



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

Laila Ribeiro Fernandes

**Papel pró-tumoral da trombospondina-1 (TSP-1) em modelos de células de  
adenocarcinoma mamário**

Rio de Janeiro

2019

Laila Ribeiro Fernandes

**Papel pró-tumoral da trombospondina-1 (TSP-1) em modelos de células de adenocarcinoma mamário**

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. Verônica Maria Morandi da Silva

Rio de Janeiro

2019

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

F363 Fernandes, Laila Ribeiro.  
Papel pró-tumoral da trombospondina-1 (TSP-1) em modelos de células de adenocarcinoma mamário / Laila Ribeiro Fernandes – 2019.  
183f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Verônica Maria Morandi da Silva.

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

1. Adenocarcinoma - Teses. 2. Trombospondina 1. 3. Endocitose. 4. Mamas – Câncer – Teses. I. Silva, Verônica Maria Morandi da. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 577.112.85

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

Laila Ribeiro Fernandes

**Papel pró-tumoral da trombospondina-1 (TSP-1) em modelos de células de adenocarcinoma mamário**

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 24 de setembro de 2019.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Verônica Maria Morandi da Silva

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Sheila Coelho Soares Lima

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Tânia Cristina Leite de Sampaio e Spohr

Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer

---

Prof. Dr. André Luiz Mencialha

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2019

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta tese à minha família, minhas raízes, minha referência e meu porto seguro, em especial aos meus pais Elisabeth e Luiz Gomes, e minha irmã Michelle.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por me sustentar, renovar minha fé e por estar a todo momento cuidando de mim e minha família, e guiando nossa caminhada.

À minha mãe Elisabeth, pela sua dedicação, por ser a força que me inspira e impulsiona, acolhe, aconselha, que não mede esforços, que me ensinou o verdadeiro significado de amor incondicional e eterno. Todos os dias aprendo algo com você. Obrigada por sempre me incentivar a continuar seguindo em frente na realização dos meus sonhos, e por não me deixar desistir deles.

Ao meu pai Luiz Gomes, por ser meu grande encorajador, por ter me ensinado desde cedo o refrão da Dory: “continue a nadar, continue a nadar”, que eu só viria a conhecer alguns anos depois, mas que já fazia parte da minha história, e me ajudou a entender que seja no esporte ou no mar da vida temos que perseverar em nossos objetivos. Obrigada também pela sua dedicação, cuidado e apoio.

À minha irmã Michelle, minha melhor amiga, que me entende sem ser necessário pronunciar uma só palavra, por me ensinar a ser uma pessoa melhor, por me ajudar a transpor barreiras que eu julgava não ser capaz. Sem dúvidas, sem as suas colocações certas e necessárias o aprendizado ao longo desta jornada teria sido muito mais difícil. Por abraçar hobbies comigo e me conduzir à novas perspectivas, por saber que você esteve e estará sempre presente, seja nos momentos árduos ou de alegria. Com você sigo aprendendo, me transformando e me inspirando!

Aos meus primos Pedrinho e Vitor por serem a leveza, o sorriso fácil, as brincadeiras, a esperança, e por me mostrarem como as melhores coisas são, de fato, as mais simples.

À tia Maria, minha eterna flor, por ter tido o privilégio de dividir com você tantos momentos, foram muitos ensinamentos, brincadeiras, e muito, muito amor, tanto que a sua luz irradia e continua me aquecendo, mesmo que você já não esteja mais entre nós, mas com certeza ao lado de seres de bem e luz, olhando por todos aqui. À tia Luzia pelo seu ânimo e fé infinitos que me contagiam e fortalecem, pela sua atenção e cuidado, e à tia Patricia, por estar sempre de perto acompanhando e torcendo pelas minhas conquistas.

Ao meu tio Jorge Bafica, pelo seu incentivo diário, por em tantas ocasiões ter sido o ponto de equilíbrio e clareza que eu precisava, por me ensinar que na vida temos que agir com paciência, alegria e com uma dose extra de coragem e persistência. Você, que mesmo diante

dos seus momentos difíceis, continuava sendo o conselheiro, amigo, brincalhão, contagiando a todos. Assim, aprendi, um dia de cada vez.

À minha avó Norma, pelos seus cuidados, abraços carinhosos, preocupações, por não me deixar sair da sua casa sem um bolinho e por ser a minha melhor co-pilota. E ao meu avô Adolpho, que ficava acompanhando os resultados dos vestibulares só para me avisar, pelos ensinamentos e apoio. À minha avó Francisca, pelo carinho e pelos momentos compartilhados.

Ao meu namorado Thiago, por ser meu companheiro em todas as horas, por ter entendido quando minha ausência foi necessária, por me impulsionar a cada vez mais acreditar e confiar na minha capacidade, por dividir as dificuldades, alegrias e vitórias comigo, por ser o abraço aconchegante que diz: “vai dar tudo certo!”, pela nossa cumplicidade, respeito, admiração mútuos, e por estarmos aprendendo e construindo juntos.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Verônica Morandi por todos os ensinamentos, oportunidades, paciência, compreensão, discussões científicas e por acreditar no meu trabalho. Em especial, por ter compartilhado comigo a trombospondina-1 e seus desdobramentos.

À professora Dr<sup>a</sup> Prescilla Emy Nagao Ferreira pela revisão deste trabalho e pelas sugestões.

Ao Marcos Temperini, pela organização, que contribui para o melhor andamento das atividades no laboratório, pelas culturas de HUVEC, pelas dicas de compra e viagem, por ser nosso fornecedor oficial de vinhos, pelas conversas, palavras de incentivo e apoio.

Ao Antonio, a Marcella e a Carol pela companhia inúmeras vezes até tarde no laboratório, por terem torcido a cada revelação, pelo incentivo, conversas, cafês, bolos de potes e várias guloseimas, pelas risadas e momentos de diversão. E claro, pelas viagens de trem, que com certeza são melhores e mais engraçadas com vocês, e ao Antonio também por ter dividido os ubers de volta para casa.

À Aline, Vivi e Edward por terem sido companheiros de laboratório durante tanto tempo, compartilhado conhecimentos, e por terem me auxiliado nas diferentes etapas da vida acadêmica, me incentivando e apoiando, e também por partilharem os momentos de alegria e diversão.

Ao Chico por toda a ajuda com o equipamento e as análises de microscopia confocal, e tubulogênese, pelos momentos de descontração, e por ser nosso organizador oficial dos eventos e dos deliciosos brunchs.

À Andreza pela ajuda com as zimografias, e pelos momentos de diversão.

À tia Mariléa pelas carinhosas mensagens todos os dias, por sempre deixar o laboratório perfumado e pelo apoio.

À professora Dr<sup>a</sup> Thereza Christina Barja Fidalgo por ter disponibilizado o uso do citômetro em seu laboratório e à Dr<sup>a</sup> Mariana Renovato pela ajuda com a realização das citometrias.

À Anninha e Raficthaa, pela atenção e pelo carinho, por sempre trazerem tranquilidade e alegria, pela empolgação que me contagia, pelos momentos de diversão, aprendizado, e troca de experiências. E à Jessica, que também me acompanhou ao longo deste caminho, pelas conversas e momentos de descontração.

À Luisa e Larissa por estarem comigo há muitos anos, e que mesmo que estejam distantes fisicamente, compreendem que a amizade vai muito além disso, e de forma singular respeitam as nossas individualidades, e sempre encontram um meio de estarem presentes e trazerem afago para o meu coração.

À família do meu namorado que sempre me incentiva e torce por mim: Rita, pelo carinho, por suas doces e singelas palavras, que sempre chegam no momento certo; Regina, por sua força, alegria e otimismo contagiantes, e por me ensinar a sempre aproveitar as oportunidades e o melhor da vida; Yasmim, por sempre me receber com aquele sorriso e abraços tão acolhedores; Daniel, por me ensinar a teoria do Daniel do futuro e pelas curiosidades biológicas; Klaus, pelos momentos de descontração, pelas melhores técnicas de jogos de tabuleiro e pela grande cultura compartilhada; Avimar, pelo carinho, pelas dicas de plantas e por aquele almoço de domingo; Diogo, pelo carinho e pelas conversas; Dona Lourice, por sempre ter me recebido de forma tão amável, e seu Emílio pelos quitutes árabes e por dividir as suas histórias comigo.

Ao Matheus, pelo apoio, alegria, por estar presente quando as situações difíceis apareceram e claro, pelos momentos de diversão e comemoração.

À Deise pelo suporte, acompanhamento, por ter me auxiliado a enxergar de diferentes ângulos e a trabalhar as minhas potencialidades.

Aos professores e colegas de laboratórios e departamentos vizinhos (Giselle, Marcelo, Anderson, Tião, Gabi, Thiago, Pamella, Jessica, Carol, Leslie, Graça, Dani, Cláudia, Márcia) que contribuíram de alguma forma para o andamento do projeto disponibilizando equipamentos, reagentes e o mais importante: conversas e trocas de ideias e conhecimentos.

Às pessoas maravilhosas que a UERJ me deu a oportunidade de conhecer: Celle, Nina, Mari, Bruno, João, Milla, Gi, Chico, Luisa e Raquel.

À PPGB e à Mônica Chagas pela oportunidade de participar do projeto de divulgação científica da pós-graduação e pelo lindo e essencial trabalho que está sendo desenvolvido.

Ao Marcos Aurélio, Vitor e Gislene pelo auxílio com as questões administrativas e pelos momentos de descontração.

Às agências de fomento (CNPq, FAPERJ, CAPES) pelo apoio financeiro, que são de extrema importância para o avanço da ciência, tecnologia e inovação no país, e que possibilitaram a realização deste trabalho, assim como de todos os projetos que estive envolvida desde a iniciação científica até aqui.

À UERJ, minha casa acadêmica, que me permitiu descobrir e mergulhar no mundo científico com todos os seus encantos e dificuldades, aonde cresci profissionalmente e pessoalmente, por todas as oportunidades, aprendizados, vivências, pessoas e relações estabelecidas, meu muito obrigada!

Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante.

*Antoine de Saint-Exupéry*

## RESUMO

FERNANDES, Laila Ribeiro. *Papel pró-tumoral da trombospondina-1 (TSP-1) em modelos de células de adenocarcinoma mamário*. 2019. 183f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

A trombospondina-1 (TSP-1), o primeiro inibidor fisiológico da angiogênese a ser caracterizado em 1990, possui papel controverso na angiogênese tumoral e na metástase. O domínio N-terminal da TSP-1 (NTSP-1) é pró-angiogênico e nossos trabalhos em modelos endoteliais sugerem que ele potencializa a ação de fatores de crescimento (FCs) angiogênicos através de seus receptores tirosina-quinase (RTKs). Dada a importância do N-terminal na interação da TSP-1 com células tumorais, torna-se essencial definir se tais eventos também ocorrem nessas células. Selecionamos as linhagens MCF-10A (hiperplásica), MCF-7 (tumoral; não invasiva) e MDA-MB-231 (tumoral; invasiva), que foram caracterizadas quanto à expressão de receptores para o domínio NTSP-1, com o objetivo de avaliar suas respostas funcionais ao EGF, cujo RTK (EGFR) foi o único consistentemente detectado nas três linhagens mamárias. As células foram tratadas com EGF ou NTSP-1, além de uma combinação de ambos, nos seguintes ensaios funcionais: (i) “wound healing” (migração coletiva); (ii) migração individual; (iii) análise de proliferação e morte celular; (iv) diferenciação em esferoides 3D (exceto MDA-MB-231); (v) ativação de EGFR e de ERK1/2. Mudanças expressivas foram detectadas nos parâmetros individuais de migração de cada linhagem, ressaltando: células MCF-10A e MDA-MB231 tratadas com NTSP-1/EGF exibiram maior distância acumulada, se comparadas com células tratadas com EGF. Nas células MCF-7, os tratamentos com EGF e NTSP-1/EGF induziram as maiores velocidades de migração. A análise de trajetórias, para as três linhagens, sugere que as respostas a NTSP-1 estão relacionadas à aquisição de padrões de migração randômicos, relacionados na literatura ao comportamento metastático. Não foram observadas modificações importantes na homeostase da proliferação e morte celulares nas células MCF-10A e MDA-MB-231, enquanto o tratamento NTSP-1/EGF estimulou a proliferação de células da linhagem MCF-7. A análise das linhagens MCF-10A e MCF-7 em ambiente tridimensional (3D) evidenciou transições morfológicas importantes em ambas, mas apenas nas células MCF-7, o NTSP-1 potencializou a mudança induzida pelo EGF nos esferoides, para fenótipos em cachos e em colar de contas, ambos considerados menos diferenciados e/ou mais migratórios. Investigamos a via canônica Ras→Raf→MEK→ERK1/2, ativada por EGFR. NTSP-1 e EGF não pareceram atuar com sinergismo na ativação do EGFR e de ERK1/2 nas linhagens MCF-10A e MDA-MB-231, mas uma forte tendência de potencialização de ERK1/2 pelo NTSP-1/EGF foi observada na linhagem MCF-7, com redução do nível total de EGFR, sugerindo o aumento da sua endocitose, o que foi confirmado por microscopia confocal, com a observação de persistência da co-localização de EGFR com Rab5A (marcador de endossoma primário) até 60 minutos, apenas com o tratamento NTSP-1/EGF, sugerindo que o NTSP-1 prolonga a ação do EGF nessas células. Ensaios da via de ERK em células MCF-7, nos quais NTSP-1 foi substituído por TSP Hep II, um peptídeo bioativo ligante de sindecina-4, demonstrou tendência de maior ativação da via. Em ensaios clonogênicos, o tratamento com TSP Hep II, isolado ou em combinação com EGF, levou à formação de colônias de menor diâmetro e de aspecto celular disperso. Por fim, caracterizamos a potencialização de outro FC, FGF-2, na resposta angiogênica dependente de FGFR1, em CEs microvasculares. Nossos dados reforçam hipótese de um papel pró-tumoral e pró-angiogênico para domínio N-terminal da TSP-1 presente no microambiente de tumores mamários, em sinergia com FCs.

Palavras-chave: Trombospondina-1. Domínio N-terminal. Receptores tirosina-quinase (RTKs). EGF (sinalização EGFR). ERK1/2-MAPK. Carcinoma mamário. Endocitose.

## ABSTRACT

FERNANDES, Laila Ribeiro. *Pro-tumoral role of thrombospondin-1 (TSP-1) in adenocarcinoma breast cells*. 2019. 183f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Thrombospondin-1 (TSP-1) was described in 1990 as the first physiologic angiogenesis inhibitor, but today its role in tumor angiogenesis and metastasis remains controversial. The N-terminal heparin-binding domain of TSP-1 (NTSP-1) is rather pro-angiogenic, partially through its ability to potentiate the activity of growth factor-dependent receptor tyrosine kinases (RTKs), in endothelial cells. Since NTSP-1 also binds to a vast array of cancer cells, it is important to ascertain if the molecule also affects relevant RTKs in tumor contexts. MCF-10A (hyperplastic), MCF-7 (tumoral; noninvasive) e MDA-MB-231 (tumoral; invasive) breast cell lines were characterized for the expression of NTSP-1 receptors and then investigated for their responses to EGF, since its receptor EGFR was the most consistently detected in all three cell lines. Treatments (NTSP-1 or EGF, alone or in combination) were performed before the following functional assays: (i) wound healing (for assessment of collective migration); (ii) cell tracking (for individual migration); (iii) analysis of cell death and proliferation; (iv) organoid differentiation (3D-assay; except for MDA-MB-231 cells); (v) cell signaling through EGFR and the Ras→ERK pathway. No significant changes in the homeostasis between cell proliferation and death were observed in MCF-10A and MDA-MB-231 cells with the treatments, while NTSP-1/EGF treatment stimulated MCF-7 cell proliferation. We found significant shifts in individual migration patterns. Among the most important, we observed that MCF-10A e MDA-MB231 cells treated with NTSP-1/EGF exhibited larger accumulated distances, while EGF and NTSP-1/EGF induced significant increases in cell speed, in MCF-7 cells. Overall, for the three lineages, the cell tracking analysis showed that NSTP-1 (alone or in combination with EGF) favored random patterns of cell migration, a trait that rather correlates with the acquisition of metastatic phenotypes. MCF-10A and MCF-7 cell lines grown on a three-dimensional (3D) environment showed both important morphological transitions, but only in MCF-7 cells NTSP-1 enhanced EGF-induced changes in spheroids, from clustered phenotypes to a grape-like and multicellular streaming organization, both considered less differentiated and/or more migratory. We investigated the canonical pathway Ras→ - - →ERK1/2 upon EGFR activation. NTSP-1 and EGF did not appear to act synergistically in the activation of EGFR and ERK1/ 2 in MCF-10A and MDA-MB-231 cells. However, a strong trend towards ERK1/2 potentiation by NTSP-1/EGF was observed in MCF-7 cells, including a strong reduction in the unphosphorylated form of EGFR, suggesting an increase in its endocytosis. This was confirmed by confocal microscopy, which demonstrated the persistence of EGFR co-localization with Rab5A (a primary endosome marker) observed for up to 60 minutes only under the NTSP-1/EGF treatment, suggesting that NTSP-1 prolongs EGF action in these cells. The analysis of ERK activation in MCF-7 cells, when NTSP-1 was replaced by TSP Hep II - a syndecan-4-binding bioactive peptide - showed a tendency for increased activation. In clonogenic assays, treatment with TSP Hep II, alone or in combination with EGF, led to the formation of colonies smaller in diameter, with a dispersed cell appearance. Finally, we characterized the potentiation of another growth factor, FGF-2, in the course of FGFR1-dependent angiogenic response in microvascular ECs. Our data support the hypothesis of a pro-tumor and pro-angiogenic role for the TSP-1 N-terminal domain in the breast microenvironment, in synergy with growth factors.

Keywords: Thrombospondin-1. N-terminal domain. Receptor tyrosine kinase (RTK).

EGF/EGFR signaling. ERK1/2-MAPK pathway. Breast carcinoma. Endocytosis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura da mama e seus principais tipos celulares.....	25
Figura 2 –	Classificação histológica dos cânceres de mama.....	27
Figura 3 –	Classificação molecular dos cânceres de mama.....	30
Figura 4 –	Correspondência entre a arquitetura da glândula mamária e os organoides 3D.....	33
Figura 5 –	Microambientes dinâmicos regulam tanto o desenvolvimento normal da glândula mamária quanto a progressão maligna.....	38
Figura 6 –	Funções exercidas pela matriz extracelular.....	40
Figura 7 –	Influência da matriz extracelular nos marcadores de câncer.....	43
Figura 8 –	Estágios de adesão celular e indução do estado intermediário de adesão por proteínas matricelulares.....	44
Figura 9 –	Representação esquemática da molécula de TSP-1.....	47
Figura 10 –	A angiogênese é regulada pelo balanço entre fatores anti-angiogênicos e pró-angiogênicos.....	49
Figura 11 –	Diversidade de mecanismos de neovascularização tumoral.....	51
Figura 12 –	O domínio N-terminal de ligação à heparina (HBD).....	54
Figura 13 –	Sinalização dos receptores tirosina-quinase e sua regulação.....	58
Figura 14 –	Representação esquemática da família de receptores EGFR/ErbB e seus ligantes.....	61
Figura 15 –	Destinos do EGFR ativado.....	65
Figura 16 –	Análise da expressão de FGFR-1 nas linhagens de mama por <i>western blotting</i> .....	81
Figura 17 –	Análise da expressão de VEGFR-2 nas linhagens de mama por <i>western blotting</i> .....	82
Figura 18 –	Análise da expressão de EGFR nas linhagens de mama por <i>western blotting</i> .....	83
Figura 19 –	Análise da expressão de sindecan-4 nas linhagens de mama por <i>western blotting</i> .....	85
Figura 20 -	Análise da expressão da integrina $\alpha 3$ (CD49c) por citometria de fluxo	86
Figura 21 -	Análise da expressão da integrina $\alpha 4$ (CD49d) por citometria de fluxo	87
Figura 22 -	Análise da expressão da integrina $\alpha 6$ (CD49f) por citometria de fluxo	

	<i>e western blotting</i> .....	88
Figura 23 -	Análise da expressão da integrina $\beta 1$ (CD29) por citometria de fluxo.....	89
Figura 24 -	Análise da expressão da integrina $\alpha 9 \beta 1$ por <i>western blotting</i> .....	90
Figura 25 -	Efeito de NTSP-1 e EGF na migração da linhagem MCF-10A em ensaio de lesão de monocamada (“wound healing” <i>in vitro</i> ).....	94
Figura 26 -	Efeito de NTSP-1 e EGF na migração da linhagem MCF-7 em ensaio de lesão de monocamada (“wound healing” <i>in vitro</i> ).....	95
Figura 27 -	Efeito de NTSP-1 e EGF na migração da linhagem MDA-MB-231 em ensaio de lesão de monocamada (“wound healing” <i>in vitro</i> ).....	96
Figura 28 -	Efeito de NTSP-1 e EGF na migração individual de células MCF-10A	99
Figura 29 -	Efeito de NTSP-1 e EGF na migração individual de células MCF-7....	100
Figura 30 -	Efeito de NTSP-1 e EGF na migração individual de células MDA-MB-231.....	101
Figura 31 -	Análise de proliferação e morte celular na linhagem MCF-10A tratada com EGF e NTSP-1 .....	103
Figura 32 -	Análise de proliferação e morte celular na linhagem MCF-7 tratada com EGF e NTSP-1.....	104
Figura 33 -	Análise de proliferação e morte celular na linhagem MDA-MB-231 tratada com EGF e NTSP-1.....	106
Figura 34 -	Morfologias e critérios para classificação de esferoides mamários em cultura tridimensional (3D).....	108
Figura 35 -	Análise morfológica da linhagem MCF-10A tratadas com EGF e NTSP-1, em ambiente 3D.....	110
Figura 36 -	Análise morfológica da linhagem MCF-7 tratadas com EGF e NTSP-1, em ambiente 3D.....	112
Figura 37 -	Análise das vias de sinalização de EGFR e ERK1/2 na linhagem MCF-10A, em resposta aos tratamentos com NTSP-1 e EGF.....	116
Figura 38 -	Análise das vias de sinalização de EGFR e ERK1/2 na linhagem MCF-7, em resposta aos tratamentos com NTSP-1 e EGF.....	117
Figura 39 -	Análise da via de sinalização de EGFR e ERK1/2 após o tratamento com o fragmento (NTSP-1) na presença do fator de crescimento EGF na linhagem MDA-MB-231.....	119

Figura 40 -	Avaliação da cinética de residência de EGFR em endossomas primários de células MCF-7 tratadas com EGF e NTSP-1.....	121
Figura 41 -	Aspecto morfológico da distribuição de EGFR e Rab5A em células MCF-7 tratadas com EGF e NTSP-1 (10 minutos de tratamento com EGF).....	123
Figura 42 -	Aspecto morfológico da distribuição de EGFR e Rab5A em células MCF-7 tratadas com EGF e NTSP-1 (30 minutos de tratamento com EGF).....	124
Figura 43 -	Aspecto morfológico da distribuição de EGFR e Rab5A em células MCF-7 tratadas com EGF e NTSP-1 (60 minutos de tratamento com EGF).....	125
Figura 44 -	Análise da via de sinalização de EGFR e ERK1/2 após o tratamento com o peptídeo bioativo TSP HepII na presença do fator de crescimento EGF na linhagem MCF-7.....	126
Figura 45 -	Ensaio clonogênico de células MCF-7 após tratamentos com NTSP-1, o peptídeo bioativo TSP HepII, na presença do fator de crescimento EGF.....	128
Figura 46 -	Papel do domínio NTSP-1 e do peptídeo bioativo TSP Hep II na sinalização de MAPK mediada pelo receptor FGFR1 em células endoteliais microvasculares humanas (linhagem HMEC-1).....	132
Figura 47 -	Ensaio tubulogênico com células endoteliais microvasculares (linhagem HMEC-1 tratada com NTSP-1, FGF-2 ou com uma combinação de ambos).....	134

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.....	24
Tabela 2 –	Características moleculares de algumas linhagens usadas em pesquisa.....	36
Tabela 3 –	Receptores de adesão e RTKs das linhagens mamárias.....	92
Tabela 4 –	Resumo dos resultados obtidos nos ensaios funcionais.....	114

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ m	Micrômetro
$\mu$ M	Micromolar
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ADAMTS	Desintegrinas e metaloproteinases com motivos de trombospondina
AEBSF	4-benzenossulfonilo
AIs	Inibidores de aromatase
AJCC	Comitê Conjunto Americano para o Câncer
AKT	Proteína quinase B, serina/treonina quinase
APC	Aloficocianina
ARG	Anfiregulina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> – Coleção Americana de Cultura de Células
B16F10	Linhagem murina de melanoma
<i>BRCA-1</i>	Gene câncer de mama tipo I associado ao reparo de DNA
BSA	Albumina sérica bovina
BT-474	Linhagem tumoral mamária isolada a partir de carcinoma ductal
BTC	Betacelulina
CD29	Integrina $\beta$ 1
CD49c	Integrina alfa 3
CD49d	Integrina alfa 4
CD49f	Integrina alfa 6
CIE	Endocitose independente de clatrina
cm	Centímetro
CME	Endocitose mediada por clatrina
<i>CRK</i>	Proto-oncogene Crk, proteína adaptadora
DAPI	4,6-diamino-2- fenilindol
DMEM	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
DPI	Pontos por polegada
DTT	Ditiotreitol

DUSPs	Fosfatase de dupla especificidade
EC	Célula endotelial
ECFC	Células endoteliais formadoras de colônias
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EEA1	Antígeno de endossoma primário-1
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidermal
EGN	Epigen
Elk1	Fator de transcrição ETS ELK1
EPCs	Células endoteliais precursoras
EPR	Epiregulina
ER	Receptor de estrogênio
ER- $\alpha$	Receptor de estrogênio alfa
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
ERK5	Quinase regulada por sinal extracelular 5
ETS 1	Proto-oncogene ETS 1, fator de transcrição
ETS 2	Proto-oncogene ETS 2, fator de transcrição
F-12 HAM	Meio de cultura mistura de nutrientes Ham's F-12
FAK	Quinase de adesão focal
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FGF-1	Fator de crescimento de fibroblasto-1
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblasto-2
FGFb	Fator de crescimento de fibroblasto básico
FGFR-1	Receptor de fator de crescimento de fibroblasto-1
FGFR-2	Receptor de fator de crescimento de fibroblasto-2
FGFR-3	Receptor de fator de crescimento de fibroblasto-3
FGFR-4	Receptor de fator de crescimento de fibroblasto-4
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
<i>FLT-1</i>	Gene do receptor do fator de crescimento endotelial vascular 1 (VEGFR-1)
FN	Fibronectina
<i>Fos</i>	Proto-oncogene Fos, subunidade do fator de transcrição AP-1
Grb2	Proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento

HBD	Domínio N-terminal de ligação à heparina
HB-EGF	Fator de crescimento tipo EGF ligante de heparina
HCl	Ácido clorídrico
Hepes	4-(2-hidroxietil) piperazina-1-ácido etanossulfônico
HER2	Receptor de fator de crescimento epidermal-2
HER3	Receptor de fator de crescimento epidermal 3
HER4	Receptor de fator de crescimento epidermal 4
HMEC-1	Célula endotelial microvascular humana
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> - Peroxidase de rábano silvestre
HSPGs	Proteoglicanos de heparan sulfato
HUVEC	Célula endotelial isolada da veia do cordão umbilical humano
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IGF-IR	Receptor de fator de crescimento tipo insulina I
ILVs	Vesículas intraluminais
IM	Índice mitótico
IMC	Índice de morte celular
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
JNK	N-terminal quinase c-Jun
<i>JUN</i>	Proto-oncogene Jun, subunidade do fator de transcrição AP-1
KDa	Quilodalton
<i>KDR</i>	Gene do receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR-2)
Ki67	Antígeno marcador de proliferação celular
LOX	Lisil oxidase
LRP-1	<i>Low density protein-related protein 1</i>
M	Molar
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MB	Membrana basal
MCDB-131	Meio de cultura para o cultivo de células endoteliais microvasculares
MCF-10A	Linhagem mamária não tumorigênica isolada de doença fibrocística da mama
MCF-7	Linhagem mamária tumorigênica obtida a partir de adenocarcinoma
MDA-MB-231	Linhagem mamária tumorigênica obtida a partir de adenocarcinoma

MEC	Matriz extracelular
MEK	Quinase ativadora de proteína quinase ativada por mitógeno
min	Minuto
MKPs	MAP-quinase fosfatases
mL	Mililitro
MMPs	Metalloproteases
mTOR	Alvo de mamíferos da rapamicina
MVB	Corpos multivesiculares
<i>MYC</i>	Proto-oncogene Myc, fator de transcrição hélice-volta-hélice
NaCl	Cloreto de sódio
NAF	Fluoreto de sódio
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
NRG	Neuregulina
NTSP-1	Domínio N-terminal da Trombospondina-1
p38 MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno p38
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PDGFs	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKC	Proteína quinase C
PLC- $\gamma$	Fosfolipase C-gama
PR	Receptor de progesterona
PTP1b	Proteína tirosina fosfatase 1B
PTPs	Proteínas tirosina fosfatases
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RAB5	Membro da família RAS de oncogene, pequena GTPase
RAC	Subfamília da família de Rho GTPases
<i>RAF</i>	Proto-oncogene, serina/treonina quinase
RAS	Superfamília de pequenas GTPases
RhoA	Membro A da família de genes homólogos a Ras
RhoG	Membro G da família de pequenas GTPases homólogos a Ras
ROIs	Regiões de interesse

RPM	Rotações por minuto
RPTP $\kappa$	Proteína fosfatase kappa do tipo receptor
RTKs	Receptores tirosina-quinase
SDC-1	Sindecán-1
SDC-2	Sindecán-2
SDC-4	Sindecán-4
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SERMs	Moduladores seletivos de receptor de estrogênio
SFB	Soro fetal bovino
sFRP-1	<i>Secreted frizzled-related protein-1</i> – Proteína 1 secretada relacionada ao receptor Frizzled
SK-BR-3	Linhagem tumoral mamária isolada a partir de adenocarcinoma
SOS	<i>Son of sevenless</i> – Fator de troca do nucleotídeo guanina
SPARC	Proteína secretada, acídica e rica em cisteína
SRC	Proto-oncogene proteína tirosina-quinase Src
T4-2	Linhagem tumorigênica da mama derivada da linhagem não tumorigênica S1
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TGF- $\alpha$	Fator de crescimento transformante alfa
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformante beta
TIMP-2	Inibidor tecidual de metaloproteinase-2
TNBC	Câncer de mama triplo negativo
TN-C	Tenascina-C
TNM	Tumor primário [T], linfonodos regionais [N] e metástases distantes [M]
TP53	Gene que codifica a proteína supressora de tumor p53
TSP Hep I	Peptídeo sintético derivado da sequência N-terminal da TSP-1 (aa 17-35)
TSP Hep II	Peptídeo sintético derivado da sequência N-terminal da TSP-1 (aa 78-94)
TSP-1	<i>Thrombin sensitive protein</i> - Proteína sensível à trombina
TSP18	Domínio N-terminal recombinante, de 18 kDa da TSP-1 (TSP18,

	seqüência de aminoácidos 1-174)
TSP28	Fragmento recombinante derivado do domínio N-terminal da trombospondina-1 com 28KDa
TSPN25	Fragmento recombinante derivado do domínio N-terminal da trombospondina-1 com 25KDa
TSRs	Repetições de tipo I da trombospondina-1
Tyr	Tirosina
uPA	Ativador de plasminogênio tipo uroquinase
uPAr	Receptor de ativador de plasminogênio tipo uroquinase
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR-2	Receptor de fator de crescimento endotelial vascular -2
VPF	Fator de permeabilidade vascular
WHO	<i>World Health Organization</i> – Organização de Mundial de Saúde
<i>Wnt</i>	<i>Wingless</i>
YAP	Proteína associada a yes -1

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	23
1	<b>METODOLOGIA</b> .....	69
1.1	<b>Proteínas, peptídeos e anticorpos</b> .....	69
1.2	<b>Cultivo Celular</b> .....	70
1.3	<b>Pré-tratamento com o fragmento ou peptídeos derivados do domínio N-terminal da TSP-1</b> .....	70
1.4	<b>Análise de proteínas por Eletroforese PAGE-SDS e <i>Western Blotting</i></b> .....	72
1.5	<b>Dosagem de proteínas</b> .....	72
1.6	<b>Análise dos receptores celulares por citometria de fluxo</b> .....	73
1.7	<b>Ensaio de lesão em monocamada</b> .....	73
1.8	<b>Time-Lapse e <i>tracking</i> celular</b> .....	74
1.9	<b>Ensaio Clonogênico</b> .....	74
1.10	<b>Ensaio 3D (<i>On-Top Assay</i>)</b> .....	75
1.11	<b>Ensaio de adesão e proliferação celular</b> .....	77
1.12	<b>Marcação por Imunofluorescência e Análise por Microscopia Confocal</b> .....	78
1.13	<b>Ensaio de Tubulogênese Endotelial</b> .....	79
1.14	<b>Análise Estatística</b> .....	79
2	<b>RESULTADOS</b> .....	80
2.1	<b>Caracterização da expressão de receptores tirosina-quinase (RTKs) e de receptores de adesão celular em linhagens epiteliais mamárias</b> .....	80
2.2	<b>Efeito do fragmento NTSP-1 e do EGF na migração celular das linhagens mamárias</b> .....	91
2.2.1	<u>Ensaio de lesão em monocamada</u> .....	92
2.2.2	<u>Monitoramento em tempo real e <i>tracking</i> celular por videomicroscopia</u> .....	97
2.3	<b>Papel do tratamento com o fragmento NTSP-1 e EGF na proliferação e morte celular das linhagens mamárias</b> .....	102
2.4	<b>Papel do EGF e NTSP-1 na regulação da morfologia tridimensional de linhagens mamárias</b> .....	105
2.5	<b>Papel do domínio N-terminal da TSP-1 na sinalização mediada por EGFR</b> ...	113
2.6	<b>Análise da endocitose de EGFR sob modulação de NTSP-1 e EGF por microscopia confocal, na linhagem tumoral MCF-7</b> .....	120

2.7	<b>Estudos preliminares funcionais com o peptídeo bioativo TSP HepII na sinalização mediada por EGFR.....</b>	122
3	<b>DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS.....</b>	136
	<b>CONCLUSÕES.....</b>	158
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	160

## INTRODUÇÃO

### Epidemiologia do Câncer de Mama

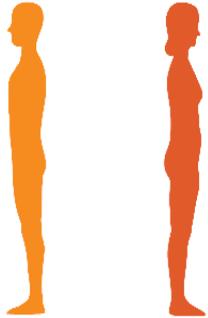
O câncer de mama é o segundo tipo mais incidente no mundo, atrás apenas do câncer de pulmão (Ferlay *et al*, 2015; Estimativa INCA 2018), sendo a neoplasia mais comum em mulheres (Ban & Godellas, 2014), correspondendo a 25% dos novos casos a cada ano (Ferley *et al*, 2015), e constituindo a principal causa de morte de mulheres por câncer no mundo (Torre *et al*, 2016). O câncer de mama também pode acometer homens, embora seja um evento raro, que corresponde a menos de 1% de todos os tipos de neoplasias que atingem o sexo masculino e menos de 1% de todos os tipos de câncer de mama (Abdelwahab, 2017). Na prévia de sua última avaliação, divulgada na íntegra em 2019, a IARC (Agência Internacional para Pesquisa em Câncer), estimou em 2,1 milhões o número de novos casos de câncer de mama no mundo em 2018, e cerca de 627.000 mortes associadas a esta doença (Bray *et al*, 2018; Ferlay *et al*, 2018).

No Brasil, o número de novos casos de câncer de mama feminina estimados para 2018 foi de 59.700, de acordo com dados publicados pelo INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva) na Estimativa 2018 – Incidência de Câncer no Brasil. Nessa estimativa, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais frequente nas mulheres das regiões Sul (73,07/100 mil), Sudeste (69,50/100 mil), Centro-Oeste (51,96/100 mil) e Nordeste (40,36/100 mil). No Norte, é o segundo mais incidente (19,21/100 mil). A **Tabela 1** mostra a incidência de câncer estimada para 2018, de acordo com sexo, onde o câncer de mama aparece como mais incidente no sexo feminino.

Diferentes fatores estão relacionados com o surgimento da doença, entre eles destacam-se aspectos relacionados à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, menopausa tardia), questões hormonais, nuliparidade ou gravidez tardia (Torre *et al*, 2016), genéticos (histórico familiar), uso de alguns anticoncepcionais e reposição hormonal na menopausa (Estimativa INCA 2018) e ambientais (consumo de álcool, exposição à radiação ionizante), sedentarismo e obesidade, além do envelhecimento (Key *et al*, 2001; Estimativa INCA 2018; Ban & Godellas, 2014), e a alta densidade do tecido mamário (Nazari & Mukherjee, 2018). Em contrapartida, a amamentação reduz o risco de desenvolvimento da doença (Torre *et al*,

2016). O melhor entendimento destes fatores possibilita um melhor aconselhamento e tratamento dos pacientes (Ban & Godellas, 2014).

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

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%		<b>Homens</b> <b>Mulheres</b>	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

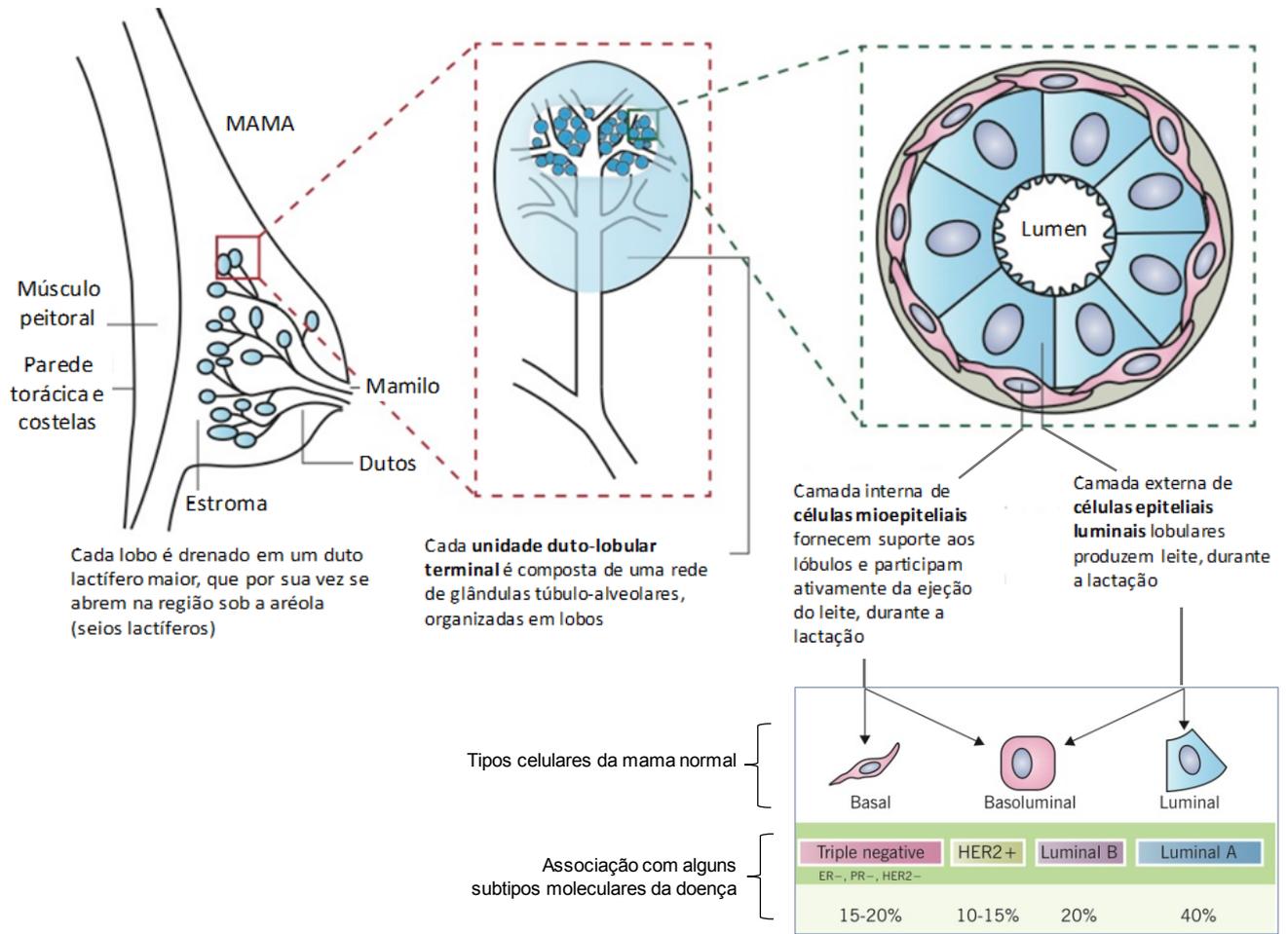
\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Retirada de *Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil*, editada pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2018.

## Estrutura da Mama

A glândula mamária é composta por uma série de ductos ramificados que conectam as unidades glandulares funcionais (ácinos) ao mamilo. Os ductos de ramificação, assim como os ácinos localizados nas extremidades de cada sistema ductal, são compostos de dois tipos celulares: (i) uma camada interna de células epiteliais luminais secretoras com microvilosidades apicais, cercadas por células mioepiteliais contráteis. As células luminais dos ácinos estão arranjadas radialmente com a presença de junções oclusivas (*tight junctions*) entre as células localizadas no polo apical, próximo ao lúmen central (Vidi *et al*, 2013), conforme ilustrado na **Figura 1**. A principal função do ácino é a secreção de leite. E o fluxo de leite nos ductos é alimentado pela contração das células mioepiteliais. As células luminais apresentam como marcadores principais as queratinas 8 e 18, e as células mioepiteliais/basais, as queratinas 5/6 e 17, integrina  $\beta 4$  e laminina (Perou *et al*, 2000).

Figura 1 - Estrutura da mama e seus principais tipos celulares



Legenda: Organização anatômica e histológica da glândula mamária. As células do tecido mamário dividem tarefas na produção e ejeção do leite materno, durante o processo de lactação. A regulação do metabolismo celular por hormônios e fatores de crescimento tem importância fundamental para a homeostasia da lactação, além de profundo impacto no desenho de tratamentos para as neoplasias da glândula mamária. Dos três tipos celulares principais (luminal, basoluminal e basal), o luminal é o mais envolvido na origem de neoplasias, enquanto os cânceres de características basais podem se apresentar como os de tratamento mais difícil.

Fonte: Adaptado de Wong e Rebelo, 2012 ([www.pathophysiol.org](http://www.pathophysiol.org) – *Learning resources of the MacMaster University, Ontario, Canada*)

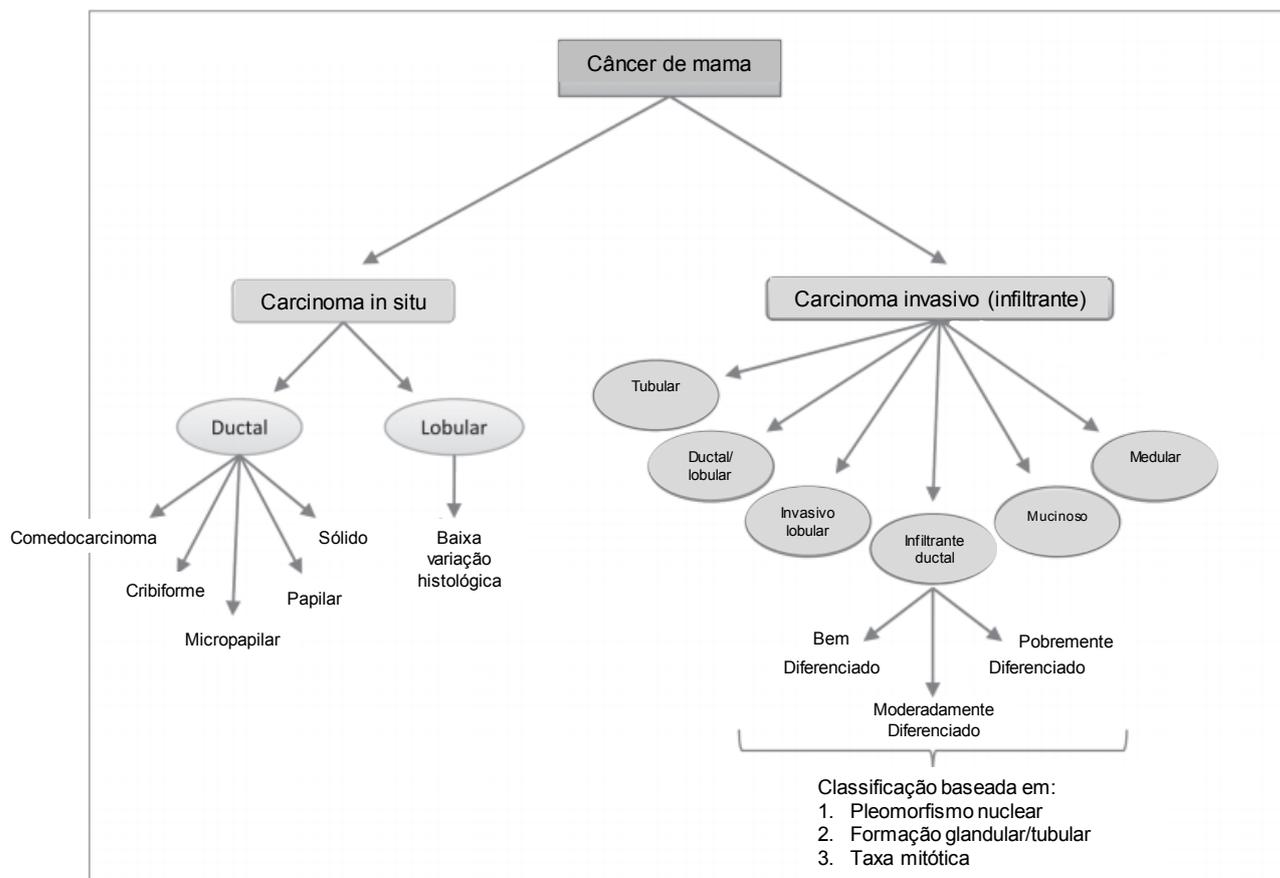
## Classificação do Câncer de Mama

O câncer de mama é uma doença heterogênea, com alto grau de variabilidade inter- e intratumoral, e diversidade considerável tanto biologicamente quanto clinicamente. Assim, a estratificação dos diferentes tipos de tumores é essencial para que melhores resultados clínicos possam ser alcançados (Sorlie *et al*, 2003; Yeo e Guan, 2017).

Os carcinomas mamários podem ser categorizados de acordo com o comportamento clínico, características histológicas, e/ou propriedades biológicas (Russnes *et al*, 2017). De modo geral, os pilares da caracterização continuam pautados no subtipo histológico, o grau e o estágio do tumor, os quais refletem o grau de diferenciação tumoral (ex: formação tubular) e sua taxa de crescimento (tamanho e contagem mitótica) (Provenzano *et al*, 2018).

A **Figura 2** mostra o esquema de classificação histológica mais amplamente utilizado até 2012, mas que ainda é bastante aplicado na prática clínico-diagnóstica (Malhotra *et al*, 2010). Basicamente, os tipos têm sido classificados em *in situ* (ductal ou lobular) ou *invasivo* (infiltrante), sendo este segundo grupo o foco da grande complexidade da classificação histológica, com pelo menos seis subtipos. O tipo histológico classificado como *infiltrante ductal* corresponde a cerca de 80% das neoplasias da mama feminina.

Figura 2- Classificação histológica dos cânceres de mama



Legenda: Este esquema, correntemente utilizado na clínica oncológica, categoriza a heterogeneidade observada no câncer de mama com base na arquitetura tecidual e nos padrões de crescimento tumoral.

Fonte: Adaptado de Malhotra *et al*, 2010.

A última classificação do câncer de mama liberada pela Organização mundial de Saúde (WHO-*World Health Organization*) (Lakhani *et al*, 2012) incluiu também as lesões precursoras, lesões de baixo potencial maligno, proliferações epiteliais benignas, fibroepiteliais, mioepiteliais, e neoplasias mesenquimais, entre outras. Nessa edição, a terminologia para o tipo mais comum de câncer de mama mudou de “*carcinoma ductal invasivo, não especificado de outra forma*” (NOS – *not otherwise specified*), para “*carcinoma invasivo de nenhum tipo especial*” (NST – *no special type*), categoria não uniforme que compreende todos os tumores da mama sem características de diferenciação específicas. Dessa forma, a terminologia de uso preferencial para essa categoria passou a ser **carcinoma de nenhum tipo especial**, sendo seu diagnóstico realizado através de um mecanismo de exclusão, ou seja, a não identificação de características presentes em tipos histológicos específicos de carcinoma mamário invasivo (Sinn e Kreipe *et al*, 2013). Assim, os subtipos

histológicos mais prevalentes passaram a ser o carcinoma invasivo de nenhum tipo especial (50-80%) e o carcinoma lobular invasivo (5-15%) (Sachs *et al*, 2018).

Aos subtipos invasivos, que são os de classificação mais complexa, aplica-se ainda uma *gradação histológica*, sendo que o método mais utilizado no câncer de mama é o sistema de Nottingham, criado em 1957 por Bloom e Richardson e modificado por Elston e Ellis em 1991, o qual confere um grau de malignidade de acordo com três parâmetros, e cada um deles pode receber uma pontuação de 1-3: (a) o grau de diferenciação estrutural (avaliado pela presença de diferenciação tubular); (b) grau de pleomorfismo nuclear (variação no formato, tamanho e coloração do núcleo); (c) taxa mitótica. Nas análises clínico-patológicas tradicionais, o grau histológico é mais importante do que o tipo morfológico para o manejo de paciente com câncer de mama (Russnes *et al*, 2017).

O estadiamento dos tumores de mama, ou seja, a adoção de critérios que definirão a *extensão da doença* no organismo, é realizada através do sistema TNM (tumor primário [T], linfonodos regionais [N] e metástases distantes [M]). O sistema foi criado em 1959 pelo Comitê Conjunto Americano para o Câncer (AJCC- *American Joint Committee for Cancer*). No sistema TNM para o parâmetro T, é conferido um número de 0-4 para descrever o tamanho e a localização do tumor. No parâmetro N, de 0-3 associado a invasão dos linfonodos regionais, e no parâmetro M de 0-1 associado a ocorrência de metástase. Cada um desses parâmetros apresenta subcategorias associadas a critérios clínicos e patológicos.

A última edição (8ª) do manual de estadiamento do câncer de mama continuou baseada em características anatômicas, mas reconheceu a influência prognóstica da categorização molecular dos tumores de mama – descrita mais adiante - com ênfase na expressão de receptores hormonais (ER e PR), da taxa de proliferação e da amplificação de HER2, assim como de painéis de expressão gênica associados ao prognóstico da doença (Giuliano *et al*, 2017; Giuliano *et al*, 2018).

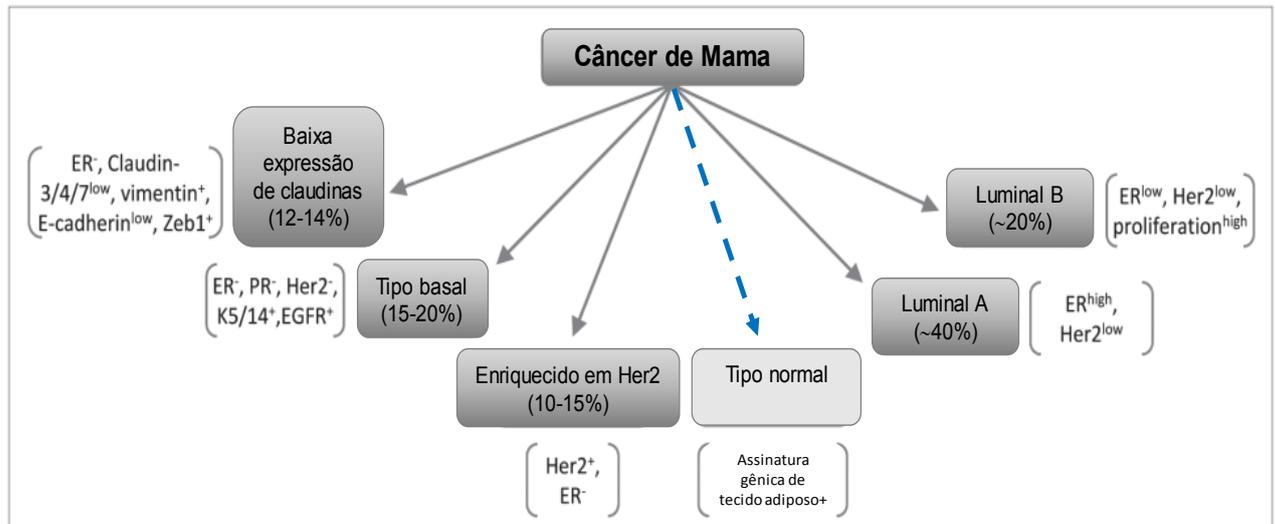
A categorização molecular dos tumores mamários teve início em 2000, quando Perou e colaboradores, propuseram que a diversidade fenotípica dos tumores de mama deveria ser acompanhada de uma diversidade nos perfis de expressão gênica. Dessa forma, eles investigaram, através de uma análise hierárquica de agrupamentos (*clustering hierarchical analysis*), os padrões de expressão em tecidos humanos mamários normais e tumorais. A partir dessa análise, foram estabelecidos os denominados **subtipos intrínsecos**: o subtipo normal; o subtipo *luminal/positivo para o receptor de estrogênio (ER<sup>+</sup>)* (subtipos luminal A e luminal B), o subtipo **basal**, o subtipo enriquecido para o *receptor de fator de crescimento*

*epidermal 2 (HER2<sup>+</sup>)* (Perou *et al*, 2000). Mais recentemente, foi proposto um novo subtipo molecular, denominado de *baixa expressão de claudinas* (Herschkowitz *et al*, 2007; Prat *et al*, 2010). A **Figura 3** apresenta sinteticamente algumas das principais características desses subtipos moleculares.

De modo geral, os diferentes subgrupos moleculares são diferenciados principalmente pela expressão de ER, HER2 e genes relacionados à proliferação celular, características que também podem ser analisadas, de forma mais acessível e barata, através da técnica de imunohistoquímica (Koka e Ioffe, 2013). Embora múltiplos estudos estejam direcionados para a caracterização molecular global dos perfis de câncer de mama, a rotina clínica permanece apoiada em características clínico-patológicas, e principalmente na imuno-positividade para ER, PR e HER2 como base para classificação dos tumores e para definição do tratamento (Sachs *et al*, 2018; Yanovich *et al*, 2018). Além desses marcadores, diretrizes recentes de tratamento recomendam a associação do índice de proliferação (Ki67), especialmente em tumores positivos para ER, uma vez que isso auxilia a identificação de pacientes que podem se beneficiar de quimioterapia adjuvante (Russnes *et al*, 2017).

Muitos estudos têm demonstrado a relevância das informações moleculares para a compreensão de prognósticos e, em alguns casos, reorientação do tratamento. Por exemplo, o subtipo luminal A engloba tumores tipicamente de baixo grau histológico, e que normalmente apresentam um excelente prognóstico e elevada expressão de genes ativados por ER.

Figura 3 - Classificação molecular dos cânceres de mama



Legenda: Esta classificação se baseia nos chamados *subtipos moleculares intrínsecos*, identificados diretamente em tecidos mamários normais e tumorais através da análise de microarranjos. A tipagem molecular vem se tornando importante na prática clínica, dada a variabilidade de resposta frente às novas terapias-alvo. A definição de pools genéticos mínimos, que permitam diferenciar os subtipos com maior segurança vem sendo realizada em pacientes através de técnicas moleculares mais acessíveis, como o PCR em tempo real. A caracterização molecular de tecidos mamários normais (peritumorais ou de mamas saudáveis) define um subtipo molecular normal, no qual predomina a assinatura genética de tecidos adiposos.

Fonte: Adaptado de Malhotra *et al*, 2010.

Já os do subtipo luminal B apresentam um maior grau histológico e alta taxa de proliferação celular, enquanto exibem níveis reduzidos de expressão do receptor de estrogênio e maior probabilidade de apresentarem amplificação de *ERBB2*. Os pacientes com o carcinoma luminal B apresentam um pior prognóstico quando comparados ao luminal A. Ambos os subtipos respondem a terapia hormonal, incluindo tamoxifeno, moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERMs) e inibidores de aromatase (AIs) (Koka e Ioffe, 2013).

Já os carcinomas de tipo basal são tipicamente **triplo negativos** (ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup> e HER2<sup>-</sup>), ou TN, apresentam alto grau histológico, exibem elevado índice mitótico, necrose tumoral, alta frequência de mutações de *TP53*, células tumorais escamosas e características metaplásicas e/ou medulares atípicas (Sorlie *et al*, 2001; Cheang *et al*, 2008; Koka e Ioffe, 2013). É possível identificar resposta estromal linfocítica nesses tumores, como ocorre nos carcinomas invasivos com características medulares (Sinn e Kreipe, 2013). Tais tumores apresentam tendência a disseminação hematogênica, resultando em metástases para o cérebro e pulmão, sem envolvimento dos linfonodos axilares. A sua prevalência ocorre em pacientes

jovens, africanas, afro-americanas e descendentes de latinos (Koka e Ioffe, 2013). Além disso, já foi descrito que a maioria dos tumores que apresentam mutação no gene *BRC A-1* são do subtipo basal (Cheang *et al*, 2008; Sorlie *et al*, 2003). No entanto, deve ser ressaltado que os tumores TN não constituem um grupo homogêneo. Por exemplo, enquanto a maioria dos tumores de subtipo basal são TN, nem todos os tumores TN são categorizados dentro do subtipo basal. Além disso, o subtipo basal de carcinomas TN demonstra uma maior variação genética que os TN não basais (Koka e Ioffe, 2013).

O grupo de tumores positivos para HER2 normalmente são de alto grau histológico, apresentam marcação negativa para receptor de estrogênio e progesterona, porém expressam frequentemente receptor de andrógeno. Embora os pacientes com esse tipo de tumor apresentem um prognóstico ruim devido à elevada taxa de recidiva, no entanto, são capazes de responder ao tratamento com Trastuzumab (Herceptina) e quimioterapia com antraciclina (Koka e Ioffe, 2013). O Trastuzumab quando combinado com outras drogas quimioterápicas melhora o prognóstico de pacientes com doenças metastáticas e diminui o risco de recidivas e morte (Vogel *et al*, 2002; Derakhshani *et al*, 2019).

Em suma, o estadiamento na rotina oncológica atualmente é essencialmente composto pela combinação dos três parâmetros centrais (T, N e M) de estadiamento, associados ao grau tumoral (classificação histológica) e ao status de HER2, ER e PR (Giuliano *et al*, 2017; Giuliano *et al*, 2018).

### **Modelos de carcinoma mamário para estudos *in vitro***

Diferentes estudos vêm sendo realizados com o objetivo de esclarecer os fatores responsáveis desde o surgimento até a progressão da doença. Parte significativa dos trabalhos é desenvolvida *in vitro* com linhagens imortalizadas que já foram estabelecidas há algum tempo e desde então são mantidas em cultivo celular em diferentes laboratórios. As células epiteliais mamárias não malignas, assim como outros tipos celulares diferenciados, deixam de apresentar muitas das características do seu estado diferenciado a partir da sua dissociação e cultura em substratos plásticos (Kenny *et al*, 2007).

