (10 ng/mL) for 72 hours. (A) Cell morphology was analyzed, and representative images were obtained at 40x magnification. (B-E) Lysates of MCF-7 cultured as described for 72 h were immunoblotted with anti-E-cadherin (B), anti-N-cadherin (C), anti- $\alpha$ -SMA (D), anti-fibronectin (E) and anti-vimentin (F) antibodies. The results are shown as the mean fold increase relative to the control (MCF-ECM), calculated from 3 individual experiments (\*p<0.05). (G) MCF-7 cells were cultured for 48 hours on MCF-ECM with or without TGF- $\beta$ 1 or MDA-ECM, and the expression of *TWIST* mRNA was analyzed.  *$\beta$ -Actin* was used as a housekeeping gene. The results are shown as the mean  $\pm$  SD calculated from 3 individual experiments (\*p<0.05).

**Figure 3. TGF- $\beta$  does not participate in the EMT induced by MDA-ECM.** MCF-7 and MDAMB-231 cells were cultured in standard conditions for 72 h, and decellularized ECMs were obtained as described in the *Methods*. (A) MCF-7 were seeded on their own matrix for 72h with or without conditioned medium from MDAMB-231 cultures. Cell lysates were immunoblotted with anti-E-cadherin and anti-tubulin antibodies. (B) MCF-7 cells were

seeded on decellularized MCF-ECM with or without TGF- $\beta$ 1 or MDA-ECM in the presence or absence of the TGF- $\beta$  receptor inhibitor SB431542 (1 mM) for 72 h. Cell lysates were immunoblotted with anti-E-cadherin and anti-actin antibodies. The results are shown as the mean fold increase relative to the MCF-ECM (\* $p$ <0.05); MCF-ECM treated with SB431542 (# $p$ <0.05) and MDA-ECM without inhibitor (\$ $p$ <0.05) calculated from 3 individual experiments

**Figure 4. Effect of MDA-ECM on migration of MCF-7 cells.** MCF-7 and MDAMB-231 cells were cultured in standard conditions for 72 h, and decellularized ECMs were obtained as described in the *Methods*. MCF-7 cells were cultured for 72 h on decellularized ECM derived from MDAMB-231 or MCF-7 cells with or without TGF- $\beta$ 1. After that, cells were trypsinized, seeded on Transwell chambers, and allowed to migrate toward FBS-enriched medium for 72 hours. The number of migrated cells was counted, and the results are shown as the fold increase relative to the control (MCF-ECM) and presented as the mean  $\pm$  SD calculated from 3 individual experiments (\* $p$ <0.05).

**Figure 5. MDA-ECM induces EMT in MCF-7 cells through integrin-associated signaling pathways.** (A) MCF-7 and MDAMB-231 cells were cultured in standard conditions on coverslips for 72 h, and decellularized ECMs were obtained as described in *Methods*. For double staining of F-actin and vinculin (arrows), cells were marked with rhodamine-conjugated phalloidin (red) and anti-vinculin antibody (green), and nuclei were stained with DAPI. Representative images were captured at 60x magnification. Cell lysates were immunoblotted with (B) anti-pFAK<sup>tyr397</sup> and anti-FAK, (C) anti-pERK1/2 and anti-ERK1/2, (D) anti-pAKT<sup>ser473</sup> and anti-AKT, (E) anti-pSMAD2 and anti-SMAD2, and (F) anti-SMAD 4 and anti-histone antibodies. The results are shown as the fold increase compared to the MCF-ECM group, calculated from 3 individual experiments (\* $p$ <0.05).

**Figure 6. Integrin signaling modulates E-cadherin-mediated adhesion of MCF-7 cells cultured on MDA-ECM.** MCF-ECM and MDA-ECM were obtained as described in the *Methods* section. MCF-7 cells were cultured on their own ECM with or without TGF- $\beta$ 1 or on MDA-ECM and treated with RGD for 72 h (1  $\mu$ M). Cell lysates were immunoblotted with (A) anti-E-cadherin and (D) anti-p-SMAD2 antibodies. The results are shown as the mean fold increase relative to controls: MCF-ECM (\* $p$ <0.05); MCF-ECM + RGD (# $p$ <0.05) and MDA-

ECM ( $p < 0.05$ ), calculated from 3 individual experiments. **(B)** Representative images of MCF-7 cell cultures of each experimental group, treated or not with RGD, at 40x magnification. **(C)** Effect of RGD treatment on E-cadherin expression and localization in MCF-7 cells cultured on MDA-ECM or MCF-ECM with or without TGF- $\beta$ 1. Representative images were captured on fluorescence microscopy at 60x magnification. (Arrows: E-cadherin-mediated cell-cell contacts).