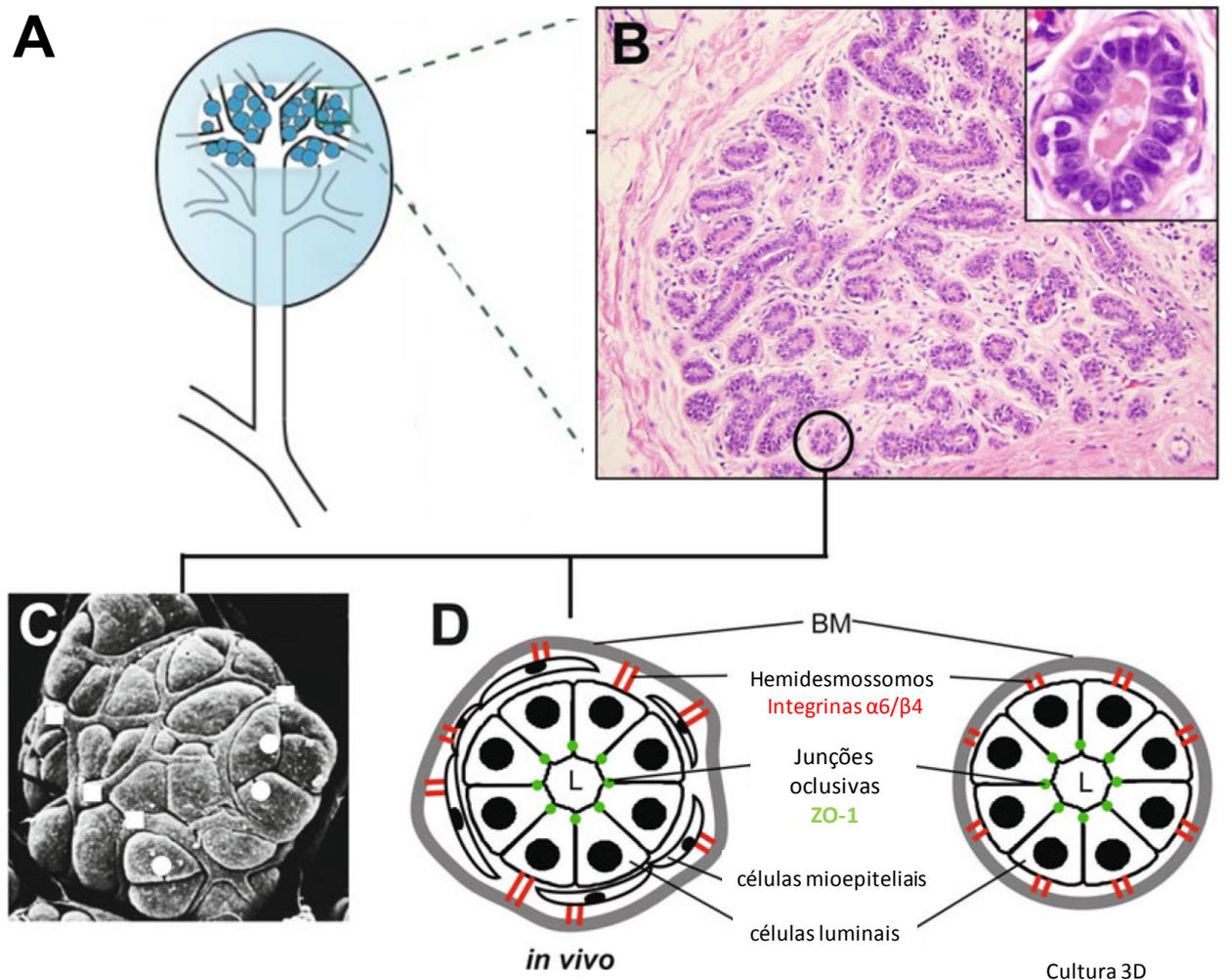
De modo geral, as células de mama cultivadas em monocamada normalmente perdem a sua polaridade, enquanto na cultura 3D, a arquitetura glandular é recapitulada e mantida, conservando, portanto, a polaridade celular (**Figura 4**). Essa situação é importante para regulação do crescimento celular, sobrevivência e manutenção do seu estado de diferenciação.

Diferentemente das células cultivadas em monocamada, as culturas tridimensionais associadas com elementos da matriz extracelular apresentam organização similar à disposição encontrada *in vivo* (do Amaral *et al*, 2010).

A realização de experimentos em um ambiente bidimensional (2D) subestima outros componentes que também fazem parte do microambiente fisiológico e que são essenciais para o estabelecimento e manutenção da especificidade tecidual das células não malignas. A mesma situação é observada para as células tumorais em sistemas de cultura 2D, no qual as células são cultivadas em superfícies sólidas planas, sem interações célula-célula e célula-matriz extracelular, que estão presentes no tumor nativo, e que, portanto, são pouco representativos da sinalização induzida pelo microambiente tumoral alterado, a qual é essencial no estabelecimento de suas características pró-proliferativas, pró-migratórias e pró-invasivas, que resultam na perda de polaridade tecidual, arquitetura desorganizada e falhas em mecanismos de controle do crescimento (Petersen *et al*, 1992; Park *et al*, 2006; Nath & Devi, 2016).

As células cultivadas em ambientes 2D apresentam morfologia alongada e rearranjos do citoesqueleto adquirindo polaridade artificial, a qual resulta em expressão gênica e proteica atípicas (Nath & Devi, 2016).

Figura 4 – Correspondência entre a arquitetura da glândula mamária e os organoides 3D



Legenda: (A) Representação esquemática de um lóbulo mamário. (B) Corte transversal de um lóbulo da mama corado com hematoxilina e eosina (os núcleos aparecem em azul). Uma visão ampliada da menor unidade estrutural e funcional da glândula mamária (ácino) é mostrada em destaque. (C) Micrografia eletrônica de varredura de um ácino. Células luminiais (círculos brancos) e células mioepiteliais (quadrados brancos) são visíveis. Reproduzido de *Rosen's Breast Pathology* (3ª edição, 2009). (D) Esquema de seções transversais através de um ácino *in vivo* (esquerda) e em cultura 3D (direita). A polaridade ápico-basal é evidenciada pelas *tight junctions* (junções oclusivas) célula-célula (pontos verdes) no polo apical e pelas junções célula-membrana basal (BM) (hemidesmosmosos, vermelho) no lado basal. Os marcadores de polaridade estão indicados. Em monocultivos 3D com ausência de células mioepiteliais, os contatos célula-BM são exclusivamente mediados pelas células luminiais. Núcleos estão apresentados em preto. L: lúmen.

Fonte: Adaptado de Vidi *et al*, 2013 e de Wong e Rebelo, 2012 ([www.pathophysiol.org](http://www.pathophysiol.org) – Learning Resources of the MacMaster University, Ontario, Canada)

Da mesma forma, Wang e colaboradores já haviam demonstrado que a co-regulação existente entre integrinas e o receptor EGFR somente funciona corretamente *in vitro* em ambientes 3D, demonstrando que as vias de sinalização celular se encontram alteradas, quando são comparadas condições de cultivo 2D versus 3D, o que possivelmente explicaria por que resultados provenientes da triagem de drogas muitas vezes não reproduzem o cenário *in vivo* (Wang *et al*, 1998; Weaver *et al*, 2002; Simian & Bissell, 2017). Igualmente, Liu e colaboradores demonstraram que o tratamento das células T4-2 com inibidores de PI3K levou a reversão do fenótipo maligno, a qual só foi observada nos ensaios realizados em ambientes 3D ricos em laminina, enquanto que as mesmas respostas não foram observadas nos ensaios realizados em ambientes 2D (Liu *et al*, 2004). Tais fatos exemplificam a importância do ambiente tridimensional para o estudo dos processos de **sinalização**, diferenciação e desenvolvimento de fármacos, o que, portanto, também reflete a relevância dos estudos de culturas 3D para a pesquisa clínica (Simian & Bissell, 2017). Desta forma, demonstra-se a necessidade de comparação e/ ou complementação dos dados gerados em sistemas de cultura bidimensionais com análises realizadas em ambientes tridimensionais que melhor se aproximam do microambiente *in vivo*.

Nos últimos anos, diversos grupos vêm aprimorando o estabelecimento de ambientes tridimensionais, de forma a torná-los similar ao microambiente tumoral, de fato demonstrando que a sinalização emitida por este ambiente é essencial na análise fenotípica e genotípica das diferentes linhagens de mama. Um trabalho realizado pelo grupo da pesquisadora Mina Bissell demonstrou que diversas linhagens de câncer de mama usadas de maneira corrente na literatura podem ser classificadas em quatro morfologias distintas em microambientes 3D, e que este cultivo resulta na mudança de expressão gênica e no padrão de expressão proteico, de forma reprodutível, mesmo entre células malignas (Kenny *et al*, 2007). Maiores detalhes sobre este modelo serão discutidos na sessão de Resultados.

As distintas morfologias identificadas foram também associadas com a invasividade das células tumorais e com as linhagens celulares originadas a partir de metástases, o que possibilita, portanto, o estabelecimento de uma correlação do comportamento fenotípico de cada linhagem em ambientes 3D com diferentes fases do desenvolvimento da doença. Tal correlação levanta outra questão de grande importância nos estudos de diferentes tipos de câncer- a necessidade de se estabelecer e/ ou escolher modelos mais próximos de cada etapa da progressão tumoral - visando uma maior proximidade da realidade clínica - assim como a escolha correta de linhagens adequadas ao enfoque do estudo pretendido. Holliday e Speirs

destacam esta questão em sua revisão de 2011, onde também apresentam uma tabela correspondente à classificação molecular de carcinoma mamário, efetuando uma correlação com as linhagens já estabelecidas (Holliday & Speirs, 2011), exemplificada na **Tabela 2**.

No presente trabalho, utilizamos a linhagem não tumorigênica **MCF-10 A**, e duas linhagens tumorais: **MCF-7** e **MDA-MB-231**. A linhagem MCF-10A, teve origem a partir de tecido mamário isolado de uma paciente com doença fibrocística. Inicialmente uma linhagem mortal (MCF-10M) foi gerada. Em seguida, essas células originaram espontaneamente duas sublinhagens imortais: MCF-10A, de células aderentes, e MCF-10F, de células em suspensão (Tait *et al*, 1990; Soule *et al*, 1990). A análise por microscopia eletrônica demonstrou que tanto a MCF-10A quanto a MCF-10F apresentam características de células ductais luminais, e não de células mioepiteliais (Tait *et al*, 1990). De acordo com os perfis morfológicos propostos pelo grupo de Mina Bissell (2007), a linhagem MCF-7 corresponde ao fenótipo agregado (*mass*), com fortes adesões célula-célula e com núcleo desorganizado, enquanto a linhagem MDA-MB-231 ao fenótipo estrelado, que apresenta corpo celular alongado com extensões e núcleo desorganizado. Adicionalmente, com base na **Tabela 2**, a MCF-7 corresponde ao subtipo luminal A e a MDA-MB-231 ao perfil com baixa expressão de claudinas. Optamos pela sua utilização por representarem modelos de células bem estabelecidos na literatura, da seguinte maneira: (i) MCF-10A: epitélio hiperplásico não-tumorigênico de mama; (ii) MCF-7: linhagem tumoral de menor potencial invasivo/migratório e (iii) MDA-MB-231: linhagem tumoral muito invasiva.

### **Microambiente tumoral**

O desenvolvimento dos tumores humanos compreende a aquisição de capacidades biológicas específicas, são elas: (a) sinalização proliferativa sustentada; (b) evasão de supressores de tumor; (c) resistência à morte celular; (d) imortalidade replicativa; (e) indução da angiogênese; (f) evasão do sistema imune; (g) inflamação associada ao tumor; (h) instabilidade genômica e mutação; (i) desregulação do metabolismo energético e (j) ativação da invasão e metástase (Hanahan & Weinberg, 2011). Durante a progressão tumoral a aquisição desses fenótipos está relacionada com as células recrutadas para o ambiente adjacente ao tumor (Hanahan & Weinberg, 2011), e também com outros componentes do

denominado microambiente tumoral.

Tabela 2- Características moleculares de algumas linhagens usadas em pesquisa

Classificação	Perfil de expressão imunológica	Outras características	Exemplo de linhagens celulares
Luminal B	ER <sup>+</sup> , PR <sup>+/-</sup> , HER2 <sup>+</sup>	Elevada expressão de Ki67, geralmente responde ao tratamento endócrino, resposta variável a quimioterapia. HER <sup>+</sup> respondem a trastusumab	BT474, ZR-75
Baixa expressão de Claudina	ER <sup>-</sup> , PR <sup>-</sup> , HER2 <sup>-</sup>	Baixa expressão de Ki67, E-caderina, claudina-3, claudina-4 e claudina-7. Resposta intermediária a quimioterapia	BT549, <b>MDA-MB-231</b> , Hs578T, SUM1315

Legenda: EGFR- receptor de fator de crescimento epidermal; ER- receptor de estrogênio; HER2- receptor de fator de crescimento epidermal humano 2; PR- receptor de progesterona.

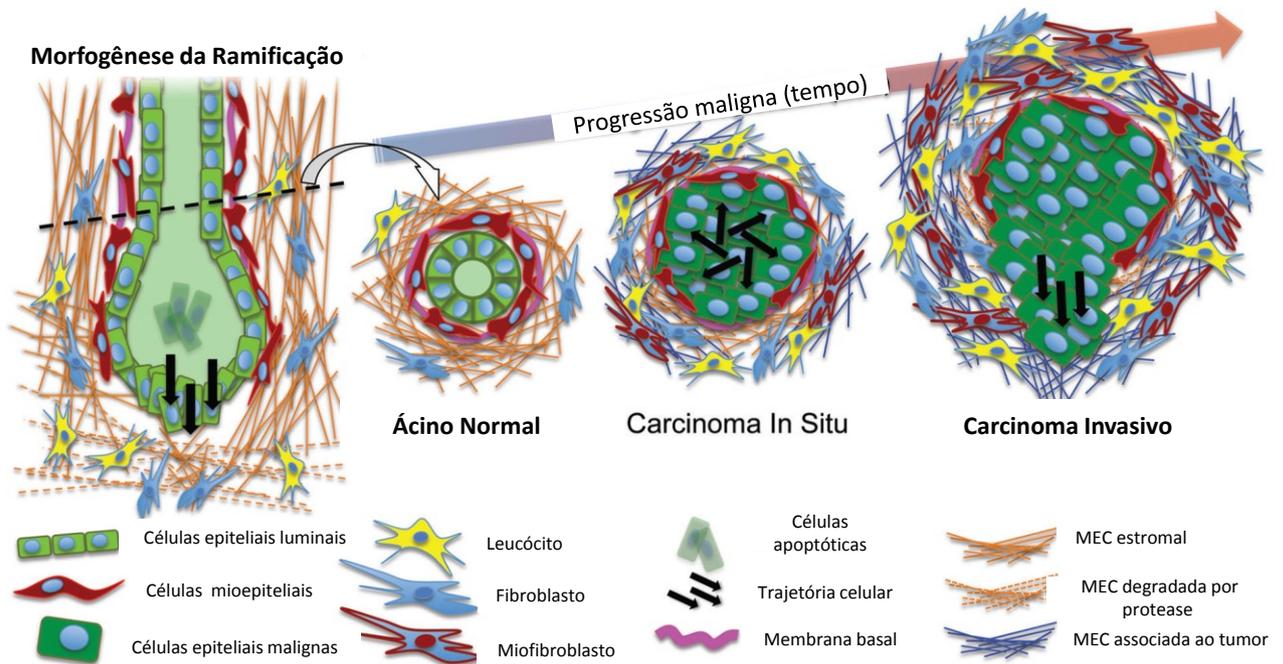
Fonte: Adaptado de Holliday & Speirs, 2011

A hipótese da semente e do solo sugerida por Stephen Paget, em 1889, defendia que as células de câncer (sementes) necessitavam de um microambiente compatível (solo) para sobreviverem e formarem metástases distantes (Paget, 1889; Trotter & Yang, 2016). Dessa forma, ele já havia conferido a ideia da modulação da tumorigênese pelo microambiente de determinados órgãos. No entanto, ela foi contestada e permaneceu por algum tempo negligenciada e até pouco tempo o estudo do desenvolvimento tumoral tinha como único foco a célula tumoral, e era reconhecido como um processo celular autônomo. Porém, hoje já é reconhecida a influência do microambiente circundante ao tumor, e o fato de que as células tumorais não manifestam a doença sozinha, principalmente pelo pioneirismo liderado pela

pesquisadora Mina Bissell, da Universidade da Califórnia em Berkeley (Bissell et al, 2002). De modo geral, o microambiente é importante na determinação tanto dos mecanismos de aquisição quanto de progressão de vários marcadores tumorais, o que reflete a sua capacidade de não apenas responder e sustentar a carcinogênese, como também contribuir ativamente para a iniciação, progressão e metástase do tumor (Hu & Poliak, 2008; Langley & Fidler, 2011). Assim, o microambiente tumoral é reconhecido como um elemento crítico para o desenvolvimento e progressão tumoral, assim como um parâmetro mensurável de resposta ao tratamento (Soysal *et al*, 2015).

O microambiente tumoral é uma complexa rede formada por diferentes tipos celulares, fatores solúveis, moléculas de sinalização, vasos sanguíneos e componentes da matriz extracelular (MEC), que orquestram o destino da progressão tumoral (Catalano *et al*, 2013). Entre os diferentes tipos de células não tumorais recrutadas pelo tumor, podemos citar: células endoteliais, fibroblastos, células imunes, pericitos, adipócitos, e células estromais mesenquimais da medula óssea (Hui & Chen, 2015; Bussard *et al*, 2016). Diferentes estudos sugerem que as interações célula-célula e célula-microambiente são capazes de modificar a proliferação, sobrevivência, polaridade, diferenciação e a capacidade invasiva das células epiteliais mamárias (Polyak & Kalluri, 2010), de forma geral tais interações atuam regulando tanto o desenvolvimento fisiológico da glândula mamária quanto o desenvolvimento tumoral. A proliferação coordenada e a migração, que ocorrem durante o processo de ramificação associado a morfogênese fisiológica, são similares às respostas observadas na invasão tumoral, como ilustrado na **Figura 5**.

Figura 5 – Microambientes dinâmicos regulam tanto o desenvolvimento normal da glândula mamária quanto a progressão maligna



Legenda: O processo de ramificação associado a morfogênese durante o desenvolvimento normal da glândula mamária requer um extensivo diálogo entre as células epiteliais e estromais, e sua matriz extracelular (MEC) subjacente. Esses eventos ressurgem ou são amplificados na presença do tumor, e são frequentemente necessários para a progressão tumoral. Dessa forma, o microambiente representa uma “vulnerabilidade de segurança” através do qual os tumores podem “hackear” o “programa” de desenvolvimento normal para se manifestar.

Fonte: Adaptada de Boudreau *et al*, 2012.

Da mesma forma, já foi demonstrado que o microambiente da glândula mamária é capaz de induzir a transdiferenciação de células originárias de outros órgãos, como células progenitoras neurais e células tumorais embrionárias, em células epiteliais mamárias que se integram nos ductos funcionais e são capazes de produzir leite, evidenciando mais uma vez que a diferenciação celular e a ramificação da arquitetura glandular são instruídas pelo microambiente tecidual (Booth *et al*, 2008; Bussard *et al*, 2010; Boudreau *et al*, 2012).

## A Matriz Extracelular

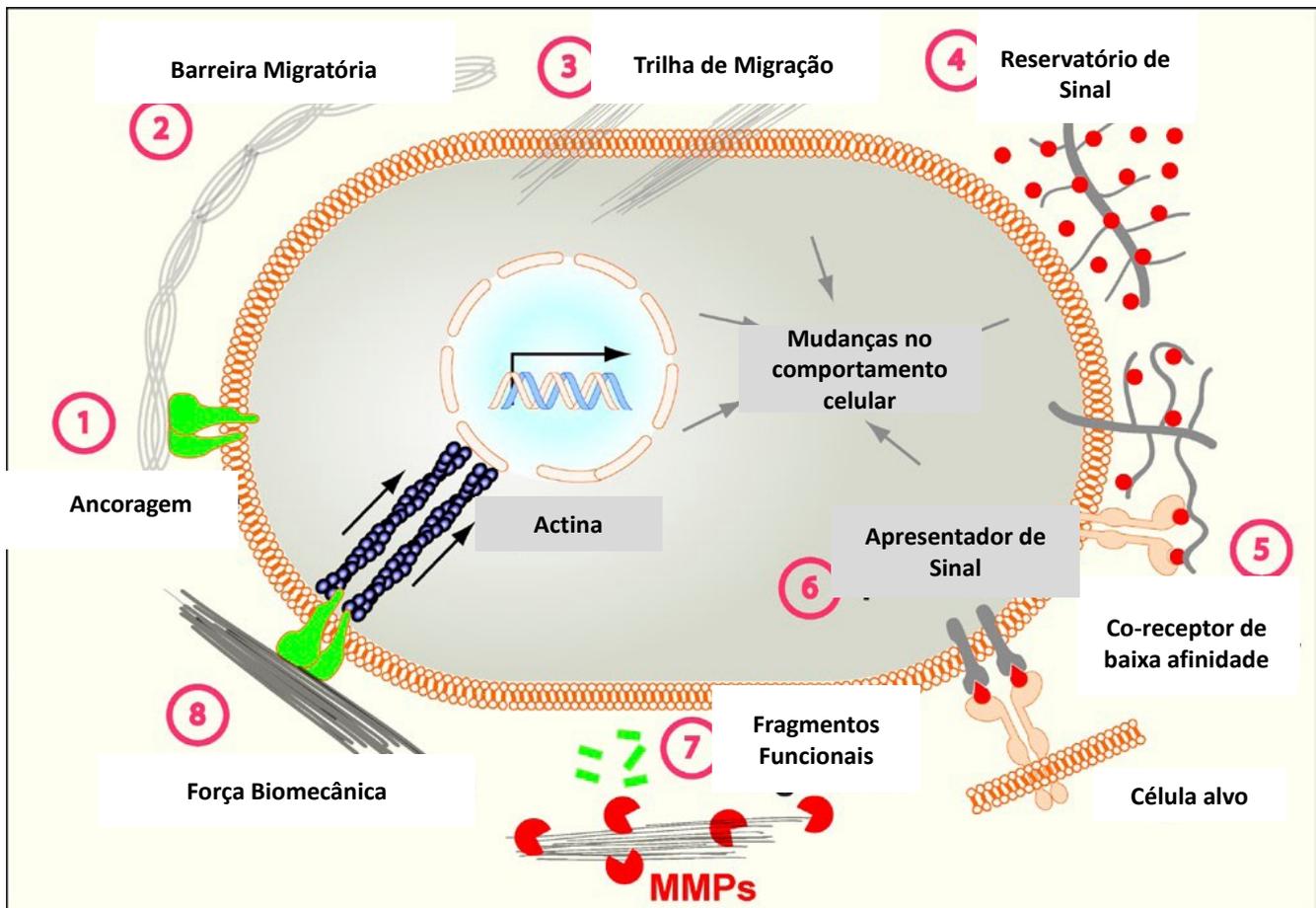
A matriz extracelular, por sua vez, é constituída por uma rede de macromoléculas com diferentes propriedades físicas, bioquímicas e biomecânicas (Lu *et al*, 2012). Entre as

diferentes macromoléculas encontram-se proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos e polissacarídeos, como exemplo podemos citar o colágeno, lamininas, a fibronectina (FN), e as **proteínas matricelulares**. Tais constituintes são responsáveis tanto por funções estruturais como por funções regulatórias (Hu & Polyak, 2008; Chiodoni *et al*, 2010; Chong *et al*, 2012; Iozzo & Gubbiotti, 2018).

Segundo Iozzo e Gubbiotti, comparando a matriz extracelular ao nosso vasto universo, podemos associá-la a um rio que flui através de um vale para providenciar sustentação e ordem para as árvores e solo ao redor para promover a existência da flora e da fauna nativas (Iozzo & Gubbiotti, 2018). Essa colocação demonstra a importância da MEC na regulação das respostas celulares. A **Figura 6** ilustra as principais etapas de regulação: (1) ancoragem; (2) atuação como barreira migratória; (3) ou como facilitadora de migração; (4) reservatório de sinais, auxiliando na formação de um gradiente de concentração; (5) atuação como co-receptor; (6) ou apresentador de sinal, ajudando no direcionamento da comunicação célula-célula; (7) sinalização através de fragmentos funcionais derivados do processamento dos diferentes componentes da matriz por proteases; (8) força biomecânica responsável por controlar a sua rigidez, entre outras características físicas que influenciam o suporte, a arquitetura tecidual e a sua integridade.

Durante o desenvolvimento embrionário e a homeostase de cada órgão, a síntese e a organização da MEC ocorre de forma finamente regulada, no entanto diante de patologias, como fibrose tecidual e câncer, tal síntese se torna desregulada e a matriz de forma geral desorganizada. Dessa maneira, o comportamento das células estromais também é alterado, facilitando a angiogênese associada ao tumor e a inflamação, o que possibilita a geração de um microambiente tumorigênico (Lu *et al*, 2012). Dentro desse contexto, a MEC regula os vários estágios de desenvolvimento e diferenciação da glândula mamária (Kaushik *et al*, 2016). A estrutura básica desse órgão compreende as células epiteliais luminiais em torno de um lúmen central, circundadas pelas células mioepiteliais contráteis, revestidas pela membrana basal (MB), a qual separa o epitélio do estroma, como ilustrado na Figura 1.

Figura 6 – Funções exercidas pela matriz extracelular



Legenda: A MEC se destaca como o principal componente do microambiente tumoral, sendo capaz de regular as respostas celulares por diferentes mecanismos. As principais etapas dessa regulação encontram-se ilustradas abaixo (1) ancoragem; (2) atuação como barreira migratória; (3) ou como facilitadora de migração; (4) reservatório de sinais; (5) atuação como co-receptor; (6) ou apresentador de sinal; (7) sinalização através de fragmentos funcionais; (8) força biomecânica.

Fonte: Adaptado de Lu *et al*, 2012

A membrana basal em associação com a matriz intersticial constitui a matriz extracelular da glândula mamária. A membrana basal é principalmente composta por colágeno tipo IV, lamininas, fibronectina e entactina. E a matriz intersticial é rica em colágenos fibrilares, proteoglicanos, glicoproteínas e fibronectina (Zhu *et al*, 2014; Kaushik *et al*, 2016). A sinalização emitida pela matriz extracelular durante a morfogênese da glândula mamária normal é regulada, de forma que ocorra a deposição e o alinhamento de colágenos fibrilares direcionando a migração e a invasão das células epiteliais mamárias durante o processo de ramificação da glândula. Da mesma forma, as proteínas da membrana basal são necessárias para determinar a polarização das estruturas acinares e para a expressão e secreção de caseína

(a proteína do leite) (Zhu *et al*, 2014).

No câncer de mama, assim como no processo de involução da glândula mamária pós-lactação, ocorre um aumento da deposição de matriz estromal fibrótica, com elevação da expressão de colágenos tipo I, III e V, elastina, vitronectina, **proteínas matricelulares** e fibronectina oncofetal, além de glicosaminoglicanos como o ácido hialurônico e sulfato de condroitina.

Em contrapartida, acontece uma redução do colágeno tipo IV, laminina, entactina e fibronectina, resultante da elevada taxa de proteólise desencadeada pela expressão de diferentes enzimas, como as metaloproteases (Oskarsson, 2013; Kaushik *et al*, 2016). A heterogeneidade do câncer de mama ocorre principalmente devido à natureza dinâmica de sua matriz (Kaushik *et al*, 2016), o que também justifica a associação da MEC a resistência tanto à quimioterapia, quanto à terapia endócrina e radioterapia neste tipo de câncer (Oskarsson, 2013).

Assim, a MEC se destaca como o principal componente do microambiente tumoral, uma vez que além de desempenhar um papel fundamental durante o processo fisiológico de morfogênese tecidual, regula também a progressão de estados patológicos, como ocorre no câncer, através da sua capacidade de modular os principais marcadores ou requisitos necessários para o surgimento e progressão dessa doença (Zhu *et al*, 2014). Os tumores normalmente apresentam desmoplasia, e este estado fibrótico é caracterizado por um aumento da deposição, organização alterada e por uma ampliação das modificações pós-traducionais das proteínas da MEC (Lu *et al*, 2012). Desta forma, a composição e as propriedades mecânicas alteradas da matriz são capazes de influenciar a aquisição e manutenção de cada um dos denominados “*cancer hallmarks*”, tanto os originais quanto os emergentes (Pickup *et al*, 2014), como ilustrado na **Figura 7**. Alguns componentes da matriz extracelular, como as proteínas adesivas fibronectina, colágeno e laminina, em associação com seus respectivos receptores, encontram-se em destaque na ilustração para exemplificar a modulação da sinalização intracelular pela MEC.

### **Glicoproteínas Matricelulares**

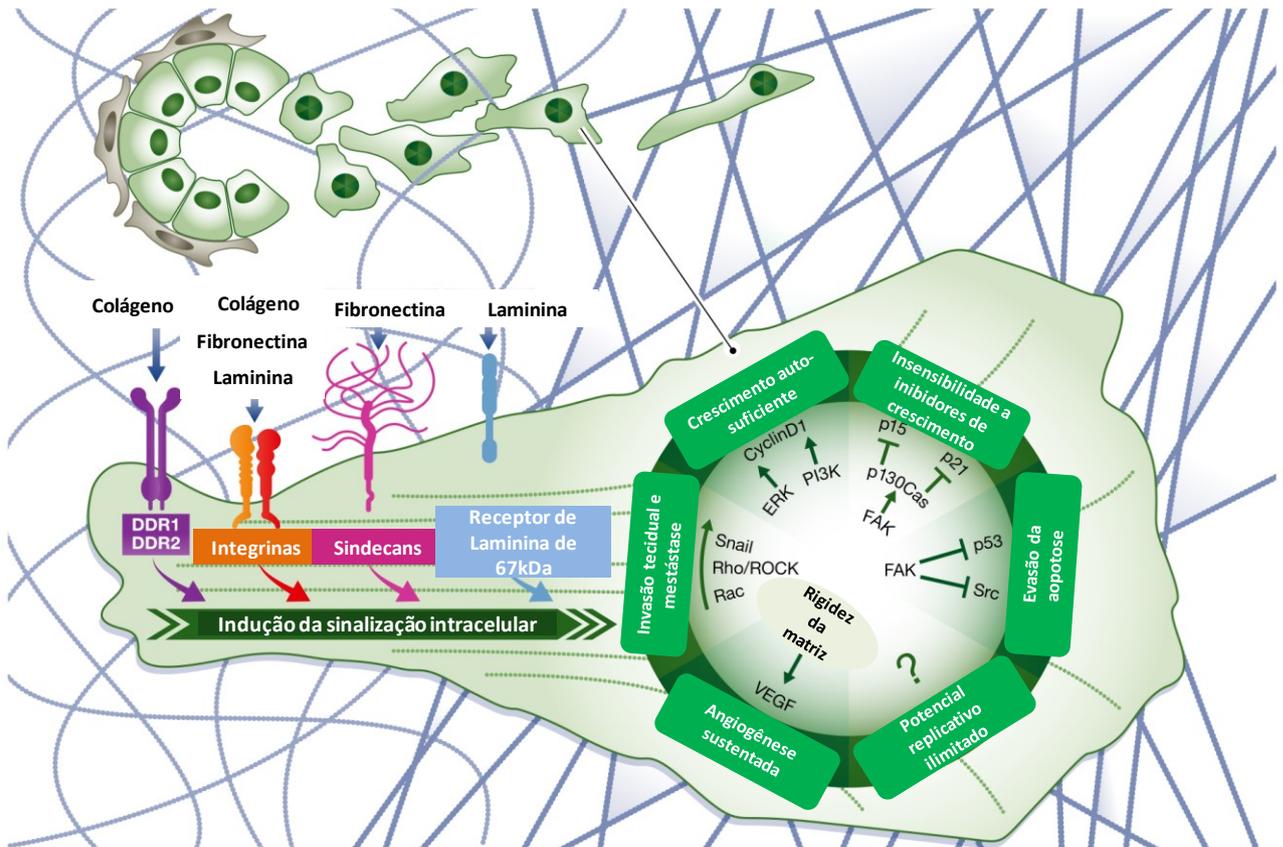
Além destas, outros componentes que exercem papel essencial nesta sinalização são as **proteínas matricelulares**. No microambiente tumoral, elas podem ser produzidas tanto pelas células tumorais quanto pelas células estromais e apresentam como principal característica no

organismo adulto a expressão durante a renovação tecidual e reparo, visando à normalização do tecido (Chiodoni *et al*, 2010).

As glicoproteínas matricelulares funcionam como adaptadoras e moduladoras das interações célula-matriz, sendo conhecidas pela sua capacidade de induzir um estado de adesão intermediário, como ilustrado pela **Figura 8**. São proteínas estruturalmente diversas que incluem as trombospondinas 1 (TSP-1) e 2, as tenascinas, a SPARC (proteína secretada, acídica e rica em cisteína), a osteopontina, a família CCN, galectinas, proteínas contendo repetições (TSRs) de TSP como a família das desintegrinas e metaloproteinases com motivos de trombospondina (ADAMTS) (Roberts *et al*, 2017), entre outras (Murphy-Ullrich, 2001; Chiodoni *et al*, 2010). Ao induzir tal estágio, elas propiciam a aquisição de um fenótipo celular mais migratório e favorável à proliferação.

De modo geral, as proteínas matricelulares não apresentam função estrutural específica, porém são importantes reguladoras celulares e moduladoras de vias de sinalização (Oskarsson, 2013; Wong & Rustgi, 2013; Trotter & Yang, 2016). Conforme supracitado, elas exercem um papel fundamental na modulação da força de adesão, principalmente ao interferirem com as funções da fibronectina e seus receptores, integrinas e sindecans (Mosher & Adams, 2012).

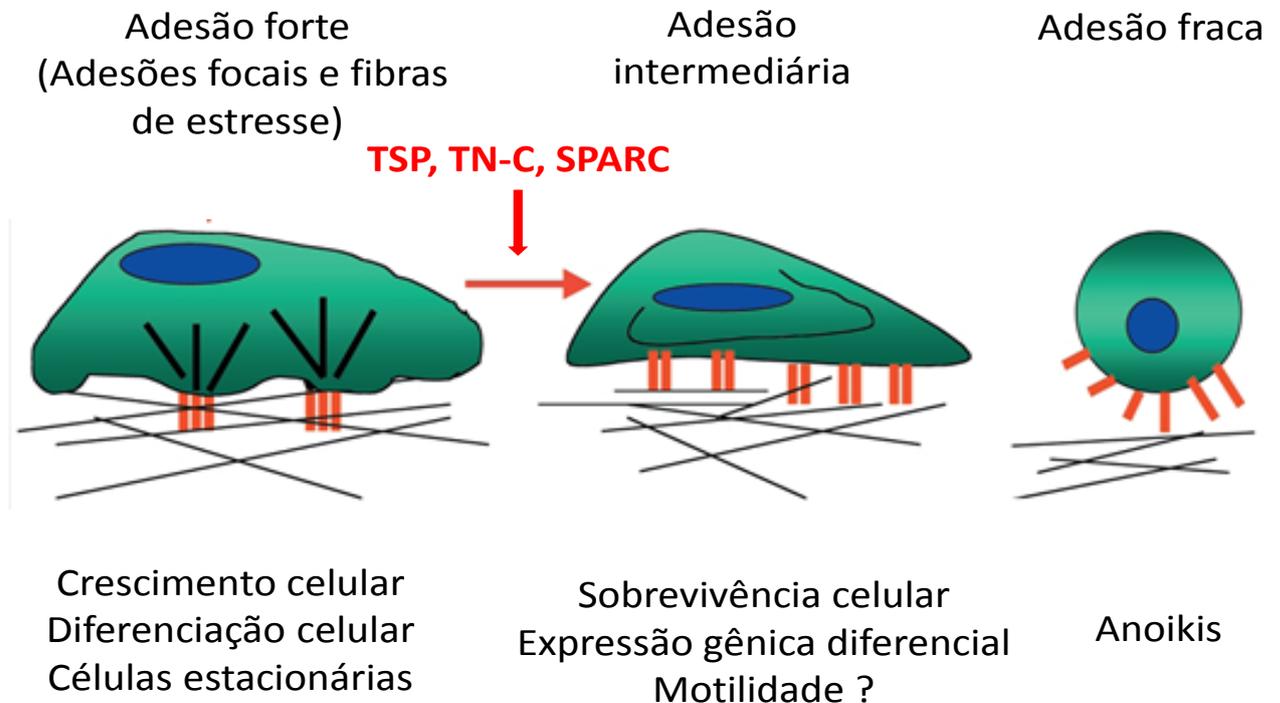
Figura 7– Influência da matriz extracelular nos marcadores de câncer



Legenda: Desde o início do desenvolvimento do tumor até a metástase, a matriz extracelular influencia em cada um dos denominados *marcos tumorais* (“*cancer hallmarks*”), tanto os originais quanto os emergentes, primeiramente descritos em 2000 por Hanahan e Weinberg, e complementados em 2011. As moléculas da matriz se ligam aos receptores da superfície celular, os quais ativam vias de sinalização intracelular. Os sinais induzidos pela adesão à matriz, através de ERK e PI3K promovem proliferação sustentada. A sinalização de FAK inibe supressores da proliferação p15 e p21 e limita a indução de apoptose através de p53. Os componentes da matriz e suas propriedades biofísicas promovem a indução da transição epitélio-mesênquima e estimulam vias pró-migratórias, particularmente através da sinalização de TGF- $\beta$  e RhoA/Rac. A rigidez da matriz também aumenta a angiogênese e a sinalização via VEGF nas células endoteliais. Em cada fase da tumorigênese, a matriz se adapta para reforçar a progressão da doença, através da promoção dos demais marcos.

Fonte: Adaptado de Pickup *et al*, 2014.

Figura 8 – Estágios de adesão celular e indução do estado intermediário de adesão por proteínas matricelulares



Legenda: O estágio de adesão forte é caracterizado pela presença de adesões focais e fibras de estresse. As proteínas matricelulares são capazes de induzir um *estado intermediário* de adesão, propiciando uma maior motilidade e proliferação celular. O balanço dessas proteínas na matriz pode ainda induzir um estado fraco de adesão, o qual pode resultar em *anoikis* ou morte celular induzida pela perda de adesão ao substrato.

Fonte: Adaptado de Murphy-Ullrich, 2001.

Desse modo, é importante compreender que as proteínas matricelulares não alteram por si sós a estrutura da matriz, mas podem regular o metabolismo da MEC, alterando as suas propriedades biomecânicas (Zhao *et al*, 2018). Dentre os diversos eventos regulados por estas proteínas estão: (a) transição epitélio-mesênquima; (b) angiogênese tumoral; (c) proliferação; (d) invasão; (e) migração; (f) evasão do sistema imune; (g) sobrevivência à *anoikis* (h) adesão; (i) deposição de MEC; (j) regulação de sinais de receptores de fatores de crescimento (Chiodoni *et al*, 2010; Chiquet-Ehrismann & Tucker, 2011).

É importante destacar que a regulação dos mecanismos citados acima pode ocorrer de duas formas distintas: através da ligação direta a outras proteínas da MEC, ativando seus receptores de superfície específicos, ou através da associação com fatores de crescimento e

citocinas, modulando suas atividades (Chiodoni *et al*, 2010).

Algumas proteínas matricelulares e fragmentos derivados destas que podem sinalizar através de receptores de fatores de crescimento têm sido denominadas **matricinas**, justamente para enfatizar as suas capacidades de sinalização celular direta (Grahovac & Wells, 2014). O termo *matricinas* foi cunhado por Maquart em 1999 para definir peptídeos originados de moléculas da MEC capazes de regular a atividade celular (Maquart *et al*, 1999). No entanto, o termo também já foi utilizado para descrever ligantes de baixa afinidade para receptores de fatores de crescimento. Nesse caso, o termo matricina relaciona-se aos elementos de sinalização que existem como subcomponentes de proteínas da matriz e se ligam aos receptores da superfície celular que pertencem à família de citocinas, quimiocinas, canais de íons ou receptores de fatores de crescimento (Ricard-Blum & Salza, 2014).

No câncer de mama, esses diferentes fragmentos gerados a partir da degradação das moléculas da matriz extracelular são produtos da atividade de enzimas como as: metaloproteases (MMPs), catepsinas, ativador de plasminogênio uroquinase (uPA) e enzimas de *cross-linking* da família da lisil oxidase (LOX), as quais estão associadas a progressão metastática (Oskarsson, 2013).

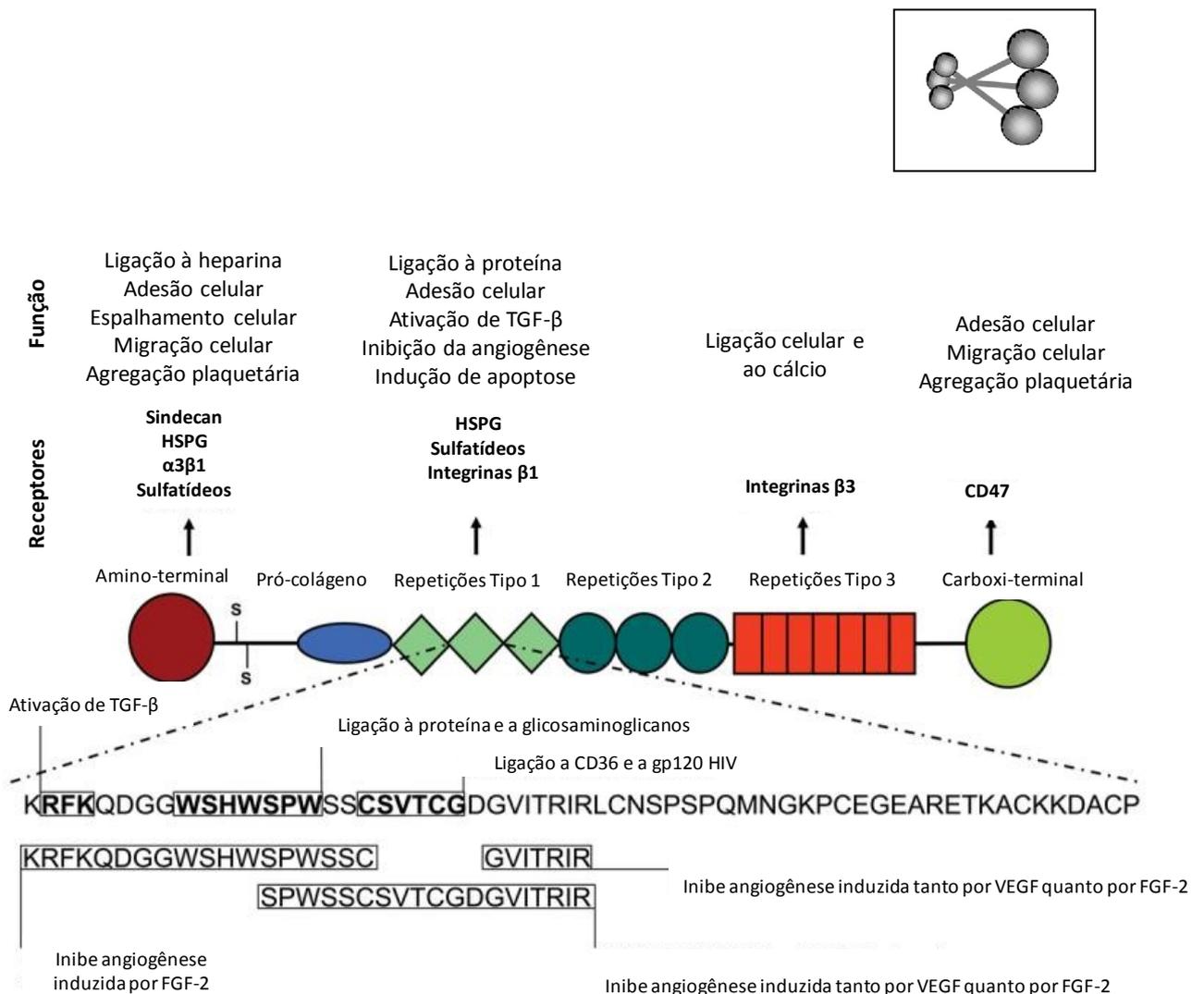
A função de cada proteína matricelular pode variar dependendo do contexto e das condições teciduais dinâmicas que acompanham atividades homeostáticas ou de reparo (Chiodoni *et al*, 2010). Além disso, as proteínas matricelulares são capazes de se ligar a múltiplos receptores celulares, podendo, portanto, induzir múltiplas respostas, e algumas vezes até mesmo respostas opostas (Grahovac & Wells, 2014). Um exemplo é a **trombospondina-1 (TSP-1)**, capaz de inibir ou estimular a angiogênese, dependendo de qual domínio da molécula interage com os receptores da superfície celular. Dessa forma, a TSP-1 apresenta um controverso papel na progressão tumoral, uma vez que existem estudos que suportam tanto a promoção quanto a supressão estimulados por ela. Tal fato é consequência da diversidade de parceiros de ligação que ela apresenta, em especial os complexos latentes de TGF- $\beta$ , que são ativados mediante a associação com esta glicoproteína (Grahovac & Wells, 2014). Como tema principal deste trabalho, a TSP-1 será melhor apresentada a seguir.

## A Trombospondina-1: Estrutura e Receptores Celulares

As trombospondinas compreendem uma família conservada de 5 glicoproteínas extracelulares, oligoméricas, de múltiplos domínios e ligantes de cálcio (Adams & Lawler, 2011). Estas glicoproteínas são sintetizadas, secretadas e incorporadas na matriz extracelular de células normais e transformadas tanto de origem mesenquimal quanto epitelial (Zhang & Lawler, 2007). A TSP-1 (*thrombin sensitive protein*-proteína sensível à trombina) foi o primeiro membro identificado, inicialmente como um produto de secreção dos grânulos- $\alpha$  de plaquetas ativadas pela trombina (Baenziger, 1971; Murphy-Ullrich & Iozzo, 2012). Esta glicoproteína é um homotrímero de 450 kDa, formada por uma cadeia de 150 kDa, contendo os seguintes domínios estruturais: (i) um domínio globular N-terminal, que contém motivos-consenso básicos de ligação à heparina (Heparin-Binding Domain, ou HBD, neste trabalho denominado NTSP-1); (ii) uma sequência de motivos repetidos de três tipos diferentes, as de tipo 1 (TSRs) com homologia à properdina, tipo 2 ou de homologia ao EGF (*EGF-like*) e tipo 3 ou domínios de ligação ao  $\text{Ca}^{++}$  muito conservado em todas as TSPs; e (iii) um domínio globular C-terminal (*lectin-like*), também presente em todos os membros da família, como ilustrado na **Figura 9**. No domínio C-terminal todas as TSPs apresentam o domínio assinatura da família, que inclui as repetições *EGF-like*, as repetições ligantes de cálcio e o módulo C-terminal (Carlson *et al*, 2008). Na presença de concentrações fisiológicas de  $\text{Ca}^{++}$ , as repetições tipo 3 envolvem domínio globular C-terminal, o que determina a formação do domínio assinatura da TSP-1 (Roberts *et al*, 2017).

A resposta à TSP-1 é determinada de acordo com o repertório específico de receptores expressos pelas células, e praticamente todos os domínios da TSP-1 apresentam um receptor na superfície celular (Zhang & Lawler, 2007).

Figura 9 – Representação esquemática da molécula de TSP-1



Legenda: A TSP-1 é um homotrímero em que cada unidade apresenta ~ 150 kDa e são associadas por pontes dissulfeto (detalhe no alto, à direita). Em cada subunidade dobrada da TSP-1, as repetições ligantes de cálcio envolvem o domínio G C-terminal para formar o domínio assinatura da TSP-1. A estrutura da trombospondina-1 e das TSRs. TSP-1 compreende múltiplos domínios funcionais e cada domínio tem diferentes receptores. A sequência de aminoácidos das repetições tipo 1 (TSR+ RFK) são demonstradas, e as sequências de aminoácidos ativas e os peptídeos anti-angiogênicos são indicados. O domínio N-terminal encontra-se representado pelo círculo vermelho, seguido pelo domínio pró-colágeno em azul, as repetições tipo 1 por triângulos em verde claro, as repetições tipo 2 por círculos em verde escuro, as repetições tipo 3 ou domínios de ligação ao cálcio por retângulos na cor laranja e por fim o C-terminal por um círculo verde claro. A figura também apresenta os receptores identificados para cada domínio da molécula, assim como a função associada a cada um deles.

Fonte: Zhang & Lawler, 2007

A lista dos principais ligantes da TSP-1 inclui componentes estruturais da matriz

extracelular, outras proteínas matricelulares, receptores celulares, fatores de crescimento, citocinas e proteases (Resovi *et al*, 2014). Diversos receptores reconhecem os domínios da TSP-1 nas interações adesivas, sendo os principais da classe das integrinas ( $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha IIb\beta 3$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 9\beta 1$  e  $\alpha 6\beta 1$ ), além de CD36, CD47, sulfatídeos e proteoglicanos de heparan sulfato - como os sindecans - dentre os mais estudados (Zhang e Lawler, 2007).

De forma mais específica, trabalhos já demonstraram que o domínio N-terminal da TSP-1 pode ser reconhecido além da heparina, por proteoglicanos de heparan-sulfato e pelas integrinas  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 9\beta 1$  e  $\alpha 6\beta 1$  (Calzada et al, 2004; Staniszewska et al, 2007; Resovi *et al*, 2014). A região N-terminal da TSP-1 também é reconhecida por outras classes de receptores, como LRP-1 (*low density protein-related protein 1*) e calreticulina (revisto por Elzie e Murphy-Ullrich, 2004).

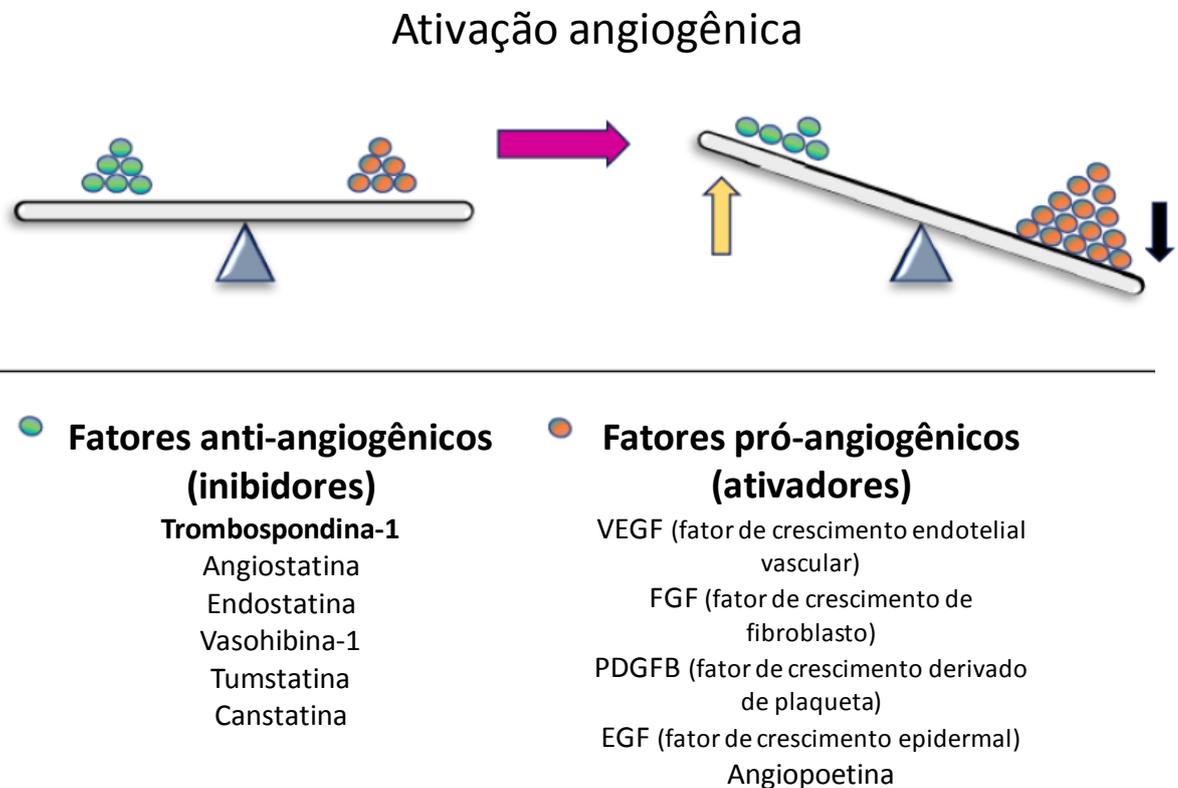
### **A Trombospondina-1 na Angiogênese**

O conceito de que o crescimento tumoral depende da angiogênese e de que a inibição da mesma pode resultar em respostas antitumorais foi primeiramente proposto por Folkman em 1971 (Folkman, 1971; Hida *et al*, 2018). A rede vascular tumoral é caracterizada pela presença de vasos sanguíneos desorganizados, tortuosos e dilatados. Além disso, são imaturos e permeáveis, devido à ausência de associação de células murais, o que resulta na deficiente perfusão dos tumores.

De modo geral, essa reduzida funcionalidade apresenta profundas consequências para o microambiente tumoral e pode levar a hipóxia, além da diminuição da infiltração e da atividade de células do sistema imune, e eleva o risco de disseminação metastática, uma vez que o microambiente hipóxico criado pela reduzida perfusão pode promover a seleção de células tumorais mais agressivas e invasivas (Viallard & Larrivé, 2017). Em geral, os vasos sanguíneos de tumores metastáticos são mais imaturos e com poucos pericitos em relação aos vasos de tumores não metastáticos (Ohga *et al*, 2012).

A angiogênese, entendida aqui no sentido clássico como brotamento de novos vasos a partir de vasos pré-existentes ocorre de maneira complexa através do balanço entre fatores anti-angiogênicos e pró-angiogênicos, como ilustrado na **Figura 10**. Em situações patológicas, como ocorre na angiogênese tumoral, acontece um desequilíbrio entre os fatores ativadores e inibidores desse processo (Hida *et al*, 2018).

Figura 10 – A angiogênese é regulada pelo balanço entre fatores anti-angiogênicos e pró-angiogênicos



Legenda: Na angiogênese, as moléculas pró-angiogênicas ativam as células endoteliais (EC). Em contraste, os fatores anti-angiogênicos inibem a sua ativação. Quando o “*angiogenic switch*” (ativação angiogênica) é ativado, existem mais fatores angiogênicos (seta preta) do que fatores inibidores (seta amarela) presentes.

Fonte: Adaptado de Hida *et al*, 2018.

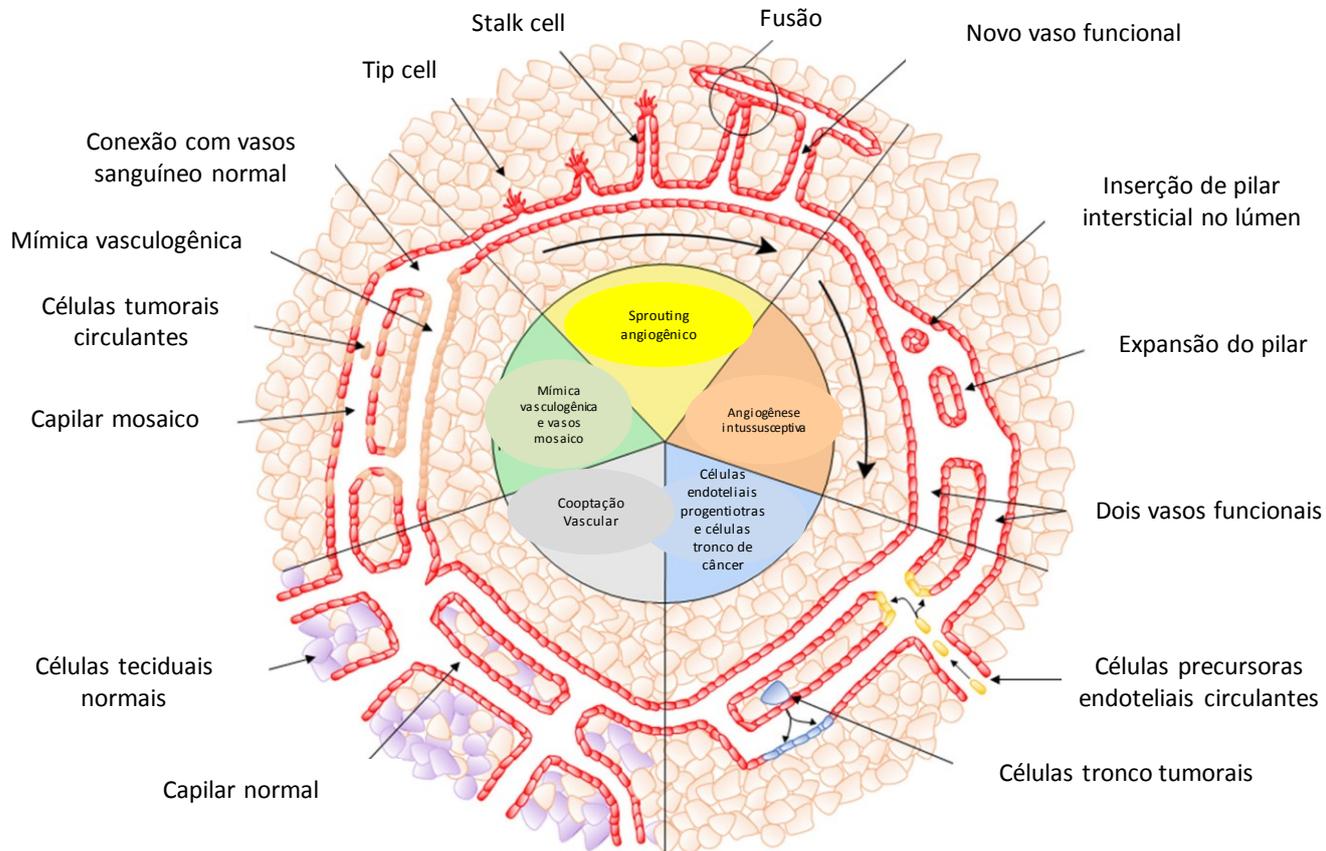
Nesse caso, os níveis de moléculas pró-angiogênicas são maiores do que os níveis de supressores angiogênicos, o que caracteriza o “*angiogenic switch*”, o qual é responsável pelo escape do período de dormência de um tumor avascularizado para um tumor vascularizado que cresce e pode apresentar progressão tumoral maligna (Baeriswyl & Christofori, 2009).

No microambiente tumoral, além da angiogênese, o tumor pode estimular o crescimento de novos vasos através de outros mecanismos, como: (a) angiogênese intussusceptiva ou de divisão; (b) mímica vasculogênica; (c) cooptação vascular; (d) precursores endoteliais. Na

angiogênese intussusceptiva ocorre a inserção de um pilar tecidual intersticial no lúmen de vasos pré-existentes, que assim os divide em dois novos vasos funcionais. É um mecanismo utilizado pelo tumor para rápidas adaptações ao microambiente que está sendo modificado, e não depende da proliferação de células endoteliais, da degradação da membrana basal e invasão tecidual, e os vasos formados apresentam menor probabilidade de apresentarem vazamentos (Ribatti & Djonov, 2012). No mimetismo vasculogênico, as células tumorais comportam-se como células endoteliais, em um processo de transdiferenciação, o qual permite que as células tumorais formem canais de perfusão e apresentem tanto marcadores endoteliais quanto tumorais. A presença de mimetismo vasculogênico já foi associada com fenótipos mais agressivos do câncer de mama, e também com prognóstico não favorável tanto em pacientes com câncer de mama quanto com outros tipos de câncer (Yang *et al*, 2016; Shen *et al*, 2017). Enquanto, no processo de cooptação vascular, como já diz o nome, o tumor coopta vasos pré-existentes de tecidos normais circundantes que sejam bem vascularizados e os utiliza para fornecer o fluxo sanguíneo necessário para a expansão do tumor (Qian, 2013). E por fim, o tumor pode recrutar células endoteliais precursoras (EPCs) para os vasos tumorais (vasculogênese pós-natal), as quais se integram a parede dos vasos crescentes e se diferenciam em células endoteliais, ou ainda as células tronco tumorais que ao se diferenciarem podem passar a expressar marcadores endoteliais, e assim participarem da mímica vasculogênica (Ribatti & Djonov, 2012; Viallard & Larrivé, 2017). Todos os processos encontram-se ilustrados na **Figura 11**.

A TSP-1 foi o primeiro inibidor natural da angiogênese descoberto (Good *et al*, 1990). A atividade anti-angiogênica foi localizada nas repetições de tipo I (TSRs), ao serem reconhecidos pelo CD36 em células endoteliais microvasculares, levando à apoptose dessas células.

Figura 11 – Diversidade de mecanismos de neovascularização tumoral



Legenda: No *sprouting* angiogênico o crescimento de novos vasos capilares é realizado através da ramificação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes. A angiogênese intussusceptiva é dirigida pela inserção de pilares teciduais intersticiais no lúmen de vasos pré-existentes dividindo-os em dois novos vasos funcionais. Na mímica vasculogênica, as células tumorais podem formar estruturas de canais que se conectam com os vasos sanguíneos normais ou podem constituir parte da parede dos vasos, formando vasos mosaico. Já no processo de cooptação vascular os tumores crescem sequestrando os vasos pré-existentes dos tecidos peritumoral. As células precursoras endoteliais circulantes são recrutadas pelos vasos tumorais, se integram na parede dos vasos e se diferenciam em células endoteliais. As células tronco tumorais também podem apresentar uma via similar integrando-se na vasculatura tumoral.

Fonte: Adaptado de Viallard & Larrivé, 2017.

A ativação de oncogenes como Src, Jun e Myc, ou a inativação de genes supressores de tumores, como o *TP53*, resulta em expressão diminuída da TSP-1, o que leva à aquisição do fenótipo angiogênico em muitos tumores (Kazerounian et al, 2008). Como podemos observar na Figura 10, a TSP-1 é apresentada como um fator anti-angiogênico, uma vez que o papel da molécula inteira de TSP-1 como supressor do crescimento vascular já é bem caracterizado. No entanto, um fator que também fomenta os questionamentos em relação ao papel desta glicoproteína no contexto tumoral é o fato desta glicoproteína apresentar domínios

capazes de também *estimular* a angiogênese, conforme já descrito por nosso grupo (Ferrari do Outeiro-Bernstein *et al*, 2002) e outros pesquisadores (Tarabolletti *et al*, 2000; Chandrasekaran *et al*, 2000), o seu domínio N-terminal apresenta efeito pró-angiogênico.

Em cada caso, foram apontadas diferentes seqüências peptídicas dentro do domínio, bem como variados receptores na superfície endotelial, como responsáveis pelos efeitos pró-angiogênicos observados. No trabalho de Tarabolletti e colaboradores, foi observada a indução de atividade de metaloproteases no estímulo angiogênico (2000). Em nossos trabalhos, os efeitos de um domínio N-terminal recombinante, de 18 kDa da TSP-1 (TSP18, seqüência de aminoácidos 1-174), foram fortemente modulados pelo ambiente matricial (fibrina ou matrigel) e reprodutíveis *in vivo* (dados não publicados), e a atividade pró-angiogênica do fragmento N-terminal da TSP-1 se deveu à indução de um estado intermediário de adesão endotelial, por interferência na atividade do receptor **sindecan-4**, um proteoglicano de heparan-sulfato da superfície celular encontrado nos contatos focais (Ferrari do Outeiro-Bernstein *et al*, 2002; Nunes *et al*, 2008). Duas seqüências peptídicas, designadas como TSP Hep I e TSP Hep II, reproduziram *in vitro* o efeito pró-angiogênico do fragmento TSP18.

Outros estudos onde foram utilizados o mesmo modelo experimental também relatam essa dualidade na resposta da TSP-1. De forma que a sua atividade pró-angiogênica, por exemplo, foi observada em concentrações de 5-50µg/ml, na presença ou ausência de FGFb, estimulando a motilidade de células endoteliais, porém com o mesmo modelo experimental e na concentração de 2,5µg/ml a TSP-1 inibiu a migração de células endoteliais. Tal fato também sugere que o efeito da TSP-1 parece ser dose-dependente (Byrne *et al*, 2007), e que essa molécula é uma proteína matricelular típica de tal forma que seus efeitos celulares são contexto-dependentes (Roberts, 2011), e variam em função de sua concentração e do tipo celular (Zhao *et al*, 2018), além de apresentar múltiplos domínios e distintos receptores celulares, o que pode justificar as diferentes respostas observadas.

O domínio NTSP-1, contrariamente aos domínios qualificados como anti-angiogênicos, pode ser liberado da molécula por ação de diversas proteases relevantes para o processo de progressão tumoral – plasmina, trombina, ADAMTS, catepsinas, etc - conforme já demonstrado por diversos autores (**Figura 12**).

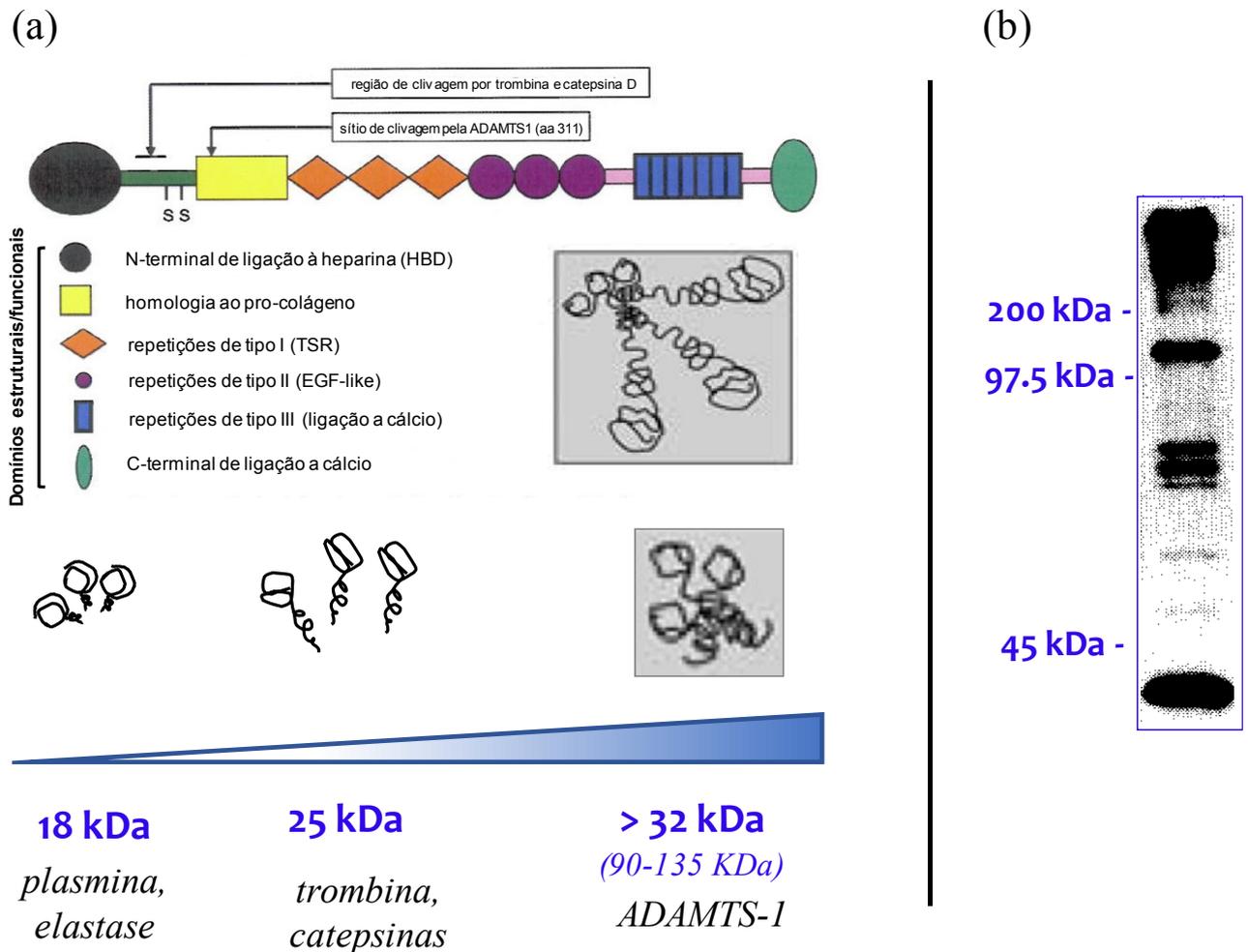
## A Trombospondina-1 no Câncer

No contexto tumoral, há sólidas evidências experimentais de que a TSP-1 é um inibidor do crescimento de tumores primários, principalmente pela sua capacidade de inibir a angiogênese: (1) tumores formados por células de melanoma B16F10 crescem mais rapidamente e exibem maior vascularização quando implantadas em camundongos knock-out (TSP-*null*) para TSP-1, do que quando injetados em animais normais; (2) a superexpressão de TSP-1 suprime o crescimento de carcinomas de próstata, de célula escamosa e mamário, e também de glioblastoma, com evidente diminuição da densidade vascular; ainda, (3) a atividade anti-tumoral da TSP-1 foi também atribuída ao seu papel na ativação do TGF- $\beta$ , em tumores que retenham a capacidade de responder a esta citocina (revisito por Ren et al, 2006).

No entanto, a degradação da TSP-1 pode gerar fragmentos proteolíticos que podem desempenhar funções extracelulares específicas e distintas (Adams & Lawler, 2011) e, embora inúmeros trabalhos já tenham confirmado a capacidade anti-angiogênica incontestável da molécula de TSP-1, assim como de certos fragmentos gerados por proteólise (Armstrong & Bornstein, 2003; Lee *et al*, 2006), a elevada expressão de TSP-1 no câncer nem sempre é suficiente para impedir o crescimento tumoral e o papel desta glicoproteína na metástase tumoral continua controverso.

Assim, muitos grupos já demonstraram a capacidade da TSP-1 estimular propriedades invasivas em linhagens de células tumorais de mama (Incardona et al, 1995, Chandrasekaran et al, 1999). Tais estudos *in vitro* demonstram que a TSP-1 pode diretamente mediar a adesão, estimular a migração e invasão das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, duas atividades que são essenciais para a disseminação tumoral (Incardona et al, 1995, Chandrasekaran et al, 1999).

Figura 12 – O domínio N-terminal de ligação à heparina (HBD)



Legenda: A TSP-1 pode ser substrato de diversas proteases envolvidas na progressão tumoral. (a) No esquema da cadeia monomérica, estão indicados os sítios de clivagem do fragmento N-terminal, que também pode ser clivado por plasmina e elastase, entre outras enzimas. A ADAMTS-1, por exemplo, é capaz de gerar formas trimerizadas do NTSP-1, enquanto a maioria das proteases clivam o domínio na região acima do ponto de união por pontes disulfeto; (b) Mapeamento de fragmentos N-terminais, detectados no sobrenadante de plaquetas ativadas pela trombina com o anticorpo MA-II.

Fonte: Adaptado de Lawler e Slayter (1981); Morandi *et al* (1994); Lee *et al* (2006); Iruela-Arispe (2008).

Ainda, a TSP-1 promove a migração de linhagens de células de carcinoma de mama invasivo, enquanto não exerce efeitos sobre linhagens não-invasivas (Wang et al, 1996); uma correlação semelhante foi estabelecida com linhagens de células de carcinoma escamoso (Yabkowitz et al 1993; Wang et al, 1995). Lawler e colaboradores (2010) observaram que a TSP-1 promove a migração e invasão de células de carcinoma de tireóide (Nucera et al, 2010).

Alguns trabalhos já observaram elevados níveis plasmáticos de trombospondina-1 em pacientes com carcinoma mamário, e sugeriram a sua potencial utilização como um biomarcador sorológico para a detecção do câncer de mama (Byrne *et al*, 2007; Suh *et al*, 2012). O aumento dessa glicoproteína já foi identificado de forma mais relevante em pacientes que apresentam marcação negativa para os receptores de estrogênio e progesterona, assim como naqueles que apresentam câncer de mama avançado associado a metástase para linfonodos (Byrne *et al*, 2007; Suh *et al*, 2012; Oskarsson, 2013). De forma geral, o nível plasmático de TSP-1 está positivamente correlacionado com a progressão e o estágio do tumor de mama (Byrne *et al*, 2007).

Porém, os padrões de expressão de TSP-1 são variáveis de acordo com os diferentes tipos de câncer, o que também reflete seu papel controverso como preditor de sobrevivência. Em consonância com sua propriedade anti-angiogênica, uma elevada expressão tumoral de TSP-1 é correlacionada com aumento da sobrevivência em pacientes com câncer de pulmão, cólon, bexiga, ovário, cervical e gástrico. Em contrapartida, elevadas taxas de TSP-1 são associadas com diminuição da sobrevivência de pacientes com câncer de mama, melanoma e carcinoma hepatocelular (Zhao *et al*, 2018).

O domínio N-terminal da TSP-1, que também apresenta atividade pró-angiogênica, como descrito anteriormente, participa também na interação entre células de carcinoma mamário organizada em esferoides e na interação destas com o endotélio (Incardona *et al*, 1995), o que sugere que esta região da molécula possa estar envolvida de forma crucial nos efeitos pró-metastáticos já apontados para a TSP-1 (Morandi, 2009). Estas divergências da atividade da TSP-1 têm gerado discussões em relação ao seu efetivo papel no microambiente tumoral. Considerando que estudos clínicos atuais - em andamento em diversos estágios - se baseiam no uso de peptídeos miméticos da TSP-1 para inibição da angiogênese (Zhang e Lawler, 2007), torna-se fundamental elucidar os contextos genéticos, celulares e fisiológicos nos quais a TSP-1 deixa de ser eficaz nesta inibição e passe a, possivelmente, promover eventos metastáticos.

O tumor primário secreta fatores na circulação que atingem sítios distantes e iniciam mudanças estruturais, tanto enzimáticas quanto não enzimáticas, para criar um nicho favorável para a colonização oncogênica, antes da chegada das próprias células tumorais (Høye & Eler, 2016; Kaushik *et al*, 2016). A formação desse nicho pré-metastático é essencial para o processo de metástase. No câncer de mama, depois de terem ultrapassado a membrana basal, as células tumorais atingem a circulação sistêmica e podem colonizar

especificamente o pulmão, fígado, osso ou cérebro (Kaushik *et al*, 2016). Nesse sentido, a matriz extracelular exerce um papel fundamental na criação e manutenção de um microambiente que propicie a instalação e proliferação das células provenientes do tumor primário. A presença da TSP-1 em um modelo que reproduziu a microvasculatura da medula óssea foi capaz de induzir a dormência em células de câncer de mama, no entanto, o aumento da expressão de TGF- $\beta$ 1 e periostina provenientes do “*sprouting*” angiogênico induziu o crescimento metastático (Ghajar *et al*, 2013).

A associação das trombospondinas com integrinas é importante na regulação da adesão celular, espalhamento e migração (Adams & Lawler, 2011). John e colaboradores (2010) demonstraram a capacidade da TSP-1 estimular a expressão da integrina  $\alpha$ 6 em células de adenocarcinoma mamário (MDA-MB-231), resultando no aumento da adesão celular e invasão das células tumorais a laminina, a qual é um dos principais componentes da membrana basal e da MEC, sugerindo que a TSP-1 exerce um papel fundamental na adesão dessas células tumorais à matriz facilitando a sua motilidade e a angiogênese (John *et al*, 2010). No mesmo trabalho, o grupo descartou a interação entre a cadeia  $\alpha$ 6 e o domínio C-terminal, ou as repetições tipo 1 da molécula de TSP-1, sugerindo que a molécula de TSP-1 inteira pode estar relacionada com os efeitos observados ou ainda que outros domínios da glicoproteína ativem tal resposta. Dentro deste contexto, especulamos se o domínio N-terminal da TSP-1 se encontra envolvido com a aquisição deste fenótipo mais migratório e invasivo das células de carcinoma mamário.

### **Fatores de Crescimento na Angiogênese e no Câncer**

A matriz intersticial é principalmente produzida pelas células estromais e é altamente carregada e hidratada, devido a maior presença de colágenos fibrilares, proteoglicanos e glicoproteínas. Assim, esse ambiente cria condições favoráveis para ligação a fatores de crescimento, o que demonstra o importante papel da MEC intersticial como reservatório de sinais, limitando a taxa de difusão e acessibilidade desses fatores. O remodelamento da matriz extracelular pode, portanto, afetar as respostas celulares através da liberação ou do sequestro de mais ou menos fatores solúveis (Høye & Ertler, 2016).

Os receptores tirosina-quinase (RTKs) são a principal classe de receptores de fatores

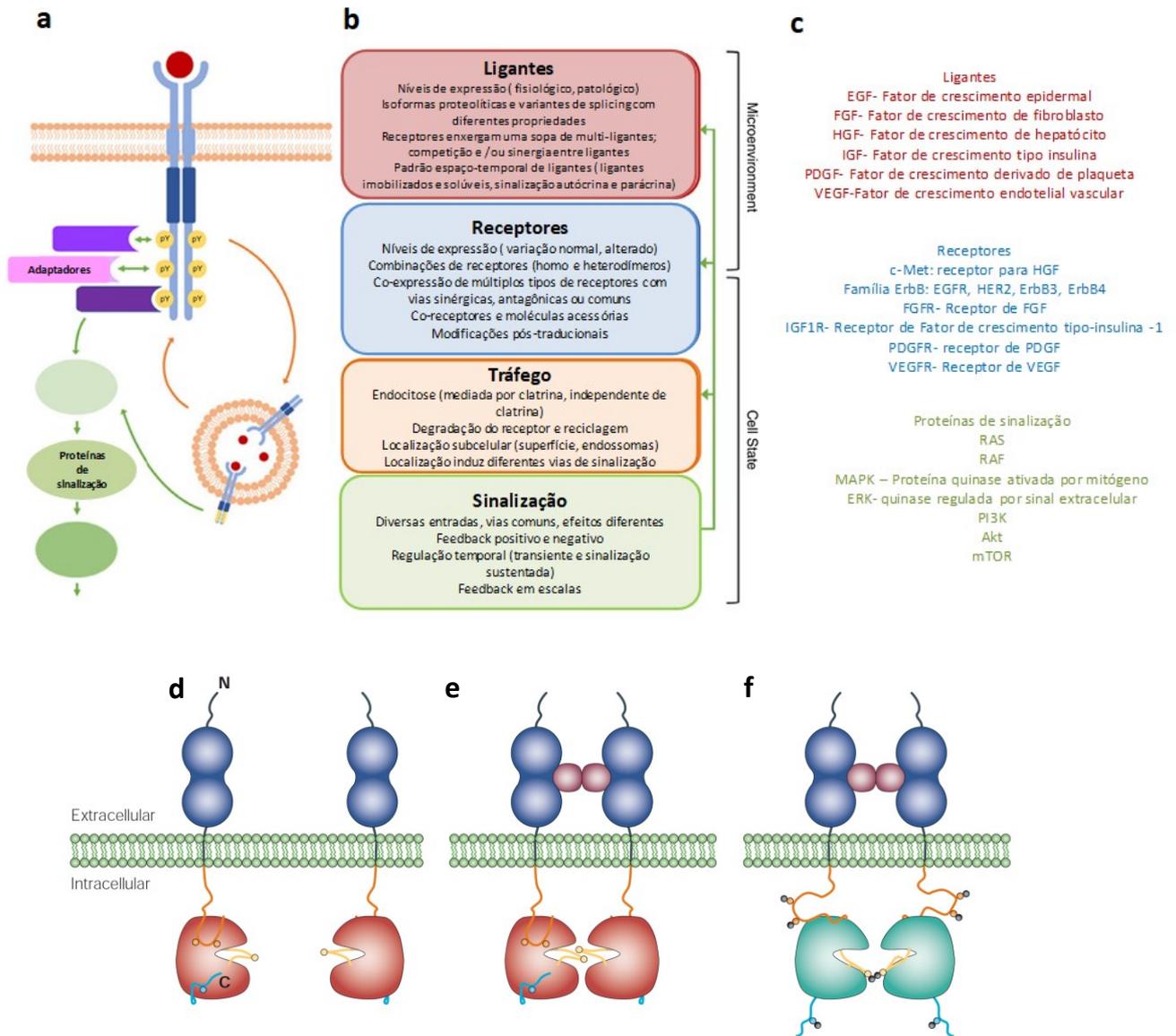
de crescimento mitogênicos. São proteínas da membrana plasmática que possibilitam às células identificarem as proteínas presentes em seus ambientes, vinculando o microambiente externo com as vias de sinalização intracelulares, e às consequentes mudanças no comportamento e na tomada de decisão celular. Como as integrinas, os RTKs sentem as proteínas da matriz extracelular e a tensão mecânica, e como as caderinas realizam contato direto entre as células adjacentes (Lam *et al*, 2019). Dessa forma, a regulação da sinalização dos RTKs é dependente do contexto extra e intracelular.

O organismo humano apresenta 58 RTKs conhecidos agrupados em 20 subfamílias. E todos apresentam uma arquitetura molecular similar com um domínio extracelular responsável pelo reconhecimento do ligante, uma única hélice transmembrana, e uma região citoplasmática que contém as regiões regulatórias justamembrana e o domínio da proteína tirosina-quinase mais o carboxi (C)-terminal (Lemmon & Schlessinger, 2010). Os fatores de crescimento atuam através de RTKs, os quais apresentam um modelo típico de ativação que envolve: (i) o reconhecimento inicial por ligantes específicos, (ii) dimerização dos receptores, e (iii) a transativação através da transfosforilação em resíduos intracelulares de tirosina (Lam *et al*, 2019), como ilustrado na **Figura 13**.

Dois famílias de fatores de crescimento têm sido as mais estudadas no contexto da angiogênese normal e patológica: os FGFs (*Fibroblast Growth Factors*) (revisto por Beenken & Mohammadi, 2009) e os VEGFs (*Vascular Endothelial Growth Factors*) (Ferrara, 2009). A família dos **FGFs** regula uma grande variedade de processos ligados ao desenvolvimento, incluindo a morfogênese cerebral, a morfogênese de estruturas ramificadas e arborizadas – como a glândula mamária e os vasos sanguíneos - e o desenvolvimento de membros, entre outros. Atividades biológicas citoprotetoras, mitogênicas e angiogênicas têm servido de base para aplicações terapêuticas dos FGFs (mais de 20 isoformas já foram descritas) (revisto por Beenken & Mohammadi, 2009).

Os receptores para FGFs (FGFRs) correspondem a uma família codificada por 4 genes: *FGFR-1* (flg), *FGFR-2* (bek, KGFR), *FGFR-3* e *FGFR-4* (Hu *et al*, 1995). Os fatores FGF-1 e **FGF-2** são os membros mais estudados e atuam primariamente através do receptor FGFR1 e foram implicados na angiogênese e no desenvolvimento vascular (Dickson *et al*, 2000).

Figura 13 – Sinalização dos receptores tirosina-quinase e sua regulação



Legenda: (a) Propagação do sinal e o tráfego intracelular de RTKs. Cada tirosina fosforilada no RTK pode servir como um sítio diferente para associação de proteínas adaptadoras e proteínas de sinalização. Na cultura celular, podemos observar diferentes padrões de múltiplas tirosinas ativadas, mas atualmente não se sabe se isso ocorre devido a múltiplas fosforilações em cada molécula do receptor ou se corresponde a uma população mista de receptores ativados em um único sítio. (b) Resumo dos principais componentes contextuais que regulam RTKs: ligantes, receptores, tráfego e sinalização. Dentro de cada categoria considerações importantes que influenciam o contexto – isso é, que podem alterar o comportamento de RTK, estão listadas. Os próprios RTKs atuam como mediadores entre o microambiente e o estado celular. (c) Exemplos de ligantes, receptores e proteínas de sinalização, e alguns que foram citados na revisão; (d) Na ausência do ligante, o domínio tirosina quinase (em vermelho) é mantido em um estado basal, de baixa atividade através de interações inibitórias com a região justamembrana (laranja) e/ou a cauda carboxi-terminal (azul) com o domínio quinase. Adicionalmente, o segmento de ativação (amarelo) não se encontra posicionado corretamente para catálise; (e) Após a dimerização mediada pelo ligante (rosa) do domínio extracelular (azul), os domínios citoplasmáticos são justapostos, o que facilita a trans-fosforilação dos resíduos de tirosina (representados como círculos) na região justamembrana, no segmento de ativação e na cauda carboxi-terminal; (f) Após a fosforilação e reconfiguração dos segmentos inibitórios, os domínios quinase se

tornam completamente ativos (verde) e um subconjunto de fosfotirosinas (esferas pretas) ficam disponíveis como sítios de recrutamento para proteínas que contêm domínios de homologia a SRC-2 ou domínios ligantes de fosfotirosina.

Fontes: Adaptado de Lam *et al*, 2019; Hubbard, 2004.

As propriedades angiogênicas do FGF-2 são bastante conhecidas, estimulando a migração e proliferação endotelial *in vivo*, inibindo apoptose endotelial, além de estimular a mitogênese de células musculares lisas e fibroblastos, induzindo o desenvolvimento de vasos colaterais com adventícia. Sete resíduos de tirosina na cauda citoplasmática do FGFR1 podem ser fosforilados: Tyr463, Tyr583, Tyr585, Tyr653, Tyr654, Tyr730 e Tyr766. Tyr653 e 654 são importantes para a atividade catalítica do FGFR1 e essenciais a sinalização (Mohammadi *et al.*, 1996), mais recentemente outro trabalho demonstrou também a importância da ativação da Tyr766 para sinalização (Zou *et al*, 2012). Os outros resíduos parecem prover sítios para interação com outros componentes “downstream” ao sinal primário, como Crk e fosfolipase-C gama. FGFs possuem ainda afinidade por proteoglicanos de heparan sulfato (HSPGs) da superfície celular e heparina. A ligação aos HSPGs é essencial para a formação de complexos FGF-FGFR estáveis e um pré-requisito para a efetiva sinalização. No entanto, modelos murinos *knockout* FGF-1<sup>-/-</sup>/FGF-2<sup>-/-</sup> não resultaram em fenótipos com desenvolvimento vascular comprometido, sugerindo que as atividades angiogênicas destes fatores possam ser compensadas por outros membros da família.

FGFs (particularmente o FGF-2) são importantes para a sobrevivência de células do epitélio mamário diferenciado, porém o papel destes fatores e seus receptores TK no câncer de mama é controverso, com estudos que mostram tanto um papel favorecedor da progressão tumoral, quanto evidências de atividades mantenedoras da diferenciação celular, resultando em tumores com melhor prognóstico (Dickson *et al*, 2000). Alguns trabalhos sugerem, porém, que a atividade mitogênica do FGF-2 pode ser potencializada pela associação de FGFRs com outras classes de receptores, como o sindecin-4 (Murakami *et al*, 2008) e a N-caderina (Suyama, 2002).

O **VEGF** (*Vascular Endothelial Growth Factor*), descrito inicialmente por Dvorak em 1983 como um fator de permeabilidade vascular (VPF), faz parte de uma família de fatores de crescimento mais seletivos para as células endoteliais. Fazem parte da família a isoforma clássica, o VEGF-A, bem como as isoformas VEGF-B, -C, -D e -E e o fator de crescimento placentário (revisto por Ferrara, 2009). São atividades mediadas pelo VEGF-A nos capilares sanguíneos: estímulo da proliferação endotelial, manutenção da viabilidade endotelial, estímulo à migração celular, além da indução da permeabilidade vascular que potencializa o

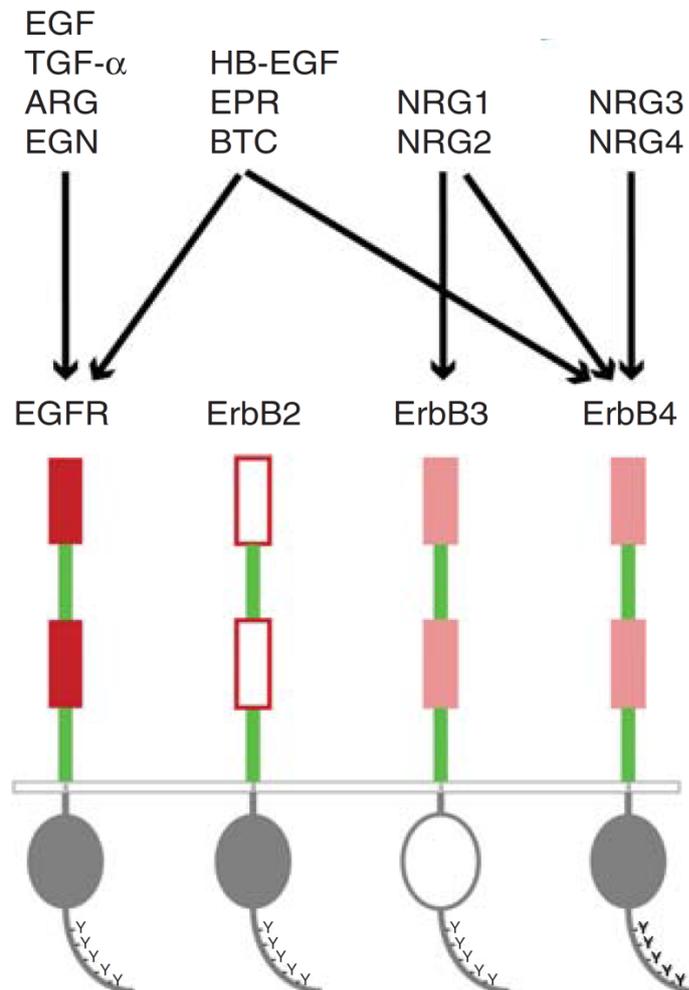
processo angiogênico, ao propiciar um microambiente rico em fibrina, trombina e outros substratos provisionais para as células endoteliais angiogênicas. Três tipos de receptores TK reconhecem os membros da família dos VEGFs: VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (Kdr) – atuantes principalmente nos vasos sanguíneos - e VEGFR3 – essencial para a angiogênese de vasos linfáticos. Co-receptores, como HSPGs e neuropilinas, facilitam a ativação dos VEGFRs. Apesar do VEGF-A se ligar ao VEGFR1 com afinidade 10 vezes maior que o VEGFR2, este último é o principal receptor responsável pelas respostas angiogênicas de células endoteliais ao VEGF. Contrariamente ao observado nos modelos genéticos desenvolvidos para estudo dos FGFs e seus receptores, a neutralização *in vivo* das atividades do VEGF-A demonstra que a atividade deste fator é incontornável para a correta resposta angiogênica. Recentemente, diversas observações mostraram que células tumorais também podem expressar VEGFR2 – além de neuropilinas - e respondem de forma parácrina e autócrina à presença deste fator de crescimento no microambiente (Giatromanolaki et al, 2007; Knizetova et al, 2008; Higgins et al, 2008; Longatto-Filho et al, 2009; Trinh et al, 2009).

Além destas duas famílias de fatores de crescimento, outra de grande importância e destaque nos estudos envolvidos com a biologia do câncer é a família do EGF (fator de crescimento epidermal), principalmente no câncer de mama, uma vez que a sua superexpressão já foi correlacionada com o aumento da agressividade e do potencial metastático nesse tipo de câncer (Kyriakopoulou *et al*, 2018). A família do EGF é composta de fatores de crescimento peptídicos que ativam os receptores da linhagem ErbB. A sinalização resultante da associação destes fatores com os receptores ErbB desempenha um importante papel no controle da proliferação, migração, diferenciação, transformação e apoptose em diferentes tipos celulares, especialmente nas células epiteliais (Zeng & Harris, 2014; Mitchell *et al*, 2018).

A família dos EGFRs ou ErbB é composta por quatro membros: EGFR (também conhecido como ErbB1 ou HER1), HER2 (HER2/neu ou ErbB2), ErbB3 (HER3) e ErbB4 (HER4) (Masuda *et al*, 2012), que se encontram representados na **Figura 14**. Os receptores ErbB consistem em um domínio extracelular glicosilado, o qual é dividido em quatro partes: domínios I e III, que participam da ligação ao ligante, e domínios II e IV, os quais contêm numerosos resíduos de cisteína que participam na formação de pontes dissulfeto. O domínio II participa na formação de homo e heterodímeros. O domínio extracelular é seguido pelo segmento transmembranar simples, e pela porção intracelular que contém: um segmento justamembrana, um domínio de proteína quinase, e uma cauda carboxi-terminal (Roskoski,

2014), também ilustrados na Figura 13.

Figura 14 – Representação esquemática da família de receptores EGFR/ErbB e seus ligantes



Legenda: EGFR é um dos quatro membros da família EGFR/ErbB em humanos. Os outros membros são ErbB2/HER2, para o qual não foi identificado nenhum ligante solúvel; ErbB3/HER3, que apresenta o domínio tirosina quinase comprometido; e ErbB4/HER4. O EGFR é ativado pelos seus agonistas: EGF, TGF- $\alpha$  (fator de crescimento transformante alfa), ARG (anfiregulina) e EGN (epigen). Os ligantes biespecíficos regulam tanto EGFR quanto ErbB4, são eles: HB-EGF (fator de crescimento tipo EGF ligante de heparina), EPR (epiregulina), e BTC (betacelulina). As neuregulinas (NRGs) 1 e 2 regulam ErbB3 e ErbB4, enquanto NRG3 e NRG4 parecem ser específicas para ErbB4. Os retângulos vermelhos preenchidos, ou apenas contornados, e os retângulos rosas representam respectivamente os domínios extracelulares I e III do EGFR, ErbB2, ErbB3 e ErbB4. Já os retângulos menores e verdes representam os domínios extracelulares II e IV em todos os receptores. O círculo cinza representa o domínio tirosina quinase seguida pela cauda carboxi-terminal, que contém pelo menos cinco sítios de autofosforilação de tirosina.

Fonte: Adaptado de Lemmon *et al*, 2014

Os ligantes de EGFR são todos produzidos como proteínas precursoras inativas ligadas a membrana e são clivadas por proteases da superfície celular originando fatores de crescimento ativos. O domínio tipo EGF contido em todos esses ligantes que é o responsável

pela associação com o receptor e sua ativação (Lemmon *et al*, 2014). Tais ligantes podem ser separados em duas classes, baseado nas preferências de ligação ao receptor. A primeira classe compreende os ligantes de ErbB1: anfiregulina (ARG), betacelulina (BTC), epiregulinas (EPR), fator de crescimento epidermal (EGF), epigen (EGN), o fator de crescimento tipo EGF ligante de heparina (HB-EGF) e o fator de crescimento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ). Os membros da família das neuregulinas (Nrg1-4) formam o segundo grupo, e elas podem se ligar a ErbB3 e ErbB4. Alguns membros da primeira classe também podem se associar ao ErbB4: BTC, HB-EGF e EPR (Adrain & Freeman, 2014). Em relação a afinidade pelo EGFR/ErbB1 os ligantes podem ser divididos em 2 grupos: (i) alta afinidade (EGF, TGF- $\alpha$ , HB-EGF e BTC); e (ii) baixa afinidade (ARG, EPR e EGN) (Mitchell *et al*, 2018). Além do domínio EGF, anfiregulina e HB-EGF apresentam um motivo de ligação a heparina (Adrain & Freeman, 2014). Já para ErbB2 nenhum ligante solúvel foi identificado até o momento (Lemmon *et al*, 2014).

O receptor de fator de crescimento epidermal foi um dos primeiros RTKs para o qual a associação do ligante foi estudada e para o qual a importância da dimerização induzida pelo ligante foi estabelecida (Lemmon *et al*, 2014). As proteínas ErbB podem funcionar como homo e heterodímeros (Roskoski, 2014). ErbB2 não apresenta ligante conhecido, desta maneira assume-se que sua regulação ocorra mediante heterodimerização com outros receptores ErbB. ErbB3 por sua vez apresenta a atividade do domínio tirosina quinase comprometida (pseudoquinase), e também só sinaliza através de heterodimerização com outros receptores ErbB (Roskoski, 2014; Lam *et al*, 2019). De forma surpreendente, o heterodímero de ErbB2 com ErbB3 representa um dos complexos de sinalização mais robusta dentro da família ErbB (Roskoski, 2014).

A dimerização ativa a autofosforilação dos RTKs e o recrutamento de proteínas de sinalização acessórias (Bergeron *et al*, 2016). No caso dos receptores ErbB a cascata de sinalização ativada pode envolver as vias de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) /AKT (PKB) /mTOR, Ras/ Raf/MEK/ERK1/2 e fosfolipase C gama (PLC- $\gamma$ )/PKC (Han & Lo, 2012). A via de PI3K desempenha um importante papel na modulação da sobrevivência celular e Ras/ Raf/MEK/ERK1/2 e PLC- $\gamma$  atuam na regulação da proliferação celular (Roskoski, 2014). A sinalização cruzada entre EGFR e integrinas, mediada pelas proteínas matricelulares TN-C e SPARC, pode resultar na ativação de PI3K e ERK, culminando com o aumento da motilidade e invasão celular. No entanto, a associação da sinalização entre EGFR e integrinas disparadas pela TSP-1 ainda permanece em aberto (Grahovac & Wells, 2014).

De forma geral, as funções mais bem caracterizadas do EGFR estão relacionadas ao contexto: presença do ligante e ativação dependente de quinase, conhecidas como vias de sinalização canônicas do EGFR. No entanto, novas funções, tanto dependentes quanto independentes de quinase, foram recentemente identificadas, revelando a participação do EGFR em vias como a regulação da autofagia e metabolismo, as quais são denominadas funções não canônicas e que geralmente são induzidas por estresse celular e ambiental (Sigismund *et al*, 2018). Dessa forma, uma vez que o EGFR associado à membrana pode mediar processos celulares de forma independente da sua atividade tirosina quinase, tal mecanismo pode contribuir para a falha da maioria dos agentes farmacológicos que têm como alvo justamente a atividade tirosina quinase do receptor. Além disso, o EGFR também pode ser transportado para o núcleo ou para a mitocôndria, exercendo dentro dessas organelas funções distintas daquelas relacionadas a sua via clássica como um RTK associado à membrana plasmática (Han & Lo, 2012).

### **Sinalização mediada por RTKs: papel do ciclo endocítico**

Dentre os alvos moleculares mais estudados para terapias antitumorais estão os receptores para fatores de crescimento epidermal (EGFRs) (Masuda *et al*, 2012), justamente por serem considerados direcionadores oncogênicos, como ocorre nos casos de câncer de pulmão, câncer de mama e glioblastoma (Lemmon *et al*, 2014). Dentre os receptores da família, EGFR, ErbB2 e ErbB3 já são alvos terapêuticos validados (Lemmon *et al*, 2014).

Uma etapa importante nos estudos que visam a validação de novos alvos moleculares ou de novas drogas relacionados à cascata de sinalização dos receptores TKs é a investigação da via de internalização e das possíveis sinalizações associadas à rota endocítica destes receptores.

Os sistemas biológicos apresentam componentes centrais de regulação baseados em um denso circuito de respostas positivas e negativas- “*negative and positive feedback loops*” - como por exemplo, a **endocitose** de receptores e sua desfosforilação, permitindo que fatores de crescimento e RTKs da família ERB, regulem a função celular (Avraham e Yarden, 2011).

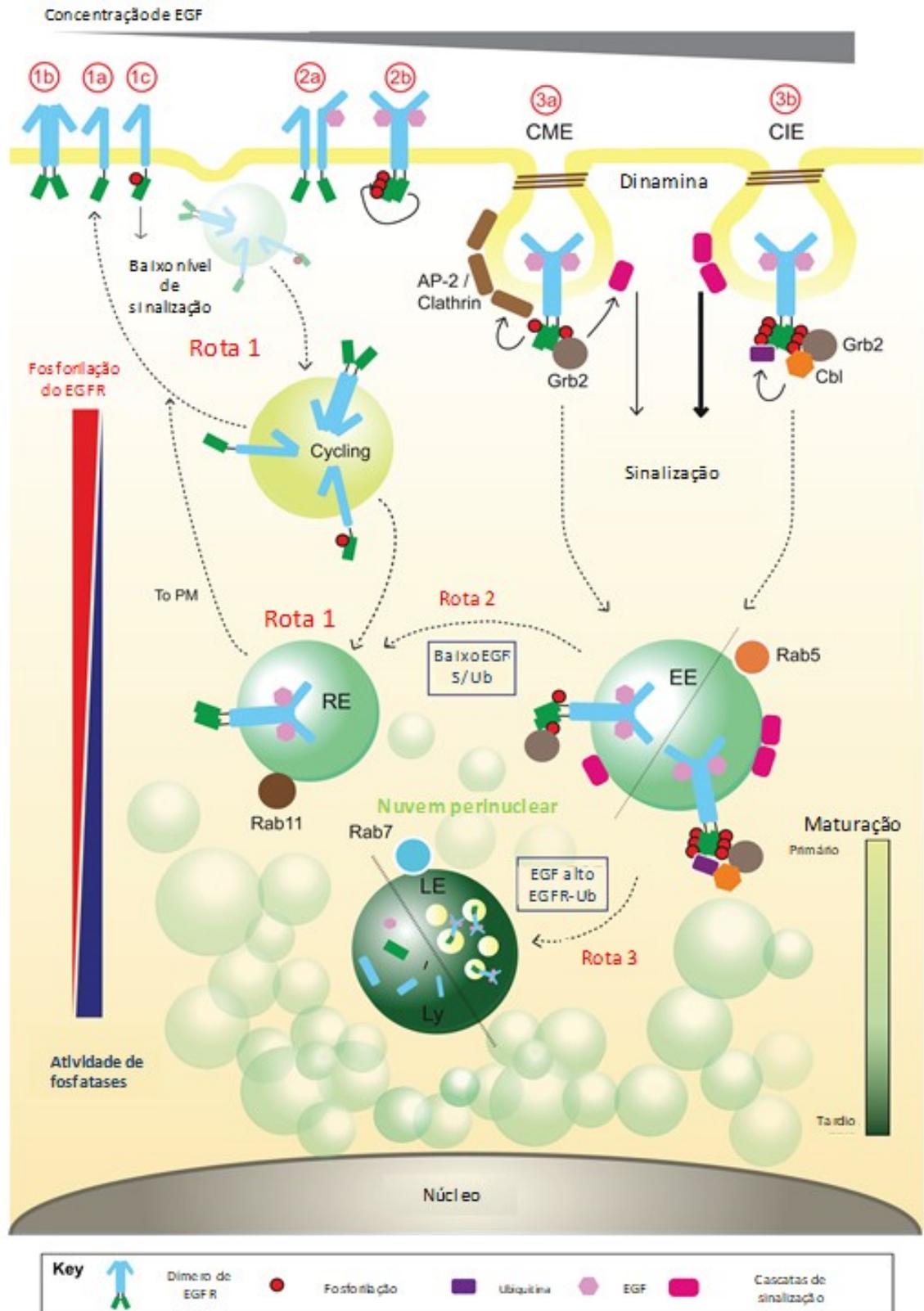
A importância da endocitose de receptores TK, após sua ligação a diversos fatores de crescimento, no prolongamento de sua resposta de sinalização, já foi demonstrada (revisto por Mukherjee *et al*, 2006). Inicialmente, a internalização de receptores foi interpretada unicamente como uma etapa rumo à degradação e, portanto, cessação do sinal (Tomas *et al*,

2014). No entanto, a regulação da atividade destes receptores é um processo mais complexo, e o número de evidências sugerindo que alguns receptores, incluindo o EGFR, são capazes de continuar sinalizando a partir dos compartimentos endocíticos se consolidou na última década (Goh e Sorkin, 2013). Evidências providas pelo estudo dos fatores de crescimento EGF e VEGF-A sugerem que a endocitose dos receptores TK resulta em sinalização celular mais persistente, a partir de *endossomas primários* e que esta etapa precederia a degradação e reciclagem dos receptores para a membrana plasmática. Os receptores inativos também são endocitados, porém eles apresentam baixas taxas de internalização e altas taxas de reciclagem, o que garante seu acúmulo na superfície celular (Bakker *et al*, 2017).

Nesses mecanismos, o balanço entre ativação e inibição é mantido principalmente através da retirada dos receptores da superfície celular em vesículas pertencentes à via endocítica, no qual o tempo e a direcionalidade do transporte modulam a duração do sinal e determinam o destino do receptor (Bakker *et al*, 2017). Para o EGFR, já foi observado que o receptor sinaliza não apenas na superfície celular, aonde ocorre a associação com o ligante, mas continua sinalizando nos endossomas por um período comparável, sugerindo, portanto, a necessidade de endocitose do receptor para a ativação de vias de sinalização específicas (Tomas *et al*, 2014; Bakker *et al*, 2017). Na via endocítica, ocorre uma sub-compartimentalização do sinal. Um exemplo se dá com uma subpopulação de endossomas primários com marcação positiva para **Rab5**, que tem sido descrita com a capacidade de regular a atividade de AKT (Tomas *et al*, 2014). Assim, a qualidade, amplitude, e duração dos eventos de sinalização são finamente reguladas pela compartimentalização e tráfego do EGFR ao longo da via endocítica (Sigismund *et al*, 2018).

Um resumo da via endocítica e dos diferentes mecanismos de endocitose do EGFR se encontram ilustrados na **Figura 15**. De forma geral, nos endossomas a sinalização iniciada na membrana plasmática pode ser prolongada – tanto para a obtenção de uma resposta de sinalização produtiva e/ou diversificada – através da organização de complexos de sinalização específicos (revisado por Villaseñor *et al*, 2016).

Figura 15 – Destinos do EGFR ativado



Legenda: Os monômeros de EGFR não associados a ligante, residem principalmente na membrana celular (1a), e podem ser espontaneamente internalizados e reciclados (Rota 1). Mesmo na ausência de estímulo, a

dimerização estocástica (1b) e a auto-ativação (1c) do EGFR podem ocorrer. O último passo é mantido sob controle pela endocitose, inativação e reciclagem através de endossomas de reciclagem positivos para Rab11(REs) (Rota 1). A associação com o ligante promove a dimerização do receptor (2a, 2b), levando à ativação e à fosforilação de caudas citoplasmáticas que atuam mediando o recrutamento de várias proteínas adaptoras (como Grb2) (3a, 3b) para ativação de cascatas de transdução de sinal. O destino intracelular do EGFR depende da extensão de sua ativação. Em condições de baixo estímulo (p. ex: baixa concentração do ligante), o complexo adaptador AP-2 é recrutado e possibilita a endocitose mediada por clatrina (CME) (3a), resultando em endossomas primários de sinalização positivos para Rab5 contendo EGFR (3a, 3b). À medida que os endossomas amadurecem, eles viajam para a região perinuclear, aonde o EGFR ativado por ligante (e auto-ativado) encontra uma elevada atividade de fosfatases e é inativado para ser reciclado (Rota 2). Em contraste, altos níveis de ativação de EGFR resultam em extensiva fosforilação do receptor e ubiquitinação pela E3 ligase Cbl, a qual causa um desvio de EGFR, que nesse caso é preferencialmente internalizado por endocitose independente de clatrina (CIE), longe dos endossomas de reciclagem e em direção a degradação nos lisossomos (Ly) localizado na nuvem perinuclear. Esse processo ocorre através de endossomas tardios (LE) positivos para Rab7, aonde o EGFR ubiquitinado é direcionado a partir do limite da membrana endossomal para vesículas intraluminais (ILVs), dando origem a corpos multivesiculares (MVB) (Rota 3). A subsequente fusão dos endossomas tardios com os lisossomos entrega o EGFR para degradação.

Fonte: Adaptado de Bakker *et al*, 2017

Nesse contexto, a propagação do sinal ocorre através dos endossomas primários, e a dessensibilização nos endossomas tardios, aonde ocorre o recrutamento de fosfatases de fosfotirosinas que inativam os receptores (Bergeron *et al*, 2016).

A natureza do ligante, assim como a concentração e a duração do estímulo (Jones & Rappoport, 2014) também estão relacionados com o destino do EGFR: endocitose, ubiquitinação e degradação. Além disso, os parceiros de dimerização do receptor também podem determinar o seu destino, como ocorre com os heterodímeros EGFR/ErbB2, os quais são internalizados com uma velocidade menor e apresentam uma taxa de reciclagem maior quando comparados com os homodímeros EGFR/EGFR (Tomas *et al*, 2014). Os heterodímeros apresentam uma reduzida interação ligante-receptor, o que possibilita a dissociação do ligante nos endossomas, e não recrutam de forma tão eficiente quanto os homodímeros (EGFR/EGFR) a maquinaria endocítica e a ubiquitina ligase Cbl, relacionada ao processo de degradação do receptor (Sigismund *et al*, 2018). A dependência da sinalização EGFR do tráfego vesicular pode conferir um mecanismo geral através do qual a célula pode gerar plasticidade funcional em resposta ao estímulo de fatores de crescimento enquanto preserva especificidade na comunicação célula-célula (Stallaert *et al*, 2018).

Ainda, distintas proteínas da superfície celular, como as integrinas, podem se associar ao EGFR e mudar a sua taxa de internalização e degradação, regulando, portanto, a atividade das moléculas efetoras de sua cascata de sinalização (Kyriakopoulou *et al*, 2018). No caso da ligação VEGF-VEGFR2, o sequestro dos receptores ativados nos endossomas os afastam das fosfatases que, ancoradas à membrana plasmática, defosforilam VEGFR2 de forma

constitutiva. Desta maneira, uma consequência direta da endocitose é o aumento do tempo durante o qual o receptor permanece ativo dentro da célula, garantindo a ativação de ERK1/2 também mais prolongadamente (Horowitz & Seerapu, 2012). Este conceito foi ainda reforçado por publicações que demonstram que a ativação sustentada da via de ERK1/2, iniciada por RTK, está relacionada à ativação do processo endocítico, com importante envolvimento de receptores do tipo “scavenger” (Gourlaouen et al, 2013). A internalização do complexo fator angiogênico/RTK pode ainda resultar em sua translocação nuclear, aumentando a eficácia da sinalização e expondo novos alvos no núcleo e aumentando a potência da resposta mitogênica: este é o caso, por exemplo, do FGF-2 e seu receptor FGFR1, que são endocitados através de um processo que também envolve o sindecan-4 (revisto por Murakami et al, 2008).

Dados obtidos através da colaboração de nosso grupo com o Dr. Jack Lawler (Harvard Medical School, Boston, EUA) mostram que uma forma de 25 kDa do domínio N-terminal pró-angiogênico da TSP-1 é capaz de aumentar a ativação do VEGFR2 em células endoteliais e que esta ativação ocorre em paralelo ao aumento da internalização do receptor (trabalho em conclusão). Por outro lado, resultados obtidos *in vivo* demonstraram que os dois peptídeos pró-angiogênicos, cujas sequências são derivadas deste domínio e caracterizados por nosso grupo, foram incapazes de estimular a vascularização quando usados isoladamente (Dias et al, 2012). No entanto, ambos potencializaram fortemente a atividade angiogênica do FGF-2, sugerindo que, também para este fator, o domínio N-terminal esteja atuando na potencialização das vias de sinalização por ele ativadas.

Dada a importância deste domínio na interação da TSP-1 com células tumorais e o controverso papel desta glicoproteína na promoção da metástase em diversos tipos de tumores sólidos, tornou-se uma questão importante, em nossas linhas de investigação, tentar esclarecer se o domínio N-terminal da TSP-1, sabidamente pró-angiogênico, seria capaz de potencializar a ação de fatores de crescimento também em células tumorais.

## **Objetivo Geral**

- a) Visando contribuir para a elucidação de novos mecanismos que possam explicar os efeitos pró-tumorais da TSP-1 já observados no câncer de mama, propusemos investigar o papel do domínio NTSP-1 da trombospondina-1 (ou motivos estruturais/funcionais relacionados) na resposta celular a fatores de crescimento que atuam através de receptores tirosina quinase (RTK).

### Objetivos específicos

- a) Estudar o comportamento adesivo, migratório e invasivo de células de carcinoma mamário sob modulação de fragmentos NTSP-1 da TSP-1;
- b) Avaliar a morfologia, em ambiente tridimensional, tanto de linhagens não tumorigênicas quanto de linhagens tumorais, em resposta ao domínio NTSP-1 e/ou fatores de crescimento;
- c) Estudar vias de sinalização ativadas por fatores de crescimento RTK-dependentes, em células tumorais de mama tratadas com o domínio NTSP-1 e/ou peptídeos;
- d) Investigar o tráfego intracelular de RTKs, sob modulação de fragmentos NTSP-1, na presença e ausência de EGF;
- e) Buscar correlacionar os achados funcionais com a expressão de diferentes classes de receptores de adesão (integrinas, sindecans, etc) sabidamente envolvidos no reconhecimento do domínio NTSP-1 da TSP-1.

## 1 METODOLOGIA

### 1.1 Proteínas, peptídeos e anticorpos

Proteínas recombinantes correspondentes ao domínio N-terminal da TSP-1, denominadas TSP28 e TSPN25 foram utilizadas e serão referenciadas neste trabalho como NTSP-1. O fragmento TSP28 foi expresso em *Escherichia coli*, cepa A255F, e purificado conforme descrito previamente (Vogel et al, 1993). TSPN25 foi produzido no laboratório do Dr. Jack Lawler (Harvard Medical School, Boston, EUA), segundo previamente descrito (Tan et al, 2006). Ambos os fragmentos apresentam in vitro as principais propriedades biológicas deste domínio estrutural e funcional da TSP-1, como suporte à adesão celular dependente de heparina e a estabilização da fase secundária da agregação plaquetária (Legrand et al, 1992). O peptídeo sintético derivado da seqüência N-terminal da TSP-1 (aa 78-94) denominado, TSP Hep II (Nunes et al, 2008), foi sintetizado no laboratório do prof. Luiz Juliano (EPM/Unifesp). Os anticorpos utilizados nas análises por *western blotting* da marca Cell Signaling (Danvers, MA, EUA) foram anti-FGFR-1 (referência 9740s), anti-fosfo-FGFR1 (Y653/654, ref. 3476); anti-VEGFR-2 (ref. 2479s), anti-EGFR (ref. 4267s), anti-fosfo-EGFR (sítio Y1068 ref. 3777s), anti-p44/42 MAPK (ERK1/2, ref. 4695s), anti-fosfo-p44/42 MAPK (ERK1/2, sítio T202/Y204, ref. 4370s), anti-sindecan-4 (ref. IMG-6268A, IMGENEX), anti-tubulina (ref. T5168, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA), anti-integrina  $\alpha 6$  (ref. OAABO6671, Aviva Systems Biology, San Diego, CA, EUA) e anti-integrina  $\alpha 9\beta 1$  (ref. ab27947, clone Y9A2, Abcam, Cambridge, MA, EUA). Os anticorpos utilizados nas análises por citometria de fluxo, todos adquiridos da Biolegend (San Diego, CA, EUA), foram: APC anti-CD49c (integrina alpha-3, ref.343808), FITC anti-CD49d (integrina alpha-4, ref.304315), FITC anti-CD49f humano (clone GoH3-integrina alpha-6, ref.313605), APC anti-CD29 humano (clone TS2/16- integrina Beta 1, ref.303008), e isotipos controles (FITC IgG1 de camundongo, FITC IgG2a de rato ref.400505, e APC IgG1 de camundongo ref.400122).

## 1.2 Cultivo Celular

Todas as linhagens mamárias humanas são oriundas da ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA, EUA). A linhagem não tumorigênica de mama (MCF-10A) foi expandida em meio DMEM-F12 HAM, com 10% de soro fetal bovino, L-glutamina 2mM, bicarbonato de sódio 26mM, fungizona 2,5 µg/ml, penicilina 500U/ml, gentamicina 40 µg/ml, insulina 10µg/mL, EGF 20 ng/mL e hidrocortisona 0,5µg/mL. Já as linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas em meio DMEM com alta concentração de glicose, com 10% de soro fetal bovino, na presença de todos os componentes citados anteriormente com exceção da insulina, EGF e hidrocortisona. A linhagem HMEC-1 (células endoteliais microvasculares da derme humana) foi cultivada em meio MCDB 131, com 10% de soro fetal bovino, na presença de todos os complementos supracitados, com exceção da insulina, e com EGF 10 ng/mL, e hidrocortisona 1,0µg/mL.

Os meios de todas as linhagens eram trocados a cada dois dias e as células mantidas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Atingido o estado de confluência, as células eram tripsinizadas (tripsina-EDTA 0,025%) e expandidas, para uso posterior nos experimentos. Em alguns experimentos, as células foram desaderidas com tratamentos com solução Versène (EDTA 0,5 mM em PBS) ou com a enzima Accutase®. Exceto pelo meio de cultura e insulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA) e pelo soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP), todos os demais reagentes utilizados em cultivo celular foram adquiridos na Life Technologies/Invitrogen (São Paulo, SP).

## 1.3 Pré-tratamento com o fragmento ou peptídeos derivados do domínio N-terminal da TSP-1

Células das diferentes linhagens de mama (MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231, além da linhagem endotelial HMEC-1, neste caso tratada com FGF-2 50 ng/mL) foram plaqueadas na densidade de  $1,5 \times 10^4$  ou  $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em seus respectivos meios de cultura e na presença de SFB. Após 24 horas, células em todas as condições foram lavadas duas vezes com meio sem SFB e incubadas com meio contendo 0,1% BSA, na ausência de SFB (procedimento de depleção metabólica dos fatores de crescimento séricos, ou adicionados no

meio de expansão, como no caso das linhagens MCF-10A e HMEC-1). Após 18 horas, as culturas foram lavadas uma vez com meio sem SFB, seguido do pré-tratamento com o fragmento NTSP-1 (isoformas de 25 ou 28 KDa) ou peptídeo TSP HepII, todos derivados do domínio N-terminal e utilizados na concentração de 500nM, por 35 minutos a 37°C. Em seguida, o meio contendo o fragmento ou o peptídeo foi retirado, as células foram lavadas uma vez com meio sem SFB, e seguiu-se o tratamento com a citocina (EGF) na concentração de 50 ng/mL, a 37°C, por tempos variáveis segundo o tipo de experimento (de 10 minutos a 72 horas).

#### 1.4 Análise de proteínas por Eletroforese PAGE-SDS e *Western Blotting*

A técnica de *western blotting* foi utilizada para caracterização dos receptores celulares presentes nas três linhagens de mama (MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231), assim como para a análise da sinalização EGFR e ERK1/2. As linhagens foram depletadas em fatores de crescimento (cultivadas na ausência de SFB) por um período de 18 horas. Para análise de receptores por *western blotting*, os extratos celulares foram obtidos com tampão de lise: HEPES (10mM), pH 7,4 (contendo NaCl 150mM, 1% Triton X-100, NaF [20mM] e coquetel inibidor de proteases [AEBSF 104 nM, aprotinina 80µM, bestatina 4nM, E-64 1.4mM, leupeptina 2mM e pepstatina A 1.5mM, Sigma, ref. p8340] e fosfatases [ortovanadato de sódio, molibdato de sódio, tartarato de sódio e imidazol, Sigma, ref. P5726]). O mesmo tampão de lise serviu para o preparo das amostras destinadas à análise de vias de sinalização, após os tratamentos das células com os mediadores estudados (item 2.3). Os extratos foram centrifugados a 14.000 rpm a 4°C por 30 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi recuperado, dosado e diluído em tampão de amostra de Laemli (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 1%, glicerol 10%) contendo 0.001% pironina Y e, quando necessário, ditioneitol (DTT) a 54 mg/mL. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100°C por 5 minutos.

A eletroforese foi realizada em um sistema de mini-gel vertical (Mini-Protean II Tetra, Bio-Rad). As amostras foram aplicadas em géis de poli-acrilamida com diferentes malhas, de acordo com o peso molecular da proteína de interesse. A corrida eletroforética foi realizada a 100V em tampão Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1% e a mesma quantidade de proteína total de cada condição foi aplicada nos poços. O padrão de peso molecular utilizado compreendia a faixa de 12 kDa a 225 kDa (Full-range Rainbow, GE Healthcare Life Sciences,

São Paulo). Em seguida, as proteínas separadas foram eletrotransferidas para uma membrana de PVDF (Imobilon-P, Millipore, São Paulo), utilizada segundo as recomendações do fabricante. A membrana foi previamente preparada através de incubações sequenciais com metanol absoluto (3 segundos), água destilada (15 minutos) e tampão de transferência (5 minutos) (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e metanol 20%) e a transferência foi realizada em um sistema Trans-Blot para mini-gel (Bio-Rad), por aproximadamente 18 horas a 30 V e a 4°C. A membrana foi bloqueada por um período de 18 horas com BSA 5% diluído em salina tamponada com Tris (ou TBS - Tris 0,02M pH 7,6 contendo NaCl 150 mM) a 4°C. Em seguida, as membranas foram incubadas por 18 horas a 4°C com diferentes anticorpos para cada proteína de interesse: monoclonal anti-FGFR-1 humano (1:1000), monoclonal anti-VEGFR-2 humano (1:1000), monoclonal anti-EGFR (1:1000), anti-p44/42;MAPK (ERK1/2, 1:1000), anti-Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2, 1:2000), anti-Phospho-EGFR Tyr 1068 (1:1000), anti-sindecin-4 (1µg/mL), anti-tubulina (1:10000), anti-integrina  $\alpha 6$  (1:2000), anti-integrina  $\alpha 9\beta 1$  (1:2000). Após a incubação com anticorpos primários, as membranas passaram por sucessivas lavagens com TBS pH 7,6 contendo 0,05% de Tween-20 (TBS-T) e foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados à HRP (1:2000; Cell Signaling) por 2 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T. Após as sucessivas lavagens, as membranas foram incubadas com um reagente quimioluminescente (ECL, GE Healthcare Life Sciences, São Paulo) e exposto ao filme recomendado (ECL), de acordo com as instruções do fabricante. O filme revelado foi digitalizado e a densidade das bandas reveladas foi quantificada por análise no programa ImageJ (versão 1.51, java 1.8).

### 1.5 Dosagem de proteínas

Os extratos celulares foram coletados. Em seguida, realizamos uma dosagem de proteína total utilizando o reagente BCA. A placa de 96 poços foi sensibilizada com 5µL de cada amostra ou padrões em concentrações conhecidas e 100µL do reagente BCA (Thermo Scientific/Pierce, Rockford, EUA). Após 30 minutos de incubação à 37°C, as densidades ópticas foram obtidas em um leitor de microplacas (Multiskan Spectrum/Thermo Scientific) a 562nm.

A dosagem de proteína dos meios condicionados obtidos após o tratamento de 72h foi realizada com *Qubit Protein Assay Kit* (Invitrogen, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) e leitura no fluorômetro *Qubit*, segundo as recomendações do fabricante.

### 1.6 Análise dos receptores celulares por citometria de fluxo

As células das diferentes linhagens de mama (MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231) foram plaqueadas na densidade de  $1,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em seus respectivos meios de cultura por 24 horas e em seguida lavadas duas vezes com meio sem SFB e incubadas com meio contendo 0,1% BSA na ausência de SFB. Após 18 horas, as culturas foram lavadas uma vez com meio sem SFB e desaderidas na presença de Accutase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA). Em seguida, as células foram centrifugadas a  $180 \times g$  por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e cada linhagem foi ressuspensa em tampão FACs (PBS+2% SFB+5mM EDTA). Posteriormente, as células foram marcadas com os seguintes anticorpos para caracterização do perfil de integrinas: APC anti-CD49c (integrina  $\alpha 3$ ), FITC anti-CD49d (integrina  $\alpha 4$ , FITC anti-CD49f humano (integrina  $\alpha 6$ ), APC anti-CD29 humano (integrina  $\beta 1$ ), e isotipos controles (FITC IgG1 de camundongo, FITC IgG2a de rato, e APC IgG1 de camundongo). Logo após a marcação as aquisições (25000 eventos por condição) foram realizadas no citômetro BD Accuri C6 Flow Cytometer.

### 1.7 Ensaio de lesão em monocamada

As linhagens MCF-10A ( $2,5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>), MCF-7 ( $2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>) e MDA-MB-231 ( $8 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) foram plaqueadas na presença de SFB 10%. Após 24 horas, lavadas com DMEM sem SFB e incubadas com BSA 0,1% por aproximadamente 18 horas, novamente lavadas e uma lesão na monocamada foi realizada com auxílio de uma ponteira de 200 microlitros. Em seguida, foram lavadas com meio sem SFB e tratadas com mitomicina C (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA) por 2 horas à 37°C. Logo após a mitomicina foi retirada, as condições lavadas com meio sem SFB e o fragmento NTSP-1 (500nM) adicionado por 35

minutos a 37°C, seguido do tratamento com o EGF (50ng/mL), os quais foram deixados em contato com as células em meio contendo SFB 2%. O fechamento da monocamada foi registrado através de uma câmera fotográfica acoplada a um microscópio de luz invertido. A área de cada tempo (0, 24, 48h e 72h) foi calculada com o auxílio do programa *Image J*.

### 1.8 Time-Lapse e *tracking* celular

As células das diferentes linhagens de mama (MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231) foram semeadas na presença de SFB 10%, na densidade de  $1,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em seus respectivos meios de cultura, e em placa de cultura especializada HiQ-4 (Nikon), a qual apresenta quatro divisões e possibilita a observação conjunta de até 4 condições distintas ao mesmo tempo. Após 24 horas, as culturas foram lavadas com meio sem SFB e metabolicamente depletadas fatores séricos (mitógenos, essencialmente), em meio contendo BSA 0,1% por aproximadamente 18 horas. Em seguida, as células foram lavadas com meio sem SFB, tratadas com o fragmento NTSP-1 (500nM), por 35 minutos a 37°C e depois com o EGF (50ng/mL), os quais foram deixados em contato com as células em meio contendo 0,5% de SFB por 72 horas. Durante esse período foi realizado o monitoramento das células através da utilização do sistema de imagens time-lapse BioStation IM-Q (Nikon). Os vídeos obtidos foram utilizados para análise do perfil da trajetória celular, bem como para a avaliação dos dados estatísticos relacionados à velocidade e à distância celular percorridas, com auxílio de dois plugins (*manual tracking* e *chemotaxis and migration tool*) do programa Image J (versão 1.51j8).

### 1.9 Ensaio Clonogênico

As células da linhagem MCF-7 foram plaqueadas ( $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) na presença de 10% SFB. Após 24 horas, foram lavadas com meio sem SFB e depletadas em fatores de crescimento em meio suplementado com 0,1% BSA por aproximadamente 18 horas. Em seguida, foram lavadas com meio sem SFB, tratadas com NTSP-1 ou com o peptídeo TSP

HepII (500nM), por 35 minutos a 37°C e depois com o EGF (50ng/mL), os quais foram deixados em contato com as células em meio contendo 0,5%SFB. Após 72 horas, as células foram lavadas com solução Versène (EDTA 0,5 mM em PBS, estéril), desaderidas com Accutase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA), centrifugadas a  $180 \times g$  por 10 minutos, e a contagem realizada na presença de solução de azul de tripan 0,4%. As células provenientes dos diferentes tratamentos foram semeadas ( $2 \times 10^2$  células/cm<sup>2</sup>) em placas de 6 poços, na presença de SFB 10%, e a formação de colônias foi observada ao longo de 18 dias. Após esse período, as condições foram lavadas com meio sem SFB, fixadas com glutaraldeído 1,1% diluído em PBS, coradas com solução de cristal de violeta 0,5% por 1 hora. Em seguida, a placa foi lavada uma vez com água e permaneceu secando por aproximadamente 18 horas em temperatura ambiente. O registro fotográfico foi realizado através de uma câmera (Sony Steady Shot DSC-W610) acoplada a uma lupa (Bel Photonics). As fotos obtidas de campos aleatórios (5-6) foram utilizadas para determinação do número, tamanho e morfologia das colônias. O tamanho foi obtido com o auxílio do programa *Image J* (versão 1.51j8), através da correlação com a barra de calibração utilizada.

### 1.10 Ensaio 3D (*On-Top Assay*)

O ensaio tridimensional foi realizado com as três linhagens mamárias MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231, conforme protocolo previamente descrito (Lee *et al*, 2007) para a realização do ensaio *on-top*. As células foram tripsinizadas, centrifugadas a  $180 \times g$  por 10 minutos, ressuspensas em meio DMEM/F12-HAM sem aditivos na presença de SFB 1%, e contadas com azul de tripan 0,4%. A faixa de densidade celular utilizada para cada linhagem foi estabelecida com base nas informações fornecidas pelo mesmo grupo em outro trabalho (Kenny *et al*, 2007). Dessa forma, após a contagem as diferentes linhagens foram separadas em microtubos, novamente centrifugadas, e ressuspensas em meio H-14 (Blaschke *et al*, 1994) (DMEM/F12-HAM com SFB 1%, suplementado com os seguintes aditivos: insulina [250ng/mL; Sigma-Aldrich]; transferrina [10µg/mL; Sigma-Aldrich] selenito de sódio [2.6ng/mL; Sigma-Aldrich]; β-estradiol [ $10^{-10}$  M; Sigma-Aldrich]; hidrocortisona  $1,4 \times 10^{-6}$  M e prolactina [5µg/mL; Peprotech, Ribeirão Preto, SP, Brasil). As células MCF-10A ( $5,2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>), MCF-7 ( $3,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) e MDA-MB-231 ( $1,6 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>)

foram semeadas sobre uma fina camada de Matrigel® com teor reduzido de fatores de crescimento, em metade do volume de meio (H-14) total. Nas condições tratadas com o fragmento NTSP-1, além de receberem o tratamento solúvel nessa primeira metade do volume total, a fina camada de matrigel também foi polimerizada juntamente com o fragmento NTSP-1 (500nM). Em seguida, a placa foi incubada a 37°C, e recebeu agitação no plano x-y em intervalos de 5 minutos durante 30 minutos. Após esse período, a segunda metade do meio H-14 foi adicionada sobre as células contendo 10% de Matrigel® (mistura meio H-14+matrigel) reduzido de fator de crescimento, juntamente com o EGF 50ng/mL nas condições tratadas com essa citocina. A cultura tridimensional foi mantida por 4 dias, e a troca da mistura matrigel+meio realizada a cada 2 dias, e no caso das condições tratadas com EGF, este também foi adicionado na troca. Após 4 dias de ensaio, o meio foi retirado, a placa foi lavada duas vezes com PBS gelado, fixada com glutaraldeído 1,1% diluído em PBS por 15 minutos em temperatura ambiente, seguido da adição de PBS+glicina 100mM por 10 minutos, e nova lavagem com PBS. Para a marcação imunofluorescente das culturas a placa foi lavada por 3 vezes com PBS+glicina 100mM (10 minutos/lavagem), permeabilizada com Triton X-100 0,1% diluído em PBS por 10 minutos em temperatura ambiente, lavada com PBS, bloqueada por 30 minutos com solução de Tris-Albumina-NaCl (BSA 1% diluída em TBS). Em seguida, foi realizada a marcação com faloidina-Alexa 488 (1U/2cm<sup>2</sup>) (Molecular Probes, Invitrogen, São Paulo) diluída em Tris-Albumina-NaCl por 30 minutos em temperatura ambiente, novas lavagens com PBS, e posterior marcação com DAPI (1:2000) também diluído em Tris-Albumina-NaCl e lavagens com PBS.

O aspecto morfológico das células, como a aparência do citoesqueleto celular de actina e dos núcleos celulares foi observado em microscopia de contraste de fase e em microscopia de fluorescência, ambas realizadas no microscópio invertido EVOS-*fl* (Thermo Fisher/Invitrogen, São Paulo). As fotos obtidas, em campo claro, de campos aleatórios, e as imagens obtidas por microscopia de fluorescência foram utilizadas para a classificação das esferas em diferentes morfologias de acordo com os parâmetros propostos por Kenny e colaboradores (2007) [ver adiante na seção *Resultados*, Fig. 34]. Foi estabelecida uma relação entre o número de colônias de cada tipo morfológico presente em cada campo, em relação a um número total de colônias, frente aos diferentes tratamentos.

### 1.11 Ensaios adesão e proliferação celular

As células MCF-7 e MDA-MB-231 foram semeadas ( $1,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) em placa de 24 poços, na presença de SFB 10%. Após 24 horas, foram lavadas com meio sem SFB e metabolicamente depletadas em fatores séricos em meio contendo BSA 0,1%, por aproximadamente 18 horas. Em seguida, foram lavadas com meio sem SFB, tratadas com o NTSP-1 (500nM), por 35 minutos a 37°C e depois com o EGF (50ng/mL), os quais foram deixados em contato com as células em meio contendo SFB 0,5%. Após 72 horas, as condições foram lavadas com meio sem SFB e fixadas com formaldeído 3,7% por 10 minutos, seguido de lavagens com PBS, incubação com DAPI por 5 minutos e novas lavagens com PBS. Por fim, a contagem de células/campo foi realizada em 25 campos aleatórios em microscópio de fluorescência (magnificação: 20 ×).

Além disso, com base nos fotogramas resultantes do registro por videomicroscopia do ensaio descrito no item 2.8, calculamos também as taxas de adesão inicial, o índice mitótico (IM) e de morte celular (IMC). O IM foi estabelecido através da relação (n° de mitoses detectadas no tempo X/ n° inicial de células no tempo anterior; com base em escala de tempo com intervalos de 24 horas). Do mesmo modo, o índice de morte de celular foi definido (n° de mortes detectadas no tempo X/ n° inicial de células no tempo anterior; com base na mesma escala de tempo). Os eventos de morte selecionados para compor este índice foram aqueles aparentemente decorrentes do processo de *anoikis* (morte celular por desaderência), através da observação dos seguintes critérios morfológicos: desaderência → borbulhamento da membrana → fragmentação celular → dispersão dos debris.

Os fotogramas também foram utilizados para determinar a taxa de adesão inicial de células que foram submetidas aos tratamentos, por 72 horas, com o peptídeo bioativo TSP Hep II (na presença e ausência de EGF). Após os tratamentos, células MCF-7 foram lavadas com solução Versène, desaderidas com Accutase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA), centrifugadas a 180 x g por 10 minutos, e a contagem realizada na presença de solução de azul de tripan 0,4%. Em seguida, as células ( $1,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) foram plaqueadas sobre gelatina na presença de SFB 10%, em placa de cultura HiQ-4 (Nikon) para videomicroscopia, e adesão celular foi observada durante o período de 2 horas.

### 1.12 Marcação por Imunofluorescência e Análise por Microscopia Confocal

As células MCF-7 foram semeadas ( $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) sobre lamínulas previamente tratadas com gelatina, na presença de SFB 10%. Após 24 horas, foram lavadas com meio sem SFB e metabolicamente depletadas em meio suplementado com BSA 0,1%, por aproximadamente 18 horas. Em seguida, foram lavadas com meio sem SFB, pré-incubadas com o fragmento NTSP-1 (500nM) e/ou com o EGF 50ng/mL, conforme descrito no **item 2.3**. O tratamento com EGF foi realizado em três tempos distintos (10, 30 e 60 minutos). Ao final dos respectivos tempos, os meios foram retirados e as lamínulas imediatamente fixadas com formaldeído 3,7% (diluído em PBS) por 20 minutos em temperatura ambiente, e lavadas sucessivamente com PBS.

Para a marcação imunofluorescente, as lamínulas foram permeabilizadas com Triton X-100 0,1% (diluído em PBS) por 2 minutos, seguido de lavagens com PBS, e incubação com solução de Tris-Albumina-NaCl (BSA 1%, diluída em TBS) por 30 minutos em temperatura ambiente. Logo após foram incubadas com anti-EGFR (1:50; ref. 4267s, Cell Signaling) por 30 minutos, lavadas com PBS, e incubadas com o anticorpo anti-Rab5A (1:50; ref. MABT182, Millipore) também por 30 minutos em temperatura ambiente, e novamente lavadas com PBS consecutivas vezes. Em seguida, as lamínulas foram incubadas com os anticorpos secundários adequados (anti-coelho ou anti-camundongo), conjugados a Alexa Fluor 555 (vermelho-alaranjado) ou a Alexa Fluor 488 (verde) (Molecular Probes, ThermoFisher, São Paulo), diluídos em solução de Tris-Albumina-NaCl com 10% de soro de jumento, por 30 minutos em temperatura ambiente, seguido de lavagens com PBS. Por fim, as lâminas foram montadas utilizando o ProLong *antifade* (Thermo Fisher Scientific) associado ao DAPI como meio montagem. As imagens de microscopia confocal foram obtidas no sistema ZEISS LSM510 META. Os programas ZEN 2.3 SP1 (ZEN black) e ZEN 2.5 lite (ZEN blue) foram utilizados para análise e obtenção das ROIs (regiões de interesse). As imagens foram deconvoluídas com o auxílio do plugin *Iterative Deconvolve 3D* e os índices de co-localização obtidos através do plugin JACoP, ambos do programa Image J (versão 1.51j8).

### 1.13 Ensaio de Tubulogênese Endotelial

Células endoteliais microvasculares da linhagem HMEC-1 foram previamente lavadas com meio MCDB-131 sem SFB e sem EGF, e estarvadas com 0,1%BSA por aproximadamente 18h. Em seguida, foram lavadas com solução Versène e desaderidas com Accutase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA). As células foram centrifugadas a  $180 \times g$  por 10 minutos, ressuspensas em meio MCDB-131 sem SFB, e contadas na presença de solução de azul de tripan 0,4%. Em seguida, foram divididas em quatro tubos (120.000 células/tubo), novamente centrifugadas e ressuspensas em seus respectivos tratamentos (NTSP-1 500nm; FGF-2 50ng/mL; NTSP-1/FGF-2, nas mesmas concentrações) na presença de SFB 2%. As células foram semeadas (40.000 células/poço) sobre Matrigel® com teor reduzido em fatores de crescimento (Corning/BD, ref. 354230) em placa de 96 poços e em duplicata. A formação de estruturas foi acompanhada durante 8 horas, e após esse período as células foram lavadas com meio sem SFB por 5 minutos, fixadas com glutaraldeído 1,1% diluído em PBS, novamente lavadas com PBS (3 vezes). O registro fotográfico foi realizado através de uma câmera acoplada a um microscópio de luz invertido. As fotos obtidas no aumento de  $4\times$  foram utilizadas para contabilização da extensão (em  $\mu\text{m}$ ) de monocamada e *sprouts*. Esta quantificação envolveu a demarcação manual de regiões de monocamada e regiões de *sprouts* com o auxílio de uma mesa digitalizadora (Wacom Co.; Ltd) e do programa Adobe-Photoshop CC 2018, versão 19.1. A correlação do tamanho em  $\mu\text{m}$  foi obtida com base na barra de calibração de cada foto, gerada automaticamente pelo *programa* do microscópio invertido EVOS fl (Thermo do Brasil, Life Sciences, São Paulo).

### 1.14 Análise Estatística

As análises foram realizadas no programa GraphPad Prism 8, utilizando a análise ANOVA com múltiplas comparações;  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Foram utilizados A maioria dos dados foi relatada como média  $\pm$  desvio padrão (DP), mas alguns experimentos de maior variabilidade receberam o tratamento gráfico do tipo *box plot*, nos quais o conceito estatístico usado foi o da mediana, com a mesma análise ANOVA.

## 2 RESULTADOS

### Parte I- Papel pró-tumoral da TSP-1 em modelo de epitélio mamário

---

#### 2.1 Caracterização da expressão de receptores tirosina-quinase (RTKs) e de receptores de adesão celular em linhagens epiteliais mamárias

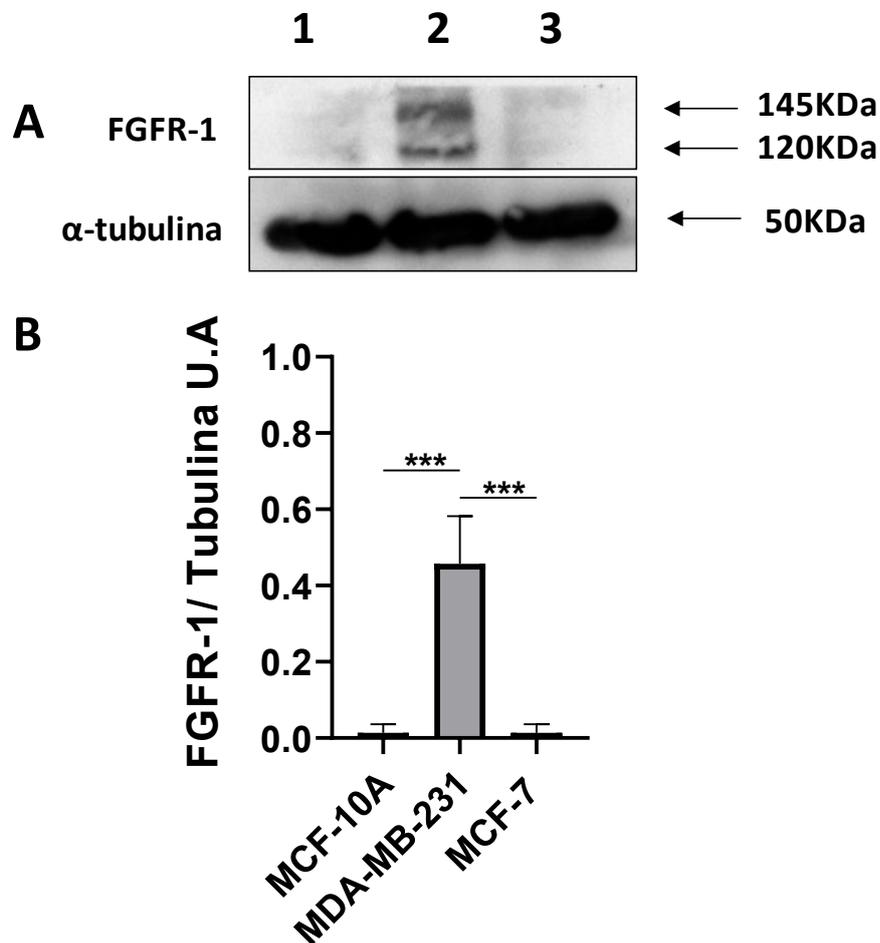
Inicialmente, realizamos a caracterização das diferentes linhagens de mama (MCF-10A, não tumorigênica, MDA-MB-231, tumoral muito invasiva, e MCF-7, tumoral com reduzido potencial invasivo) quanto à expressão de receptores de fatores de crescimento que atuam através de RTKs, uma vez que, apesar de alguns já estarem descritos na literatura para estas linhagens, é sabido que pode ocorrer variabilidade feno-genotípica entre lotes de linhagens celulares imortalizadas mantidas nos diversos laboratórios de pesquisa (Geraghty et al, 2014).

Assim, avaliamos expressão dos receptores **FGFR-1**, **VEGFR-2**, **EGFR** por *western blotting*. Verificamos que a linhagem MDA-MB-231 expressa de forma estatisticamente significativa o nível mais elevado do receptor FGFR-1, quando comparada às linhagens MCF-10A e MCF-7 (**Figura 16**;  $p < 0,001$ ). A expressão de VEGFR-2 foi observada apenas na linhagem MCF-10A, enquanto que a expressão deste receptor nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 não foi detectada pela técnica de *western blotting*, no qual células endoteliais isoladas da veia do cordão umbilical humano (HUVEC) foram utilizadas como controle positivo (**Figura 17**). O receptor EGFR é altamente expresso nas linhagens MCF-10A e MDA-MB-231, e reduzidamente expresso na linhagem MCF-7 (**Figura 18**;  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ; respectivamente).

Diversos receptores celulares já foram descritos para TSP-1 e para o domínio N-terminal desta proteína, que denominaremos **NTSP-1**. Em trabalhos prévios, demonstramos que os efeitos pró-angiogênicos do N-TSP1 dependiam parcialmente do engajamento do HSPG sindecan-4, significativamente expresso em células endoteliais (Ferrari do Outeiro-Bernstein et al, 2002; Nunes et al 2008; Dias et al, 2012).

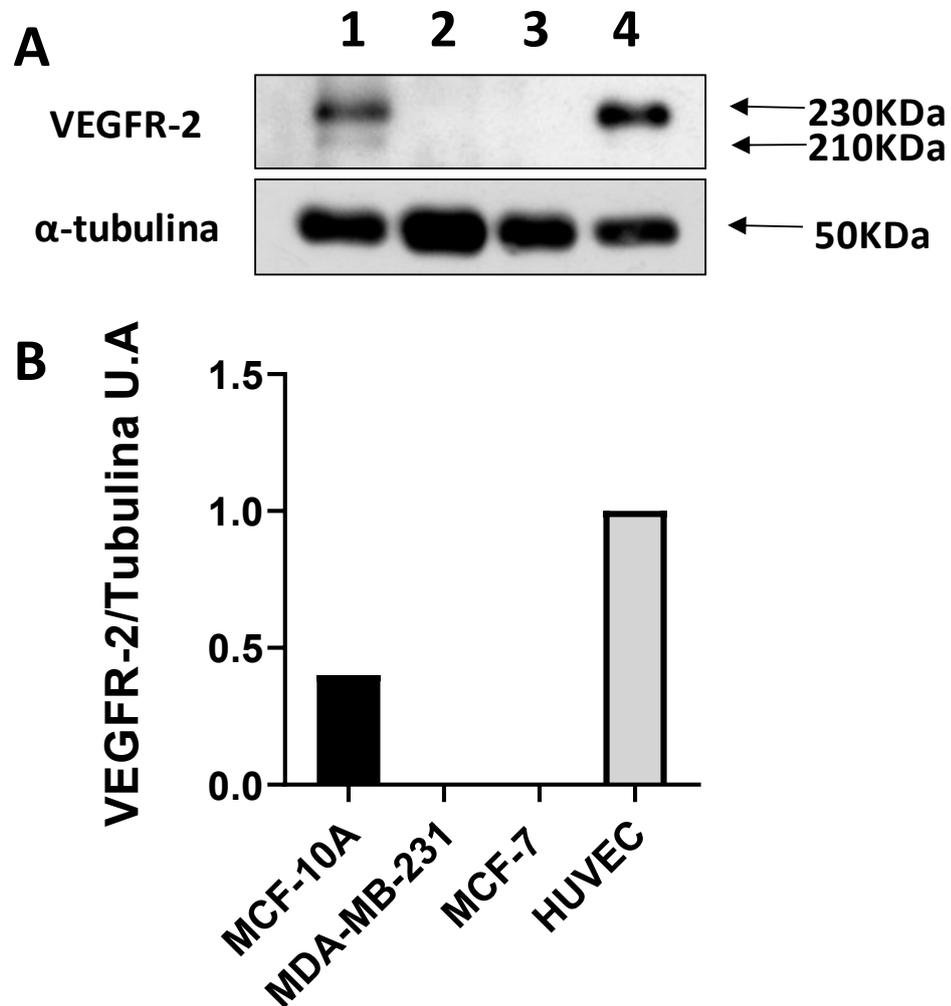
Porém, outros grupos mostraram que esta região da TSP-1 também é reconhecida por diversas integrinas, como  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 9\beta 1$  e  $\alpha 6\beta 1$  (Calzada e Roberts, 2005). Desta forma, avaliamos a expressão dessas moléculas nas linhagens mamárias do presente estudo.

Figura 16 - Análise da expressão de FGFR-1 nas linhagens de mama por *western blotting*



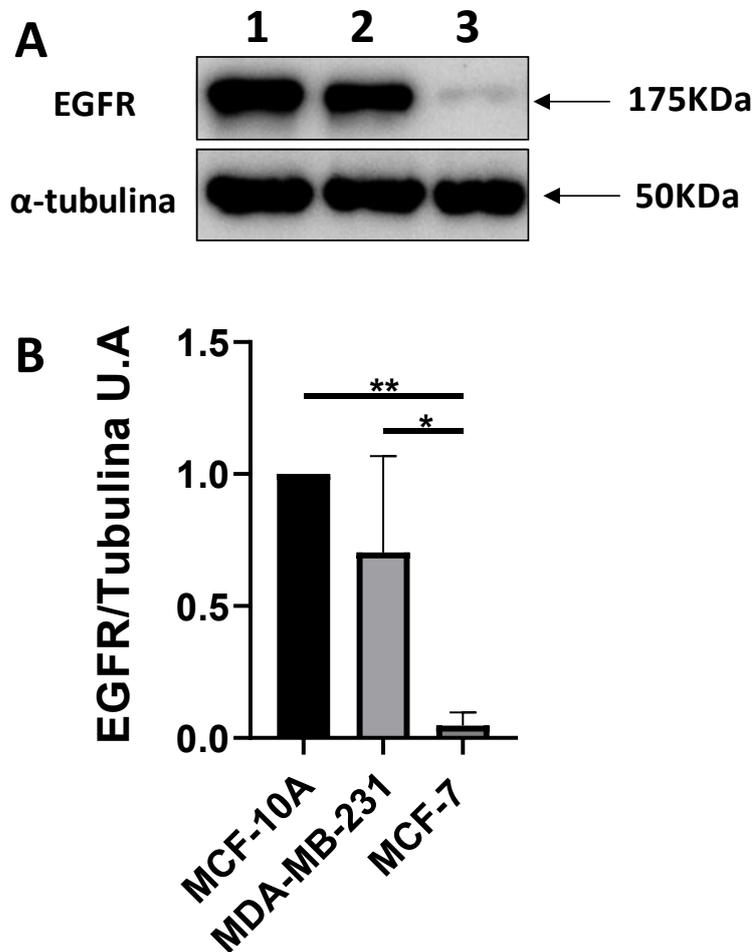
Legenda: (A) Os extratos celulares foram submetidos a uma corrida eletroforética e transferidos para uma membrana de PVDF (Immobilon-P). A membrana foi incubada com um anticorpo monoclonal anti-FGFR-1 humano, que foi detectado indiretamente, por um sistema de quimioluminescência, conforme descrito na Metodologia. A tubulina foi usada como controle de *loading*. Condições: 1- linhagem não tumorigênica MCF-10A; 2- linhagem tumoral MDA-MB-231; 3- linhagem tumoral MCF-7. (B) As bandas eletroforéticas presentes nos filmes digitalizados (resolução de 300 dpi) foram analisadas pelo programa ImageJ (versão 1.51, java 1.8) [imagem de um experimento representativo]. As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste Ordinary One-way ANOVA no programa Graph-Pad Prism (versão 8.0.1). (média de 3 experimentos, \*\*\*p<0,001).

Figura 17 - Análise da expressão de VEGFR-2 nas linhagens de mama por *western blotting*



Legenda: (A) Extratos celulares obtidos como descrito na Metodologia (item 2.4) foram submetidos a uma corrida eletroforética e transferidos para uma membrana de PVDF (Immobilon-P). A membrana foi incubada com um anticorpo monoclonal anti-VEGFR-2 humano, que foi detectado indiretamente, por um sistema de quimioluminescência, conforme descrito na Metodologia. A tubulina foi usada como controle de *loading*. Condições: 1- linhagem não tumorigênica MCF-10A; 2- linhagem tumoral MDA-MB-231; 3- linhagem tumoral MCF-7, 4- HUVEC (controle positivo). (B) As bandas eletroforéticas presentes nos filmes digitalizados (resolução de 300 dpi) foram analisadas pelo programa ImageJ (versão 1.51, java 1.8). (n=3, gráfico representativo de um experimento típico).

Figura 18 - Análise da expressão de EGFR nas linhagens de mama por *western blotting*



Legenda: **(A)** Os extratos celulares foram submetidos a uma corrida eletroforética e transferidos para uma membrana de PVDF (Immobilon-P). A membrana foi incubada com um anticorpo monoclonal anti-EGFR humano, que foi detectado indiretamente, por um sistema de quimioluminescência, conforme descrito na Metodologia. A tubulina foi usada como controle de *loading*. Condições: 1- linhagem não tumorigênica MCF-10A; 2- linhagem tumoral MDA-MB-231; 3- linhagem tumoral MCF-7 (imagem de um experimento representativo). **(B)** As bandas eletroforéticas presentes nos filmes digitalizados foram analisadas pelo programa ImageJ (versão 1.51, java 1.8). As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste Ordinary One-way ANOVA no programa Graph-Pad Prism (versão 8.0.1). (média de 3 experimentos, \*p < 0,05; \*\*p < 0,01).

A análise da expressão do sindecana-4 por *western blotting* demonstrou que a linhagem tumoral MCF-7 apresenta uma maior expressão deste proteoglicano, tanto em relação a linhagem não tumorigênica MCF-10A, quanto em relação a linhagem tumoral MDA-MB-231 (**Figura 19**; p < 0,05; p < 0,01; respectivamente).

A expressão das cadeias de **integrinas  $\alpha 3$**  (CD49c),  **$\alpha 4$**  (CD49d),  **$\alpha 6$**  (CD49f) e  **$\beta 1$**  (CD29) na superfície das células foi avaliada por citometria de fluxo, e de  **$\alpha 9\beta 1$**  em extratos celulares foi avaliada por *western blotting*. A análise por citometria demonstrou que **88%** das

células na linhagem MCF-10A expressam a **integrina  $\alpha 3$** , enquanto as linhagens tumorais MDA-MB-231 e MCF-7 expressaram **91%** e **75%**, respectivamente (**Figura 20**;  $p < 0,05$ ), conforme análise estatística de pelo menos três experimentos.

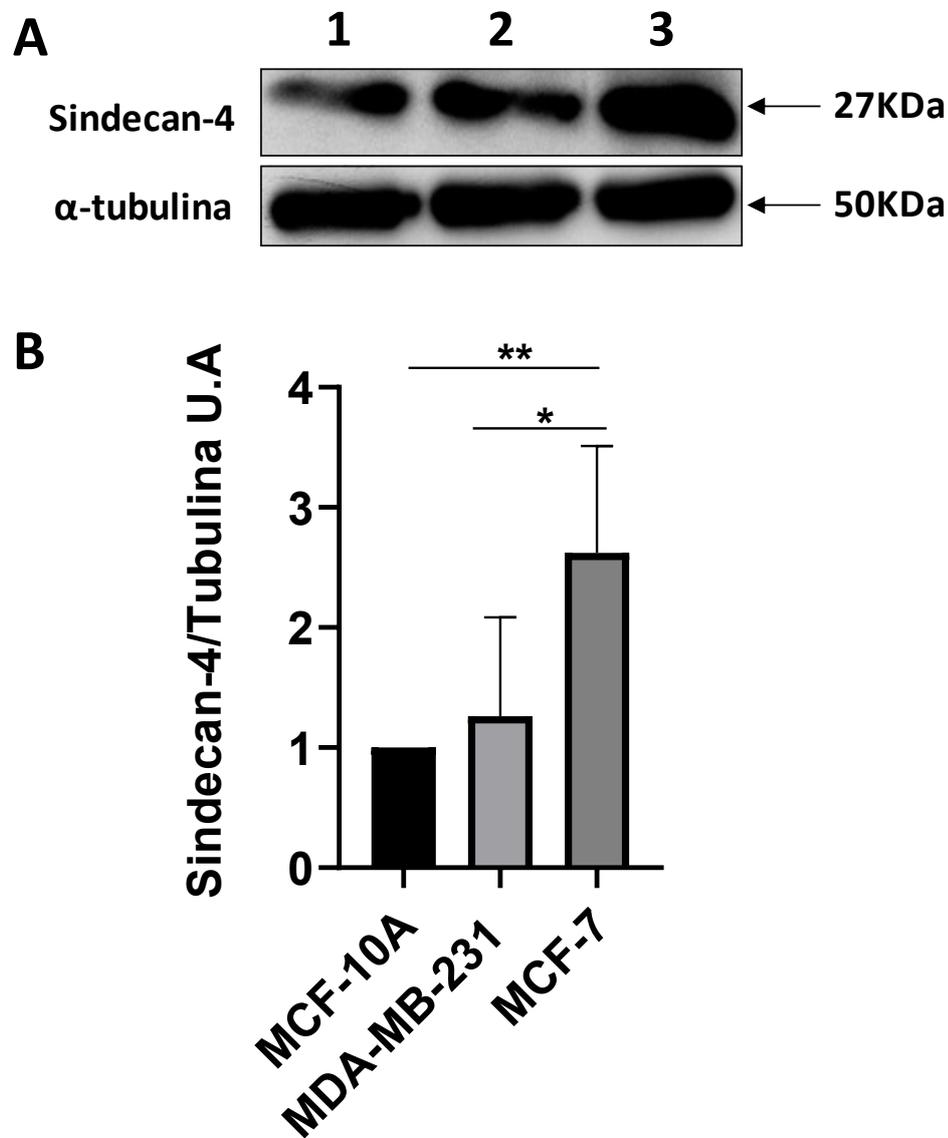
Em relação à **integrina  $\alpha 4$** , a linhagem MCF-10A apresenta aproximadamente **61%** de expressão, a linhagem MDA-MB-231 **63%** e a linhagem MCF-7 **56%** (**Figura 21**), sendo, portanto, níveis de expressão bastante similares entre as três linhagens mamárias.

Quanto à **integrina  $\alpha 6$** , a linhagem MCF-10A apresentou aproximadamente **74%** de expressão, que difere significativamente dos percentuais expressos pelas linhagens tumorais MDA-MB-231 **27%** e MCF-7 **13%**, fato corroborado por *western blotting* (**Figura 22**;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,0001$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os percentuais expressos pelas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7.

Em relação à **integrina  $\beta 1$** , as três linhagens celulares apresentam um nível de expressão elevado e comparável, sem diferenças significativa entre elas: MCF-10A com **99%** das células positivamente marcadas, MDA-MB-231 com **97%** e MCF-7 com **98%** (**Figura 23**).

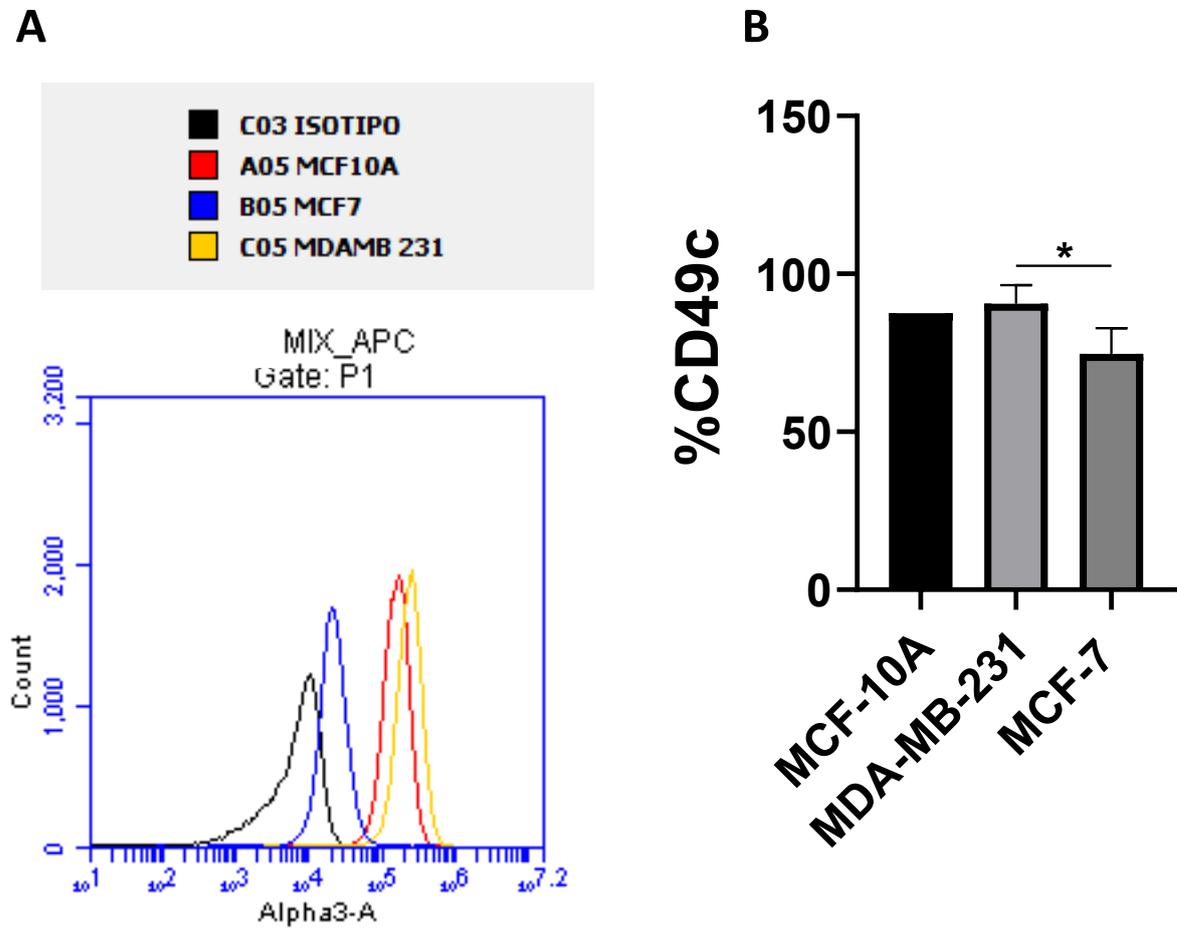
Na análise por *western blotting*, a banda da **integrina  $\alpha 9$**  correspondente ao peso molecular de 130KDa foi detectada nas linhagens MCF-10A e MDA-MB-231, e de maneira significativa mais expressa na linhagem não tumorigênica do que na linhagem tumoral (**Figura 24**;  $p < 0,05$ ). Além disso, a presença de outras bandas na altura de 100 e 76KDa também foram detectadas, respectivamente, nas linhagens MCF-10A e MDA-MB-231 (possivelmente por causa da presença de agente redutor as amostras, como será discutido posteriormente). Em contrapartida, uma maior expressão da banda de menor peso molecular é detectada na linhagem MDA-MB-231, embora a diferença não seja estatisticamente significativa, quando comparada a linhagem MCF-10A.

Figura 19- Análise da expressão de sindecan-4 nas linhagens de mama por *western blotting*.



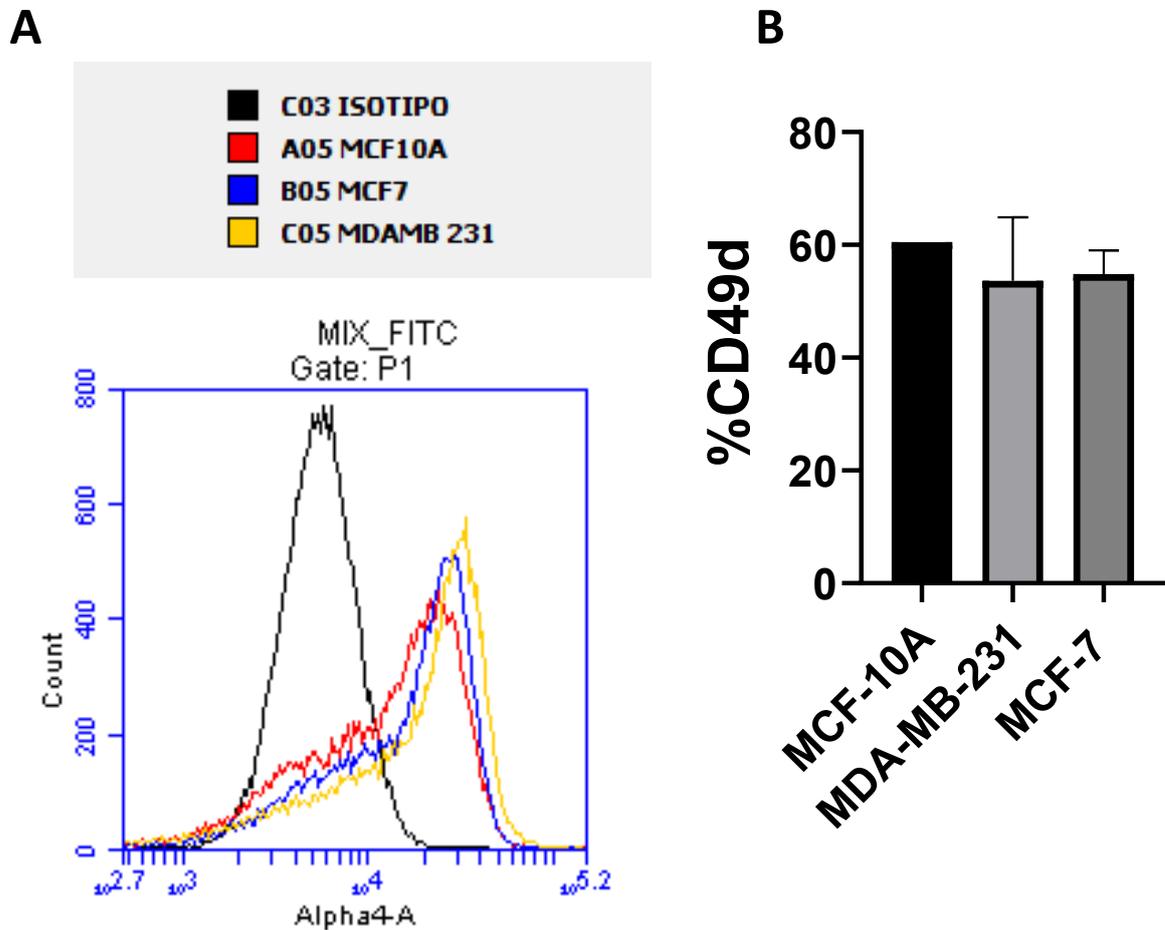
Legenda: (A) Os extratos celulares foram submetidos a uma corrida eletroforética e transferidos para uma membrana de PVDF (Immobilon-P). A membrana foi incubada com um anticorpo monoclonal anti-sindecan-4 humano, que foi detectado indiretamente, por um sistema de quimioluminescência, conforme descrito na Metodologia. A tubulina foi usada como controle de *loading*. Condições: 1- linhagem não tumorigênica MCF-10A; 2- linhagem tumoral MDA-MB-231; 3- linhagem tumoral MCF-7 (imagem de um experimento representativo). (B) As bandas eletroforéticas presentes nos filmes digitalizados (resolução de 300 dpi) foram analisadas pelo programa ImageJ (versão 1.51, java 1.8). As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste Ordinary One-way ANOVA no programa Graph-Pad Prism (versão 8.0.1). (média de 5 experimentos, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

Figura 20- Análise da expressão da integrina  $\alpha 3$  (CD49c) por citometria de fluxo



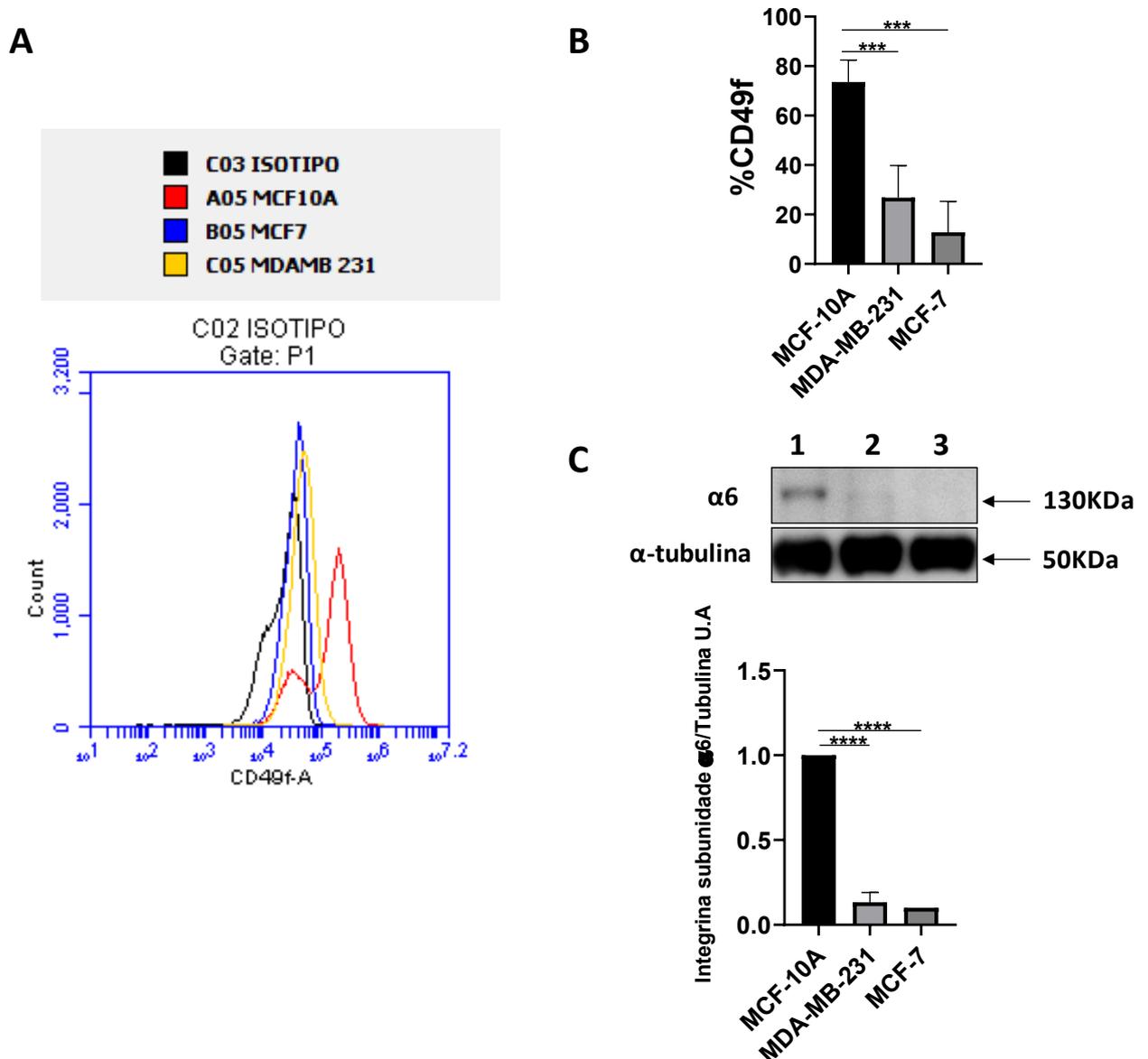
Legenda: As análises foram realizadas em relação ao isotipo IgG1 de camundongo acoplado ao fluoróforo APC, representado pela linha preta. **(A)** Histograma de uma análise típica, onde os deslocamentos das linhagens MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 são representados respectivamente pelas linhas vermelha, azul e amarela. **(B)** Média dos percentuais de expressão de alpha 3 detectados por citometria. (n=3; p<0,05).

Figura 21- Análise da expressão da integrina  $\alpha 4$  (CD49d) por citometria de fluxo



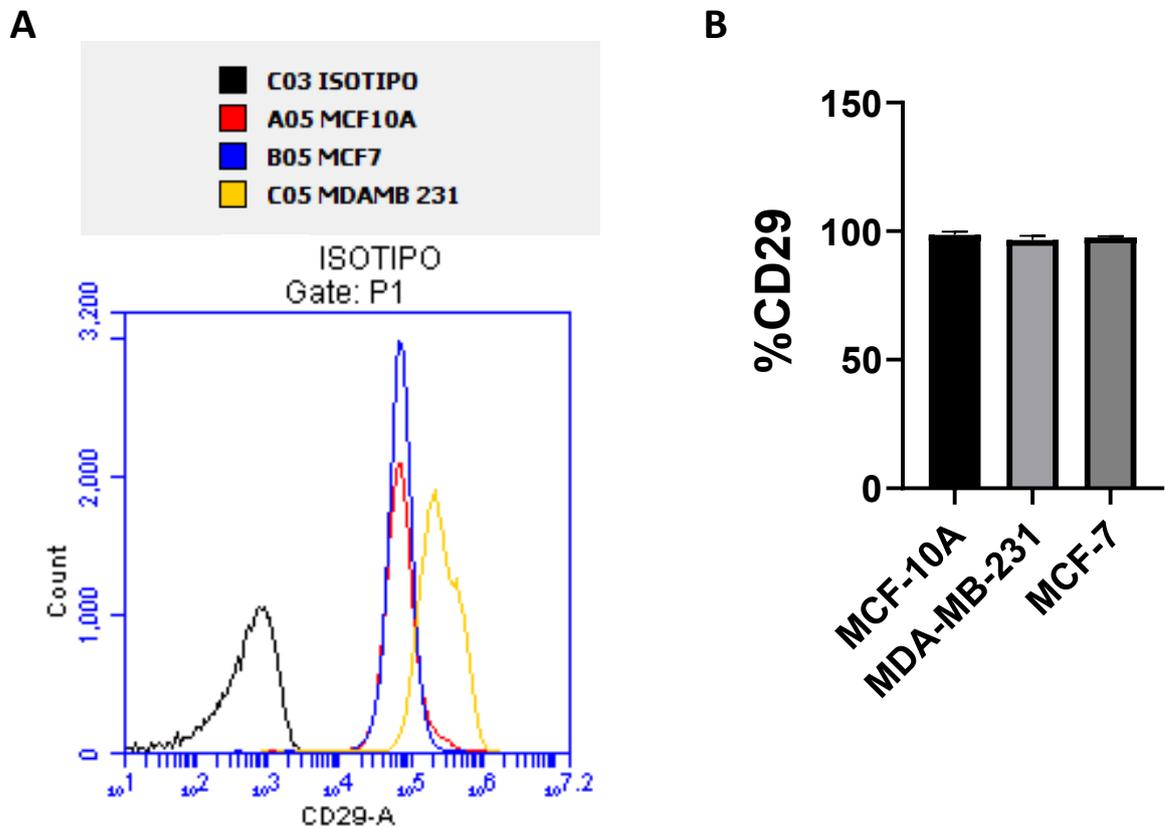
Legenda: As análises foram realizadas em relação ao isotipo IgG1 de camundongo acoplado ao fluoróforo FITC, representado pela linha preta. (A) Histograma de uma análise típica, onde os deslocamentos das linhagens MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 são representados respectivamente pelas linhas vermelha, azul e amarela. (B) Percentuais de expressão de alpha 4 detectados por citometria. (Experimento representativo).

Figura 22 - Análise da expressão da integrina  $\alpha 6$  (CD49f) por citometria de fluxo e *western blotting*



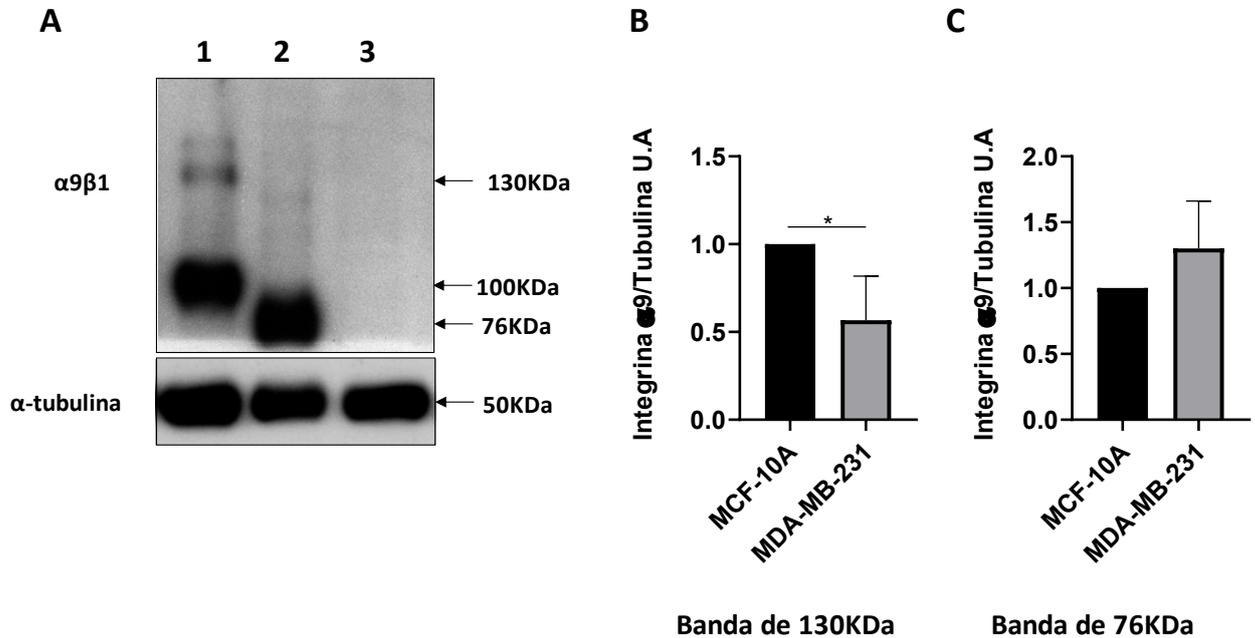
Legenda: As análises foram realizadas em relação ao isotipo IgG2a de rato acoplado ao fluoróforo FITC, representado pela linha preta. (A) Histograma de uma análise típica, onde os deslocamentos das linhagens MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 são representados respectivamente pelas linhas vermelha, azul e amarela. (B) Média dos percentuais de expressão de alfa 6 detectados por citometria. As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste Ordinary One-way ANOVA no programa Graph-Pad Prism (versão 8.0.1). (média de 4 experimentos, \*\*\* $p < 0,001$ ). (C) Análise da expressão da integrina alfa 6 por *western blotting* (média de 3 experimentos, \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Figura 23- Análise da expressão da integrina  $\beta 1$  (CD29) por citometria de fluxo



Legenda: As análises foram realizadas em relação ao isotipo IgG1 de camundongo acoplado ao fluoróforo APC, representado pela linha preta. (A) Histograma de uma análise típica, onde os deslocamentos das linhagens MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 são representados respectivamente pelas linhas vermelha, azul e amarela. (B) Média dos percentuais de beta 1 detectados por citometria (n=4). As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste Ordinary One-way ANOVA no programa Graph-Pad Prism (versão 8.0.1).

Figura 24- Análise da expressão da integrina  $\alpha 9\beta 1$  por *western blotting*



Legenda: Os extratos celulares foram submetidos a uma corrida eletroforética e transferidos para uma membrana de PVDF (Immobilon-P). A membrana foi incubada com um anticorpo anti- $\alpha 9\beta 1$ , que foi detectado indiretamente, por um sistema de quimioluminescência, conforme descrito na Metodologia. A tubulina foi usada como controle de *loading*. Condições: 1- linhagem não tumorigênica MCF-10A; 2- linhagem tumoral MDA-MB-231; 3- linhagem tumoral MCF-7. (B) Densitometria bandas de 130KDa. As bandas eletroforéticas presentes nos filmes digitalizados (resolução de 300 dpi) foram analisadas pelo programa ImageJ (versão 1.51, Java 1.8). (C) Densitometria bandas entre 76 e 100 KDa. As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste T de Student no programa Graph-Pad Prism (versão 8.0.1). (média de 3 experimentos, \* $p < 0,05$ ).

Esta análise nos permite ainda observar que o perfil de bandas expressas pela linhagem MCF-10A difere do observado nas células MDA-MB-231, o que pode sugerir diferentes perfis de glicosilação da integrina  $\alpha 9\beta$ , entre a linhagem não tumorigênica e a linhagem tumoral. Na linhagem MCF-7, a expressão de  $\alpha 9\beta 1$  não foi detectada por *western blotting*.

Com base nesta caracterização preliminar, pudemos concluir que as três linhagens mamárias selecionadas para o estudo (MCF1-10A, MCF-7 e MDA-MB-231) expressam, ainda que de forma heterogênea, a maioria dos receptores descritos na literatura para o reconhecimento do domínio N-terminal da TSP-1 (NTSP-1) (Tabela 3), assim como o receptor tirosina quinase EGFR, o que nos encorajou a prosseguir na investigação da potencial relevância do NTSP-1 na resposta celular a fatores de crescimento prevalentes no

microambiente tumoral, com foco inicial no fator de crescimento epidermal (EGF), devido a sua importância na biologia do câncer de mama, e a reduzida expressão de FGFR-1 nas linhagens MCF-10A e MCF-7, assim como a ausência de VEGFR-2 nos lotes das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7.

## 2.2 Efeito do fragmento NTSP-1 e do EGF na migração celular das linhagens mamárias

A TSP-1 já foi descrita como promotora da adesão, migração e invasão de células de carcinoma de mama MDA-MB-231 e MCF-7 (Incardona et al, 1995, Chandrasekaran et al, 1999). Dessa forma, avaliamos inicialmente o papel do domínio NTSP-1 em processos celulares relacionados à progressão tumoral, porém buscando verificar a sua capacidade de potencializar tais respostas, quando também estimuladas por fatores de crescimento que atuam através de receptores tirosina-quinase. Iniciamos nossas abordagens funcionais pela análise da migração celular, usando duas metodologias distintas: (a) ensaio de lesão em monocamada; (b) análise de migração em tempo real (*time-lapse*) com monitoramento de células individuais (*cell tracking*). No primeiro, já há consenso na literatura de que se trata de um monitoramento da migração dita *coletiva* (Molinie e Gautreau, 2018). No segundo modelo, busca-se avaliar a *quimiotaxia de células individuais*, igualmente relevante para o processo de disseminação tumoral (Friedl e Wolf, 2010).

Tabela 3 – Receptores de adesão e RTKs das linhagens mamárias

Receptores	MCF-10A	MDA-MB-231	MCF-7
FGFR-1	+	++	+
VEGFR-2	+	-	-
EGFR	++	++	+
Sindecin-4	+	+	++
$\alpha$ 3 integrina	++	++	+
$\alpha$ 4 integrina	+	+	+
$\alpha$ 6 integrina	+++	++	+
$\beta$ 1 integrina	+++	+++	+++
$\alpha$ 9 $\beta$ 1 integrina	+	+	-

Legenda: Resumo dos receptores de adesão e RTKs expressos nas linhagens mamárias analisadas.

### 2.2.1 Ensaio de lesão em monocamada

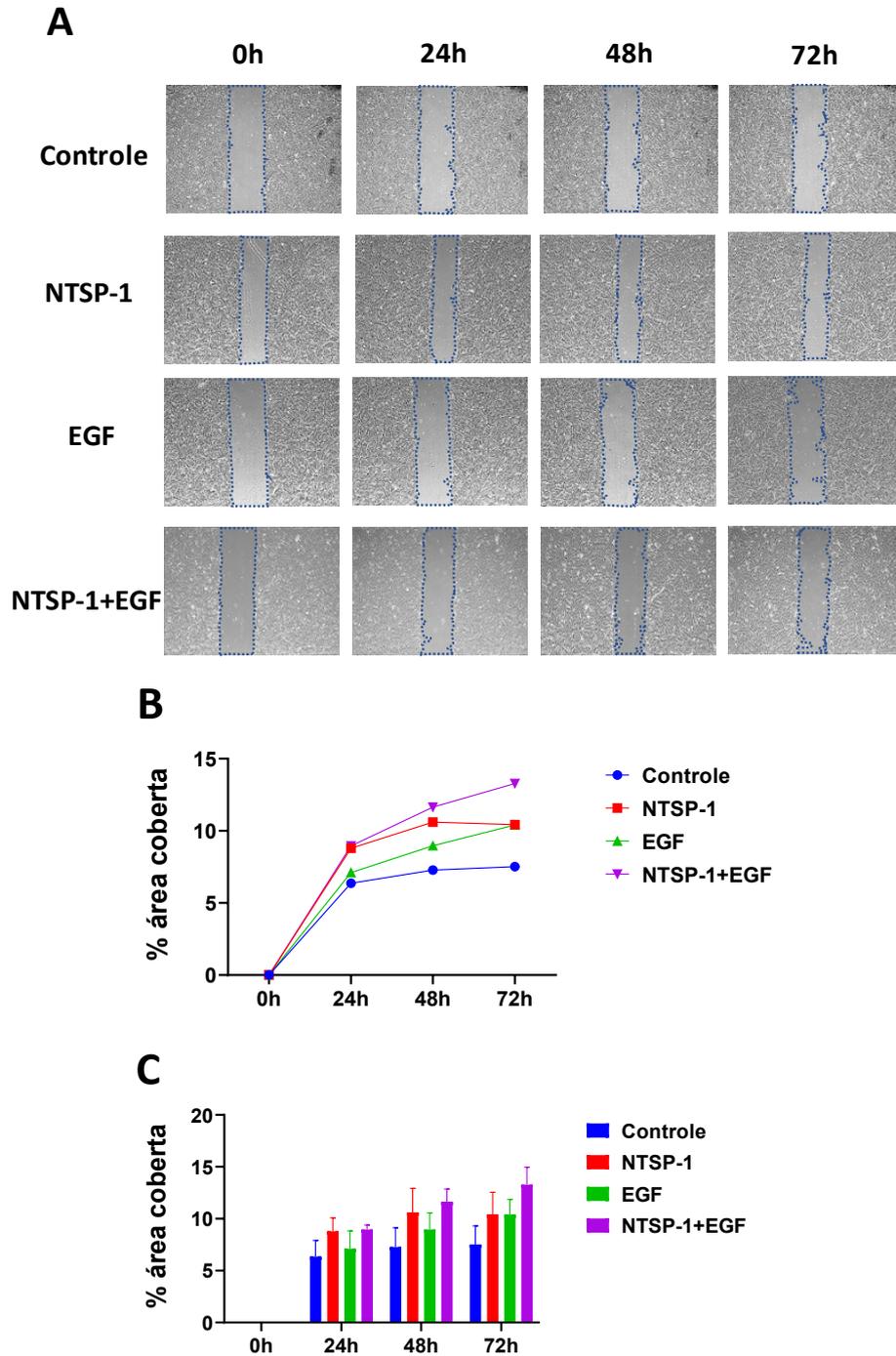
Neste ensaio, a área de lesão mecânica produzida em monocamadas celulares com auxílio de uma ponteira estéril foi considerada 0% quando  $t=0$  ( $T_0$ ), sendo o fechamento da lesão quantificado após períodos determinados e expresso como *área percentual de cobertura da lesão* (ou *área coberta*). Ressaltamos que: (i) o uso da droga anti-mitótica mitomicina C durante o ensaio permite interpretar a área de cobertura como resultado da migração celular, sem contribuição significativa da proliferação celular; e (ii) a presença de SFB em baixa concentração (2%) representa uma reduzida interferência nos potenciais efeitos dos fatores exógenos investigados sobre a migração.

Na linhagem não tumorigênica **MCF-10A**, o tratamento com fator de crescimento EGF (50 ng/mL) mostrou uma tendência ao longo do tempo em estimular o fechamento da área de lesão, relativamente ao controle não tratado (**Figura 25**), porém sem diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos tempos monitorados (24, 48 ou 72 horas). O tratamento com NTSP-1 isoladamente (500 nM) mostrou uma tendência similar à exibida pelo EGF, em relação ao controle não tratado ( $\approx 8,8\%$  e  $\approx 7,1\%$ , respectivamente). Quando NTSP-1 foi testado em combinação com o EGF, os percentuais de áreas cobertas foram os

maiores observados ao longo do experimento ( $\approx 12\%$  e  $\approx 13\%$ , após 48 e 72 horas, respectivamente), em comparação aos observados nos controles, para os mesmos tempos ( $\approx 7,3\%$  e  $\approx 7,5\%$ , respectivamente). O aumento do percentual de cobertura da lesão obtido com o tratamento combinado NTSP-1/EGF apresentou uma tendência de efeito potencializador entre os dois estímulos, particularmente no tempo de 72 horas, uma vez que nenhuma das moléculas foi capaz de acelerar a migração quando testadas isoladamente, durante este tempo de tratamento. No entanto, as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas.

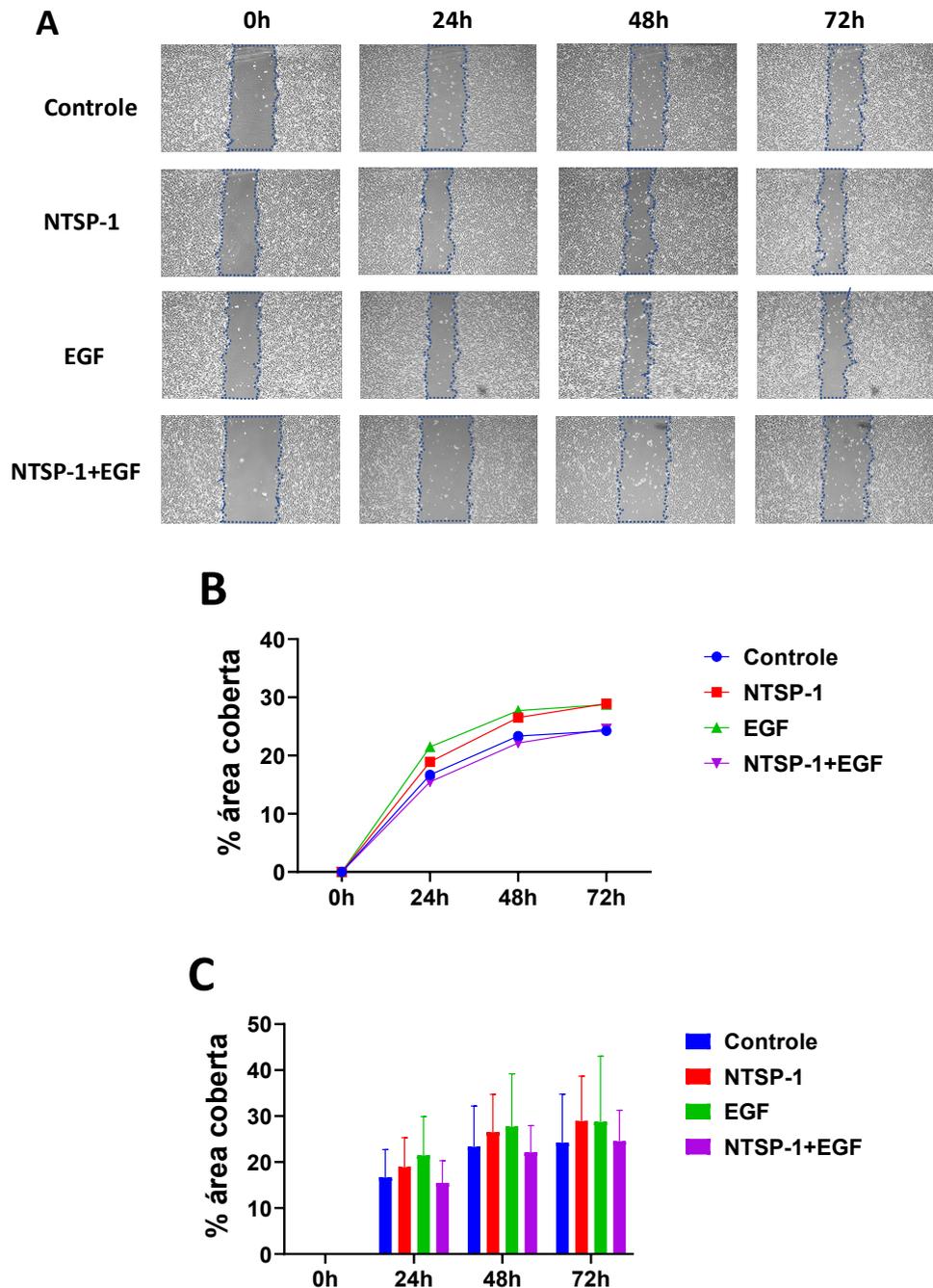
As **Figuras 26 e 27** apresentam os perfis de migração para as linhagens tumorais **MCF-7** e **MDA-MB-231**, respectivamente, nos três tempos analisados, após o tratamento com a citocina isolada ou com o fragmento NTSP-1 nas mesmas condições já descritas. Na linhagem MCF-7, o fragmento isolado pareceu ser capaz de induzir percentuais similares ao EGF de fechamento da monocamada (Fig.26). No entanto, diferenças estatisticamente significativas não foram detectadas, nem entre os tratamentos, nem em relação ao controle não tratado.

Figura 25 - Efeito de NTSP-1 e EGF na migração da linhagem MCF-10A em ensaio de lesão de monocamada (“wound healing” *in vitro*)



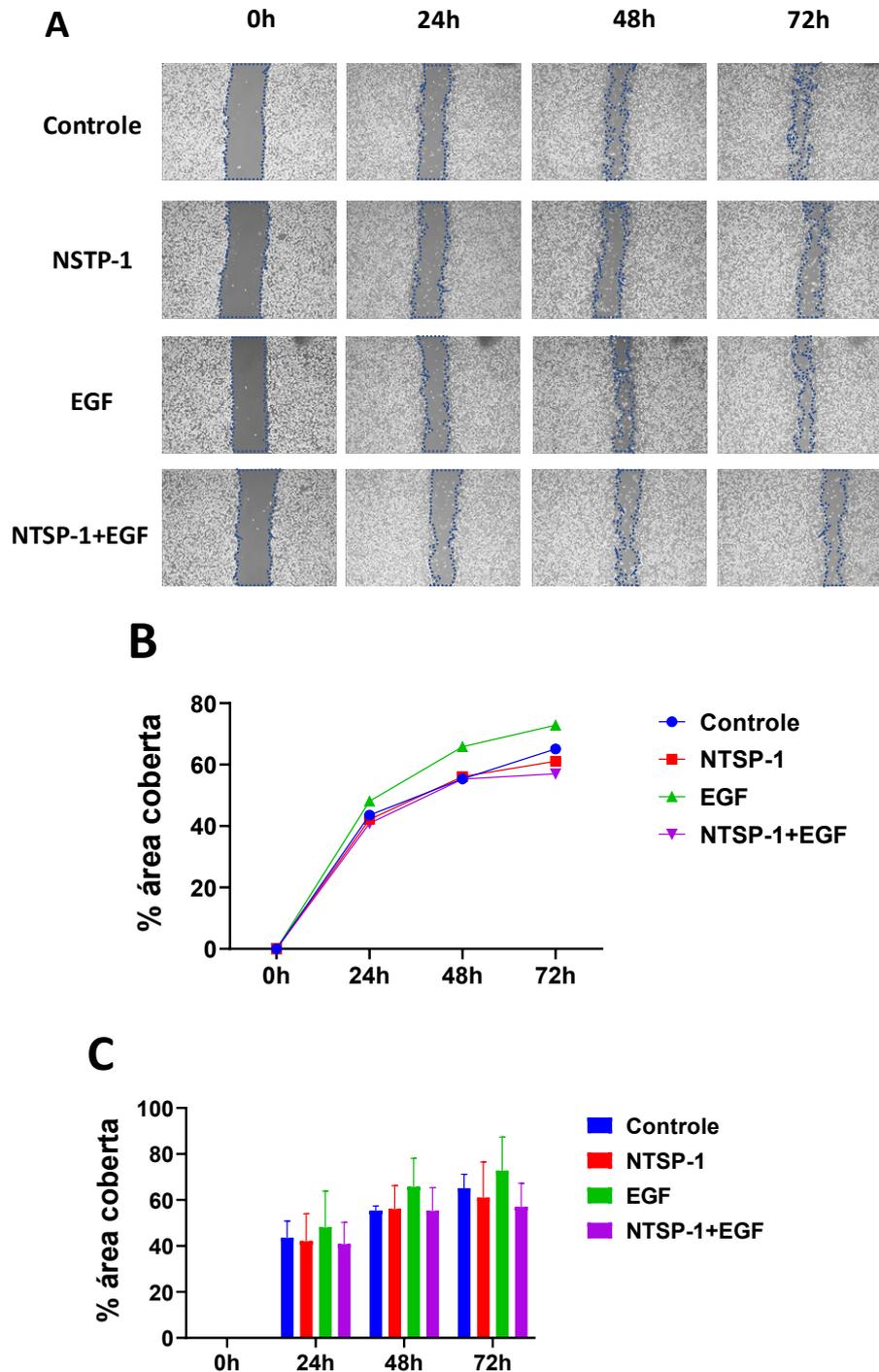
Legenda: Monocamadas confluentes de células da linhagem MCF-10A foram depletadas em fatores de crescimento em meio contendo BSA 0,1% por 18 horas e submetidas ao procedimento de lesão com ponteira plástica e tratamento com mitomicina C (ver Metodologia, item 2.7). Após lavagem com meio, NTSP-1 (500 nM) foi adicionado 35 minutos antes do EGF (50 ng/mL), em meio contendo 2% de SFB. Nos tempos indicados (24, 48 e 72 horas após a lesão), o fechamento da lesão foi registrado através de uma câmera fotográfica acoplada a um microscópio de luz invertido. A área de cada tempo foi calculada com o auxílio do software Image J, sendo a área descoberta no T<sub>0</sub> de cada tratamento considerado como 0% de cobertura da lesão produzida. (A) Fotos representativas de cada tempo (0, 24, 48 e 72 horas) após os tratamentos (NTSP-1, EGF e NTSP-1+EGF). (B) Cinética do fechamento da monocamada (à esquerda) e análises estatísticas (à direita) obtidas através do teste Ordinary Two-way ANOVA com teste de múltiplas comparações Tukey's no programa Graph-Pad Prism (versão 8.0.1) (n=3).

Figura 26 - Efeito de NTSP-1 e EGF na migração da linhagem MCF-7 em ensaio de lesão de monocamada (“wound healing” *in vitro*)



Legenda: Monocamadas confluentes de células da linhagem MCF-7 foram depletadas em fatores de crescimento em meio contendo 0,1% BSA por 18 horas e submetidas ao procedimento de lesão com ponteira plástica e tratamento com mitomicina C (ver Metodologia, item 2.7). Após lavagem com meio, NTSP-1 foi adicionado (500nM) 35 minutos antes do EGF (50ng/mL), em meio contendo 2% de SFB. Nos tempos indicados (24, 48 e 72 horas após a lesão), o fechamento da monocamada foi registrado através de uma câmera fotográfica acoplada a um microscópio de luz invertido. A área de cada tempo foi calculada com o auxílio do software Image J, sendo a área descoberta no T<sub>0</sub> de cada tratamento considerado como 0% de cobertura da lesão produzida. (A) Fotos representativas de cada tempo (0, 24, 48 e 72 horas) após os tratamentos (NTSP-1, EGF e NTSP-1+EGF). (B) Cinética do fechamento da monocamada (à esquerda) e análises estatísticas (à direita) realizadas através do teste Ordinary Two-way ANOVA com teste de múltiplas comparações Tukey's no programa Graph-Pad Prism (versão 8.0.1). (n=3).

Figura 27 - Efeito de NTSP-1 e EGF na migração da linhagem MDA-MB-231 em ensaio de lesão de monocamada (“wound healing” *in vitro*)



Legenda: Monocamadas confluentes de células da linhagem MDA-MB-231 foram depletadas em fatores de crescimento em meio contendo 0,1% BSA por 18 horas e submetidas ao procedimento de lesão com ponteira plástica e tratamento com mitomicina C (ver Metodologia, item 2.7). Após lavagem com meio, NTSP-1 foi adicionado (500nM) 35 minutos antes do EGF (50ng/mL), em meio contendo 2% de SFB. Nos tempos indicados (24, 48 e 72 horas após a lesão), o fechamento da monocamada foi registrado através de uma câmera fotográfica acoplada a um microscópio de luz invertido. A área de cada tempo foi calculada com o auxílio do software Image J, sendo a área descoberta no T<sub>0</sub> de cada tratamento considerado como 0% de cobertura da lesão produzida. (A) Fotos representativas de cada tempo (0, 24, 48 e 72 horas) após os tratamentos (NTSP-1, EGF e NTSP-1+EGF). (B) Cinética do

fechamento da monocamada (à esquerda) e análises estatísticas (à direita) realizadas através do teste Ordinary Two-way ANOVA com teste de múltiplas comparações Tukey's no programa Graph-Pad Prism (versão 8.0.1). (n=3).

A linhagem tumoral MDA-MB-231 é a de comportamento migratório mais acentuado dentre as três linhagens mamárias, exibindo entre  $\approx 57$  e  $\approx 72\%$  de cobertura da área de lesão após 72 horas de ensaio, a depender da condição, mas sem que essas diferenças tenham sido estatisticamente significativas (Fig. 27). Houve tendência de maior migração quando as células foram estimuladas pelo EGF em tratamento isolado, bem como uma tendência de inibição do percentual de cobertura da lesão pelo tratamento combinado NTSP-1/EGF. Porém, novamente aqui não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos.

Considerados conjuntamente, os dados dos ensaios de lesão de monocamada sugerem que o domínio N-terminal da TSP-1 não seja capaz de influenciar significativamente a resposta de células mamárias (tumorais ou não) ao fator de crescimento EGF, em eventos relacionados à migração celular coletiva.

### 2.2.2 Monitoramento em tempo real e *tracking* celular por videomicroscopia

Com objetivo de ampliar o escopo de nossas análises, avaliamos o perfil migratório individual, através do registro das células em tempo real, por videomicroscopia. A análise da trajetória celular foi realizada com auxílio de dois plugins do Image J (*Manual Tracking e Chemotaxis and Migration tool*), os quais também nos permitiram calcular: (a) a *velocidade de deslocamento* (em  $\mu\text{m}/\text{min}$ ), (b) a *distância acumulada* e (c) a *distância euclidiana*, percorridas por cada célula monitorada. A distância acumulada se refere ao caminho efetivamente percorrido pela célula, enquanto a euclidiana corresponde ao comprimento de uma linha reta entre o ponto inicial e final.

Inicialmente, cabem considerações sobre os tipos de trajetória observados em cada condição. Para a linhagem **MCF-10A**, os dados mostrados na **Figura 28A** sugerem que as células monitoradas no controle, no tratamento com NTSP-1 isolado e no tratamento combinado NTSP-1/EGF migrem com padrão predominantemente individual, enquanto o tratamento apenas com o fator de crescimento sugere trajetórias típicas de células que compartilham mais contatos entre si.

Quanto aos parâmetros quantificáveis ao longo do monitoramento (velocidade/distância

acumulada/distância euclidiana), observamos que o tratamento da linhagem MCF10A tanto com o EGF isolado quanto com a combinação NTSP-1/EGF induziram equivalentes aumentos da velocidade de migração (**Figuras 28B**,  $p < 0,01$ ;  $p < 0,0001$ ). Porém, como o fragmento NTSP-1 isolado não foi capaz de modificar este parâmetro, quando comparado ao controle não tratado (**Figura 28B**), estima-se que o resultado observado no tratamento combinado NTSP-1/EGF tenha sido devido unicamente à ação do EGF.

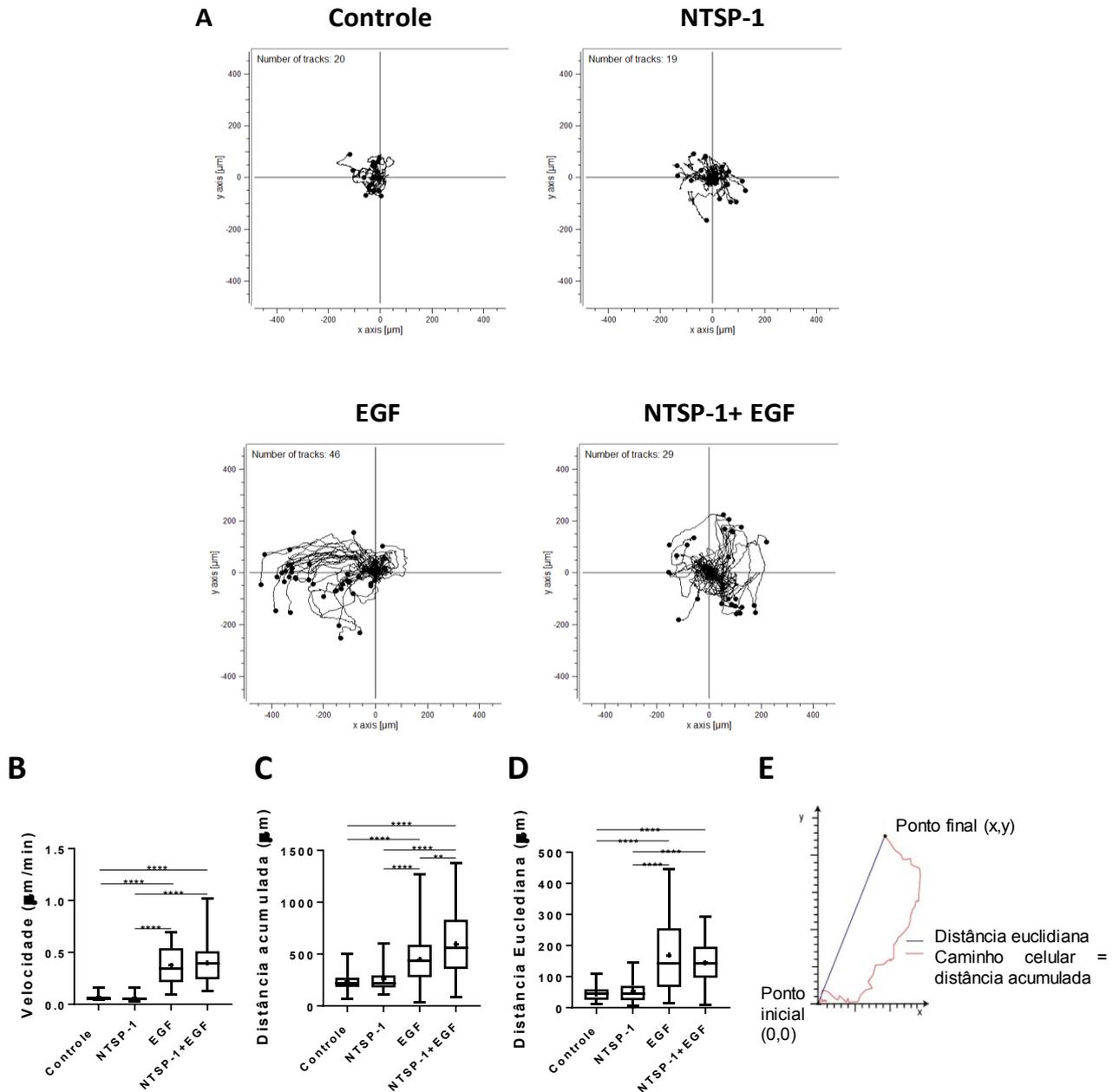
Por outro lado, as maiores distâncias acumuladas foram observadas com o tratamento combinado NTSP-1/EGF, que diferiu estatisticamente das observadas com o tratamento apenas com EGF (**Fig. 28C**,  $p < 0,01$ ). Como o tratamento com NTSP-1 isolado não modificou a distância acumulada, em comparação ao controle não tratado, pode-se deduzir que o tratamento combinado NTSP-1/EGF tenha resultado em um efeito potencializador entre os dois mediadores.

Para a linhagem MCF-7, o fragmento NTSP-1 não pareceu exercer qualquer efeito a migração celular individual (**Figura 29**), ao passo que o tratamento com EGF, tanto isoladamente quanto em combinação com o fragmento (EGF/NTSP-1), aumentou significativamente a velocidade de migração ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ) (**Fig. 29A e B**,  $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$ ; respectivamente). No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas distâncias acumuladas e euclidianas percorridas pelas células, entre quaisquer das condições testadas (**Fig. 29C e D**).

Quando células da linhagem MDA-MB-231 foram analisadas (**Figura 30**), verificamos que NTSP-1 e EGF, quando usados isoladamente não alteraram a velocidade individual, ou a distância euclidiana das células monitoradas (**Fig. 30B e 30D**). No entanto, apenas o tratamento combinado EGF/NTSP-1 foi capaz de induzir aumento estatisticamente significativo nas distâncias acumuladas percorridas pelas células individualmente (**Fig. 30C**,  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ).

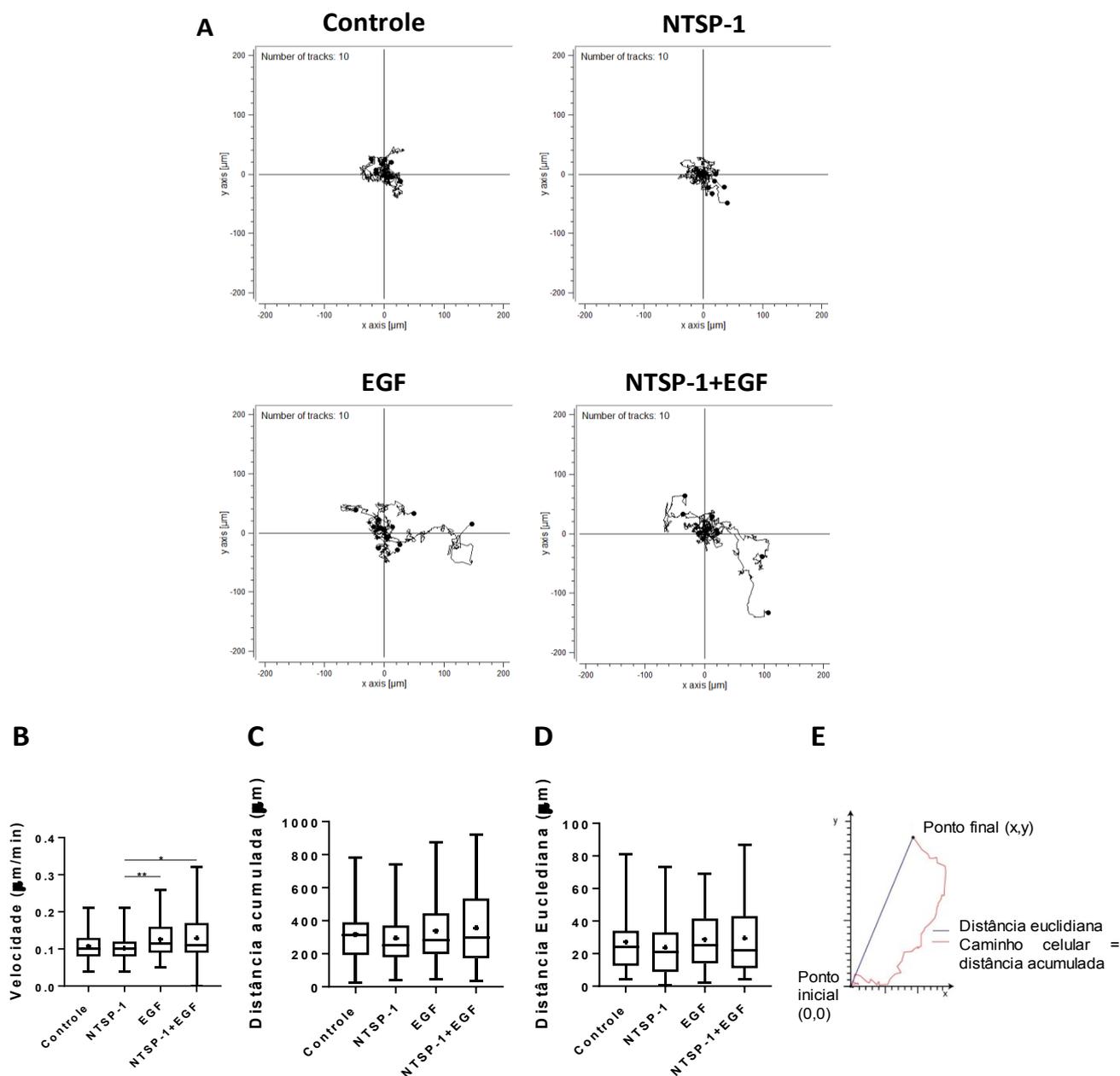
Assim, este conjunto de resultados, nos permite concluir que o domínio NTSP-1 parece exercer algum efeito potencializador da migração individual de células mamárias tratadas com EGF, principalmente quando o parâmetro considerado é a *distância acumulada*, como foi o observado com as linhagens MCF10A e MDA-MB-231. Porém, a presença desse domínio N-terminal da TSP-1 não parece influenciar significativamente a capacidade de migração coletiva das linhagens mamárias aqui investigadas.

Figura 28- Efeito de NTSP-1 e EGF na migração individual de células MCF-10A



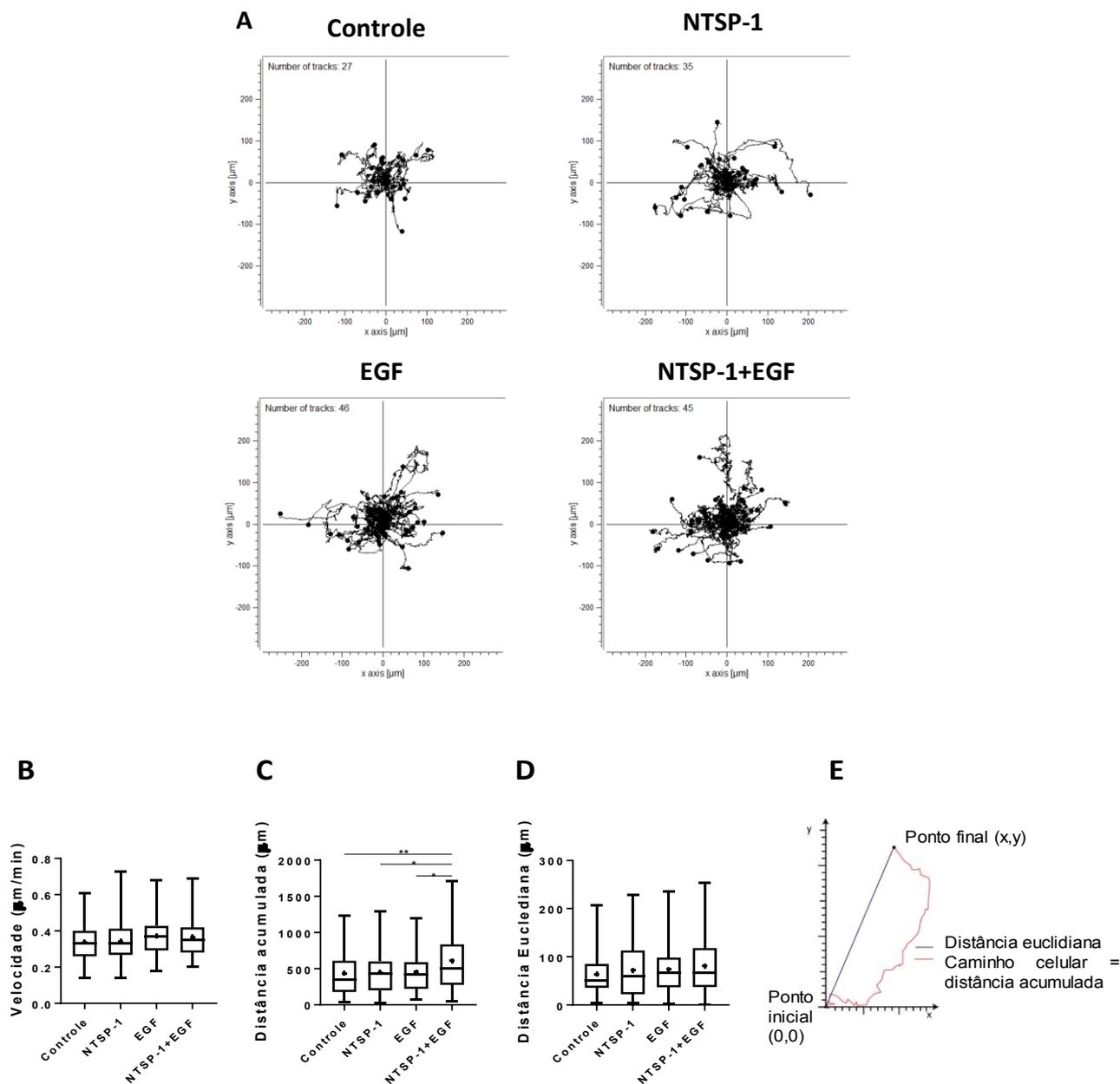
Legenda: As células da linhagem MCF-10A foram plaqueadas na presença de 10% de soro, na densidade de  $1,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em seus respectivos meios de cultura na placa HiQ-4 (Nikon), como descrito na Metodologia (item 2.8). Após 24 horas, foram lavadas e incubadas com 0,1% de BSA por 18 horas. As células foram lavadas com meio sem soro, tratadas com o fragmento NTSP-1 (500 nM) por 35 minutos a 37°C antes da adição do fator EGF (50 ng/mL), em meio contendo 0,5%. O monitoramento foi feito por até 72 horas com o sistema de imagens time-lapse BioStation IM-Q (Nikon), tendo sido os vídeos utilizados para análise do perfil da trajetória celular com auxílio de dois plugins (*manual tracking* e *chemotaxis and migration tool*) do programa Image J (versão 1.51j8). Para cada condição, um número  $\geq 10$  células foram rastreadas. (A) Plots representativos das trajetórias celulares individuais. (B) Médias (+) e medianas (traço) das velocidades de migração ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ). (C) Médias (+) e medianas (traço) das distâncias acumuladas ( $\mu\text{m}$ ). (D) Médias (+) e medianas (traço) das distâncias euclidianas ( $\mu\text{m}$ ). As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste Brown-Forsythe and Welch ANOVA com teste de múltiplas comparações Games-Howell's no programa Graph-Pad Prism (versão 8.0.1). (n=2, \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001). (E) Diferença entre distância acumulada e euclidiana – adaptado de “*Chemotaxis and Migration Tool Version 1.01-Visualization and data analysis of chemotaxis and migration processes based on ImageJ- ibidi.com*”.

Figura 29- Efeito de NTSP-1 e EGF na migração individual de células MCF-7



Legenda: As células da linhagem MCF-7 foram plaqueadas na presença de 10% de soro, na densidade de  $1,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em seus respectivos meios de cultura na placa HiQ-4 (Nikon), como descrito na Metodologia (item 2.8). Após 24 horas, foram lavadas e incubadas com 0,1% de BSA por 18 horas. As células foram lavadas com meio sem soro, tratadas com o fragmento NTSP-1 (500 nM) por 35 minutos a 37°C antes da adição do fator EGF (50 ng/mL), em meio contendo 0,5%. O monitoramento foi feito por até 72 horas com o sistema de imagens time-lapse BioStation IM-Q (Nikon), tendo sido os vídeos utilizados para análise do perfil da trajetória celular com auxílio de dois plugins (*manual tracking* e *chemotaxis and migration tool*) do programa Image J (versão 1.51j8). Para cada condição, um número  $\geq 10$  células foram rastreadas. (A) Plots representativos das trajetórias celulares individuais. (B) Médias (+) e medianas (traço) das velocidades de migração ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ). (C) Médias (+) e medianas (traço) das distâncias acumuladas ( $\mu\text{m}$ ). (D) Médias (+) e medianas (traço) das distâncias euclidianas ( $\mu\text{m}$ ). As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste Brown-Forsythe and Welch ANOVA com teste de múltiplas comparações Games-Howell's no programa Graph-Pad Prism (versão 8.0.1). (n=3, \*p<0,05; \*\*p<0,01). (E) Diferença entre distância acumulada e euclidiana – adaptado de “*Chemotaxis and Migration Tool Version 1.01-Visualization and data analysis of chemotaxis and migration processes based on ImageJ- ibidi.com*”.

Figura 30- Efeito de NTSP-1 e EGF na migração individual de células MDA-MB-231



Legenda: As células da linhagem MDA-MB-231 foram plaqueadas na presença de 10% de soro, na densidade de  $1,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em seus respectivos meios de cultura na placa HiQ-4 (Nikon), como descrito na Metodologia (item 2.8). Após 24 horas, foram lavadas e incubadas com 0,1% de BSA por 18 horas. As células foram lavadas com meio sem soro, tratadas com o fragmento NTSP-1 (500 nM) por 35 minutos a 37°C antes da adição do fator EGF (50ng/mL), em meio contendo 0,5%. O monitoramento foi feito por até 72 horas com o sistema de imagens time-lapse BioStation IM-Q (Nikon), tendo sido os vídeos utilizados para análise do perfil da trajetória celular com auxílio de dois plugins (*manual tracking* e *chemotaxis and migration tool*) do programa Image J (versão 1.51j8). Para cada condição, um número  $\geq 10$  células foram rastreadas. (A) Plots representativos das trajetórias celulares individuais. (B) Médias (+) e medianas (traço) das velocidades de migração ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ). (C) Médias (+) e medianas (traço) das distâncias acumuladas ( $\mu\text{m}$ ). (D) Médias (+) e medianas (traço) das distâncias euclidianas ( $\mu\text{m}$ ). As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste Brown-Forsythe and Welch ANOVA com teste de múltiplas comparações Games-Howell's no programa Graph-Pad Prism (versão 8.0.1). (n=2, \*p<0,05; \*\*p<0,01). (E) Diferença entre distância acumulada e euclidiana – adaptado de “*Chemotaxis and Migration Tool Version 1.01-Visualization and data analysis of chemotaxis and migration processes based on ImageJ- ibidi.com*”.

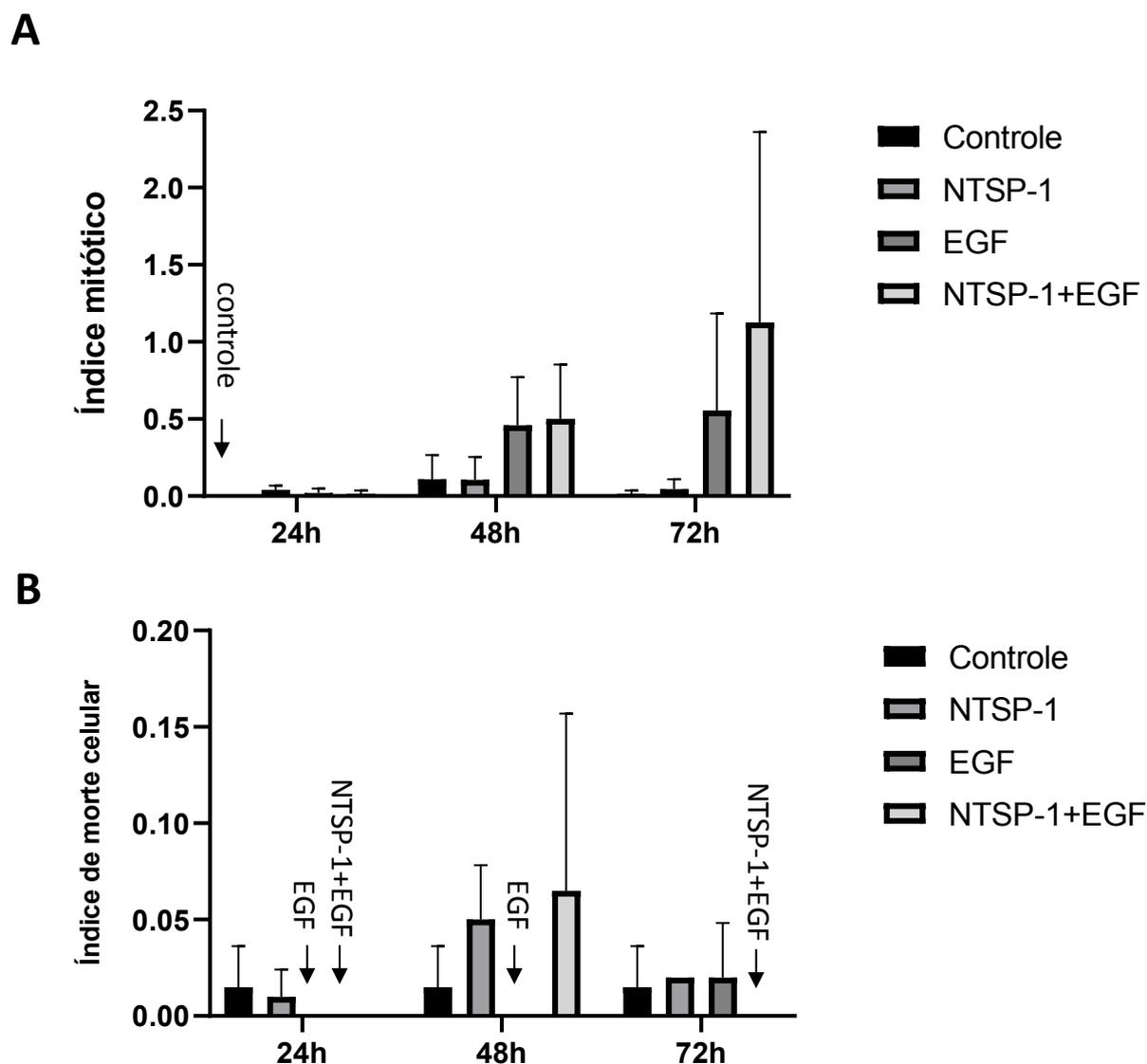
### 2.3 Papel do tratamento com o fragmento NTSP-1 e EGF na proliferação e morte celular das linhagens mamárias

Considerando o conhecido papel do EGF de estímulo à proliferação de células epiteliais, já bastante caracterizado na literatura (Wee e Wang, 2017), e o da TSP-1 como mediadora de características invasivas em células de adenocarcinoma mamário (Incardona et al, 1995, Chandrasekaran et al, 1999; John *et al*, 2010), utilizamos os ensaios de monitoramento em tempo real (*time-lapse recording*) para também investigarmos uma possível ação do domínio N-terminal com o estímulo proliferativo, principalmente analisando se o mesmo apresentaria capacidade de potencializar a resposta proliferativa estimulada pelo EGF, em células epiteliais mamárias. De maneira complementar, também avaliamos os eventos de morte celular ocorridos ao longo dos mesmos registros. A proliferação celular foi avaliada através da contagem do número ponderado de divisões celulares (índice mitótico), que foram eventualmente validados pela contagem de núcleos/campo em microscópio de fluorescência. A morte celular também foi analisada com base nas filmagens, através da quantificação de eventos de borbulhamento e desintegração celular, sugestivos de morte por apoptose por desaderência (*anoikis*).

Na linhagem hiperplásica **MCF-10A**, apesar do tratamento com EGF e o tratamento combinado NTSP-1/EGF demonstrarem tendência a estimular a proliferação celular nos tempos de 48 e 72 horas, quando comparados a resposta obtida com no controle não tratado, ou com o NTSP-1 em tratamento isolado, as diferenças observadas não foram estatisticamente relevantes (**Figura 31A**). De forma similar, as diferenças observadas quanto ao índice de morte celular não foram significativas em nenhum dos tempos avaliados (**Figura 31B**).

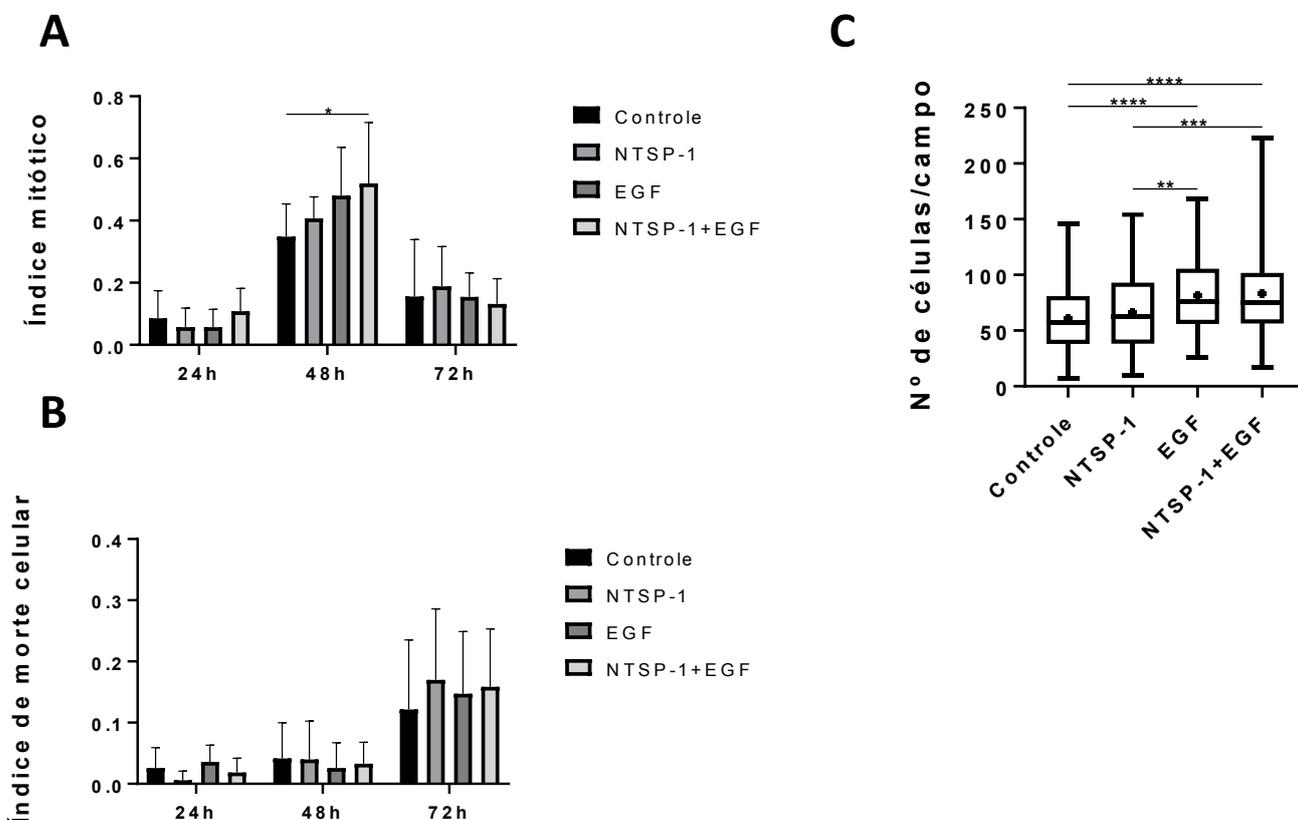
No caso da linhagem tumoral **MCF-7**, a análise desses eventos demonstrou que o tratamento combinado NTSP-1/EGF no tempo de 48 horas foi o único que resultou em um estímulo proliferativo estatisticamente significativo, quando comparado ao controle não tratado (**Figura 32A**;  $p < 0,05$ ). Nos demais tempos (24 e 72 horas), não foram observadas diferenças significativas. Também as diferenças observadas quanto ao índice de morte celular não foram significativas, em nenhum dos tempos avaliados (**Figura 32B**).

Figura 31- Análise de proliferação e morte celular na linhagem MCF-10A tratada com EGF e NTSP-1



Legenda: As células da linhagem MCF-10A foram semeadas na presença em meio contendo 10% de SFB, na densidade de  $1,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em seus respectivos meios de cultura, na placa de cultura especializada HiQ-4 (Nikon), como descrito na Metodologia (item 2.11). Após procedimento de depleção em fatores de crescimento por 18 horas, conforme descrito na Metodologia, as células foram pré-incubadas com o domínio NTSP-1 (500 nM) antes de serem desafiadas com o fator EGF (50 ng/mL), em meio contendo 0,5% SFB por até 72 horas. Durante esse período, o monitoramento das células foi realizado através do sistema de imagens BioStation IM-Q (Nikon) em intervalos de tempo entre 2 a 4 minutos. Os vídeos obtidos foram utilizados para contabilização do número de divisões e eventos de morte celular nos tempos de 24, 48 e 72 horas dos tratamentos, conforme protocolo descrito na Metodologia. (A) Média dos índices mitóticos. (B) Média dos índices de morte celular. As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste Ordinary Two-way ANOVA com teste de múltiplas comparações Tukey's no programa Graph-Pad Prism (versão 8.0.1). (n=2).

Figura 32 - Análise de proliferação e morte celular na linhagem MCF-7 tratada com EGF e NTSP-1



Legenda: As células da linhagem MCF-7 foram semeadas na presença em meio contendo 10% de SFB, na densidade de  $1,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em seus respectivos meios de cultura, na placa de cultura especializada HiQ-4 (Nikon), como descrito na Metodologia (item 2.11). Após procedimento de depleção em fatores de crescimento por 18 horas, conforme descrito na Metodologia, as células foram pré-incubadas com o domínio NTSP-1 (500 nM) antes de serem desafiadas com o fator EGF (50 ng/mL), em meio contendo 0,5% SFB por até 72 horas. Durante esse período, o monitoramento das células foi realizado através do sistema de imagens BioStation IM-Q (Nikon) em intervalos de tempo entre 2 a 4 minutos. Os vídeos obtidos foram utilizados para contabilização do número de divisões e eventos de morte celular nos tempos de 24, 48 e 72 horas dos tratamentos, conforme protocolo descrito na Metodologia. **(A)** Média dos índices mitóticos (\* $p < 0,05$ ). **(B)** Média dos índices de morte celular. As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste Ordinary Two-way ANOVA com teste de múltiplas comparações Tukey's no programa Graph-Pad Prism (versão 8.0.1). ( $n=3$ ). **(C)** Após 72 horas de tratamento, as células foram fixadas com formaldeído 3,7% e marcadas com DAPI. Em seguida, a contagem de 25 campos aleatórios foi realizada em microscópio de fluorescência (magnificação: 20 $\times$ ), e a média (+) do número de células/campo foi estabelecida. As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste Ordinary one-way ANOVA com teste de múltiplas comparações Tukey's no programa Graph-Pad Prism (Média de 3 experimentos independentes, \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Embora a quantificação ponderada das divisões celulares verificadas nos registros *time-lapse* não tenha demonstrado diferenças expressivas entre as condições no tempo de 72 horas, a avaliação da proliferação celular por outra abordagem (contagem de núcleos/campo) após 72 horas de tratamento contínuo identificou um aumento do número de células/campo, tanto nas condições que receberam o EGF isolado quanto no tratamento conjunto EGF/NTSP1, os quais diferiram estatisticamente do controle não tratado e do fragmento isolado (**Figura 32C**;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,0001$ ). No entanto, não foi observada diferença significativa entre as condições EGF e NTSP-1/EGF, demonstrando que o fragmento N-terminal da TSP-1 não parece capaz de potencializar o efeito do EGF na proliferação da linhagem MCF-7.

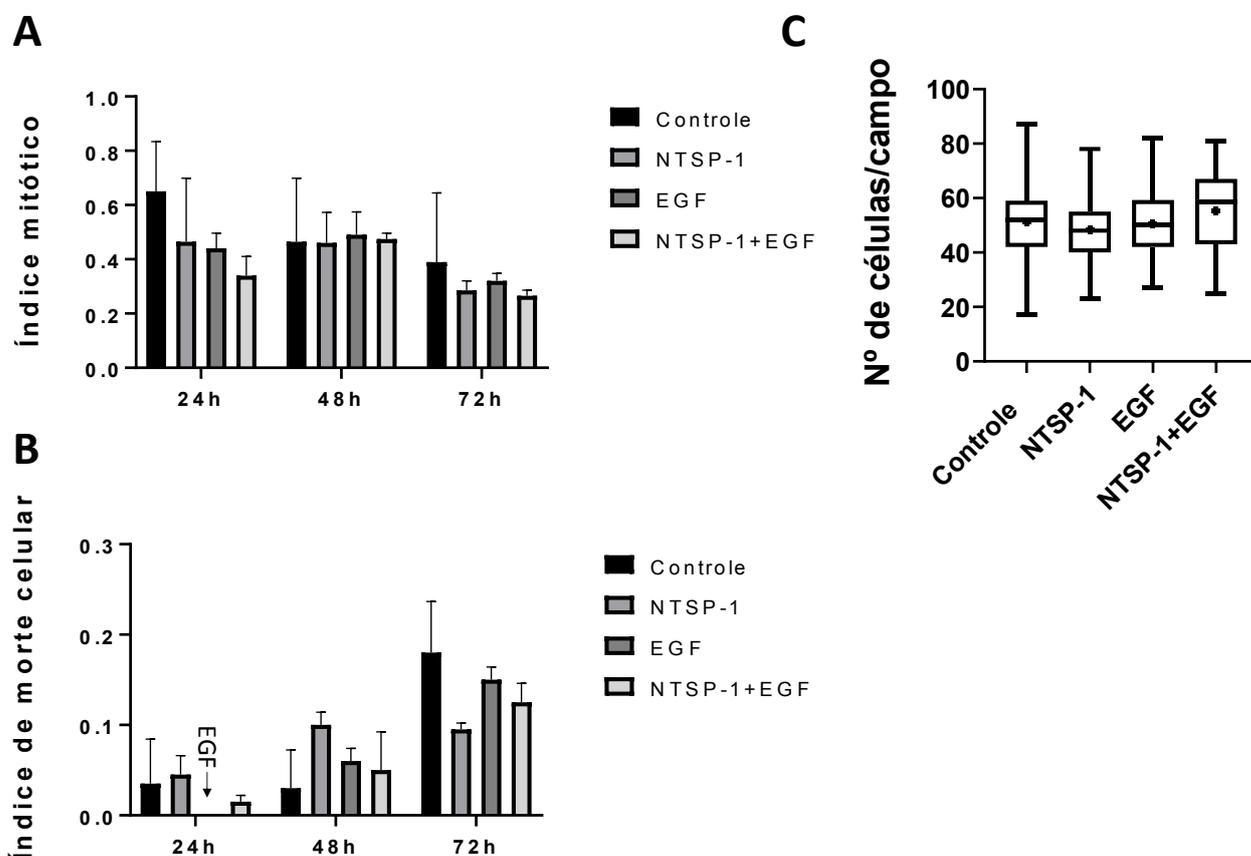
Para a linhagem tumoral de maior agressividade MDA-MB-231, a análise dos registros *time-lapse* demonstrou que todas as condições tratadas apresentaram tendência à redução da proliferação celular ao longo do tempo, quando comparados com a resposta observada no controle não tratado. No entanto, as diferenças não foram estatisticamente significativas em nenhum dos tempos avaliados (Figura 33A). Da mesma forma, as diferenças observadas quanto ao índice de morte celular também não foram significativas em nenhum dos tempos (Figura 33B). A contagem de núcleos/campo após 72 horas dos tratamentos confirmou que não existiram alterações relevantes da proliferação das células desta linhagem, entre as diferentes condições (Figura 33C).

Portanto, nossas observações sugerem que a presença do NTSP-1, isoladamente ou em combinação com o fator de crescimento EGF, não teria o potencial de alterar significativamente a homeostase entre proliferação e morte celular, no caso dessas linhagens epiteliais mamárias.

#### **2.4 Papel do EGF e NTSP-1 na regulação da morfologia tridimensional de linhagens mamárias**

Os dados apresentados até este ponto sugerem que a presença de NTSP-1 em concomitância com o tratamento de células epiteliais mamárias (benignas ou tumorais) com o fator de crescimento EGF não parece afetar a viabilidade e proliferação celulares, mas pode afetar significativamente alguns aspectos da capacidade migratória (Figs. 28 a 30).

Figura 33 - Análise de proliferação e morte celular na linhagem MDA-MB-231 tratada com EGF e NTSP-1



Legenda: As células da linhagem MDA-MB-231 foram semeadas na presença em meio contendo 10% de SFB, na densidade de  $1,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em seus respectivos meios de cultura, na placa de cultura especializada HiQ-4 (Nikon), como descrito na Metodologia (item 2.11). Após procedimento de depleção em fatores de crescimento por 18 horas, conforme descrito na Metodologia, as células foram pré-incubadas com o domínio NTSP-1 (500 nM) antes de serem desafiadas com o fator EGF (50 ng/mL), em meio contendo 0,5% SFB por até 72 horas. Durante esse período, o monitoramento das células foi realizado através do sistema de imagens BioStation IM-Q (Nikon) em intervalos de tempo entre 2 a 4 minutos. Os vídeos obtidos foram utilizados para contabilização do número de divisões e eventos de morte celular nos tempos de 24, 48 e 72 horas dos tratamentos, conforme protocolo descrito na Metodologia. (A) Média dos índices mitóticos. (B) Média dos índices de morte celular. As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste Ordinary Two-way ANOVA com teste de múltiplas comparações Tukey's no programa Graph-Pad Prism (versão 8.0.1). (n=3). (C) Após 72 horas de tratamento, as células foram fixadas com formaldeído 3,7% e marcadas com DAPI. Em seguida, a contagem de 25 campos aleatórios foi realizada em microscópio de fluorescência (magnificação: 20×), e a média (+) do número de células/campo foi estabelecida. As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste Ordinary one-way ANOVA com teste de múltiplas comparações Tukey's no programa Graph-Pad Prism (Média de 3 experimentos independentes, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001).

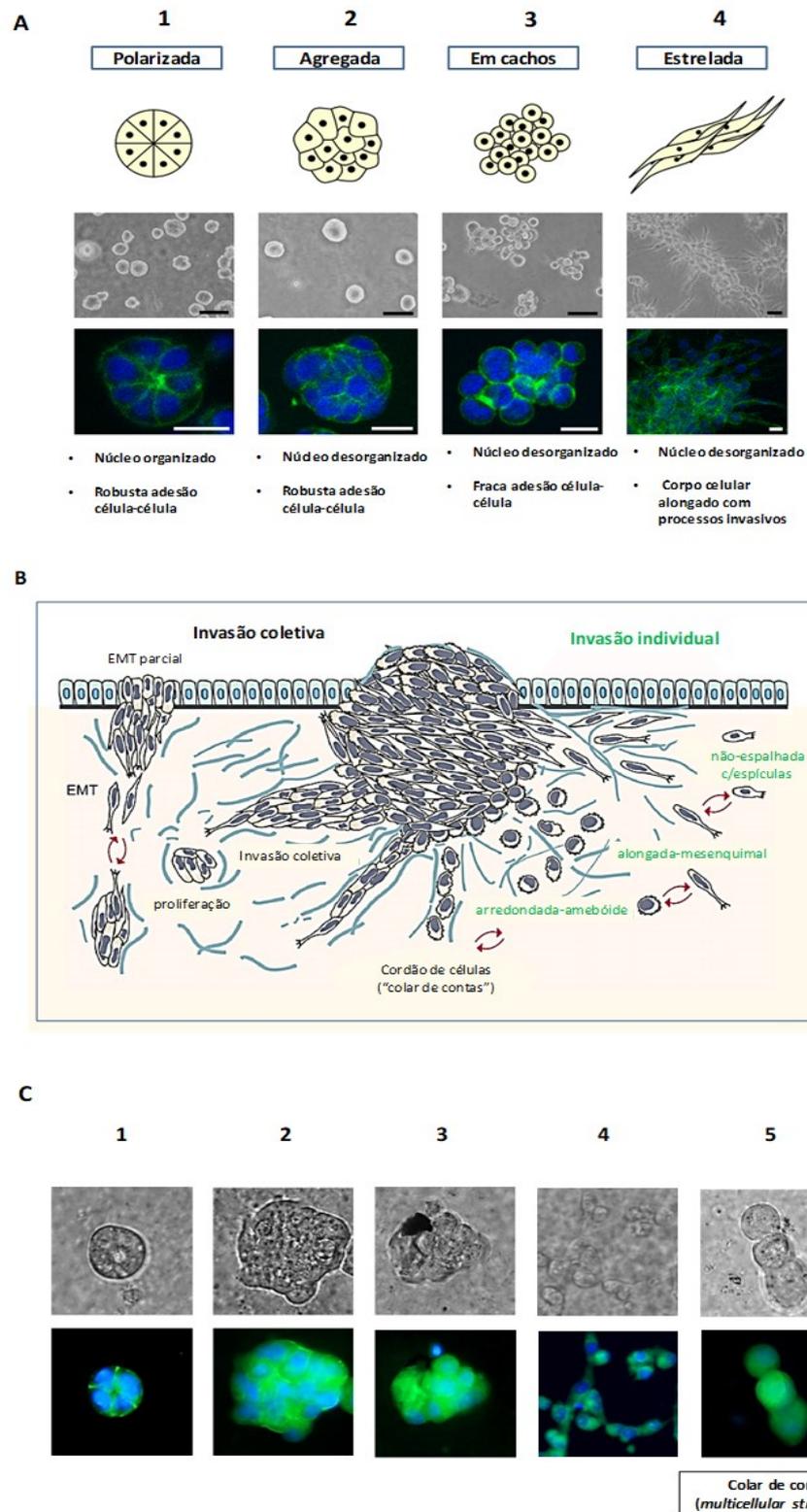
Considerando que a migração celular pode influenciar na capacidade de células epiteliais se organizarem em estruturas polarizadas, um aspecto cada vez mais valorizado nas investigações de tumores sólidos (ver Introdução, item 1.5.1), decidimos estudar os efeitos desses tratamentos através do uso de modelos de cultura tridimensionais (3D). A **Figura 34A**

revisita os perfis morfológicos tridimensionais propostos pelo grupo da pesquisadora Mina Bissell (Kenny et al, 2007). Pelos critérios deste modelo, por exemplo, a linhagem MCF-7 corresponde ao fenótipo dito “agregado” (ou *mass*), com fortes adesões célula-célula e com núcleo desorganizado, enquanto a linhagem MDA-MB-231 ao fenótipo “estrelado” (ou *stellate*), que apresenta corpo celular alongado com extensões e núcleo desorganizado. Embora este grupo não tenha utilizado a linhagem MCF-10A, outros modelos de linhagens não tumorigênicas foram avaliadas, como a MCF-12A e a S1, as quais foram classificadas como integrantes do grupo “polarizado” (*round*) com fortes adesões célula-célula, núcleo organizado e polarização apical-basal, perfil também já descrito para a linhagem MCF-10A (Debnath et al, 2003; Shaw et al, 2004; de Bessa Garcia et al, 2010).

Além das morfologias propostas por Kenny e colaboradores (2007), incluímos mais dois critérios em nossa análise quantitativa (**Fig. 34B**): (i) “colar de contas” (ou *multicellular streaming*, proposta por Friedl e Wolf, 2010); e (ii) “células dispersas”, que correspondem às células não engajadas em qualquer tipo de morfologia 3D, sendo este último critério apoiado nas mencionadas mudanças no padrão de migração individual, observadas em algumas de nossas condições experimentais (Figs. 35-36, apresentadas mais adiante).

De posse dos critérios assim adaptados, passamos à análise quantitativa da ocorrência dessas morfologias em organoides obtidos para as linhagens MCF-10A e MCF-7 em ambiente tridimensional, após os diversos tratamentos com EGF e NTSP-1 (isolados ou em combinação). Ressaltamos que a linhagem MDA-MB-231 não foi incluída nesta etapa do estudo, em virtude de a mesma não ser capaz de formar qualquer tipo de estrutura organizada no gel tridimensional, se apresentando permanentemente com o fenótipo “estrelado”, do tipo mesenquimatoso (resultados não mostrados), independentemente dos tratamentos realizados (representada na **Fig 34C**, *inserto 4*).

Figura 34 – Morfologias e critérios para classificação de esferoides mamários em cultura tridimensional (3D)



Legenda: (A) Classificação das morfologias de organoides epiteliais proposta pelo grupo de M. Bissell: Células mamárias foram incubadas em Matrigel®, conforme descrito na Metodologia (item 2.10) e observadas tanto em contraste de fase quanto em fluorescência (verde para F-actina e DAPI/azul para o núcleo). Em (A) estão as linhagens S1 (polarizada - 1); BT-474 (agregada - 2); SK-BR-3 (em cachos - 3); e

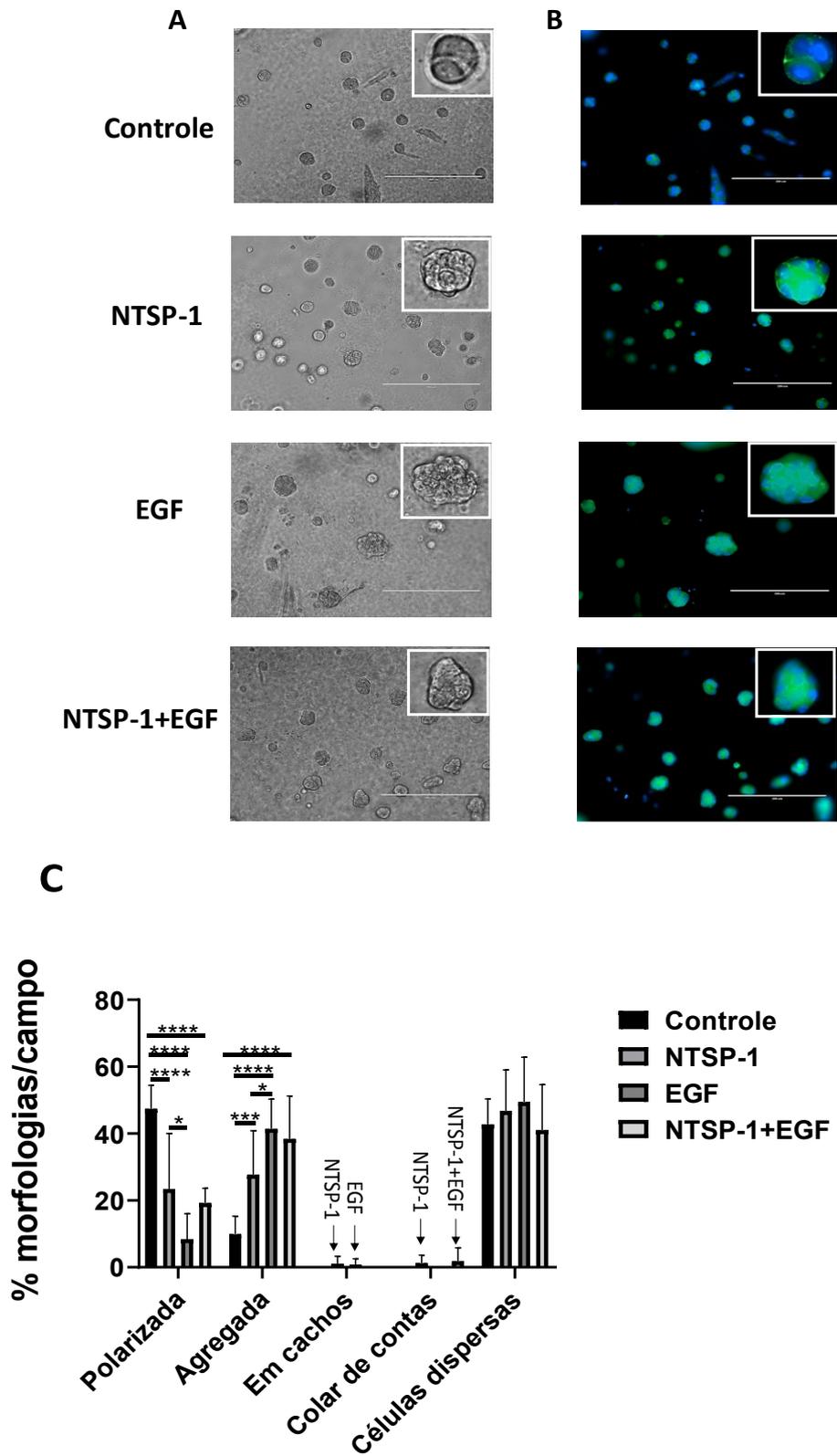
MDA-MB-231 (estrelada - 4); (adaptado de Kenny et al 2007) **(B)** Plasticidade de morfologias de grupos de células tumorais durante a progressão tumoral, segundo o grupo de Friedl: uma multiplicidade de fenótipos celulares co-existem no microambiente tumoral, a depender das formas de interação entre as células, de sua capacidade migratória e do grau de polarização epitelial (adaptado de Pandya et al, 2017); **(C)** Tendo como base o protocolo e critérios expostos em (A) e (B), apresentamos imagens típicas extraídas de nossos próprios experimentos (aumento de 20×), representativas das morfologias [1] MCF-10A; [2] MCF-7; [3] MCF-7 tratada com EGF; [4] MDA-MB-231 não tratada; e a morfologia “colar de contas” [5], observada na linhagem MCF-7 tratada com EGF/NTSP1.

De maneira concordante com a literatura, quando submetidas a este ensaio, a maioria das células da linhagem **MCF-10A** ( $47\% \pm 7$ ), se apresenta no fenótipo polarizado, enquanto os três tratamentos - NTSP-1 [500nM], EGF [50 ng/mL] ou NTSP-1/EGF, nas mesmas concentrações - foram capazes de diminuir significativamente o percentual de organoides polarizados, de forma estatisticamente significativa, quando comparados ao controle não tratado (**Figura 35**). Dentre os tratamentos, a maior redução foi identificada após tratamento com EGF isolado ( $8\% \pm 3$ ), o qual também diferiu do fragmento NTSP-1 isolado, de maneira significativa ( $23\% \pm 12$ ). Porém, não verificamos qualquer efeito aditivo ou potencializador entre os dois mediadores.

Por outro lado, a diminuição da quantidade de organoides de células MCF-10A com fenótipo polarizado foi acompanhada do correspondente aumento de morfologias com fenótipo “agregado”, com os três tratamentos utilizados, de maneira estatisticamente significativa (Fig. 35C), de  $\cong 10\%$  no controle não-tratado, para  $\cong 28\%$  (NTSP-1;  $p < 0,001$ ),  $\cong 41\%$  (EGF;  $p < 0,0001$ ) e  $\cong 38\%$  (EGF/NTSP-1;  $p < 0,0001$ ). Como observado para a diminuição da expressão do fenótipo polarizado, o maior aumento de ocorrência do fenótipo agregado também foi identificado quando a linhagem MCF-10A foi tratada com EGF isoladamente.

Esses resultados sugerem que a presença de EGF e NTSP-1 no microambiente de células hiperplásicas (como a linhagem MCF-10A) possam induzir um deslocamento do perfil morfológico polarizado para morfologias mais características de massas epiteliais desorganizadas, semelhantes às tumorais. Em relação aos fenótipos “em cachos” e “colar de contas”, não foram observadas alterações de significância estatística para a linhagem MCF-10A, nas diferentes condições experimentais, embora a primeira morfologia só tenha sido identificada - ainda que em baixos percentuais - nas condições tratadas com NTSP-1 ou EGF isoladamente, e a segunda morfologia apenas na presença do NTSP-1 (isolado ou em combinação ao EGF).

Figura 35 – Análise morfológica da linhagem MCF-10A tratadas com EGF e NTSP-1, em ambiente 3D



Legenda: Células da linhagem MCF-10A foram cultivadas em sistema tridimensional, conforme descrito da Metodologia (item 2.10), nas condições investigadas (tratamentos com EGF 50 ng/mL ou NTSP-1

500 nM isoladamente, ou com a combinação NTSP-1/EGF, nas mesmas concentrações), com renovação dos meios após 2 dias. Após 4 dias, as culturas 3D foram fixadas e marcadas duplamente com DAPI (núcleos, em azul) e F-actina (faloidina acoplada à Alexafluor 488, em verde). Os fenótipos morfológicos descritos na Fig.33 foram avaliados e quantificados para cada condição, por microscopia de contraste de fase **(A)** e de fluorescência **(B)** em microscópio invertido (aumento de 20×, barra de calibração: 200µm), sendo os resultados expressos em percentuais, em relação à quantidade total de estruturas morfológicas encontradas em 5-10 campos/condição; **(C)** Média dos percentuais morfológicos identificados. As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste Ordinary two-way ANOVA com teste de múltiplas comparações Tukey's no programa Graph-Pad Prism (\*p<0,05; \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001).

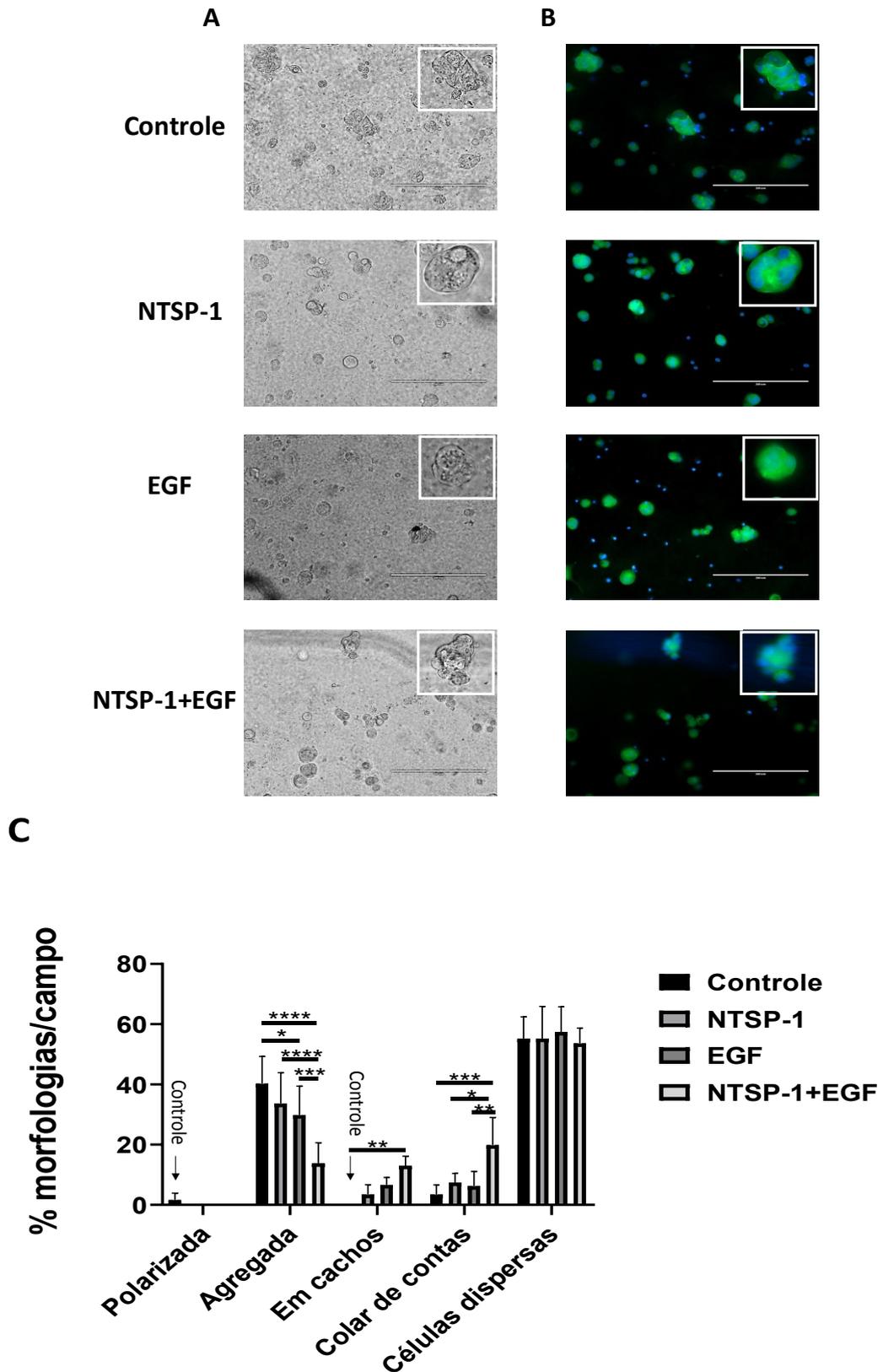
O número de células da linhagem MCF-10A não engajadas em estruturas tridimensionais (representado pela categoria “células dispersas”) não foi afetado por quaisquer dos tratamentos, quando comparado ao número observado no controle não tratado.

A linhagem tumoral **MCF-7 (Figura 36)** apresentou uma quantidade bastante reduzida de organoides polarizados na condição controle, ao lado da esperada prevalência (40% ± 9) das estruturas com fenótipo “agregado” (ou *mass*), em concordância com a literatura (Kenny et al, 2007). O tratamento com EGF isoladamente diminuiu significativamente (aprox. -25%; p<0,05) a quantidade de organoides MCF-7 com fenótipo agregado, em comparação ao controle não tratado (mas não em comparação ao tratamento com NTSP-1, com aproximadamente -15%). De forma interessante, o tratamento combinado NTSP-1/EGF causou a maior diminuição do número de estruturas com fenótipo agregado neste ensaio (aprox. -65%; p<0,0001), o que foi bastante sugestivo de um efeito *potencializador* entre os dois mediadores, uma vez que o tratamento com NTSP-1 isoladamente não havia alterado significativamente o número observado no controle não tratado.

Tanto a conformação de organoides “em cachos” quanto aquela em “colar de contas” são morfologias de transição rumo a fenótipos menos diferenciados e/ou mais migratórios (ou tendentes a maior quimiotactismo), segundo Kenny e colaboradores, (2007).

Neste contexto, o tratamento combinado NTSP-1/EGF foi o único a induzir um aumento significativo do número de células MCF-7 em organoides com fenótipo de cachos, em comparação ao controle não tratado, além de induzir o maior número de células organizadas como “colar de contas”, em comparação aos observados após tratamentos com os dois mediadores isoladamente (os quais não diferiram individualmente do controle não tratado) **(Fig. 36C)**.

Figura 36 – Análise morfológica da linhagem MCF-7 tratadas com EGF e NTSP-1, em ambiente 3D



Legenda: Células da linhagem MCF-7 foram cultivadas em sistema tridimensional, conforme descrito da Metodologia (item 2.11), nas condições investigadas (tratamentos com EGF 50 ng/mL ou NTSP-1

500 nM isoladamente, ou com a combinação NTSP-1/EGF, nas mesmas concentrações), com renovação dos meios após 2 dias. Após 4 dias, as culturas 3D foram fixadas e marcadas duplamente com DAPI (núcleos, em azul) e F-actina (faloidina acoplada à Alexafluor 488, em verde). Os fenótipos morfológicos descritos na Fig.33 foram avaliados e quantificados para cada condição, por microscopia de contraste de fase **(A)** e de fluorescência **(B)** em microscópio invertido (aumento de 20×, barra de calibração: 200µm), sendo os resultados expressos em percentuais, em relação à quantidade total de estruturas morfológicas encontradas em 5-10 campos/condição; **(C)** Média dos percentuais morfológicos identificados. As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste Ordinary two-way ANOVA com teste de múltiplas comparações Tukey's no programa Graph-Pad Prism (\*p<0,05; \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001).

Assim, os achados podem ser considerados sugestivos de uma *ação sinérgica* entre os dois mediadores, tendo como resultado um aumento da prevalência de fenótipos morfológicos potencialmente mais migratórios, ou menos diferenciados.

Por fim, da mesma forma como foi observado para a linhagem não tumoral MCF-10A, não foram verificadas diferenças quantitativas dentre percentuais de células MCF-7 não-engajadas em qualquer tipo de estrutura 3D (“células esparsas”), entre as quatro condições estudadas.

## 2.5 Papel do domínio N-terminal da TSP-1 na sinalização mediada por EGFR

O conjunto de resultados apresentados até este ponto (**Tabela 4**) mostrou evidências de que a incubação de células epiteliais mamárias (normais ou malignas) com o domínio N-terminal da TSP-1 (NTSP-1), antes de serem desafiadas pelo fator de crescimento EGF, parece gerar uma sinergia entre estes dois mediadores, em algumas situações, quando funções celulares como quimiotaxia e diferenciação celulares em ambiente tridimensional são avaliadas quantitativamente.

Conforme descrito na Introdução (item 1.6), as respostas ao EGF são mediadas principalmente pelo receptor tirosina-quinase EGFR/ErbB1. Uma das maneiras de se medir a sustentabilidade de eventos potencializadores em vias de sinalização celular é determinar o grau de ativação de vias *downstream* ao receptor primário da resposta (McKay e Morrison, 2007). A via de Ras/Raf→MEK→ERK1/2 é uma das principais vias envolvidas na cascata de sinalização disparada pelos receptores da família ErbB. Desta maneira, além de quantificar a expressão de EGFR e seu estado de ativação através da fosforilação do resíduo de tirosina Y<sup>1068</sup>, quantificamos também a expressão de ERK1/2 e seu grau de fosforilação nos sítios T<sup>202</sup>/Y<sup>204</sup>.

Tabela 4 – Resumo dos resultados obtidos nos ensaios funcionais

Ensaio Funcionais	Migração		Proliferação		Morte celular	Cultura 3D
Abordagens	Lesão em monocamada (migração coletiva)	Tracking (migração individual)	Índice mitótico (Ponderado entre 3 intervalos: 24, 48 e 72h)	Contagem de núcleos/campo (Tempo único: 72h)	Índice de morte (sugestivo de apoptose por anoikis)	Análise morfológica dos esferoides
<b>MCF-10A</b>	NS	VM( $\mu\text{m}/\text{min}$ )– (EGF e NTSP-1/EGF) DA ( $\mu\text{m}$ )* – (EGF e NTSP-1/EGF) DE( $\mu\text{m}$ ) – ((EGF e NTSP-1/EGF)	NS	-	NS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <span style="color: blue;">↓</span> fenótipo polarizado</li> <li>• <span style="color: red;">↑</span> fenótipo agregado (NTSP-1, EGF e NTSP-1/EGF)</li> </ul>
<b>MCF-7</b>	NS	VM – (EGF e NTSP-1/EGF)	NTSP-1/EGF-48h	EGF e NTSP-1/EGF	NS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <span style="color: blue;">↓</span> fenótipo agregado* (EGF e NTSP-1/EGF)</li> <li>• <span style="color: red;">↑</span> fenótipos em cachos e colar de contas* (NTSP-1/EGF)</li> </ul>
<b>MDA-MB-231</b>	NS	DA* – (NTSP-1/EGF)	NS	NS	NS	-

Legenda: NS- não significativo; VM: velocidade de migração ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ); DA: distância acumulada ( $\mu\text{m}$ ); DE: distância euclidiana ( $\mu\text{m}$ ); \*parâmetro que apresentou diferença estatística entre o EGF isolado e o tratamento combinado (NTSP-1/EGF).

As respostas das diferentes linhagens mamárias aos tratamentos com NTSP-1 e EGF (isoladamente ou combinados) foram analisadas pela técnica de *western blotting*.

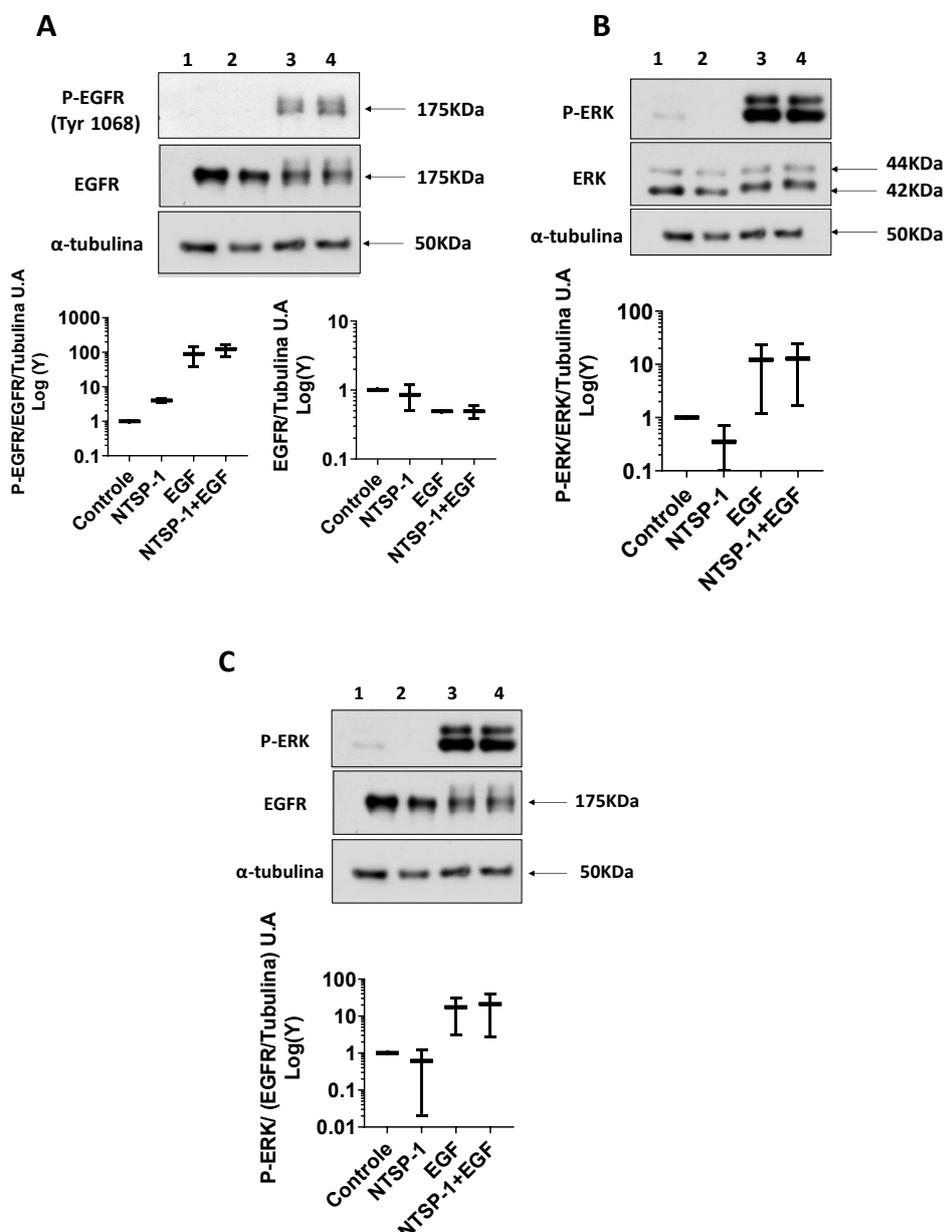
Na linhagem **MCF-10A**, tal como esperado, observamos que a potente ativação de EGFR e ERK1/2 apenas ocorreu quando as células foram desafiadas pelo EGF (50 ng/mL), sozinho ou em combinação ao NTSP-1 (**Figura 37A e 37B**). Nestas condições, também foi detectada uma diminuição dos níveis totais de EGFR, observação que está em concordância com uma maior endocitose - e consequente degradação - do receptor ativado, já descritas na literatura (Introdução, item 1.7). Quando o nível de atividade do receptor foi ponderado pelos indicadores de “loading” das proteínas totais de cada amostra, não foi possível detectar diferenças significativas entre os graus de ativação de EGFR pelo EGF, na ausência ou presença do pré-tratamento com NTSP-1, na linhagem MCF-10A. Como esperado, fragmento NTSP-1 não levou à ativação de ERK (Fig. 37B).

A fim de correlacionar o grau de fosforilação de ERK1/2 com a quantidade total de

EGFR remanescente após o estímulo, determinamos o coeficiente  $P\text{-ERK}/(EGFR/tubulina)$  para cada condição experimental. Esta análise, que pode indicar eventos potencializadores da sinalização *downstream* ao receptor primário, não revelou diferenças significativas entre o tratamento com o EGF e o tratamento conjunto NTSP-1/EGF (**Fig. 37C**). Concluimos que, na linhagem hiperplásica benigna MCF-10A, NTSP-1 e EGF não parecem atuar de forma sinérgica durante a ativação do EGFR, ou da ativação da via Ras/Raf→MEK→ERK1/2, *downstream* à fosforilação de EGFR.

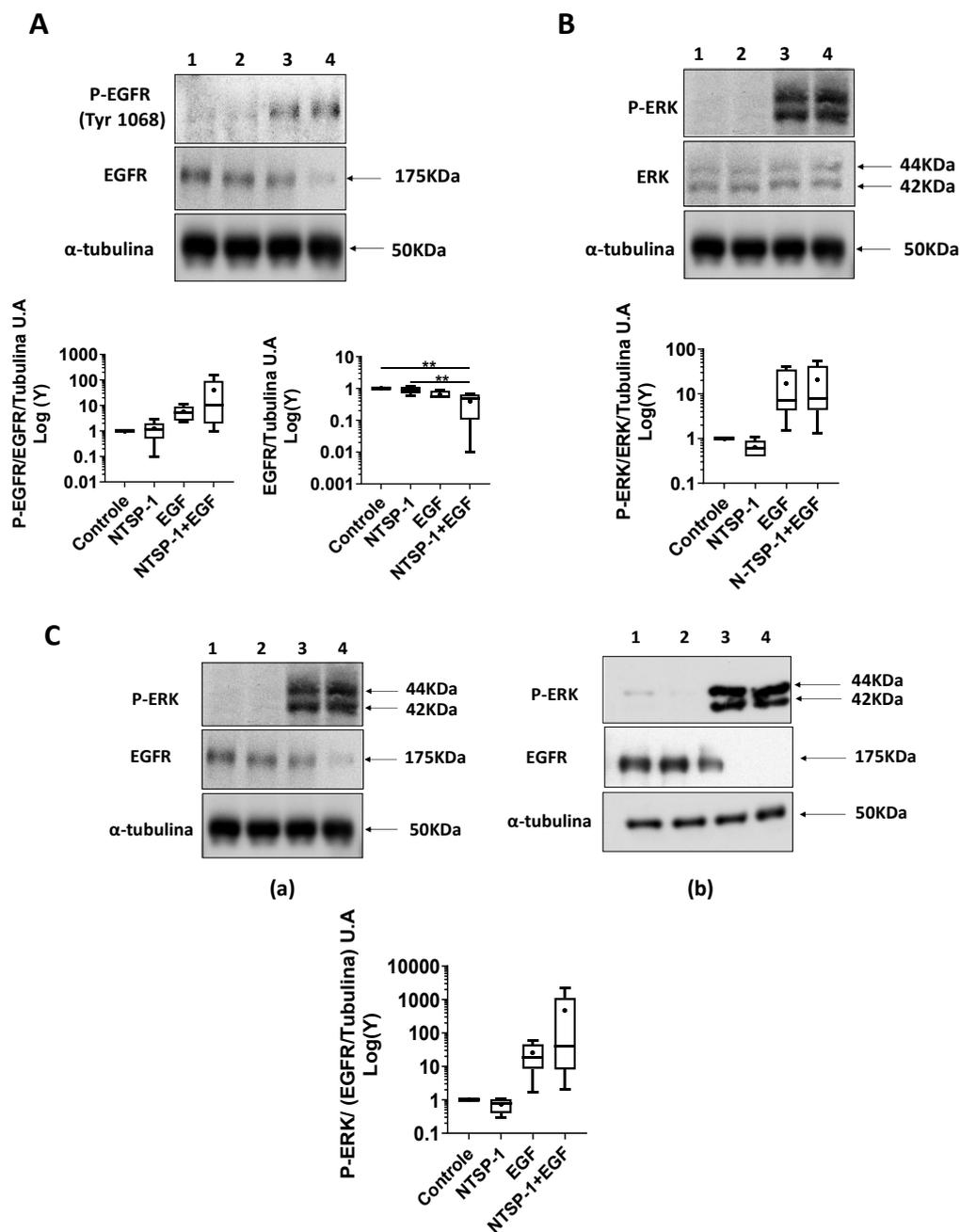
Quando analisamos as mesmas vias em células da linhagem tumoral MCF-7 (**Figura 38**), o tratamento com NTSP-1 também não foi capaz de ativar EGFR, conforme esperado. Observamos que tanto o fator de crescimento isoladamente quanto o tratamento combinado de NTSP-1/EGF induziram um aumento da fosforilação do receptor EGFR, com uma tendência de maior ativação com o tratamento combinado (**Fig.38A**, imagem e gráfico à esquerda), apesar da análise estatística conjunta dos experimentos não ter demonstrado ser esta uma diferença significativa. Deve ser notado que uma diminuição do nível total de EGFR ocorreu quando as células foram desafiadas apenas com EGF, fato que está em concordância com a já descrita endocitose/degradação de RTKs induzida pelos seus ligantes (Wiley, 2003). Porém, de maneira bastante interessante, foi possível verificar que o tratamento combinado NTSP-1/EGF levou uma diminuição muito maior da quantidade de EGFR total remanescente ao final do estímulo com EGF, quando comparado ao controle não tratado (**Fig. 38A**;  $p<0,01$ ; imagem e gráfico à direita), o que poderia ser correlacionado a uma maior ativação e endocitose do RTK, nesta condição.

Figura 37 – Análise das vias de sinalização de EGFR e ERK1/2 na linhagem MCF-10A, em resposta aos tratamentos com NTSP-1 e EGF



Legenda: Células MCF-10A sub-confluentes foram incubadas com NTSP-1 (500nM), EGF (50 ng/mL) ou com uma combinação dos dois mediadores (NTSP-1/EGF), nas mesmas concentrações. As condições detalhadas desses tratamentos, bem como das análises por *western blotting* estão descritas na Metodologia (itens 2.3 e 2.4). O controle de *loading* de proteínas totais foi realizado através da detecção de  $\alpha$ -tubulina. Condições: 1- controle não tratado; 2- células tratadas (35') apenas com o fragmento NTSP-1; 3- células tratadas (10') apenas com o fator de crescimento EGF; 4- células pré-tratadas com o fragmento NTSP-1 e em seguida ativadas com EGF. (A) Revelação por quimioluminescência, com o uso de anticorpos monoclonais anti-EGFR humano (total e fosforilado no resíduo Y1068). A densitometria das bandas foi realizada para determinar tanto a fração de EGFR fosforilado (pEGFR/EGFR - gráfico à esquerda), quanto a quantidade de EGFR total remanescente pós-ativação (EGFR/ $\alpha$ -tubulina - gráfico à direita); (B) Detecção da fração de ERK1/2 fosforilada nos resíduos T202/Y204; (C) Cálculo da fração de ERK1/2 ativada, em função da quantidade de EGFR total. A densitometria das bandas eletroforéticas presentes nos filmes digitalizados (resolução de 300 dpi) foi realizada com auxílio do programa ImageJ (versão 1.51, java 1.8). As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste Ordinary One-way ANOVA no programa Graph-Pad Prism (versão 8.0.1). Imagens representativas, com média das quantificações densitométricas (n = 3).

Figura 38 – Análise das vias de sinalização de EGFR e ERK1/2 na linhagem MCF-7, em resposta aos tratamentos com NTSP-1 e EGF



Legenda: Células MCF-7 sub-confluentes foram incubadas com NTSP-1 (500nM), EGF (50 ng/mL) ou com uma combinação dos dois mediadores (NTSP-1/EGF), nas mesmas concentrações. As condições detalhadas desses tratamentos, bem como das análises por *western blotting* estão descritas na Metodologia (itens 2.3 e 2.4). O controle de *loading* de proteínas totais foi realizado através da detecção de  $\alpha$ -tubulina. Condições: 1- controle não tratado; 2- células tratadas (35') apenas com o fragmento NTSP-1; 3- células tratadas (10') apenas com o fator de crescimento EGF; 4- células pré-tratadas com o fragmento NTSP-1 e em seguida ativadas com EGF. (A) Revelação por quimioluminescência, com o uso de anticorpos monoclonais anti-EGFR humano (total e fosforilado no resíduo Y1068). A densitometria das bandas foi realizada para determinar tanto a fração de EGFR fosforilado (pEGFR/EGFR - gráfico à esquerda), quanto a quantidade de EGFR total remanescente pós-ativação (EGFR/ $\alpha$ -tubulina - gráfico à direita); (B) Detecção da fração de ERK1/2 fosforilada nos

resíduos T202/Y204; **(C)** Cálculo da fração de ERK1/2 ativada, em função da quantidade de EGFR total. A densitometria das bandas eletroforéticas presentes nos filmes digitalizados (resolução de 300 dpi) foi realizada com auxílio do programa ImageJ (versão 1.51, java 1.8). As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste Ordinary One-way ANOVA no programa Graph-Pad Prism (versão 8.0.1) (\*\* $p < 0,01$ ). Imagens representativas, com média (+) e mediana (-) das quantificações densitométricas (n = 5 experimentos).

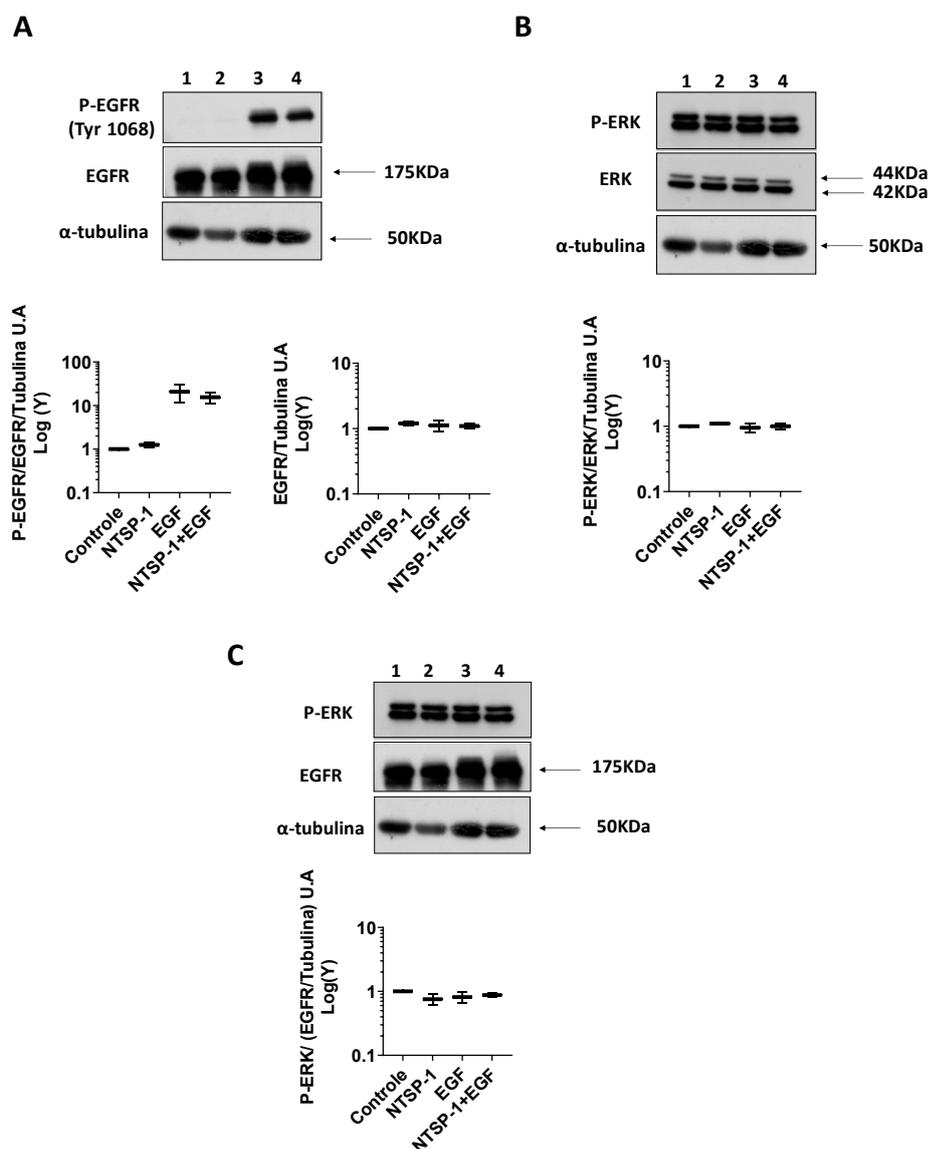
Da mesma forma que o observado para a ativação de EGFR, detectamos a tendência de maior ativação de ERK1/2 quando células MCF-7 receberam o tratamento combinado NTSP-1/EGF (**Fig. 38B**), porém mais uma vez essa diferença não foi considerada significativa em relação EGF em tratamento isolado. No entanto, quando a atividade de ERK1/2 (ou seja, níveis de fosfo-ERK1/2) foi correlacionada aos níveis de EGFR remanescente ao final dos estímulos, encontramos uma tendência muito importante de efeito potencializador da via de ERK1/2 pelo tratamento NTSP-1/EGF (**Fig. 38C**): na maioria dos experimentos (n=5), a quantidade de EGFR detectada ao final de 10 minutos de ativação com EGF foi muito residual (**Fig. 38C**, como no painel **a**) ou virtualmente inexistente (**Fig. 38C**, painel **b**), achados estes que sugerem uma potencialização do aumento da endocitose - e consequente degradação - do RTK ativado. Assim, este resultado sugere um aumento da endocitose do receptor EGFR em células MCF-7 pré-tratadas com NTSP-1 antes da ativação com EGF, o que também pode resultar no aumento da persistência da ativação da via de ERK1/2.

A linhagem **MDA-MB-231** apresenta um perfil de resposta distinto do observado na linhagem não tumorigênica MCF-10A e da linhagem tumorigênica MCF-7 (**Figura 39**). Embora seja possível observar a fosforilação do EGFR tanto com o tratamento com EGF isoladamente, ou em conjunto com o NTSP-1, nessa última condição foi observada uma tendência de redução da ativação de EGFR, quando comparada ao estado de ativação do receptor apenas na presença de EGF, embora a diferença não tendo sido estatisticamente significativa. Tampouco foram observadas diferenças significativas entre os níveis de EGFR residual ao final do tempo de ativação (10') entre as diversas condições (**Fig. 39A**).

Quanto à fosforilação de ERK1/2, deve ser ressaltado que o lote da linhagem MDA-MB-231 disponível em nosso laboratório apresenta, em concordância com dados da literatura, um perfil de ativação *constitutiva* de ERK (Zhou *et al*, 1998; Seddighzadeh *et al*, 1999; Kim *et al*, 2014), que independe do tratamento com fator de crescimento (**Fig. 39B**). Possivelmente por causa desta característica, não conseguimos identificar variações expressivas da ativação de ERK entre as distintas condições. Também não observamos diferenças estatisticamente

significativas da correlação entre a fosforilação de ERK1/2 com os níveis de remanescentes de EGFR após a cessação do estímulo (**Fig. 39C**).

Figura 39 – Análise da via de sinalização de EGFR e ERK1/2 após o tratamento com o fragmento (NTSP-1) na presença do fator de crescimento EGF na linhagem MDA-MB-231



Legenda: Células MDA-MB-231 sub-confluentes foram incubadas com NTSP-1 (500nM), EGF (50 ng/mL) ou com uma combinação dos dois mediadores (NTSP-1/EGF), nas mesmas concentrações. As condições detalhadas desses tratamentos, bem como das análises por *western blotting* estão descritas na Metodologia (itens 2.3 e 2.4). O controle de *loading* de proteínas totais foi realizado através da detecção de  $\alpha$ -tubulina. Condições: 1- controle não tratado; 2- células tratadas (35') apenas com o fragmento NTSP-1; 3- células tratadas (10') apenas com o fator de crescimento EGF; 4- células pré-tratadas com o fragmento NTSP-1 e em seguida ativadas com EGF. (A) Revelação por quimioluminescência, com o uso de anticorpos monoclonais anti-EGFR humano (total e fosforilado no residuo Y1068). A densitometria das bandas foi realizada para determinar tanto a fração de EGFR fosforilado (pEGFR/EGFR - gráfico à esquerda), quanto a quantidade de EGFR total remanescente

pós-ativação (EGFR/ $\alpha$ -tubulina - gráfico à direita); **(B)** Detecção da fração de ERK1/2 fosforilada nos resíduos T202/Y204; **(C)** Cálculo da fração de ERK1/2 ativada, em função da quantidade de EGFR total. A densitometria das bandas eletroforéticas presentes nos filmes digitalizados (resolução de 300 dpi) foi realizada com auxílio do programa ImageJ (versão 1.51, java 1.8). As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste Ordinary One-way ANOVA no programa Graph-Pad Prism (versão 8.0.1). Imagens representativas, com média das quantificações densitométricas ( $n = 2$ ).

## 2.6 Análise da endocitose de EGFR sob modulação de NTSP-1 e EGF por microscopia confocal, na linhagem tumoral MCF-7

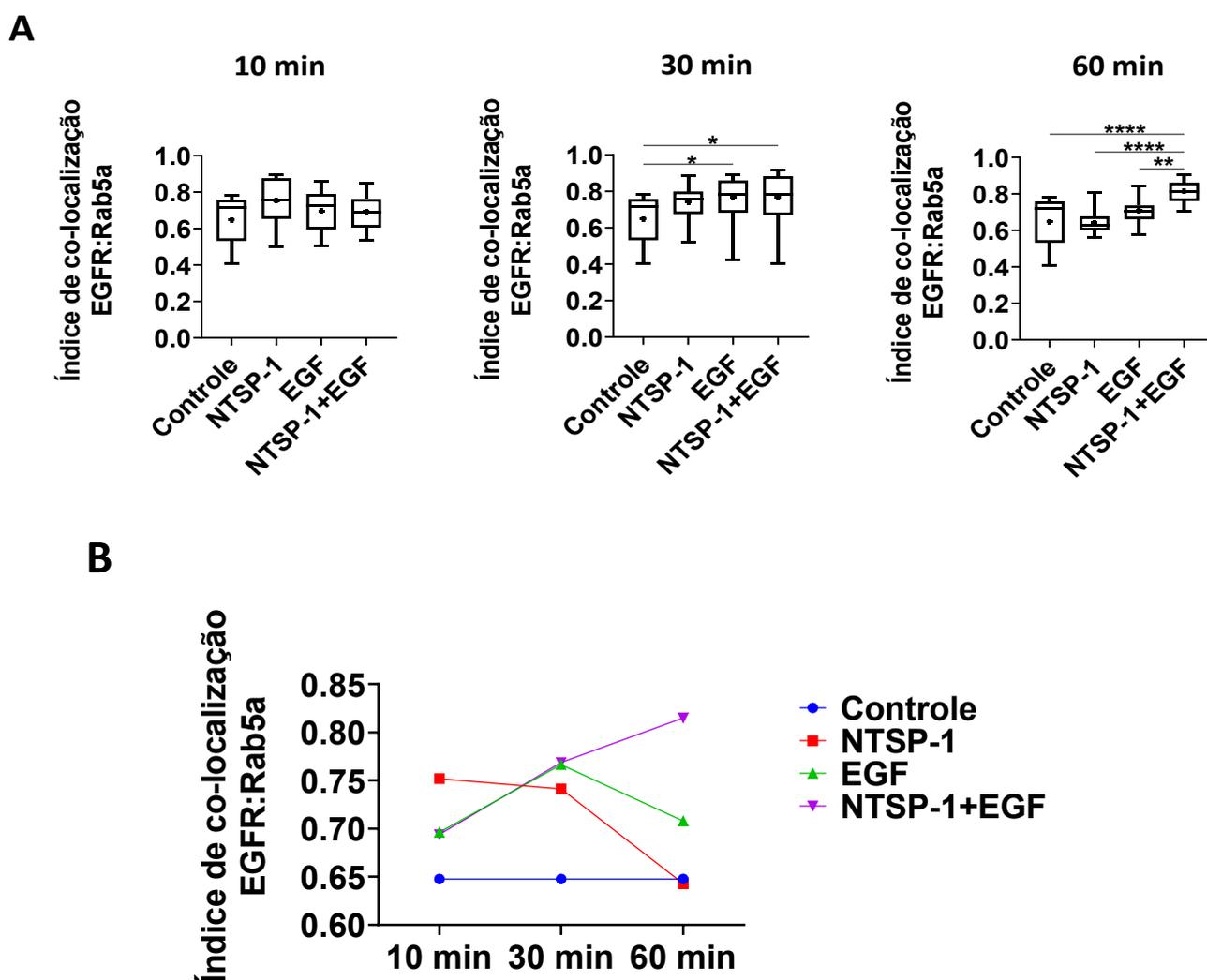
Quando investigamos particularmente as respostas da linhagem celular MCF-7 em alguns testes funcionais, como migração celular e diferenciação em ambiente 3D, observamos efeitos potencializadores entre o fator de crescimento EGF e o domínio NTSP-1 da trombospondina-1 (Figs. 32 e 36). Aliada a estas evidências, também detectamos uma forte tendência – ainda que estatisticamente não significativa - de que ambos os mediadores atuam juntos para potencializar a ativação da via de ERK mediada por EGFR, quando o estímulo com o fator de crescimento foi realizado por 10 minutos (Fig. 38), nesta mesma linhagem, mas não nas linhagens MCF-10A e MDA-MB-231. Como mencionado anteriormente, dados da literatura demonstram que a internalização de receptores tirosina-quinase (RTK) após sua ativação pelos ligantes (fatores de crescimento) está associada ao prolongamento da persistência de algumas vias de sinalização neles iniciadas.

Considerando conjuntamente essas evidências, decidimos investigar a dinâmica de endocitose do receptor EGFR por microscopia confocal, nos intervalos de 10, 30 e 60 minutos de incubação com o fator de crescimento, a fim de verificarmos se uma possível extensão do tempo de residência em endossomos primários, induzida pelo tratamento conjunto NTSP-1/EGF, poderia ser melhor esclarecida por esta técnica. Como marcador fenotípico de endossomas primários, utilizamos a *proteína Rab5A*.

Como mostrado na **Figura 40**, a análise quantitativa da co-localização *EGFR-Rab5* nas diferentes condições experimentais (controle não tratado; NTSP-1; EGF e a combinação NTSP-1/EGF) não mostrou modificações significativas entre os índices de co-localização após 10 minutos, por esta abordagem morfológica. Após 30 minutos de estímulo, no entanto, uma maior e significativa co-localização foi observada tanto com o tratamento com EGF isoladamente ( $p < 0,05$ ), quanto deste associado ao domínio NTSP-1 ( $p < 0,05$ ). Quando o tempo de estímulo foi estendido até 60 minutos, apenas com o tratamento combinado NTSP-1/EGF foi detectada uma persistência significativa de co-localização de EGFR com Rab5 ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,0001$ ), confirmando que os dois mediadores atuam de forma sinérgica na

sinalização deste RTK, nas células da linhagem MCF-7.

Figura 40 – Avaliação da cinética de residência de EGFR em endossomas primários de células MCF-7 tratadas com EGF e NTSP-1



Legenda: Células da linhagem tumoral MCF-7, cultivadas em sub-confluência sobre lamínulas de vidro e depletadas em fatores séricos conforme descrito na Metodologia (item 2.3), foram pré-incubadas com NTSP-1 (ou não) por 35 minutos, antes de serem incubadas (ou não) com EGF (50 ng/mL). O processo endocítico foi visualizado nos tempos de 10, 30 e 60 minutos de tratamento com EGF, através de marcação imunofluorescente, com dupla marcação com anticorpos específicos (anti-EGFR, verde; anti-Rab5A, vermelho), conforme descrito na Metodologia (item 2.12). Os softwares ZEN 2.3 SP1 (ZEN black) e ZEN 2.5 lite (ZEN blue) foram utilizados para análise e obtenção das ROIs (regiões de interesse; 10 ROIs/imagem). As imagens foram deconvoluídas com o auxílio do plugin *Iterative Deconvolve 3D* e os índices de colocalização (coeficientes de Manders-M1 e M2) obtidos através do plugin JACoP, ambos do programa Image J (versão 1.51j8). **(A)** Média (+) e mediana (traço) dos índices de colocalização M1 (percentual da marcação verde [EGFR] co-localizado com a marcação vermelha [Rab5A]). **(B)** Perfil cinético da colocalização entre EGFR e Rab5A. As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste Ordinary one-way ANOVA com teste de múltiplas comparações Tukey's no programa Graph-Pad Prism (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

As **Figuras 41 a 43** mostram o aspecto morfológico das marcações imunofluorescentes realizadas nas células MCF-7. É importante ressaltar que esta abordagem morfológica permitiu verificar que, principalmente nos tempos mais curtos (10' e 30') usados nesta análise, a pré-incubação com NTSP-1 isoladamente claramente alterou a distribuição/adensamento dessas moléculas no citosol das células tratadas, apesar de não ter causado diferenças mensuráveis em seus índices de co-localização.

## **2.7 Estudos preliminares funcionais com o peptídeo bioativo TSP HepII na sinalização mediada por EGFR**

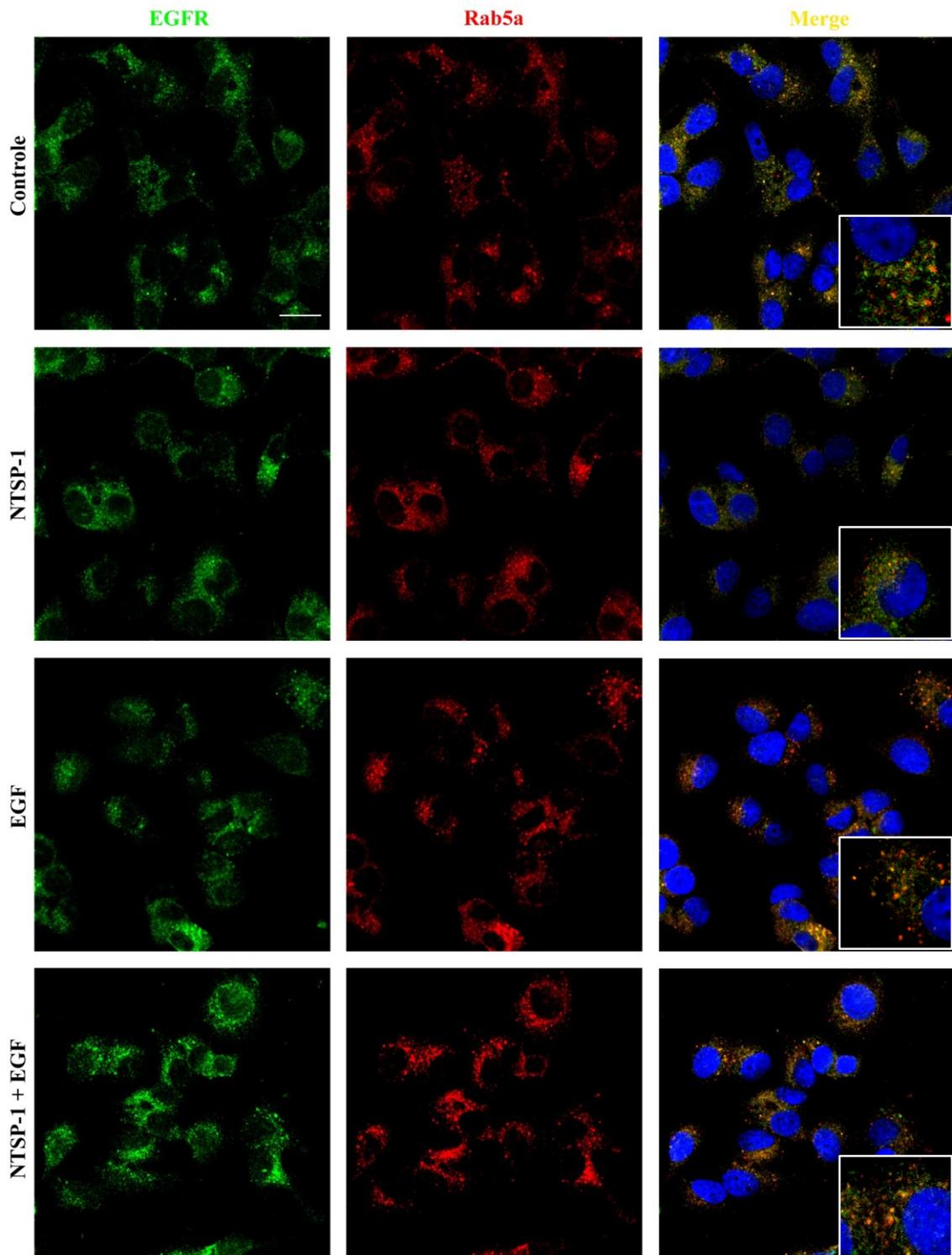
Dados prévios publicados por nosso grupo, em estudo desenvolvido com células endoteliais, mostraram que um peptídeo bioativo sintetizado a partir da estrutura primária do domínio N-terminal da TSP-1 foi capaz de inibir a adesão endotelial dependente de sindecan-4, além de reproduzir os efeitos pró-angiogênicos desta molécula (Nunes et al, 2008). Este peptídeo potencializou a sinalização de ERK ativada por FGFR em células endoteliais (Parte II dos Resultados; manuscrito em preparação).

Dada a elevada expressão de sindecan-4 pelas células da linhagem MCF-7 (Fig. 19), e o fato desta linhagem ter sido a única linhagem na qual ficou uma resposta de potencialização da via de ERK dependente da ativação de EGFR foi mais claramente sugerida pelos nossos resultados, decidimos prospectar a possibilidade do sindecan-4 participar dos eventos pró-tumorais observados. O tratamento com o peptídeo TSP Hep II tendeu a estimular um perfil de ativação celular similar ao observado com o uso de NTSP-1 em nossos experimentos (**Figura 44**). Porém, as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas. A tendência de diminuição do nível de EGFR total também foi mais importante no tratamento conjunto TSP Hep II/EGF.

Considerando que o pré-condicionamento das células da linhagem MCF-7 com o EGF, isoladamente ou em combinação com o domínio NTSP-1, afetaram a proliferação celular (Fig. 32) e que o tratamento combinado afetou de maneira importante a organização de colônias tridimensionais (Fig. 36), decidimos verificar o efeito dos diferentes tratamentos na capacidade clonogênica dessas células tumorais, buscando comparar o fragmento NTSP-1 com o peptídeo TSP Hep II, na medida em que este ensaio pode fornecer dados sobre a capacidade proliferativa e de estabelecimento de interações celulares das células tratadas nas

diferentes condições.

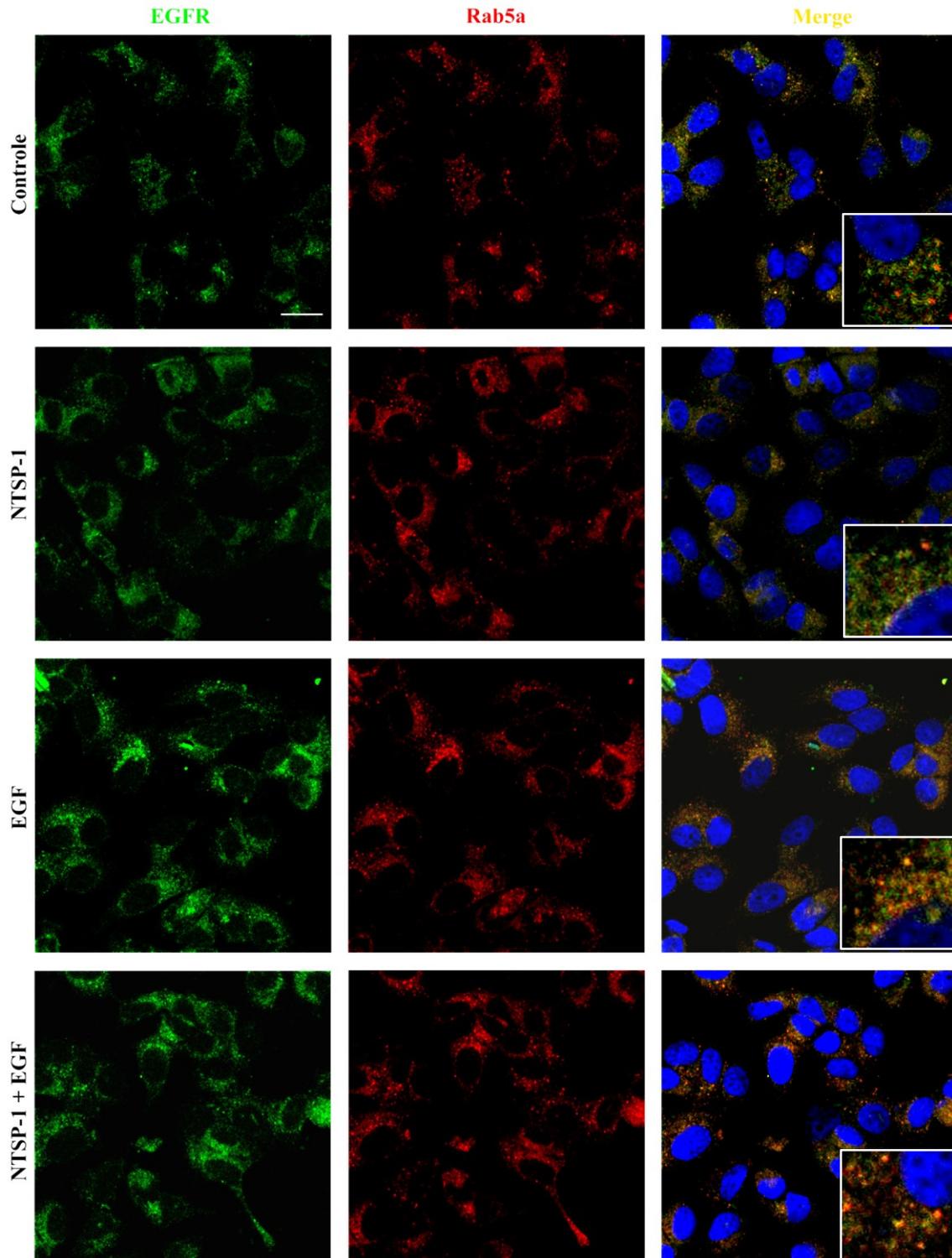
Figura 41 – Aspecto morfológico da distribuição de EGFR e Rab5A em células MCF-7 tratadas com EGF e NTSP-1 (10 minutos de tratamento com EGF)



Legenda: As condições experimentais, bem como as de captura, tratamento de imagens e quantificação de

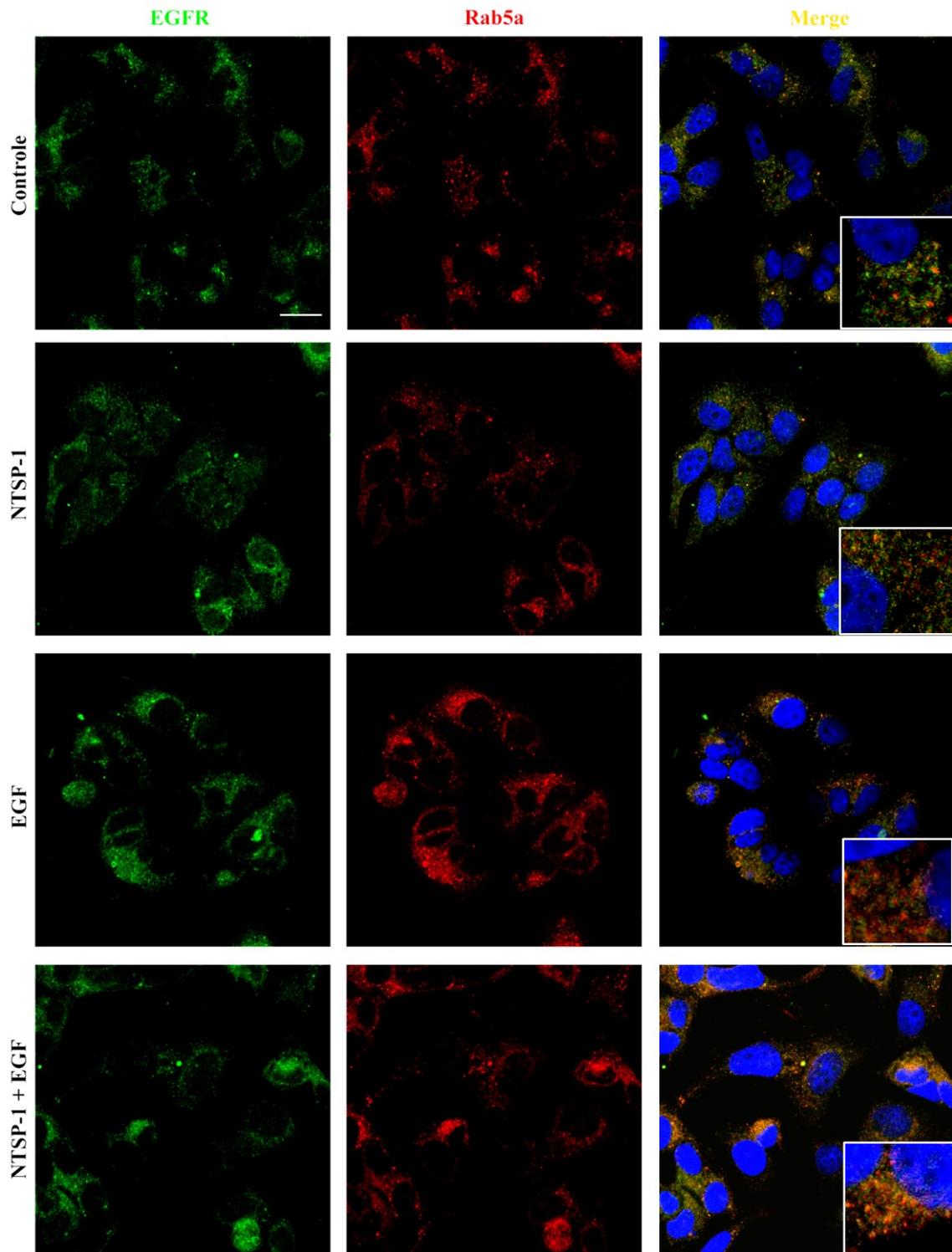
índices de co-localização são as mesmas descritas para **Fig. 40**.

Figura 42 – Aspecto morfológico da distribuição de EGFR e Rab5A em células MCF-7 tratadas com EGF e NTSP-1 (30 minutos de tratamento com EGF)



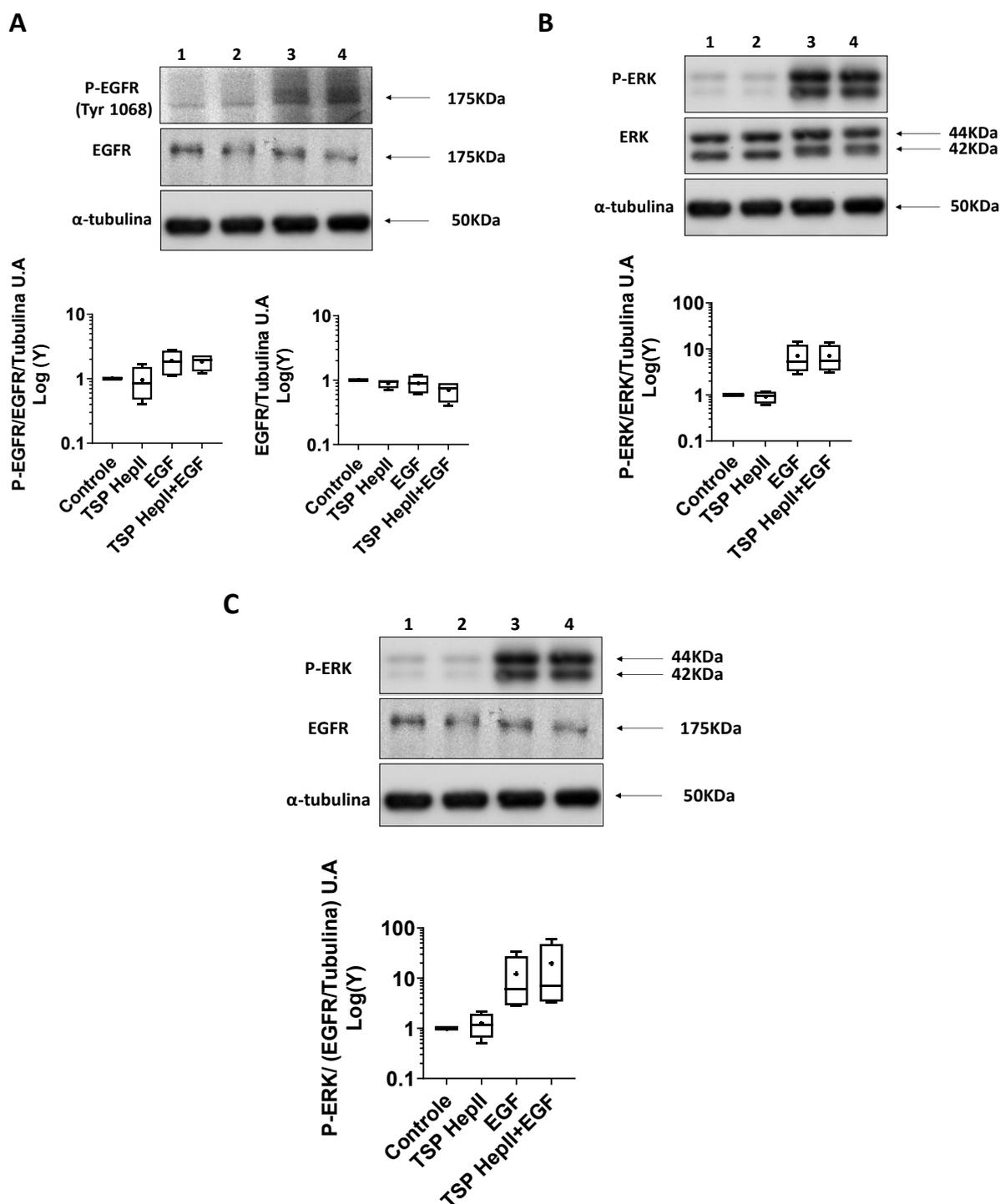
Legenda: As condições experimentais, bem como as de captura, tratamento de imagens e quantificação de índices de co-localização são as mesmas descritas para **Fig. 40**.

Figura 43 – Aspecto morfológico da distribuição de EGFR e Rab5A em células MCF-7 tratadas com EGF e NTSP-1 (60 minutos de tratamento com EGF)



Legenda: As condições experimentais, bem como as de captura, tratamento de imagens e quantificação de índices de co-localização são as mesmas descritas para Fig. 40.

Figura 44 – Análise da via de sinalização de EGFR e ERK1/2 após o tratamento com o peptídeo bioativo TSP HepII na presença do fator de crescimento EGF na linhagem MCF-7



Legenda: Células MCF-7 sub-confluentes foram incubadas com TSP Hep II (500nM), EGF (50 ng/mL) ou com uma combinação dos dois mediadores (TSP Hep II/EGF), nas mesmas concentrações. As condições detalhadas desses tratamentos, bem como das análises por *western blotting* estão descritas na Metodologia (itens 2.3 e 2.4). O controle de *loading* de proteínas totais foi realizado através da detecção de  $\alpha$ -tubulina. Condições: 1- controle não tratado; 2- células tratadas (35') apenas com o peptídeo TSP Hep II; 3- células tratadas (10') apenas com o fator de crescimento EGF; 4- células pré-tratadas com o peptídeo TSP Hep II e em seguida ativadas com EGF. (A) Revelação por

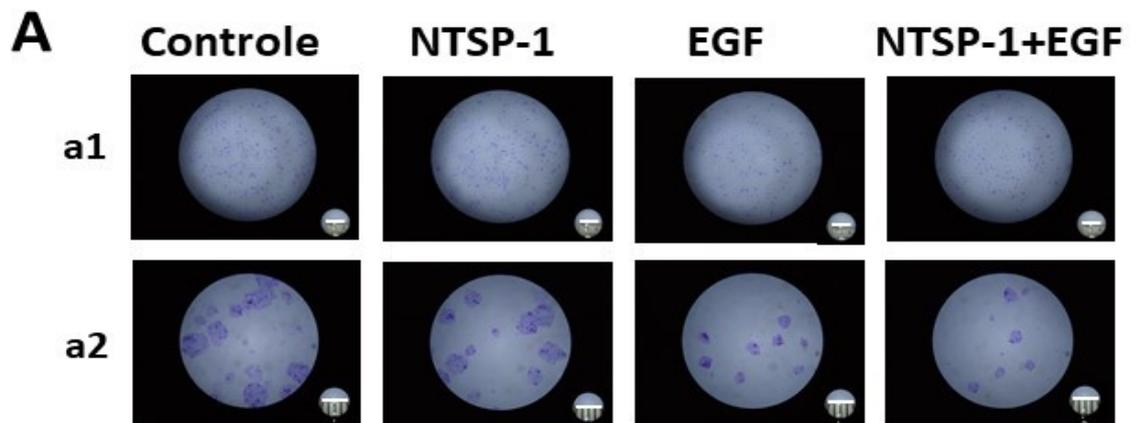
quimioluminescência, com o uso de anticorpos monoclonais anti-EGFR humano (total e fosforilado no resíduo Y1068). A densitometria das bandas foi realizada para determinar tanto a fração de EGFR fosforilado (pEGFR/EGFR - gráfico à esquerda), quanto a quantidade de EGFR total remanescente pós-ativação (EGFR/ $\alpha$ -tubulina - gráfico à direita); **(B)** Detecção da fração de ERK1/2 fosforilada nos resíduos T202/Y204; **(C)** Cálculo da fração de ERK1/2 ativada, em função da quantidade de EGFR total. A densitometria das bandas eletroforéticas presentes nos filmes digitalizados (resolução de 300 dpi) foi realizada com auxílio do programa ImageJ (versão 1.51, java 1.8). As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste Ordinary One-way ANOVA no programa GraphPad Prism (versão 8.0.1). Imagens representativas, com média (+) e mediana (-) das quantificações densitométricas (n = 4).

A **Figura 45 (A e B)** mostra o resultado de um ensaio clonogênico usando nas células MCF-7 os mesmos tratamentos já discutidos anteriormente, com a ressalva de que a duração dos tratamentos foi de 72 horas, a fim de tornar o ensaio mais comparável ao protocolo utilizado no ensaio de diferenciação de organoides em ambiente 3D, bem como nos ensaios de proliferação e morte celular. O tratamento com NTSP-1 isoladamente resultou em um número e diâmetro de colônias comparável ao verificado no controle não tratado, enquanto os tratamentos com EGF, isoladamente ou em combinação a NTSP-1, resultaram em colônias menores em número e em área, sem diferenças significativas entre essas duas últimas condições (Fig. 45B).

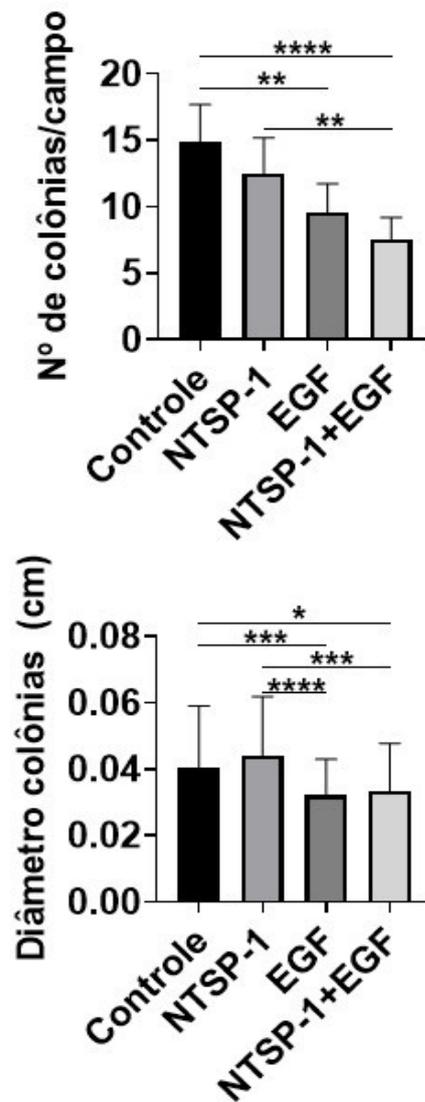
O ensaio clonogênico foi também realizado após pré-tratamento com peptídeo TSP HepII e/ou EGF por 72 horas (**Figura 45C e 45E**). Diferentemente do observado com o fragmento NTSP-1, em todas as condições tratadas (TSP HepII, EGF e TSP HepII/EGF) o número de colônias foi reduzido em relação ao controle não tratado de maneira estatisticamente significativa (**Fig. 45D**,  $p < 0,001$ ;  $p < 0,0001$ ). Ainda, os tratamentos com peptídeo isolado ou com EGF estimularam a formação de colônias menores em diâmetro (**Fig. 45E**, painel c2,  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ), quando comparado aos demais tratamentos, alterações que também apresentaram significância estatística. No entanto, a redução do número e diâmetro das colônias provavelmente não se devem a alterações na adesão inicial após os tratamentos (**Fig. 45D**). O aspecto morfológico das colônias revela que o EGF isolado e TSP HepII+EGF induziram um certo grau de desorganização das estruturas formadas, e que esta morfologia foi observada de forma mais acentuada na condição TSP HepII+EGF (Fig. 45C – painel c3).

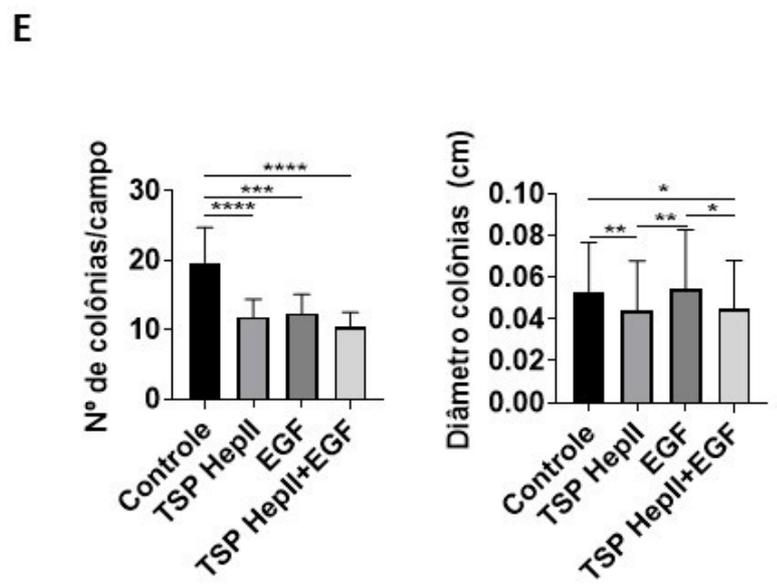
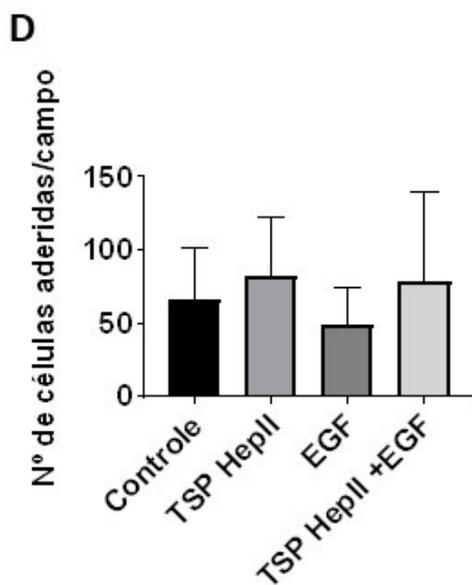
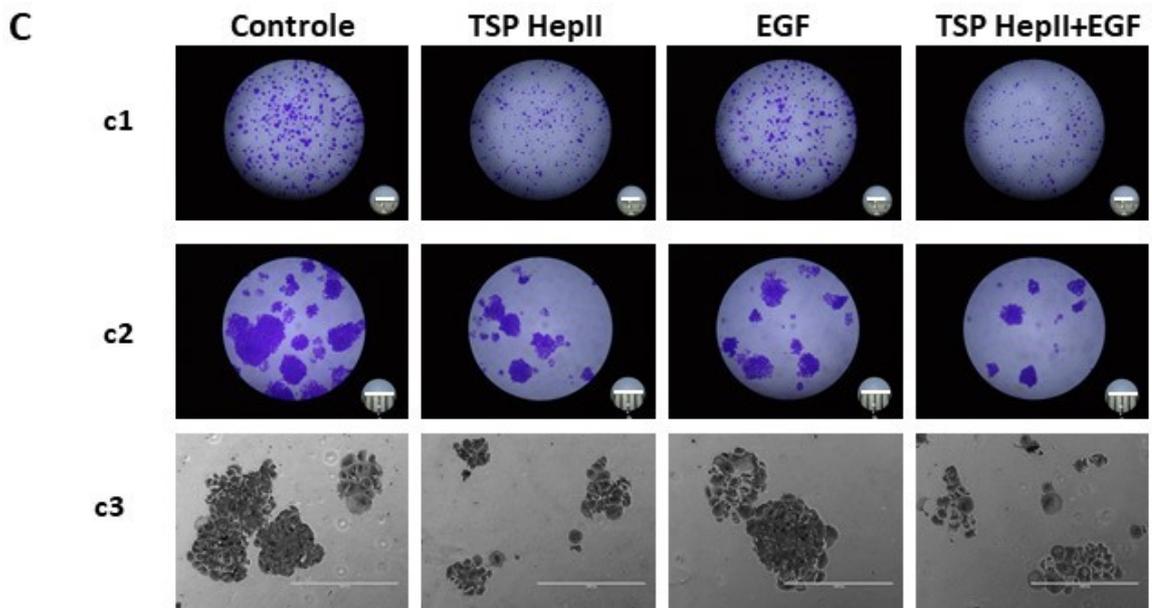
Apesar de preliminares, estas observações sugerem uma participação do sindecina-4 nas respostas da linhagem MCF-7 à presença do domínio N-terminal da TSP-1, um aspecto que será explorado na continuidade desta investigação.

Figura 45 – Ensaio clonogênico de células MCF-7 após tratamentos com NTSP-1, o peptídeo bioativo TSP HepII, na presença do fator de crescimento EGF



**B**





Legenda: Células da linhagem MCF-7 ( $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) cultivadas na presença de 10% SFB e posteriormente depletadas em fatores séricos por 18 horas foram submetidas aos diversos tratamentos por 72 horas. As células foram então desaderidas e replaqueadas ( $2 \times 10^2$  células/cm<sup>2</sup>) em placas de 6 poços, na

presença de 10% SFB, para acompanhamento da formação de colônias, ao longo de 15-18 dias. Após esse período, foram fixadas com glutaraldeído e coradas com solução de cristal de violeta. O registro fotográfico foi realizado através de uma câmera acoplada a uma lupa (Bel Photonics). As fotos obtidas de campos aleatórios (5-6) foram utilizadas para determinação do número, tamanho e morfologia das colônias. Foram consideradas colônias com número de células  $\geq 3$ . Em **(A)** e **(B)**, as células foram tratadas com NTSP-1 (500 nM), EGF (50 ng/mL) ou com uma combinação desses mediadores nas mesmas concentrações. **Painel a1**: representação das diferentes condições sem ampliação (escala = 2,0 cm); **Painel a2**: Fotos com ampliação representativas dos campos (escala = 0,4cm). **(B)** Gráfico da média do número de colônias por campo; n=1. Em **(C)**, **(D)** e **(E)**, as células foram tratadas com TSP Hep II (500 nM), EGF (50 ng/mL) ou com uma combinação desses mediadores nas mesmas concentrações. **Painel c1**: representativo das diferentes condições sem ampliação (escala = 2,0 cm); **Painel c2**: Fotos com ampliação representativas dos campos (escala = 0,4cm); **Painel c3**: Aspecto morfológico das colônias, em fotos em campo claro do microscópio invertido digital EVOS fl (AMG, Thermo Fisher Scientific), aumento 4  $\times$ ; **(D)** Gráfico da média do número de células aderidas/campo (após 2h do plaqueio). **(E)** Gráfico da média do número de colônias/campo e diâmetro das colônias (em cm); (n=3). As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste Ordinary one-way ANOVA com teste de múltiplas comparações Tukey's no programa Graph-Pad Prism. As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste Brown-Forsythe and Welch ANOVA com teste de múltiplas comparações Games-Howell's no programa Graph-Pad Prism. (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001).

## Parte II- Papel do domínio NTSP-1 da Trombospondina-1 na sinalização FGF-2/FGFR-1

---

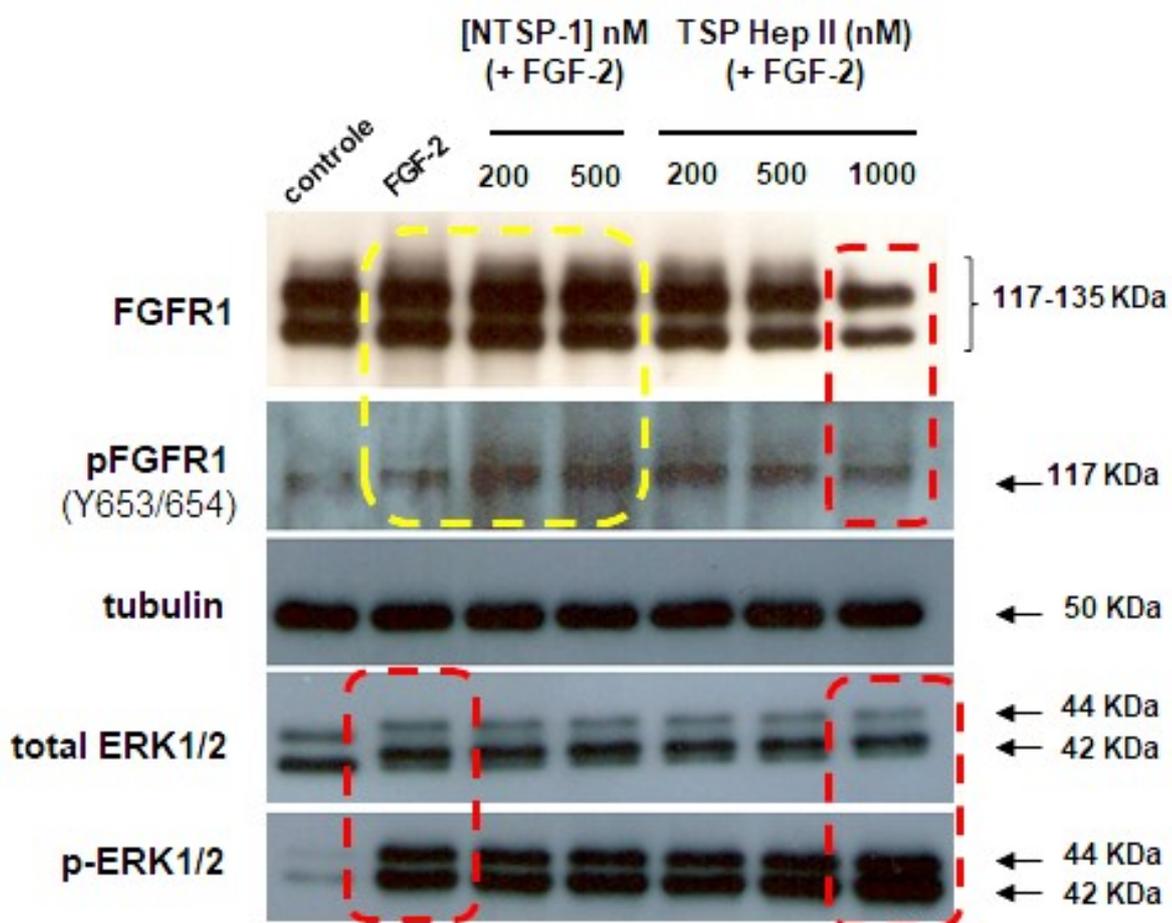
### Contexto:

*Durante o período do trabalho desta tese surgiu a oportunidade de participar em outro projeto do LabAngio, sobre o papel pró-angiogênico do domínio N-terminal da TSP-1. Em trabalho que vem sendo desenvolvido através de uma colaboração com o grupo do Dr. Jack Lawler (Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, EUA), cujos dados constituem um manuscrito em preparação, observamos que o domínio N-terminal da aumenta a endocitose do receptor VEGFR2 endotelial após sua fosforilação no resíduo de tirosina Y<sup>175</sup>, que resulta no prolongamento da ativação da via de ERK1/2, sugerindo uma vez mais que esta região da TSP-1 atua como potencializadora da resposta a fatores de crescimento que agem através de receptores tirosina-quinase (RTK). O tratamento de células endoteliais microvasculares com o domínio N-terminal da proteína aumenta a co-localização do receptor VEGFR2 com marcadores de endossomas primários (EEA1 e Rab5), bem como com Rab11, que atua na reciclagem do VEGFR2 desfosforilado de volta à membrana plasmática. Esse processo envolve ainda as integrinas  $\alpha 9\beta 1$  e  $\alpha 6\beta 1$ , em associação ao VEGFR2 (Morandi, V. - manuscrito em preparação).*

---

Na sequência destas observações, surgiu o interesse de investigar se esta nova atividade biológica do domínio NTSP-1 seria compartilhada por outro importante fator de crescimento angiogênico, o FGF-2, que atua através do receptor FGFR1, que também pertence à classe dos RTK. Células endoteliais microvasculares da linhagem **HMEC-1** foram submetidas aos protocolos de “priming” com NTSP-1 ou com o peptídeo bioativo TSP Hep II, em variáveis concentrações, antes de serem ativadas com FGF-2 (50 ng/mL). A **Figura 46** mostra que o tratamento com NTSP-1 ou seu peptídeo derivado TSP Hep II aumentam a ativação do receptor FGFR1, tal como medida pela fosforilação em seus resíduos Y<sup>653/654</sup>, quando combinados ao FGF-2. No entanto, com o tratamento combinado não observamos diferenças significativas nos níveis de ativação de ERK1/2 quando usamos o fragmento NTSP-1 na concentração máxima de 500 nM (a mesma usada em ensaios celulares com VEGF<sub>165</sub> e EGF, em outros experimentos com células endoteliais e tumorais, respectivamente).

Figura 46 – Papel do domínio NTSP-1 e do peptídeo bioativo TSP Hep II na sinalização de MAPK mediada pelo receptor FGFR1 em células endoteliais microvasculares humanas (linhagem HMEC-1)



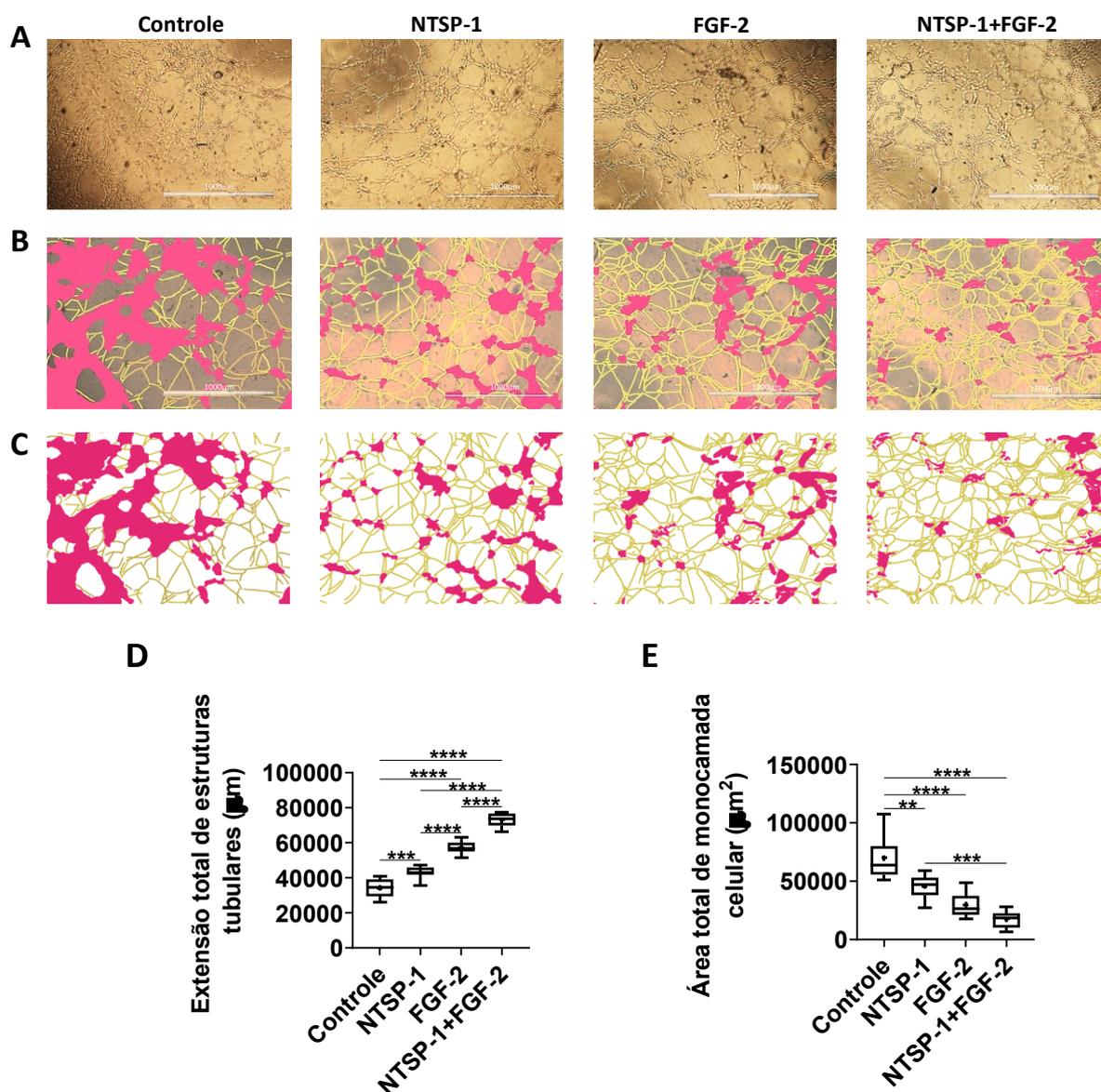
Legenda: Células da linhagem endotelial HMEC-1 sub-confluentes foram incubadas com NTSP-1 ou TSP Hep II nas concentrações indicadas na figura FGF-2 (50 ng/mL), ou com as combinações indicadas. As condições detalhadas desses tratamentos, bem como das análises por *western blotting* estão descritas na Metodologia (itens 2.3 e 2.4). O controle de *loading* de proteínas totais foi realizado através da detecção de  $\alpha$ -tubulina. A revelação por quimioluminescência foi realizada com o uso de anticorpos monoclonais anti-FGFR1 humano (total e fosforilado nos resíduos Y653/654), anti-ERK (total e fosforilada em T202/Y204 e  $\alpha$ -tubulina). Os pontilhados amarelos ressaltam a maior ativação de FGFR1 na presença de NTSP-1/FGF-2; as áreas nos pontilhados em vermelho indicam a potencialização de ERK1/2 em concomitância com menores níveis de FGFR1 total, em comparação aos controles. Experimento representativo (n = 3).

Porém, quando o peptídeo TSP Hep II foi usado, uma potencialização concentração-dependente da ativação de ERK foi observada, com máxima ativação na concentração de 1 $\mu$ M de TSP Hep II, com destaque para significativa diminuição dos níveis de FGFR1 nesta condição, sugestiva do aumento de endocitose deste receptor.

Visando investigar a relevância biológica da modulação na via FGFR1→[Ras/ERK] pelo domínio N-TSP1, realizamos um ensaio de tubulogênese endotelial (**Figura 47**). Todos os tratamentos (NTSP-1, FGF-2 e NTSP-1/FGF-2) foram capazes de induzir o aumento do comprimento total de estruturas tubulares em 26% (p<0,001), 69% (p<0,0001) e 115% (p<0,0001), respectivamente, quando comparados ao controle não tratado. A determinação de áreas remanescentes de monocamada celular (ou seja, células não envolvidas na formação das estruturas), de maneira concordante, variou inversamente ao número de estruturas em cada condição, corroborando aquele resultado.

Considerando que a diferenciação angiogênica observada com o tratamento combinado NTSP-1/FGF-2 induziu um efeito significativamente maior do que o observado para cada mediador de forma isolada, esses resultados sugerem que o fragmento NTSP-1 seja capaz de agir sinergicamente com o fator de crescimento FGF-2, em sua atividade pró-angiogênica.

Figura 47 – Ensaio tubulogênico com células endoteliais microvasculares (linhagem HMEC-1 tratada com NTSP-1, FGF-2 ou com uma combinação de ambos)



Legenda: As células HMEC-1 foram previamente lavadas com meio MCDB-131 sem SFB e sem EGF, e estarvadas com 0,1%BSA por aproximadamente 18h. Posteriormente, o ensaio de tubulogênese foi realizado, 40000 células/poço foram plaqueadas na presença dos diferentes tratamentos (NTSP-1 500nm; FGF-2 50ng/mL; NTSP-1+FGF-2), na presença de 2%SFB, sobre matrigel reduzido de fator de crescimento em placa de 96 poços e em duplicata. A formação de estruturas foi acompanhada durante 8h, e após esse período as células foram lavadas com meio sem SFB por 5 minutos, fixadas com glutaraldeído 1,1% diluído em PBS1x, novamente lavadas com PBS1x. As fotos foram obtidas em contraste de fase em microscópio invertido, aumento de 4x. A contabilização da extensão (em µm) de *sprouts* e da área de monocamada (µm<sup>2</sup>) foi realizada através da demarcação manual de regiões de *sprouts* e de monocamada com o auxílio de uma mesa digitalizadora (Wacom Co.; Ltd) e do programa Adobe-Photoshop. A correlação do tamanho em µm foi obtida com base na barra de calibração de cada foto. (A) As imagens são representativas de cada condição em contraste de fase. (B) Fotos (aumento 4x, barra de calibração; 1000µm) representativas dos campos analisados (4 campos/foto) com demonstração da técnica utilizada: monocamada em rosa e sprouts em amarelo. (C) Ilustrações características da superfície coberta por monocamada e sprouts. (D) Média (+) e mediana (-) dos valores de sprouts (µm). (E) Média (+) e mediana (-) dos valores de monocamada (µm<sup>2</sup>). As análises

estatísticas foram realizadas empregando o teste Ordinary two-way ANOVA com teste de múltiplas comparações Tukey's no programa Graph-Pad Prism (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

### 3 DISCUSSÃO

A presença da trombospondina-1 (TSP-1) no microambiente tumoral tem sido relacionada a progressão de diferentes tipos de tumor, muitas vezes com conclusões contraditórias, algumas vezes estimulando a progressão e, em outros contextos, sendo capaz de inibir a tumorigênese através de seu papel anti-angiogênico (Huang *et al*, 2017). No entanto, uma recente e extensa revisão da literatura foi realizada sobre o papel da TSP-1 em variados contextos patológicos (Zhao *et al*, 2018), da qual emergiu com maior clareza um papel consistentemente pró-tumoral para a TSP-1 em pelo menos três tipos de câncer: mama, melanoma e carcinoma hepatocelular.

No caso dos carcinomas mamários, o papel pró-tumoral da TSP-1 residiria tanto em um potencial para aumentar as metástases (Yee *et al*, 2009) quanto para induzir angiogênese (Byrne *et al*, 2007). Considerando que nosso grupo tem contribuído significativamente para caracterizar as atividades pró-angiogênicas do domínio N-terminal da TSP-1 (Ferrari do Outeiro-Bernstein *et al*, 2002; Nunes *et al*, 2008; Dias *et al*, 2012), incluindo a caracterização da capacidade deste domínio potencializar a sinalização de fatores de crescimento angiogênicos em células endoteliais (manuscrito em preparação), se tornou um desdobramento natural a construção da hipótese de que a porção N-terminal da TSP-1 poderia contribuir também para os efeitos pró-tumorais diretos já evidenciados em inúmeros trabalhos sobre câncer de mama, na literatura.

Por outro lado, fatores solúveis, representados por fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, hormônios, entre outras moléculas, também constituem parte fundamental dos sistemas que harmonizam os tecidos e os mantém com a quantidade de células e graus de diferenciação apropriados. Muitas dessas moléculas agem através de receptores tirosina-quinase (RTKs), sendo já bastante estudados os EGFs, FGFs e VEGFs, conforme descrito com maior detalhamento na Introdução deste trabalho. A interação cruzada destes RTKs com outras classes de receptores, como as integrinas e os proteoglicanos de heparan-sulfato, tem sido demonstrada de forma crescente na literatura da última década (Soung *et al*, 2010). Sabe-se hoje que muitas moléculas da matriz podem participar na interação entre RTKs e outros receptores, como integrinas e sindecans, o que resulta na formação de complexos multiprotéicos, que atuam como plataformas de sinalização celular (Cabodi *et al*, 2004; Streuli & Akhtar, 2009). Devido a sua capacidade de interagir com proteoglicanos, moléculas

da matriz extracelular e fatores de crescimento, a TSP-1 direciona a organização de complexos multiprotéicos que modulam o fenótipo celular. A compreensão do significado biológico dessas interações e a multiplicidade de vias de sinalização celular se tornou um desafio para os pesquisadores desse campo (Iruela-Arispe, 2008).

É importante ressaltar que tanto sindecans como integrinas já foram implicados na regulação da sinalização celular disparada por RTKs, no contexto do câncer de mama. As três classes de receptores inclusive podem atuar cooperativamente nas balsas lipídicas, organizados em *clusters* (Soung et al, 2010; Afratis et al, 2017). No entanto, nenhum dos trabalhos até hoje investigou se a TSP-1 e seu domínio N-terminal pró-angiogênico participam nesses complexos multiprotéicos que geralmente regulam a atividade dos RTKs ativados por fatores de crescimento. Na primeira etapa deste trabalho, procuramos verificar se as linhagens selecionadas MCF-10A (benigna, porém hiperplásica), MCF-7 (tumoral, não invasiva) e MDA-MB-231 (tumoral, invasiva) expressavam os receptores já descritos na literatura para o reconhecimento do domínio NTSP-1, além de confirmar o real *status* de expressão para os RTKs de interesse (FGFR1, VEGFR2 e EGFR) nos lotes celulares disponíveis em nosso laboratório, visto que sempre há chances dos fenótipos moleculares sofrerem alterações em função de repiques e condições de crescimento, em cada laboratório (Geraghty et al, 2014). Na literatura, o reconhecimento do domínio N-terminal com afinidade à sulfatos de heparana/heparina (NTSP-1), já foi atribuído a sindecanas (principalmente a isoforma 4, SDC4) e a algumas integrinas da sub-família  $\beta 1$  de integrinas, com ênfase nos membros:  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  e  $\alpha 9\beta 1$  (Calzada & Roberts, 2005). Apesar da integrina  $\alpha v\beta 3$  também já ter sido implicada no reconhecimento da TSP-1, a interação parece envolver a sequência RGD desta glicoproteína, que se encontra fora da região N-terminal, razão pela qual não a incluímos em nosso estudo (Smith e Cheresch, 1990).

A importância das integrinas na progressão tumoral tem sido alvo de intenso estudo. As mudanças na composição da matriz tumoral mamária alteram o perfil de expressão e consequentemente a sinalização “*downstream*” que direcionam para o aumento da invasão celular e metástase do tumor (Gehler *et al*, 2013). A expressão da integrina  $\alpha 3\beta 1$  é característica de células epitelias mamárias, tanto luminais quanto mioepiteliais (Taddei *et al*, 2003; Lahlou & Muller, 2011), o que foi corroborado pelas nossas análises, que também estão em concordância com descrições de que a linhagem MDA-MB-231 apresenta elevados níveis de  $\alpha 3$  e maiores do que a linhagem MCF-7 (Morini *et al*, 2000). Também detectamos a presença da subunidade  $\alpha 4$  em todas as linhagens, sem alterações significativas entre os

percentuais de expressão, entre nenhuma delas. No entanto, a maior parte da literatura relata a ausência da integrina  $\alpha 4$  no epitélio mamário (Taddei *et al*, 2003) ou expressão extremamente reduzida nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 (Morini *et al*, 2000). As variações entre os anticorpos utilizados poderiam justificar os diferentes resultados. E para melhor investigarmos esse aspecto, futuramente avaliaremos a expressão desta cadeia de integrina também pela técnica de *western blotting*.

A expressão de  $\alpha 6$  foi detectada tanto por citometria de fluxo quanto por *western blotting*, e ambas análises demonstraram que a linhagem MCF-10A apresentou a maior expressão desta integrina, a qual diferiu de forma significativa dos níveis expressos pelas linhagens tumorais. A integrina  $\alpha 6\beta 4$  é responsável pela manutenção da integridade epitelial devido a sua habilidade de mediar a formação de hemidesmossomas que conectam os filamentos intermediários de citoqueratina com lamininas presentes na matriz extracelular (Lahlou & Muller, 2011). Dessa forma, a maior expressão na linhagem MCF-10A da subunidade  $\alpha 6$  se encontra em consonância com as funções fisiológicas do heterodímero  $\alpha 6\beta 4$  na manutenção da polaridade epitelial, propriedade esta que a linhagem MCF-10A apresentou em nossos ensaios 3D.

A ocorrência da cadeia  $\alpha 6$  na linhagem MDA-MB-231 já foi descrita por ser reduzida (John *et al*, 2010), observação também verificada em nossas amostras, embora uma elevada expressão de  $\alpha 6$  tenha igualmente sido atribuída a esta linhagem (Mukhopadhyay *et al*, 1999; Morini *et al*, 2000). Esta variabilidade de dados para a mesma linhagem reforça a necessidade de verificação regular dos níveis de expressão de receptores celulares de interesse, ao longo dos estudos. Já foi descrita a ausência ou expressão extremamente reduzida da integrina  $\alpha 6$  na linhagem MCF-7 (Howlett *et al*, 1995; Morini *et al*, 2000) - dados que nossas observações corroboraram - além de uma relação inversa entre a expressão do receptor de estrogênio e a expressão desta subunidade de integrina (Mukhopadhyay *et al*, 1999), o que poderia justificar a reduzida ou praticamente ausente expressão da cadeia  $\alpha 6$  na linhagem MCF-7.

Conforme mencionado, as cadeias  $\alpha$  que discutimos até aqui possuem como parceira frequente a cadeia  $\beta 1$  das integrinas. Na glândula mamária normal, a interação entre as células epiteliais com a membrana basal adjacente é necessária para integridade estrutural e funcional dos componentes ductais da glândula. A integrina  $\beta 1$  desenvolve um papel essencial na manutenção da integridade do tecido mamário, assim como para o controle da sobrevivência e proliferação celular durante o desenvolvimento e diferenciação da glândula mamária (Lahlou & Muller, 2011). Por outro lado, a ativação anômala da integrina  $\beta 1$  vem sendo

correlacionada com o fenótipo maligno das células de mama, contribuindo para a progressão tumoral e resistência à terapia citotóxica (Park *et al*, 2006). Dados mostram que a inibição da sua atividade exacerbada é capaz de reverter o fenótipo maligno nas linhagens tumorais, sem afetar a estrutura e funcionalidade das células não malignas, em ambientes tridimensionais. Por isto, a integrina  $\beta 1$  vem sendo considerada um potencial alvo farmacológico para controle da progressão tumoral (Howe e Addison, 2012). Há evidências de que não seria apenas a quantidade de integrina  $\beta 1$  que contaria para a progressão tumoral, mas a maneira como ela se distribui e organiza nas células epiteliais (Park *et al*, 2006). Em concordância com esta evidência, os nossos ensaios revelaram níveis de expressão da integrina  $\beta 1$  equivalentes entre as três linhagens (MCF-10A, MDA-MB-231 e MCF-7).

A integrina  $\alpha 9\beta 1$  foi identificada como um novo marcador para o câncer de mama de subtipo basal e teve sua expressão relacionada à redução da sobrevivência dos pacientes com carcinoma mamário, ao promover a migração e invasão das células tumorais (Allen *et al*, 2011). Esta integrina foi identificada como um receptor para tenascina-C matricial, que por sua vez também está envolvida na progressão tumoral (Guttery *et al*, 2010). A integrina  $\alpha 9\beta 1$  se localiza nas células mioepiteliais nos ductos normais e ácinos. A linhagem MCF-7 tem sido descrita como negativa para expressão de  $\alpha 9\beta 1$  (Allen *et al*, 2011; Mostovich *et al*, 2011), dados estes confirmados na caracterização dos lotes celulares do nosso laboratório. Allen e colaboradores (2011) demonstraram ainda uma correlação inversa entre a expressão de  $\alpha 9\beta 1$  e a expressão do receptor de estrogênio e progesterona, o que estaria coerente com a ausência desta integrina na linhagem MCF-7. De forma interessante, a integrina  $\alpha 9\beta 1$  já foi identificada como receptor para o domínio NTSP-1 em células endoteliais microvasculares, promovendo angiogênese através desta interação (Staniszewska *et al*, 2007).

Considerando a importância da expressão de sindecans na biologia tumoral, e especificamente do SDC-4 no nosso trabalho, como um possível receptor de NTSP-1 no contexto tumoral, resolvemos verificar o grau de expressão deste proteoglicano nas linhagens de mama utilizadas, em paralelo à detecção das integrinas selecionadas. Os sindecans constituem uma família composta de quatro isoformas transmembranares (SDC1-4), ligantes de fatores de crescimento com afinidade à heparina: FGFs, VEGFs, PDGFs (*platelet-derived growth factors*), entre outros (Elfenbein & Simons, 2013). Tais habilidades possibilitam a atuação destes receptores como reguladores-chave do processo de invasão tumoral e metástase.

Detectamos a expressão de SCD4 tanto na linhagem não tumorigênica MCF-10A

quanto nas linhagens tumorais MDA-MB-231 e MCF-7, com maior expressão nesta última. A expressão de sindecan-4 no epitélio mamário humano normal já havia sido reportada por Mundhenke e colaboradores (2002). No mesmo trabalho, eles também identificaram a expressão do sindecan-4 na linhagem MCF-7, que também confirmamos no lote dessa linhagem em uso em nosso laboratório.

Lendorf e colaboradores (2011) demonstraram, em amostras clínicas de tumores de mama, uma correlação positiva entre o grau de expressão de sindecan-1 e o tipo histológico do tumor, com marcação positiva em tumores de elevado grau de malignidade. Já a expressão de SDC4 tem sido correlacionada a bons prognósticos, em pacientes de câncer de mama estrógeno-dependentes (Lendorf et al, 2011). Porém, existe um relato prévio que demonstrou a correlação da elevada expressão de ambos SDC-1 e SDC-4 com elevadas taxas de proliferação de tumores hormônio-independentes (Baba et al, 2006), mas apenas SDC-1 teve valor preditivo para maus prognósticos de pacientes. Em contrapartida, a internalização do SCD-2 e SDC-4 parece estar associada com o aumento da capacidade migratória de células tumorais da mama (Tsonis *et al*, 2013; Theocharis *et al*, 2015).

A isoforma SDC-1 é de fato a mais estudada no contexto do câncer de mama e a literatura sobre possíveis mecanismos envolvidos no papel da isoforma SDC-4 é bastante escassa (revisto por Theocharis et al, 2015). A função celular mais estudada para o SDC-4 é a estabilização de adesões focais, como co-receptor de integrinas, principalmente da integrina  $\alpha 5 \beta 1$  favorecendo uma adesão firme, na maioria das células analisadas (Woods e Couchman, 1994). De fato, em um trabalho envolvendo a linhagem invasiva MDA-MB-231 (Lim et al, 2015), a exposição a sulfatos de heparana e heparina exógenos levou ao aumento do espalhamento celular, aumento do número de adesões focais e junções aderentes, além de reduzida degradação da matriz e invasão, sendo que um perfil semelhante foi obtido com a indução do aumento de expressão de SDC-4.

Uma segunda importante propriedade dos sindecans é a capacidade de regular a atividade de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (Afratis et al, 2017). A formação de complexos entre sindecans, fatores de crescimento, RTKs de alta afinidade e integrinas, no plano da membrana plasmática, pode afetar a duração da resposta a mitógenos e alterar o comportamento adesivo e migratório celular. Assim, SDC-1 e SDC-4 foram descritos recentemente como essenciais na resposta migratória induzida pela ativação de HER2 e EGFR, respectivamente, em células epiteliais, em um processo dependente das integrinas  $\alpha 6 \beta 4$  primariamente, com cooperação da integrina  $\alpha 3 \beta 1$  ligada ao seu substrato laminina-5

(Wang et al, 2014 e 2015), dados que exemplificam o papel da adesão celular na regulação da resposta a fatores que estimulam proliferação e migração celular.

No entanto, as primeiras evidências da participação de HSPGs na resposta efetiva a fatores de crescimento aos seus RTKs surgiram de estudos acerca do fator FGF-2 (Yayon et al, 1991), que atua principalmente através de seu receptor de alta afinidade FGFR1. Desde então, SDC-1 e SDC-4 têm sido identificados como os principais HSPGs que cooperam com este FGFR1 na sinalização estimulada por FGF-2, principalmente em células endoteliais e fibroblastos, mas um evento já demonstrado também na linhagem MCF-7 (Mundhenke et al, 2002). A expressão aumentada de FGFR-1 em células tumorais mamárias já foi descrita anteriormente, assim como a expressão reduzida desse receptor em células tumorais benignas e células intersticiais (Yoshimura *et al*, 1998). Em nossas mãos, a linhagem MDA-MB-231 apresentou a maior expressão de FGFR1 entre as linhagens avaliadas, enquanto as linhagens MCF-10A e MCF-7 apresentaram níveis similares e bastante reduzidos deste receptor.

A elevada expressão de FGFR-1 nas células MDA-MB-231 já havia sido relatada em alguns trabalhos, como por Cailliau e colaboradores (Cailliau *et al*, 2005) e, mais recentemente, um grupo demonstrou que o silenciamento da expressão de FGFR-1 nesta linhagem foi capaz de reduzir significativamente a migração celular (Cheng *et al*, 2015). Quanto à linhagem MCF-7, a baixa expressão de FGFR-1 também já havia sido descrita (Johnston *et al*, 1995; Turner *et al*, 2010). Sugerimos que a linhagem MDA-MB-231 poderá se constituir, nas próximas etapas de nossa investigação, em um bom modelo tumoral para verificarmos os efeitos do fragmento NTSP-1 na modulação da sinalização mediada por FGFR-1, uma vez que já evidenciamos que este RTK tem sua atividade potencializada por NTSP-1 em células endoteliais, como discutiremos mais adiante.

Já o receptor RTK angiogênico VEGFR-2, cuja expressão observamos apenas na linhagem MCF-10A - considerada hiperplásica, porém não tumorigênica – não foi detectada nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, por *western blotting*. No entanto, na literatura encontramos trabalhos que relatam a detecção da expressão de VEGFR-2 na linhagem MDA-MB-231. Timoshenko e colaboradores (2007) demonstraram a expressão do RNA mensageiro de VEGFR-2 nesta linhagem pela técnica de RT-PCR, e a expressão da proteína por imunocitoquímica. No mesmo trabalho, a detecção da expressão de VEGFR-2 na linhagem MCF-7 não foi observada. A marcação positiva para VEGF-A, VEGFR-1 e VEGFR-2 também já foi observada em células epiteliais mamárias normais (Arias-Pulido *et al*, 2012). Estes dados estão em concordância com a nossa detecção da presença de VEGFR-2 na

linhagem não tumorigênica MCF-10A, que é originária de doença fibrocística da mama, uma condição considerada benigna. Tais observações sugerem que o VEGF exerça funções tróficas em eventos fisiológicos variados que transcorram com aumento de massas celulares, sejam elas malignas ou não.

Ao longo do presente trabalho, nossa atenção se voltou de maneira mais importante para uma possível co-participação do domínio N-terminal da TSP-1 na ativação celular mediada pelo EGFR, não apenas por ser este um RTK central para a tumorigênese (Kyriakopoulou *et al*, 2018), conforme foi apresentado na Introdução, mas por este RTK ter sido consistentemente detectado nas três linhagens mamárias e que portanto melhor permitiria traçar possíveis correlações morfo-funcionais entre nossos resultados e o grau de diferenciação epitelial de cada linhagem. Os nossos lotes de linhagens mamárias apresentaram perfis de expressão de EGFR (ou ErbB1/HER1) bastante semelhantes aos frequentemente encontrados na literatura, segundo a qual as linhagens mamárias MCF-10A e MDA-MB-231 expressariam níveis relativamente equiparáveis entre si, porém maiores que os encontrados em lotes da linhagem MCF-7 (Subik *et al* 2010). Apesar da MCF-7 ter sido eventualmente identificada como negativa para a expressão de EGFR (Kao *et al*, 2009), a maioria dos trabalhos apontam uma expressão de moderada à fraca como característica de células tumorais de perfil luminal (Saunus *et al*, 2018; Liu *et al*, 2019).

A associação entre trombospondina-1 e EGF já foi demonstrada algumas vezes na literatura. Em células epiteliais do timo, o EGF é capaz de estimular a síntese de TSP-1, a qual atua como mediadora da diferenciação neurotípica dessas células (Vacca *et al*, 1999). Da mesma forma, o EGF também foi capaz de estimular a expressão de TSP-1 em células de carcinoma hepatocelular (Okamoto *et al*, 2002), e em células de carcinoma da tireoide (Soula-Rothhut *et al*, 2005). Ainda, a sinalização iniciada pelo heterodímero EGFR/HER-2 após a ligação com EGF está intimamente relacionada a atuação da TSP-1 na disfunção da barreira endotelial e abertura da via paracelular no endotélio vascular pulmonar (Liu *et al*, 2009; Garg *et al*; 2011). Nesses trabalhos, porém, não foi dada nenhuma atenção ao possível papel da região N-terminal da TSP-1 nessas propriedades.

A fim de testar a hipótese de que a presença do domínio NTSP-1 poderia afetar a resposta de células epiteliais mamárias ao EGFR, realizamos inicialmente análises funcionais de atividades celulares consideradas relevantes para a progressão tumoral, como a migração, proliferação e morte celulares. Em nossas análises da migração celular, buscamos examinar tanto o perfil de migração coletiva quanto individual das três linhagens submetidas aos

diferentes tratamentos. Assim, utilizamos o ensaio de lesão da monocamada (*wound healing*), o qual é uma conhecida metodologia utilizada para avaliar a migração coletiva (Nobes & Hall, 1999; Poujade *et al*, 2007; Vedula *et al*, 2013; Svensson *et al*, 2018), enquanto os movimentos celulares espontâneos e individuais foram avaliados por meio da análise das trajetórias celulares em tempo real, por videomicroscopia. O estudo da migração celular em nível individual é particularmente importante e não deve ser negligenciado na busca da compreensão de processos biológicos que são possivelmente levados à cabo por uma pequena porção de células de uma população, como é o caso da metástase tumoral (Wolf *et al*, 2003; Islam & Resat, 2017). No contexto de células individuais, a migração celular pode ser classificada como randômica, quando se refere a capacidade intrínseca das células migrarem, frequentemente denominada motilidade celular ou quimiotaxise (Szatmary & Nossal, 2017), ou como migração celular direcionada ou quimiotática, que ocorre quando as células migram em direção a um gradiente de estímulos químicos ou físicos (Szatmary & Nossal, 2017; Dang & Gautreau, 2018). Em geral, a direcionalidade da movimentação celular difere entre linhagens normais e tumorais, sendo menos direcionado e mais aleatório nas tumorais (Weiger *et al*, 2013).

O estímulo migratório do EGF em ensaios de lesão de monocamada já foi descrito na literatura para todas as linhagens (Vergara *et al*, 2011; Mezi *et al*, 2012; Keinan *et al*, 2014; Kim *et al*, 2016). Da mesma forma, a capacidade da TSP-1 estimular a migração da linhagem MDA-MB-231 também já foi descrita e associada ao domínio N-terminal (Martin-Manso *et al*, 2011). No entanto, em nossos ensaios, apesar de vislumbrarmos tendências de maior migração quando as células são submetidas aos diferentes tratamentos (NTSP-1 ou EGF isoladamente, ou em tratamento combinado) não conseguimos determinar variações estatisticamente significativas entre eles, em comparação à células nos controles não tratados. Existe a possibilidade da mitomicina C ter influenciado o fechamento da monocamada, uma vez que o retardo na migração de fibroblastos da córnea tratados com mitomicina C já foi relatado (Chen *et al*, 2012). Por outro lado, a sua utilização já foi descrita por não alterar a motilidade celular de células epiteliais da córnea (Castro-Muñozledo *et al*, 2017). Além disso – e talvez mais importante – as diferenças entre nossos protocolos e aqueles mais frequentemente utilizados na literatura, no qual ressaltamos o pré-tratamento das células com NSTP-1 (um procedimento eventualmente definido como “priming”, que prepara uma memória prévia ou “imprint” para a resposta celular ao estímulo subsequente; Noronha *et al*, 2019) bem como as concentrações do EGF, variáveis concentrações de soro fetal bovino,

dentre outros fatores, possam ter influenciado nossos resultados nesse tipo de ensaio.

Dadas as tendências observadas com as diferentes linhagens no ensaio de lesão de monocamada, mas que foram inconclusivas para as finalidades do estudo funcional, decidimos realizar o monitoramento por videomicroscopia com coleta de parâmetros individuais de migração e tactismo celulares, que pudessem ser quantificados com maior precisão. Weiger e colaboradores (2013) demonstraram diferenças migratórias entre a linhagem MCF-10A não tumorigênica que utilizamos e uma família de linhagens tumorais dela derivadas por manipulações genéticas e subclonagens, as quais compuseram um modelo bem caracterizado de progressão de câncer de mama humano. Em suas análises, a MCF-10A parental exibiu padrões homogêneos de migração que contrastaram com padrões muito heterogêneos de velocidade e direcionalidade apresentados pelas linhagens-filhas “tumorais”, sugerindo assim que a direcionalidade é um indicador do potencial tumorigênico.

De modo semelhante ao descrito por Weiger e colaboradores (2013), os vídeos obtidos nos ensaios de monitoramento em tempo real demonstraram que a linhagem não tumorigênica MCF-10A, nas condições tratadas com EGF ou e NTSP-1/EGF apresentou as maiores *velocidades de migração*, que pareceram depender apenas de EGF, uma vez que NTSP-1 sozinho não alterou este parâmetro. Diferenças expressivas entre os três tratamentos foram observadas nas *trajetórias celulares*: enquanto o tratamento com EGF isoladamente causou um movimento “em fase” do grupo de células, com direcionalidade homogênea, nas condições NTSP-1 e NTSP-1/EGF foram observadas trajetórias mais independentes, não direcionadas e randômicas. Esta observação sugere que o “priming” das células MCF-10A com o domínio N-terminal da TSP-1 possa estimular uma transição para um perfil com características migratórias tumorais, coerentes com eventos de migração de caráter individual. A migração celular individual randômica, quando acompanhada de movimentos ameboides, tem sido relacionada a importantes transições do citoesqueleto (principalmente dos microfilamentos) e ao aumento da capacidade de invasão independente de proteases (Wolf et al, 2003).

A MCF-10A é descrita por apresentar elevada resposta migratória ao EGF (Simpson *et al*, 2008). Na verdade, esta linhagem também conteria quantidade significativa de células com marcadores de progenitores imaturos (Qu et al, 2015; Daly et al, 2018), que podem ter comportamento migratório e proliferativo mais acentuados que as sub-populações mais diferenciadas. É preciso notar que o perfil de trajetória observada com o tratamento com EGF isoladamente, no qual se observa uma unidirecionalidade acentuada do grupo de células

monitorado, pode ter resultado de mudanças no padrão de expressão de receptores de adesão célula-célula, principalmente no âmbito da superfamília das caderinas, seja através de uma transição de expressão E→N-caderina (Friedl e Mayor, 2017), na qual a diminuição de expressão de E-caderinas leva à predominância de interações mais fracas mediadas pela isoforma N, favorecendo a mobilidade coordenada de “folhetos” celulares, compatíveis com migrações coletivas. Como nosso ensaio não incluiu, no suporte de cultivo, a presença de nenhum estímulo imobilizado que pudesse justificar a atração da maioria das células MCF-10A para a mesma região da área de registro, é possível que a diferenciação de uma célula-líder inicial, migrando exploratoriamente na direção apontada em nosso experimento, tenha sido suficiente para guiar as demais células na mesma direção, através de interações célula-célula favorecidas pelo tratamento com EGF.

Quando o parâmetro analisado foi a *distância acumulada* pelas células MCF-10A em migração, foi observado um real efeito potencializador no tratamento combinado NTSP-1/EGF. Este pode ser um aspecto relevante para a tumorigênese uma vez que, hipoteticamente, quanto maior a área tecidual explorada por uma célula transformada, maiores as chances de encontrar um escape para partes mais profundas do órgão, ou mesmo para um vaso sanguíneo. Em nossos experimentos, este mesmo parâmetro variou de maneira similar durante o monitoramento da linhagem mamária invasiva MDA-MB-231, o que pode significar ser o aumento da motilidade individual randômica um dos principais efeitos do domínio NTSP-1 em células do epitélio mamário. O perfil migratório da linhagem MDA-MB-231 selvagem já foi descrito como randômico (Barnhouse *et al*, 2018). De forma interessante, a migração induzida por TSP-1 da linhagem MDA-MB-231 foi inibida por sFRP-1 (*secreted frizzled-related protein-1*), um antagonista de Wnt, ao se ligar ao domínio N-terminal da TSP-1, em uma interação que envolveu a integrina  $\alpha3\beta1$  tumoral (Martin-Manso *et al*, 2011).

Células MCF-7, quando tratadas com EGF e NTSP-1/EGF, apresentaram aumento significativo da velocidade de migração apenas em relação ao tratamento com NTSP-1 (este não diferiu do controle não tratado). Observamos uma clara tendência de maior distância acumulada quando células MCF-7 receberam o tratamento combinado NTSP-1/EGF, embora não tenhamos observado diferenças estatisticamente significativas, como foi o caso deste parâmetro para as linhagens MCF-10A e MDA-MB-231. A linhagem MCF-7 parental, que é a disponível em nosso laboratório, foi caracterizada como pouco migratória e não invasiva (Comsa *et al*, 2015), o que pode parcialmente justificar seu comportamento migratório usualmente pouco exuberante, mesmo quando ativada por fatores de crescimento.

A migração tumoral pode se dar tanto por ação de proteases quanto por processos mecânicos que dispensam essa classe de enzimas (He e Wirtz, 2014; Caswell e Zech, 2018). Os processos independentes de proteases implicam fortemente em transições dinâmicas dos microfilamentos de actina: voltaremos a este tópico mais adiante, nesta Discussão. Por outro lado, existem relatos na literatura que apontam o domínio N-terminal da TSP-1 como capaz de aumentar a expressão de MMP-2 e MMP-9 e TIMP-2 (inibidor tecidual de metaloproteinase-2) em células endoteliais (Donnini et al, 2004). A TSP-1 íntegra também se encontra relacionada com o aumento da atividade MMP-9 em células endoteliais e câncer gástrico (Qian *et al*, 1997; Albo *et al*, 2002). A TSP-1 estromal também é capaz de estimular o aumento de MMP-9 na linhagem MDA-MB-231 (Wang *et al*, 2002). Assim, nós realizamos análises zimográficas dos meios condicionados obtidos a partir dos tratamentos em estudo, para as três linhagens mamárias, mas não evidenciamos modificação significativa dessas metaloproteases (dados não mostrados). No entanto, como temos evidências confirmadas de que um fragmento N-terminal de 18 KDa estimula a secreção de cisteíno-proteases em células endoteliais (Vardiero, 2012 e manuscrito em preparação), além do papel já descrito da TSP-1 na invasão de tumores de mama através do aumento do sistema plasminogênio/plasmina (serino-protease) (Albo *et al*, 1997; Albo *et al*, 1999), planejamos investigar essas classes de proteases, bem como verificar indícios de comportamento invasivo independente de proteases, na continuidade deste trabalho.

É importante ressaltar que a dinâmica relação entre proliferação e morte celular também recebeu nossa atenção nos estudos sobre migração celular, dada a longa duração dos ensaios e relativa escassez de fatores tróficos, imposta pela necessidade de retirar o soro fetal da composição dos meios, ao longo dos experimentos. Na literatura, o estímulo com EGF se encontra relacionado ao aumento de proliferação da linhagem MCF-10A (Martin *et al*, 2003; McIntosh *et al*, 2010; Miyake & Parsons, 2012). No entanto, apesar de observamos tendências de aumento da proliferação nos tratamentos com EGF e NTSP-1/EGF, não houve diferenças significativas. Novamente, supomos que tais diferenças possam ser atribuídas a diferenças nos protocolos e, principalmente, aos baixos níveis e até eventual depleção do soro em praticamente todos os nossos ensaios. Para a linhagem MDA-MB-231, também não verificamos mudanças no padrão proliferativo. Embora a capacidade do EGF estimular a proliferação nessa linhagem seja caracterizada na literatura (Jo *et al*, 2007; Hopkins *et al*, 2016), existem também relato da ausência de efeito do EGF (Osborne *et al*, 1980). Já o aumento da proliferação na presença de EGF na linhagem MCF-7 também foi descrito

(Nagashima *et al*, 2007; Miyake & Parsons, 2012; Herrero *et al*, 2016). Observamos uma diferença expressiva de estímulo proliferativo com o tratamento combinado NTSP-1/EGF após 48 horas de monitoramento da migração celular. No entanto, no tempo mais longo (72h), esse estímulo não foi diferente do observado quando as células MCF-7 foram tratadas apenas com EGF. Não observamos para nenhuma das três linhagens alterações significativas do número de eventos de morte celular, entre os distintos tratamentos nos tempos analisados, com a ressalva de que nos limitamos a quantificar mortes supostamente causadas por desaderência (*anoikis*). Para a validação desse resultado e bem como investigarmos possíveis diferenças entre distintos tipos de morte celular, iremos utilizar metodologias mais específicas (ex: citometria de fluxo para anexina e iodeto de propídeo). No entanto, essas análises preliminares nos deram segurança suficiente de que os tratamentos não produziram impacto significativo na dinâmica homeostase entre proliferação e morte celular, nos períodos empregados nos ensaios funcionais.

Em continuidade, julgamos fundamental investigar se os tratamentos aqui estudados seriam capazes de impactar a morfogênese em três dimensões das linhagens MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231. As culturas celulares tridimensionais permitem o desenvolvimento de uma rede complexa de contatos célula-célula e célula-MEC. Ao longo da formação de esferoides, eles são expostos a gradientes metabólico, de pH, oxigênio e proliferativo, causando estratificação da estrutura, o que se assemelha aos estágios avasculares de tumores sólidos e micrometástases, mimetizando o ambiente *in vivo* (Froehlich *et al*, 2016). Os sistemas tridimensionais de cultura celular do epitélio mamário inspiraram o surgimento de protocolos de cultura e expansão por longos períodos de organóides epiteliais, os quais podem ser estabelecidos tanto a partir de doadores saudáveis quanto de não saudáveis, como por exemplo, que apresentem algum tipo de câncer. Os organóides recapitulam a arquitetura epitelial e a fisiologia dos órgãos a partir dos quais foram isolados (Sachs *et al*, 2018). No caso dos organóides mamários, já foi visto que os retirados de tecido mamário normal são muito bem organizados e apresentam fenótipo cístico, enquanto os tumorais podem ser sólidos de diferentes tamanhos, císticos, contendo estruturas em cachos, sendo alguns completamente desagregados e desprovidos de E-caderina.

Conforme já mencionamos na descrição do modelo (Fig. 34), nossa classificação morfológica da organização de células mamárias em ambiente 3D foi baseada no artigo de Kenny e colaboradores (2007), porém com a proposta de inclusão de duas novas categorias: “cordão de contas” e células dispersas. No entanto, outras classificações foram propostas na

literatura, como a criada por Froehlich e colaboradores (2016) com base nas estruturas formadas pelas linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e SK-BR-3 (linhagem tumoral mamária ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, HER2<sup>+</sup>, Tabela 2) foram elas: (a) esferoide; (b) múltiplos esferoides pequenos; (c) agregado compacto; (d) agregado solto e (e) suspensão celular única. De acordo com as características apresentadas neste artigo, pudemos observar que as nossas duas categorias (“cordão de contas” e células dispersas) seriam equivalentes morfológicamente à subclasse suspensão celular única. Naquele trabalho, a padronização da cultura 3D com diferentes protocolos demonstrou que a linhagem SK-BR-3, que é definida como altamente invasiva, não foi capaz de formar esferoides como as demais linhagens, e foi classificada como agregado solto ou suspensão celular única. Tal dado corrobora nossa hipótese de que as estruturas “cordão de contas” formadas pela MCF-7 quando submetidas ao tratamento NTSP-1/EGF - e em quantidades significativamente maiores que as observadas quando NTSP-1 e EGF foram usados isoladamente - seriam coerentes com a aquisição de padrões morfológicos mais invasivos. Ainda, considerando que a duração do nosso ensaio foi de apenas quatro dias, é possível supor que a morfologia “cordão de contas” possa anteceder fenótipos “em cachos” ou estrelados, em uma progressão semelhante à sugerida pelo grupo de Mina Bissell (Kenny et al, 2007). Dessa forma, para que possamos avaliar esta possibilidade, é necessária a realização de ensaios 3D com maior duração (10-15 dias).

Foi interessante constatar que o tratamento da linhagem MCF-10A com NTSP-1 causou um comprometimento do fenótipo polarizado tão relevante quanto o induzido pelo fator EGF, sugerindo que o acúmulo deste domínio da TSP-1 no microambiente do epitélio mamário poderia perturbar a organização tecidual, mesmo em condições benignas da glândula, bastante frequentes na população geral (Guray, e Sahin, 2006). A possibilidade de lesões benignas aumentarem o risco para surgimento de um câncer na mama é um tema bastante discutido na literatura (Dyrstad et al, 2015).

Diante das evidências obtidas nos ensaios funcionais, de que em algumas situações o tratamento conjunto NTSP-1/EGF é capaz de gerar respostas celulares que diferem das observadas quando cada mediador era investigado isoladamente, decidimos verificar se o tratamento poderia afetar alguma via central de sinalização “downstream” à ativação do receptor primário EGFR. Em um primeiro momento, nossa atenção recaiu sobre a via **Ras→Raf→MEK→ERK1/2** (ou resumidamente, Ras→ERK), que compõem a cascata de proteína quinases ativadas por mitógenos (MAPK) mais estudada na biologia do câncer (Liu et al, 2018). Uma vez ativada, ERK1/2 possui múltiplos alvos, incluindo fatores de

transcrição (Fos, Myc, Elk1, Ets1/2, entre outros) no núcleo, para onde ERK1/2 pode ser translocada, resultando em desfechos pró-tumorais como o estímulo à proliferação celular e aumento da sobrevivência. Apesar das vias de MAPKs também incluírem as cascatas que levam à ativação de p38 MAPK e JNK e ERK5, as mutações oncogênicas mais prevalentes se concentram nos componentes positivos da via canônica Ras→ERK (Katz et al, 2007), ou em alguns reguladores negativos, como as PTPs e MAP-quinase fosfatases (MKPs or DUSPs) (Nunes-Xavier *et al*, 2013; Kidger e Keyse, 2016).

Várias mutações oncogênicas foram identificadas em Ras→ERK, que resultam em hiperativação constitutiva da via, levando ao aumento da proliferação celular, quimio e radioresistência. Mutações em *RAS* ( $\cong$  25% dos tumores humanos) e *RAF* (entre 6 e 10% dos tumores humanos), com consequente hiperativação de MEK (cujos genes também podem sofrer mutações próprias e produzirem efeitos independentes de mutações em *RAS/RAF*) foram identificadas em melanoma, câncer colorretal, tumores de cabeça e pescoço, carcinoma de tireóide, adenocarcinomas de pulmão, pâncreas, gástrico e cervical, dentre os que portam as mutações mais prevalentes (Hobbs et al, 2016; Yager e Corcoran, 2019).

Porém, mutações oncogênicas em *RAS*, *RAF* e *MEK* são consideradas extremamente raras em tumores malignos da mama humana: menos de 2% apresentaram mutações nesses genes, apesar de 50% desses tumores apresentarem a via Ras→ERK1/2 bastante ativa ou mesmo hiperativada, como no caso dos tumores triplo negativos (TNBC) e nos tumores do tipo basal (Cancer Genome Atlas Network, 2012; Cerami et al., 2012; Giltnane e Balko, 2014). A ativação exacerbada da via Ras→ERK tem sido geralmente atribuída ao aumento da atividade dos receptores RTK situados a montante, geralmente pertencentes à família ErbB, atualmente considerados os mais importantes para a proliferação e sobrevivência de tumores agressivos da mama. São raras, também nestes receptores, mutações que levam à ativação constitutiva de seus domínios quinase citoplasmáticos. A maior atividade deles em células tumorais mamárias agressivas tem sido atribuída à amplificação de cópias de seus genes codificadores, sendo frequente a maior expressão de EGFR em células com perfil TNBC (30-52%) e tipo basal (60%) (Foulkes *et al*, 2010).

Também para células tumorais mamárias que expressam receptores hormonais ER e PR, as menos agressivas, a via Ras→ERK tem sido implicada em aspectos de grande relevância terapêutica, já que de 25 a 30% das mulheres em terapia anti-hormonal apresentam recidivas clínicas em razão do surgimento de resistência ao tratamento (Haque e Desai, 2019). A ocorrência de resistência à terapia anti-hormonal tem sido parcialmente atribuída a uma

maior atividade da via Ras→ERK, mediada por fatores de crescimento, em um processo no qual receptores ErbB são capazes de aumentar a atividade do receptor de estrogênio ER- $\alpha$  por fosforilação, em ausência de estrógeno (Bunone et al, 1996; Kurokawa e Arteaga, 2001). ER- $\alpha$  regula muitas funções celulares tanto pela via genômica, atuando diretamente como fator de transcrição no núcleo, quanto pela via não genômica, interagindo com outros receptores como EGFR e IGF-IR (receptor de fator de crescimento tipo insulina I): na verdade, ER- $\alpha$  também é capaz de transativar receptores ErbB diretamente, aumentando a atividade da cascata Ras/ERK, além de ativar a via de PI3K-Akt, em um “loop” que contribui reciprocamente para a resistência ao tamoxifeno (Britton et al, 2006; Song *et al*, 2007; Skandalis *et al*, 2014; Moerkens et al, 2014; Afratis *et al*, 2017).

Assim, evidências se acumulam sobre a grande importância e o potencial impacto clínico-terapêutico da via Ras→ERK1/2, tanto para tumores de mama hormônio-dependentes, quanto para aqueles mais agressivos, como TNBC e os tipos basais. Considerando ainda a excepcional estabilidade genética dos componentes desta via nos tumores mamários, nos quais raramente esses genes têm sido associados a mutações oncogênicas, ganha peso a hipótese de que fatores do microambiente tumoral, em contextos específicos a cada subtipo de neoplasia mamária, representem o diferencial para que a via Ras→ERK1/2 contribua para a morbidade observada nos cânceres de mama.

O sítio Y<sup>1068</sup> do receptor EGFR, uma vez fosforilado é capaz de se associar com a proteína adaptadora Grb2 (portadora do domínio SH2) a qual possibilita, em contextos sequência-específicos e através do recrutamento de outras proteínas (principalmente SOS), para o plano da membrana plasmática, levando à ativação da cascata Raf→MEK→ERK1/2 (revisto por Roskoski, 2014).

Atualmente, um aspecto fundamental a ser considerado no estudo de vias de sinalização iniciadas em RTKs é a relevância biológica do processo endocítico, iniciado quando o receptor se liga com forte afinidade ao seu efetor (Horowitz e Seerapu, 2012; Bakker et al, 2017). Como descrito na Introdução, na ausência do ligante, a concentração de receptores de EGF na membrana plasmática, majoritariamente na forma monomérica, permanece relativamente constante, já que a reciclagem do receptor na forma não ativada é lenta (Dunn et al, 1986; Carpenter e Cohen 1976; Stoscheck e Carpenter 1984).

A ligação do EGF ao receptor EGFR pode iniciar um rápido processo de endocitose, com desfechos variados quanto à persistência da sinalização, que pode ser rastreada através da via Ras→ERK1/2, considerada um “marca-passo” de RTKs, além de atuar como um nó

(“hub”) distribuidor de sinais a diversas vias, em interação cruzada com outros receptores (Bakker et al, 2017). É preciso ressaltar que a atividade do EGFR é continuamente controlada por ação de fosfatases, seja na membrana plasmática pela fosfatase RPTP $\kappa$  (Xu et al, 2005), ou pela fosfatase PTP1b, residente no retículo endoplasmático e que desfosforila moléculas de EGFR associadas aos endossomas tardios (Haj et al, 2002; Kleiman et al, 2011). As evidências acumuladas na última década mostram que é nos *endossomas primários* que o EGFR ativo disporia de um sítio privilegiado, a partir do qual sinalizaria de maneira intensa, ao abrigo da ação dessas fosfatases, sendo a via Ras→ERK1/2 a mais rapidamente mobilizada (Bakker et al, 2017).

Ao investigarmos o perfil de ativação de ERK1/2 nas três linhagens mamárias, quando realizados os três tratamentos em estudo neste trabalho, conseguimos observar apenas na linhagem MCF-7 uma forte tendência de potencialização da via de ERK1/2 na condição tratada com NTSP-1/EGF, quando a quantidade de p-ERK1/2 era correlacionada com a quantidade total de EGFR disponível para sinalização, ao final dos tratamentos. Ainda que a importante variabilidade dessas quantificações entre os experimentos tenha comprometido a verificação de significância estatística entre esta condição e o tratamento com EGF isoladamente, o fato do EGFR total no tratamento combinado NTSP-1/EGF quase se extinguir em algumas amostras (**Fig. 38**) foi fortemente sugestivo de uma hiperativação de EGFR com conseqüente potencialização desta via de MAPK.

A possibilidade de uma maior persistência da atividade de ERK1/2 nas células MCF-7 submetidas ao estímulo conjunto NTSP-1/EGF colocou em perspectiva outras evidências experimentais de nosso trabalho, previamente discutidas. Por exemplo, este dado corrobora o estímulo à proliferação celular, observado com a linhagem MCF-7 sob tratamento conjunto (**Fig. 32**), evento certamente coerente com a sinalização sustentada da via Ras→ERK1/2. Além disso, em um modelo de células de carcinoma renal, Champion e colegas (2018) demonstraram que o aumento da migração celular randômica e não orientada se correlacionou positivamente com a permanência prolongada do EGFR em endossomas Rab5<sup>+</sup> e com a sinalização sustentada a partir desse RTK: relembramos que esse tipo de comportamento migratório foi bastante exibido por células MCF-7 tratadas com NTSP-1 (principalmente quando combinado ao estímulo do EGF), no curso de nossos ensaios de monitoramento de migração individual por videomicroscopia (**Fig. 29**).

Desta maneira, em nosso contexto experimental com as células MCF-7, se tornou fundamental buscar verificar se ocorria uma maior associação de EGFR a vesículas positivas

para proteína Rab5a, nas células MCF-7 submetidas ao tratamento combinado NTSP-1/EGF. No entanto, como não observamos diferenças estatisticamente significativas da potencialização da ativação de ERK1/2 em apenas 10 minutos, nas análises morfológicas por microscopia confocal decidimos ampliar os tempos de tratamento até 60 minutos. Adotando esta estratégia, foi possível confirmar que o “priming” das células MCF-7 com o domínio NTSP-1 antes da ativação celular com EGF aumentou significativamente o tempo de residência do EGFR ativado nos endossomas primários Rab5a<sup>+</sup>. De forma interessante, observamos que o “priming” de 35 minutos com NTSP-1 foi suficiente para causar uma expressiva redistribuição de vesículas Rab5a<sup>+</sup> no citosol das células MCF-7, sugestiva da dinamização do processo endocítico. Esta observação é coerente com o fato do NTSP-1 ser o domínio pelo qual a molécula íntegra é endocitada e reciclada, principalmente por ação do receptor LRP-1 em cooperação com HSPGs da superfície celular (Mikhailenko et al, 1997; Wang et al, 2002). Considerando que LRP-1 foi implicada no estímulo à invasividade tumoral através da ativação da via Ras→ERK (Langlois et al, 2010), é possível que a potencialização desta via pelo tratamento combinado NTSP-1/EGF envolva a participação de LRP-1 na membrana plasmática, em uma interação possível entre receptores RTK e receptores da TSP-1, particularmente os que possuem afinidade com seu domínio N-terminal.

Desenhemos alguns experimentos para explorar preliminarmente o efeito do peptídeo TSP Hep II em alguns ensaios funcionais com a linhagem MCF-7. Esse peptídeo corresponde à sequência de aminoácidos 78 à 94 da TSP-1 e é um dos motivos reconhecidos pelo HSPG sindecan-4, possuindo atividades pró-angiogênicas (Nunes et al, 2008). Apesar de termos observado uma tendência de maior sinalização da via de ERK com o tratamento combinado TSP HepII/EGF, no estágio atual de nossas abordagens ainda não foi possível concluir que o sindecan-4 esteja envolvido no efeito potencializador observado com o NTSP-1.

Já foi descrito que a sinalização emitida pelo EGFR se encontra associada à formação dos complexos EGFR/SDC-4/ integrina  $\alpha 6\beta 4$  (Wang *et al*, 2014) e EGFR/SDC-4/integrina  $\alpha 3\beta 1$  (Wang *et al*, 2015). Considerando que a linhagem MCF-7 apresenta elevada expressão de SDC-4 (Nunes *et al*, 2008), é possível que a ligação do NTSP-1 ao SDC-4 contribua para a transativação do EGFR, talvez até mesmo com co-participação de LRP-1, já mencionado. A presença de SDC-4 foi ainda necessária para ativação de integrinas durante a quimiocinese induzida pelo EGF (Wang *et al*, 2014), reforçando a hipótese da formação de uma plataforma de sinalização [EGFR/SDC-4/integrina (?)/outros receptores], o que iremos investigar nas próximas etapas.

Estimamos que a busca dos mecanismos pelos quais o domínio NTSP-1 exerce os efeitos observados neste trabalho sobre as linhagens MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 se revelará uma tarefa complexa, dada as diferenças de ações evidenciadas para cada tipo celular. Dadas as diferenças que encontramos na expressão dos diversos receptores para este domínio, já descritos na literatura (Tabela 3), a elucidação de mecanismos deverá ser tratada de maneira particular para cada linhagem, a fim de compreendermos o papel de cada receptor. Por exemplo, o domínio NTSP-1 exibiu efeitos potencializadores de um fator de crescimento nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, ao passo que exibiu efeitos isoladamente sobre a linhagem considerada benigna (MCF-10A), mas sempre em ensaios funcionais distintos.

Ainda assim, o trabalho realizado até aqui abre algumas avenidas bastante excitantes para serem exploradas nas próximas etapas deste estudo:

- a) Um aspecto relevante a ser explorado é a expressão do receptor de estrogênio pela linhagem MCF-7. Não podemos excluir os efeitos do estradiol presente no soro fetal bovino, mesmo quando este estava presente em pequenas quantidades nos ensaios. Já nos experimentos em 3D, o estradiol faz parte do meio, como ingrediente expressamente adicionado. Assim, é necessário investigar a ativação da via Ras→ERK na presença de doses variáveis e controladas de estradiol, nas células MCF-7, dada a transativação entre as duas vias (hormonal x MAPK) já discutida aqui (pg. 115);
- b) Um trabalho recente mostrou que a ativação de vias rápidas e lentas da endocitose induzida pela ativação de EGFR, além de ser sensível às concentrações de EGF *in vitro*, também ocorre *in vivo* (Pinilla-Macua *et al*, 2017). Seria interessante verificar, em nosso modelo, como se correlacionariam entre si a persistência da via Ras→ERK e a localização do receptor em endossomas primários, em função de uma curva de variação da concentração de EGF que contemple da faixa picomolar à nanomolar de concentração de EGF. Apesar de existirem diferenças entre o processo endocítico de EGFR e seu parceiro facultativo HER2 (Caldieri *et al*, 2018), seria interessante avaliar a resposta de uma linhagem tumoral mamária como a BT-474 (subtipo luminal B: ER+, PR+/-, HER2+, Tabela 2), também disponível em nosso laboratório, ao domínio NTSP-1, a fim de investigar possíveis efeitos do domínio N-terminal da TSP-1 na sinalização mediada pelo heterodímero EGFR/ErbB2;
- c) Com relação à participação de integrinas neste processo, apesar de não ter sido possível propor as estratégias mais adequadas para explorar a participação dessa crucial

superfamília de receptores de adesão para a biologia do câncer, nossos dados já permitem estimar, por exemplo, que a integrina  $\alpha 9\beta 1$ , que não é expressa na linhagem MCF-7, não deva estar envolvida na potencialização da via Ras→ERK1/2, ficando em aberto a possibilidade de haver participação de  $\alpha 3\beta 1$  e  $\alpha 4\beta 1$ ;

- d) O papel de TSP-1 como um modulador das adesões focais não foi explorado neste trabalho. A TSP-1, através de uma sequência presente no seu domínio HBD (TSP Hep I), estimula a desorganização das adesões focais e migração celular, de maneira dependente da ativação de FAK, ERK e PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase) (Orr *et al*, 2002; Orr *et al*, 2004). Por outro lado, sabe-se que processos de migração celular independentes de secreção de proteases transcorre com dramática re-orientação dos microfilamentos de actina, de maneira a gerar a força tensional e mecânica para forçar a passagem da célula pelos meandros da matriz extracelular. Recentemente, um novo eixo de sinalização YAP/TSP-1/FAK foi descrito para o câncer de mama. Porém, ao contrário da atividade desestabilizadora de adesões focais, descrita anteriormente para TSP-1 e P-FAK, a sinalização via YAP promove a formação de adesões focais e a fosforilação de FAK (Tyr397) mediante a expressão de TSP-1, o que promove a migração e invasão celular (Shen *et al*, 2018). Logo, o tema ainda é controverso, deixando margem para ser explorado em contextos relevantes e ainda não abordados, incluindo o papel de estrógenos e fatores de crescimento.

Yee e colaboradores investigaram o efeito *in vivo* da TSP-1 na metástase do câncer de mama e demonstraram que a sua presença no microambiente tumoral resulta na diminuição do tumor primário e da angiogênese, porém aumenta o número de metástases para o pulmão (Yee *et al*, 2009). Deve ser ressaltado que diversas proteases cruciais para o processo angiogênico e para a progressão tumoral - plasmina, trombina e catepsinas, dentre as mais importantes – geram rapidamente fragmentos N-terminais da TSP-1 biologicamente ativos (Lawler e Slayter, 1981; Morandi *et al*, 1994; Bonnefoy e Legrand, 2000), tornando factível a hipótese de que tais fragmentos N-terminais se acumulem no microambiente tumoral e ali exerçam efeitos clinicamente relevantes sobre células endoteliais e tumorais, que contribuam para a compreensão do papel controverso da TSP-1 no câncer. Reforçando bastante esta hipótese, foi demonstrado recentemente, por um modelo computacional preditivo, que a maior parte da TSP-1 presente no tecido tumoral mamário provavelmente se encontra na forma clivada (Rohrs *et al*, 2016).

Com essas premissas em foco, estimamos que os dados apresentados e discutidos na presente tese de Doutorado representam uma importante corroboração da hipótese inicial proposta, a de que o domínio N-terminal da TSP-1, pró-angiogênico e naturalmente produzido por diversas proteases relevantes para a progressão tumoral (Morandi, 2009) também seja, possivelmente, o domínio funcional da trombospondina-1 responsável pelo seu papel pró-tumoral, nas neoplasias da mama.

## **Parte II- Papel do domínio NTSP-1 da Trombospondina-1 na sinalização FGF-2/FGFR-1**

Nosso grupo vem caracterizando as propriedades angiogênicas do domínio N-terminal da TSP-1, nos últimos anos (Ferrari-do-Outeiro Bernstein, 2002; Nunes et al, 2008). A investigação dos mecanismos celulares envolvidos apontou para a participação do HSPG sindecan-4: demonstramos que este domínio estimula a migração endotelial ao competir com a fibronectina pela ligação ao proteoglicano de heparan sulfato sindecan-4, levando ao relaxamento da adesão celular e ao aumento da tubulogênese. Dois motivos estruturais/funcionais foram identificados: TSP Hep I (sequência aa 15-35) e TSP Hep II (aa 78-94) (Nunes et al, 2008). A associação de TSP Hep I ou TSP Hep II ao estímulo do FGF-2 induziu o aumento da angiogênese in vivo, com características de potencialização da resposta (Dias et al, 2012; Vardiero, 2012). Além disso, o TSP Hep I aumentou a quimiotaxia, tubulogênese e adesão de células formadoras de colônias endoteliais (ECFC) sobre monocamadas de HUVECs. Ainda, a adesão das ECFCs foi associada a interação do TSP Hep I ao sindecan-4 (Dias et al, 2012).

Nesses trabalhos, porém, a possibilidade do processo endocítico ou da via de MAPK estarem implicados no efeito pró-angiogênico não haviam ainda sido explorados. No presente trabalho, abordamos o papel do fragmento NTSP-1, o qual corresponde ao domínio funcional inteiro da TSP-1, que é dez vezes maior que o peptídeo TSP Hep I (Dias et al, 2012). Considerando que já conhecíamos que este domínio também tem como sítio de interação celular (mediada por sindecan-4) a sequência correspondente ao peptídeo bioativo TSP Hep II (Nunes et al, 2008), este também foi incluído no presente estudo.

A formação do complexo ternário FGF-2/sindecan-4/FGFR-1 leva à potencialização

dos efeitos de FGF-2 (Murakami et al, 2008), através da intensificação da sinalização FGF-2 na presença do domínio N-terminal da TSP-1, é provável que os efeitos identificados para a linhagem HMEC-1 também sejam mediados por este proteoglicano. O possível estímulo à endocitose de FGFR1 pelo peptídeo TSP Hep II, sugerido pelas nossas análises por western blotting reforçam a hipótese de que o sindecan-4 seja um componente importante da potencialização da via de FGF-2, em células endoteliais. No entanto, como o fragmento NTSP-1 contém inúmeros motivos estruturais com potencial atividade biológica (Tan et al, 2006), ele também poderia possibilitar a interação com outros receptores, como integrinas, as quais também podem estar mediando essa sinalização através da formação de complexos multiprotéicos com o próprio sindecan-4. Por exemplo, a diminuição da expressão de sindecan-4 em células epiteliais da lente inibiu a sinalização FGF-2, através do bloqueio de ERK1/2 e PI3-K/Akt/mTOR (Qin et al, 2017), o que demonstra a associação entre a sinalização ERK1/2 e o SDC-4.

Em nossos ensaios, o uso de FGF-2 na mesma concentração máxima (50 ng/mL) que as utilizadas em outros ensaios com células, com os fatores EGF e VEGF<sup>165</sup> não pareceu estimular a endocitose e degradação do receptor RTK, fenômenos que se correlacionam com a persistência da atividade de ERK1/2, enquanto o uso do peptídeo TSP Hep II 1 µM foi capaz de reproduzir este evento (Fig. 46). Um aspecto inicial importante a ser levantado para a compreensão destes efeitos aparentemente divergentes é a estequiometria ligante-RTK nesses diferentes sistemas biológicos, já que os três fatores de crescimento diferem em suas massas moleculares e afinidades pelos seus respectivos RTKs específicos e por HSPGs que atuam como co-receptores (Forsten-Williams et al, 2008; Billings e Pacifici, 2015). Além disso, as diferentes massas moleculares (VEGF<sup>165</sup>: 22 KDa; FGF-2: 18 KDa; EGF: 6,4 KDa; NTSP-1: 25-28KDa; TSP Hep II: 2,25 KDa) também correspondem a diferentes raios moleculares, aspecto que pode impor restrições ou permissividade de caráter espacial que afetam a afinidade entre ligantes e receptores/co-receptores (Schmidt e Wittrup, 2009). Além disso, já é conhecido o papel da concentração dos fatores na ativação de diferentes rotas de tráfego vesicular (lentas ou rápidas) que definem o destino dos receptores seja para reciclagem, seja para degradação (Goh e Sorkin, 2013). Essas questões serão abordadas experimentalmente, nas próximas etapas deste trabalho.

Quanto ao processo de internalização que geralmente acompanha a ativação de RTKs, aspecto amplamente discutido nesta tese, é importante ressaltar que a potência de sinalização de complexos ativos FGF-2/FGFR1 parece estar mais fortemente relacionada à translocação

nuclear do par ligante-receptor do que ao tempo de “residência” em endossomas primários. Este evento, que foi descrito há mais de duas décadas (Prudovsky et al, 1994), pode ter importantes aplicações clínico-terapêuticas (Jang et al 2012). Esse aspecto também pode estar relacionado, em células endoteliais, ao processo de internalização do receptor FGFR1 ativado por macropinocitose, uma variação de endocitose que ocorre independente de clatrin, mas com participação de RhoG e Rab5 (Elfenbein et al, 2012). No entanto, são ainda muito escassos, na literatura, dados sobre possíveis correlações entre esse tipo de endocitose e a via de ERK, bem como com o processo de translocação nuclear de RTKs (Goh e Sorkin, 2013).

A expressão de TSP-1 foi relacionada a promoção de fenótipos agressivos através da indução da transição epitélio-mesênquima em melanoma humano (Jayachandran et al, 2014). Além disso, outro grupo também demonstrou que a TSP-1 coopera com o FGF-2 e VEGF/VEGFR-1 no processo de invasão e metástase em melanoma (Borsotti et al, 2015). Do mesmo modo, já foi visto que o FGF-2 é capaz de modular a adesão e migração de células de melanoma através de um mecanismo dependente de sindecan-4 (Chalkiadaki et al, 2009), assim como que HSPGs, como SDC-1 e SDC-4 atuam modulando a ligação de FGF-2 ao seu receptor FGFR-1 em carcinomas mamários (Mundhenke et al, 2002). Assim, estabelecendo uma correlação com a parte tumoral deste trabalho, tais dados sustentam uma de nossas perspectivas: investigar a sinalização e a expressão de marcadores da transição epitélio-mesênquima após a exposição aos fragmentos ou peptídeos derivados do N-terminal, em associação com o FGF-2.

## CONCLUSÕES

- a) Todas as linhagens mamárias selecionadas para o presente estudo (MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231) expressaram receptores que permitem a resposta ao domínio N-terminal da TSP-1 (NTSP-1). No entanto, a importante heterogeneidade (qualitativa e quantitativa) entre os perfis de expressão desses receptores (sindecan-4 e algumas integrinas da sub-família  $\beta$ 1), bem como a pouca ou ausente expressão de RTKs particulares por cada linhagem, sugeriam uma igual diversidade de respostas celulares entre as linhagens, nos ensaios funcionais que se seguiram;
- b) Quando analisamos a migração celular das três linhagens submetidas aos tratamentos-chave de nosso estudo (NTSP-1 ou EGF isoladamente, ou em tratamento combinado NTSP-1/EGF), não foi possível encontrar resposta migratória significativa nas linhagens mamárias, quando o ensaio utilizado foi o de lesão de monocamada (“wound healing”), o qual reflete principalmente a capacidade de migrar coletivamente. Este resultado sugere que NTSP-1 não deve modular o processo de migração coletiva, em microambientes ricos em EGF;
- c) O monitoramento de comportamentos migratórios individuais revelou respostas relevantes para as três linhagens, seja no aumento da velocidade e distância de migração (MCF-10A, em tratamento combinado), da velocidade (MCF-7 em tratamento combinado) ou da distância percorrida (MDA-MB-231) NTSP-1/EGF. Considerando as mudanças observadas nos parâmetros de migração individual das três linhagens mamárias, incluindo uma elevada ocorrência de movimentos randômicos, principalmente nas linhagens malignas, sugerimos que as mudanças fenotípicas estejam relacionadas à diminuição de características diferenciadas, induzidas principalmente pelo tratamento combinado NTSP-1/EGF;
- d) A análise morfológica das duas linhagens capazes de formar organoides 3D (MCF-10A e MCF-7) mostrou que a linhagem MCF-10A tem seu perfil polarizado perturbado pela presença do fragmento NTSP-1, sugerindo que este domínio possa exacerbar o comportamento hiperplásico dessas células benignas. Já a linhagem MCF-7, por influência dos dois mediadores em conjunto (NTSP-1/EGF), transitou para uma morfologia menos agregada. Em ambos os casos, a presença de NTSP-1 pareceu atuar, novamente aqui, para a aquisição de fenótipos menos diferenciados;

- e) Ao estudarmos as linhagens MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 quanto à capacidade de ativação da via de ERK1/2, quando esta era estimulada através de EGFR, um RTK expresso em níveis variáveis pelas três linhagens, verificamos que o reduzido nível de expressão de EGFR pela linhagem estrógeno-dependente MCF-7 (o menor dentre as três linhagens) não foi impeditivo de uma importante ativação de ERK1/2, quando as células foram ativadas com ambos os mediadores. Esta observação sugere que o aumento de concentração de NTSP-1 no microambiente tumoral possa atuar na intensificação de respostas celulares a fatores de crescimento pró-tumorais;
- f) Estudos preliminares de sinalização com a linhagem MCF-7, no qual NTSP-1 foi substituído por TSP Hep II, um peptídeo bioativo mimético de um dos motivos estruturais de ligação da TSP-1 ao sindecan-4 sugeriu a mesma tendência de ativação de ERK observada com o domínio inteiro. Este motivo estrutural é capaz de potencializar a via de ERK1/2 em células endoteliais microvasculares ativadas por FGF-2, através do receptor FGFR1. Considerando que o mesmo par de receptores é altamente expresso também pela linhagem invasiva MDA-MB-231, sugerimos que as atividades pró-tumorais da TSP-1 nessas células mais agressivas possam estar relacionadas aos mesmos receptores, porém talvez através de outra via de sinalização, uma vez que as células MDA-MB-231 apresentam ativação constitutiva de ERK1/2;
- g) A análise quantitativa da endocitose do receptor EGFR em células MCF-7 confirmou que o tratamento conjunto NTSP-1/EGF aumenta o tempo de residência de EGFR em endossomos primários, evento que se correlaciona positivamente com o aumento de persistência da atividade de ERK1/2. Considerando os baixos níveis de EGFR em tumores de mama hormônio-dependentes e a pequena prevalência de mutações oncogênicas na via de Ras→ERK, sugerimos que a incidência de formas fragmentadas de TSP-1 no microambiente tumoral possa aumentar a potência da resposta das células tumorais ao EGF.

## REFERÊNCIAS

- Abdelwahab Yousef, A. J. Male Breast Cancer: Epidemiology and Risk Factors. *Semin Oncol*, v.44, n.4, p.267-272, Aug, 2017.
- Adams, J. C; Lawler, J. The thrombospondins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v.3, n.10, Oct, 2011.
- Adrain C, Freeman M. Regulation of receptor tyrosine kinase ligand processing. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v.6, n.1, Jan, 2014.
- Afratis, N. A; Bouris, P; Skandalis, S. S; Multhaupt, H. A; Couchman, J. R; Theocharis, A. D; Karamanos, N. K. IGF-IR cooperates with ER $\alpha$  to inhibit breast cancer cell aggressiveness by regulating the expression and localisation of ECM molecules. *Sci Rep*, v.7, Jan, 2017.
- Albo D, Berger DH, Rothman VL, Tuszynski GP. Role of urokinase plasminogen activator receptor in thrombospondin 1-mediated tumor cell invasion. *J Surg Res*, v.82, n.2, p.331-8, Apr, 1999.
- Albo D, Berger DH, Wang TN, Hu X, Rothman V, Tuszynski GP. Thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta 1 promote breast tumor cell invasion through up-regulation of the plasminogen/plasmin system. *Surgery*, v.122, n.2, p.493-9, Aug, 1997.
- Albo, D; Shinohara, T; Tuszynski, G. Up-regulation of matrix metalloproteinase 9 by thrombospondin 1 in gastric cancer. *J Surg Res*, v.108, n.1, p.51-60, Nov, 2002.
- Allen, M.D, Vaziri R, Green M, Chelala C, Brentnall AR, Dreger S, Vallath S, Nitch-Smith H, Hayward J, Carpenter R, Holliday DL, Walker RA, Hart IR, Jones JL. Clinical and functional significance of  $\alpha 9\beta 1$  integrin expression in breast cancer: a novel cell-surface marker of the basal phenotype that promotes tumour cell invasion. *JPathol*, v.223, n.5, p.646-58, Apr, 2011.
- Arias-Pulido, H; Chaher N, Gong Y, Qualls C, Vargas J, Royce M. Tumor stromal vascular endothelial growth factor A is predictive of poor outcome in inflammatory breast cancer. *BMC Cancer*, v.12, Jul, 2012.
- Armstrong, L. C; Bornstein, P. Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. *Matrix Biol*, v.22, n.1, p.63-71, Mar, 2003.
- Avraham,R; Yarden,Y. Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.12, n.2, p. 104-17, Feb, 2011.
- Baba, F; Swartz, K; van Buren R; Eickhoff, J; Zhang, Y; Wolberg, W; Friedl, A. Syndecan-1 and syndecan-4 are overexpressed in an estrogen receptor-negative, highly proliferative breast carcinoma subtype. *Breast Cancer Res Treat*, v.98, n.1, p.91-8, Jul, 2006.
- Baenziger, N. L; Brodie, G. N; Majerus, P. W. A thrombin-sensitive protein of human platelet

membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.68, n.1, p.240-3, Jan, 1971.

Baeriswyl, V; Christofori, G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*, v. 19, n. 5, p. 329-37, Oct, 2009.

Bakker, J; Spits, M; Neefjes, J; Berlin, I. The EGFR odyssey - from activation to destruction in space and time. *J Cell Sci*, v.130, n. 24, p. 4087-4096, Dec, 2017.

Ban, K. A; Godellas, C. V. Epidemiology of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am*, v.23, n.3, p.409-22, Jul, 2014.

Barnhouse, V. R; Weist, J. L; Shukla, V. C; Ghadiali, S. N; Kniss, D. A; Leight, J. L. Myoferlin regulates epithelial cancer cell plasticity and migration through autocrine TGF- $\beta$ 1 signaling. *Oncotarget*, v.9, n.27, p.19209-19222, Apr, 2018.

Beenken, A; Mohammadi, M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov*, v.8, n.3, p.235-53, Mar, 2009.

Bergeron, J. J; Di Guglielmo, G. M; Dahan, S; Dominguez, M; Posner, B. I. Spatial and Temporal Regulation of Receptor Tyrosine Kinase Activation and Intracellular Signal Transduction. *Annu Rev Biochem*, v.85, p. 573-97, Jun, 2016.

Billings, P.C; Pacifici, M. Interactions of signaling proteins, growth factors and other proteins with heparan sulfate: mechanisms and mysteries. *Connect Tissue Res*, v.56, n.4, p.272-80, 2015.

Bissell, M. J; Radisky, D. C; Rizki, A; Weaver, V. M; Petersen, O. W. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation*, v.70, n.9-10, p.537-46, Dec, 2002.

Blaschke, R. J; Howlett, A. R; Desprez, P. Y; Petersen, O. W; Bissell, M. J. Cell differentiation by extracellular matrix components. *Methods Enzymol*, v. 245, p. 535-56, 1994.

Bloom, H. J; Richardson, W. W. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*, v.11, n.3, p.359-77, Sep, 1957.

Bonnefoy, A.; Legrand C. Proteolysis of subendothelial adhesive glycoproteins (fibronectin, thrombospondin, and von Willebrand factor) by plasmin, leukocyte cathepsin G, and elastase. *Thromb Res*, v.98, n.4, p.323-32, May, 2000.

Booth, B. W; Mack, D. L; Androutsellis-Theotokis, A; McKay, R. D; Boulanger, C. A; Smith, G.H. The mammary microenvironment alters the differentiation repertoire of neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105, n. 39, p. 14891-6, Sep, 2008.

Borsotti P, Ghilardi C, Ostano P, Silini A, Dossi R, Pinessi D, Foglieni C, Scatolini M, Lacal PM, Ferrari R, Moscatelli D, Sangalli F, D'Atri S, Giavazzi R, Bani MR, Chiorino G, Taraboletti G. Thrombospondin-1 is part of a Slug-independent motility and metastatic program in cutaneous melanoma, in association with VEGFR-1 and FGF-2. *Pigment Cell*

Melanoma Res, v. 28, n.1, p.73-81, Jan, 2015.

Boudreau,A; van'tVeer,L.J; Bissell,M.J.An"elite hacker": breast tumors exploit the normal microenvironment program to instruct their progression andbiological diversity. Cell Adh Migr, v.6, n.3, p. 236-48, May-Jun, 2012.

Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin, v.68, n.6, p.394-424, Nov, 2018.

Britton DJ, Hutcheson IR, Knowlden JM, Barrow D, Giles M, McClelland RA, Gee JM, Nicholson RI.Bidirectional cross talk between ERalpha and EGFR signalling pathways regulates tamoxifen-resistant growth. Breast Cancer Res Treat, v.96, n.2, p.131-46, Mar, 2006.

Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ, Picard D. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. EMBO J, v.15, n.9, p.2174-83, May, 1996.

Bussard, K. M; Boulanger, C. A; Booth, B. W; Bruno, R. D; Smith, G. H. Reprogramming human cancer cells in the mouse mammary gland. Cancer Res, v.70, n.15, p.6336-43, Aug, 2010.

Bussard, K. M; Mutkus, L; Stumpf, K; Gomez-Manzano, C; Marini, F. C. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment.Breast Cancer Res,v. 18, n. 1, Aug, 2016.

Byrne, G. J; Hayden, K. E; McDowell, G; Lang, H; Kirwan, C. C; Tetlow, L; Kumar, S; Bundred,N.J.Angiogenic characteristics of circulating and tumoural thrombospondin-1 in breast cancer. Int J Oncol, v. 31, n. 5, p. 1127-32, Nov, 2007.

Cabodi S, Moro L, Bergatto E, Boeri Erba E, Di Stefano P, Turco E, Tarone G, Defilippi P. Integrin regulation of epidermal growth factor (EGF) receptor and of EGF-dependent responses. Biochem Soc Trans, v.32, n.Pt3, p.438-42, Jun, 2004.

Cailliau et al. FGF Receptor Phosphotyrosine 766 is a Target for Grb14 to Inhibit MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cell Signaling. Anticancer Res, v.28, n.6B, p.3877-82, Nov-Dec, 2005.

Caldieri G., Malabarba M.G., Di Fiore P.P., Sigismund S. (2018) EGFR Trafficking in Physiology and Cancer. In: Lamaze C., Prior I. (eds) Endocytosis and Signaling. Progress in Molecular and Subcellular Biology, vol 57. Springer, Cham.

Calzada MJ, Roberts DD. Novel integrin antagonists derived from thrombospondins. Curr Pharm, v.11, n.7, p.849-66, 2005.

Calzada, M. J; Zhou, L; Sipes, J. M ; Zhang, J; Krutzsch, H. C ; Iruela-Arispe, M. L; Annis,D.S ; Mosher,D.F ; Roberts,D.D.Alpha4beta1 integrin mediates selective endothelial cell responses to thrombospondins 1 and 2 in vitro and modulates angiogenesis in vivo. Circ Res, v.94, n.4, p.462-70, Mar, 2004.

Campion, C. G; Zaoui, K; Verissimo, T; Cossette, S; Matsuda, H; Solban, N; Hamet P; Tremblay, J.COMMD5/HCaRG Hooks Endosomes on Cytoskeleton and Coordinates EGFR Trafficking. *Cell Rep*, v.24, n.3, p. 670-684, Jul, 2018.

Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, v.490, n.7418, p.61-70, Oct, 2012.

Carlson, C. B; Lawler, J; Mosher, D. F. Structures of thrombospondins. *Cell Mol Life Sci*, v. 65, n. 5, p. 672-86, Mar, 2008.

Carpenter G, Cohen S. 125I-labeled human epidermal growth factor. Binding, internalization, and degradation in human fibroblasts. *J Cell Biol*, v.71, n.1, p.159-71, Oct, 1976.

Castro-Muñozledo, F; Meza-Aguilar, D. G; Domínguez-Castillo, R; Hernández-Zequinely, V; Sánchez-Guzmán, E. Vimentin as a Marker of Early Differentiating, Highly Motile Corneal Epithelial Cells. *J Cell Physiol*, v.232, n.4, p.818-830, Apr, 2017.

Caswell PT, Zech T. Actin-Based Cell Protrusion in a 3D Matrix. *Trends Cell Biol*, v.28, n.10, p.823-834, Oct, 2018.

Catalano, V; Turdo, A; Di Franco, S; Dieli, F; Todaro, M; Stassi, G. Tumor and its microenvironment: a synergistic interplay. *Semin Cancer Biol*, v.23, n.6, p.522-532, Dec, 2013.

Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*, v.2, n.5, p.401-4, May, 2012.

Chalkiadaki, G; Nikitovic, D; Berdiaki, A; Sifaki, M; Krasagakis, K; Katonis, P; Karamanos, N. K; Tzanakakis, G. N. Fibroblast growth factor-2 modulates melanoma adhesion and migration through a syndecan-4-dependent mechanism. *Int J Biochem Cell Biol*, v.41, n.6, p.1323-31, Jun, 2009.

Chandrasekaran, L; He, C. Z; Al-Barazi, H; Krutzsch, H. C; Iruela-Arispe, M. L; Roberts, D. D. Cell contact-dependent activation of alpha3beta1 integrin modulates endothelial cell responses to thrombospondin-1. *Mol Biol Cell*, v.11, n.9, p.2885-900, Sep, 2000.

Chandrasekaran, S; Guo, N. H; Rodrigues, R. G; Kaiser, J; Roberts, D. D. Pro-adhesive and chemotactic activities of thrombospondin-1 for breast carcinoma cells are mediated by alpha3beta1 integrin and regulated by insulin-like growth factor-1 and CD98. *J Biol Chem*, v.274, n.16, p.11408-16, Apr, 1999.

Cheang, M.C; Voduc, D; Bajdik, C; Leung, S; McKinney, S; Chia, S. K; Perou C.M; Nielsen, T.O. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*, v.14, n.5, p.1368-76, Mar, 2008.

Chen, T. C; Lai, C. H; Chang, J. L; Chang, S. W. Mitomycin C retardation of corneal

fibroblast migration via sustained dephosphorylation of paxillin at tyrosine 118. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v.53, n.3, p.1539-47, Mar, 2012.

Cheng, C.L; Thike, A.A; Tan, S. Y; Chua, P. J; Bay, B. H; Tan, P. H. Expression of FGFR1 is an independent prognostic factor in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