**Figure 7. Conclusion.** MDAMB-231-derived ECM activates integrins on the MCF-7 cell surface, recruiting FAK and promoting actin cytoskeleton reorganization, increasing the number of stress fibers. FAK can also activate the PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways in MCF-7 cells. In addition, FAK can activate TGF- $\beta$  receptors, activating canonical and non-canonical pathways of this receptor. These signaling pathways lead to SMAD4 translocation to the nucleus and are associated with an increase in the transcription factor *TWIST*, triggering increased expression of mesenchymal markers and migration, and down-regulation of E-cadherin.

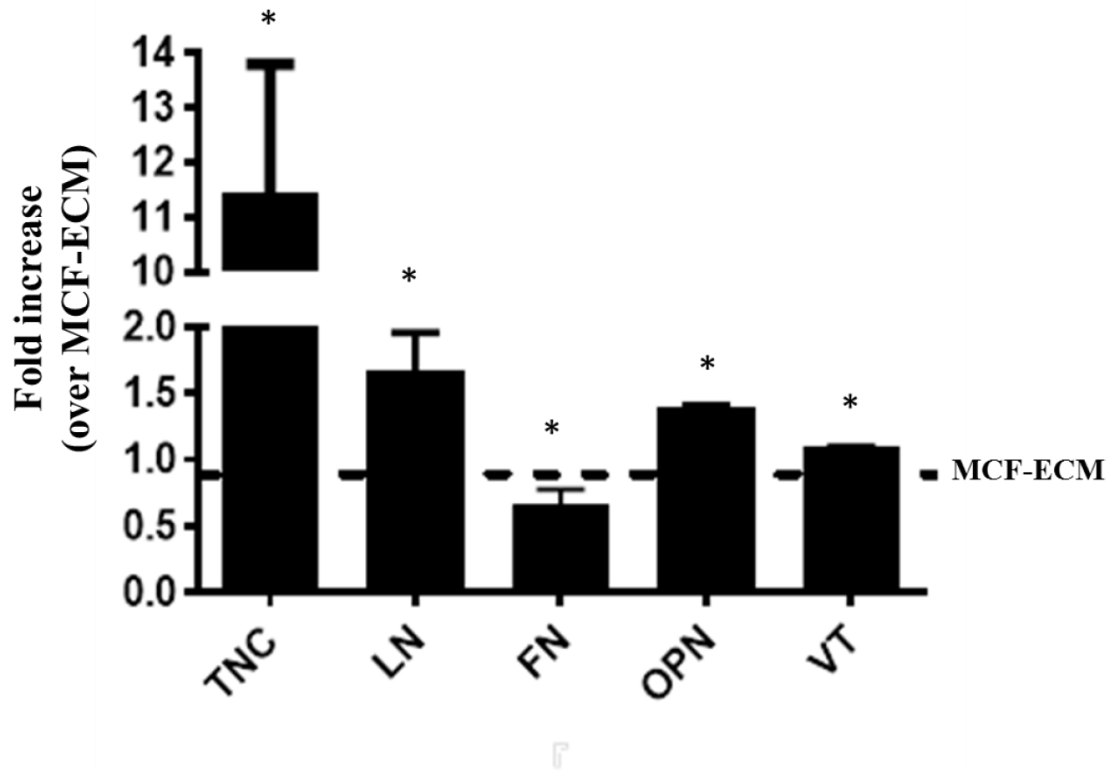
*Figures**Figure 1:*

Figure 2:

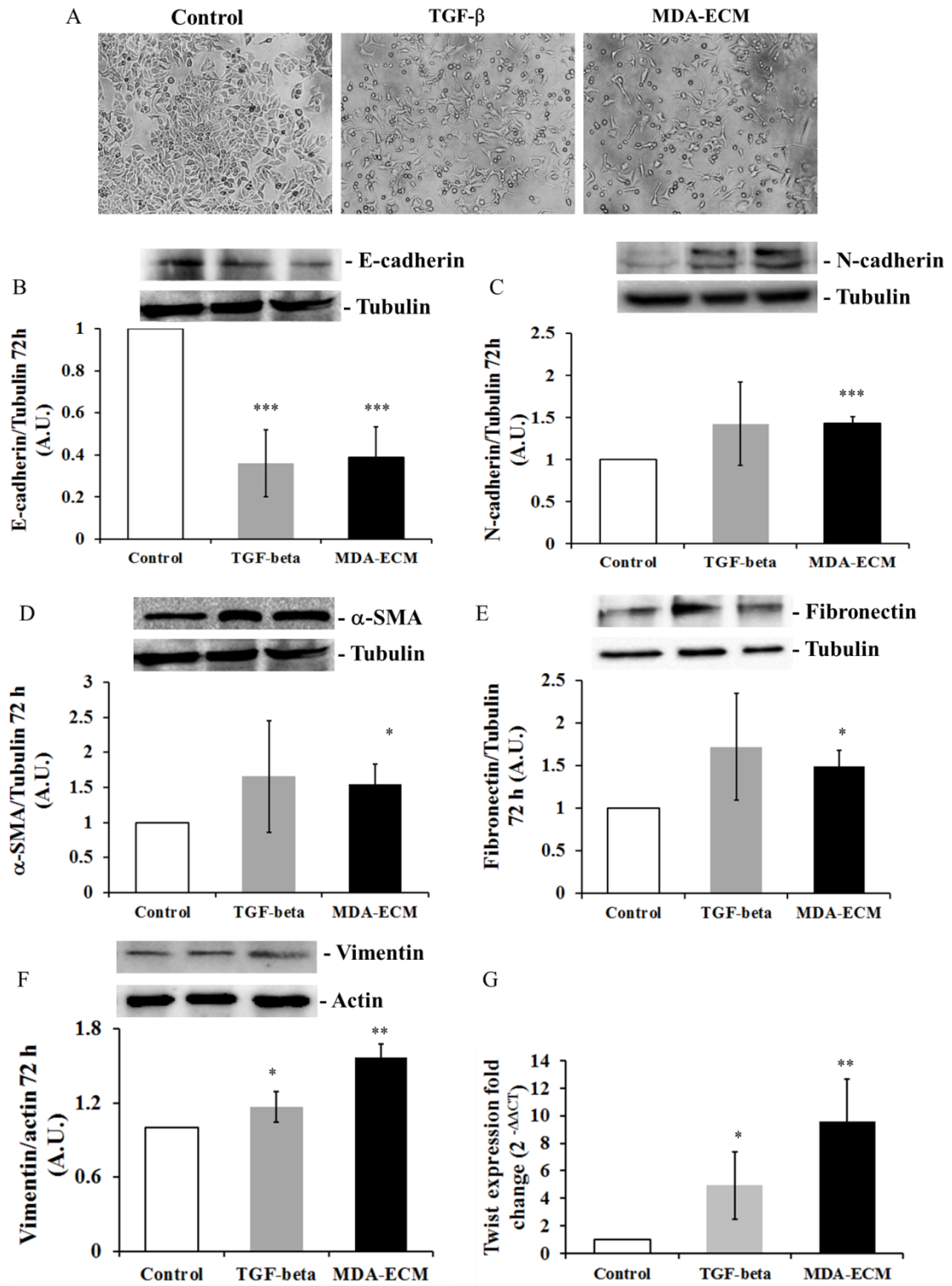


Figure 3:

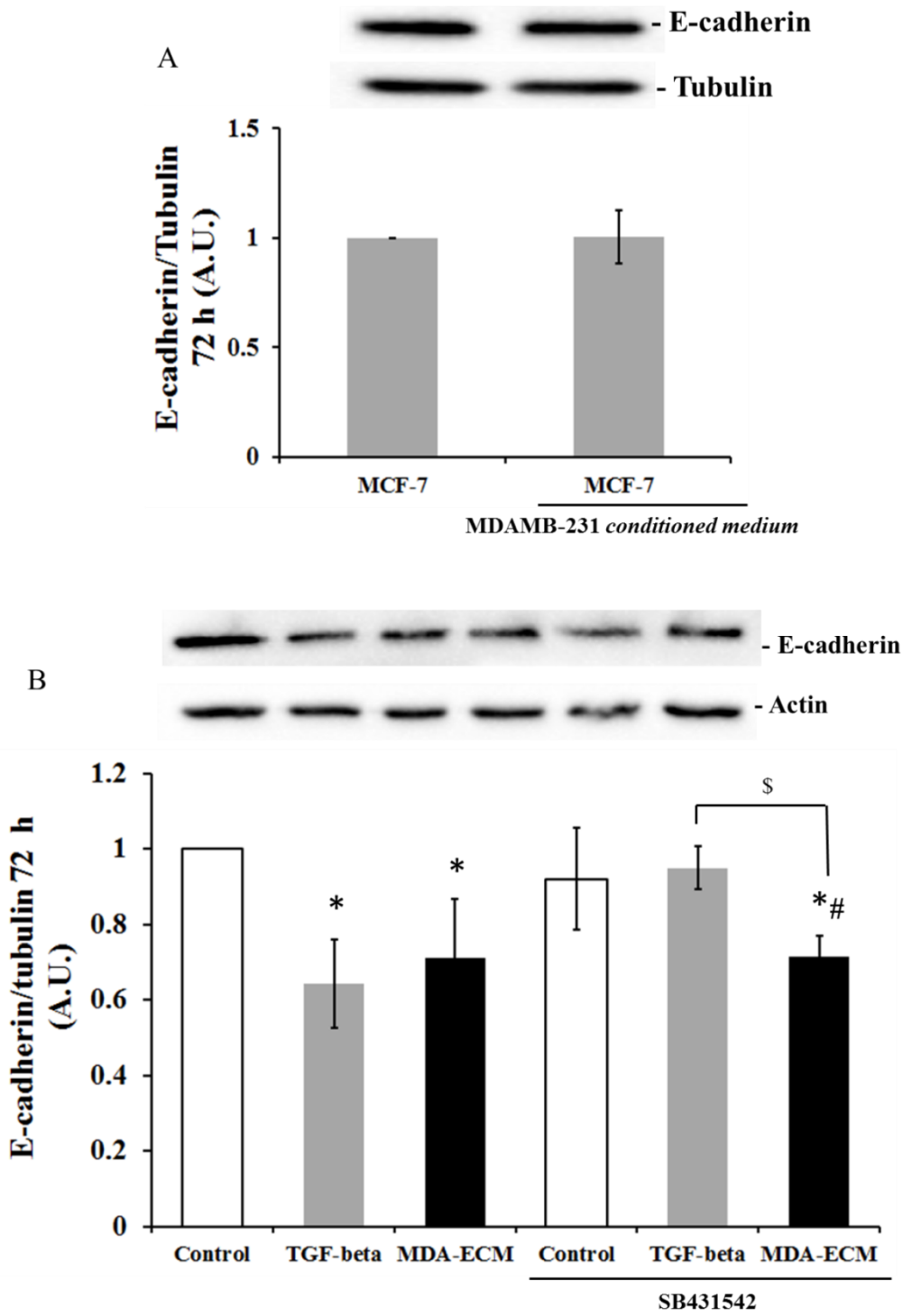


Figure 4:

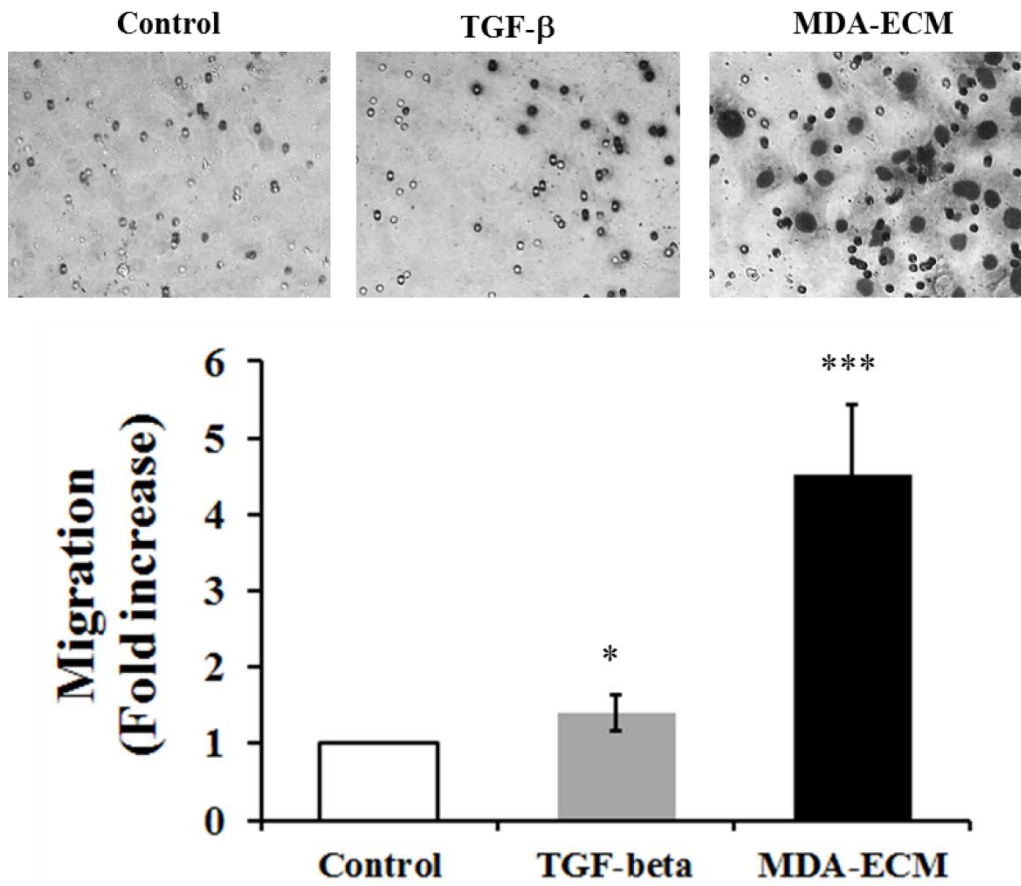


Figure 5:

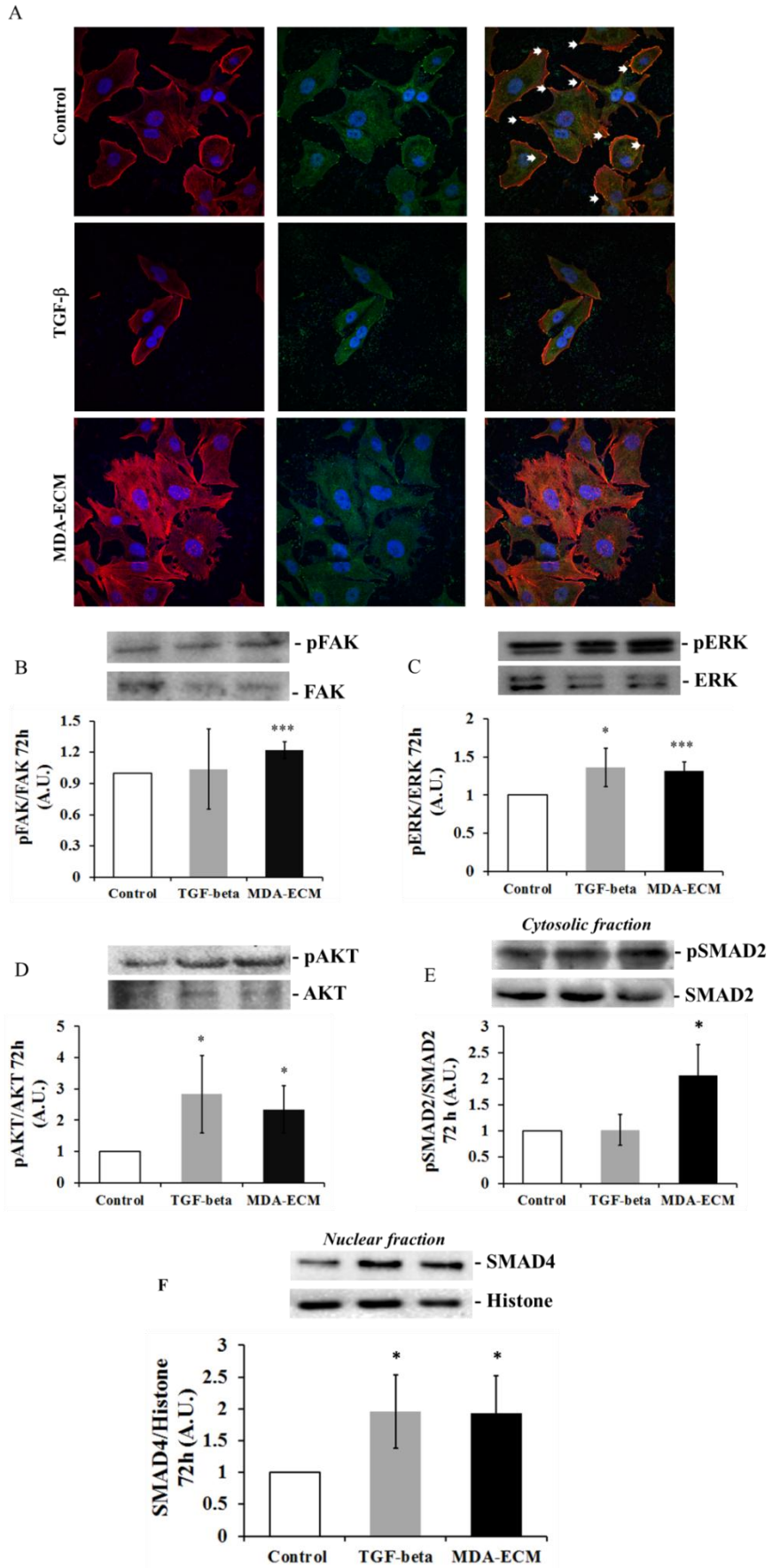




Figure 6:

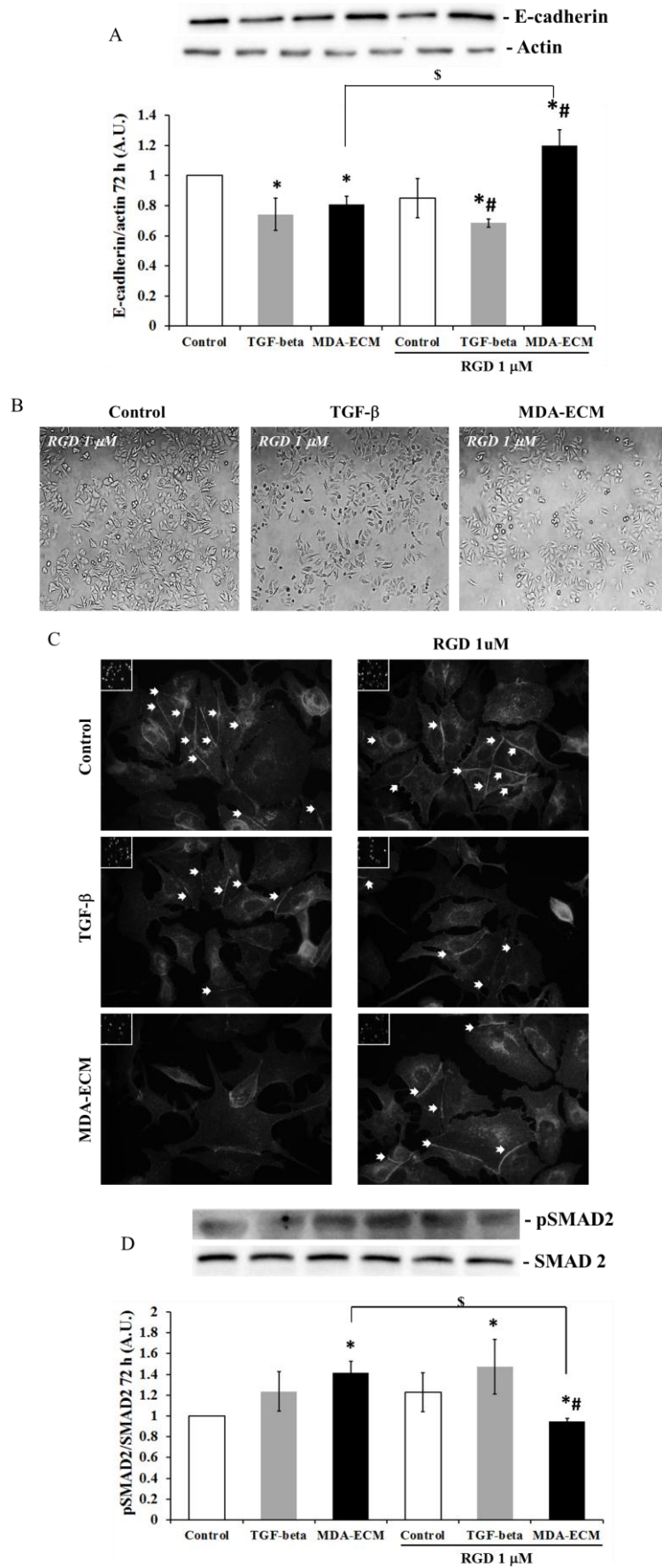


Figure 7:

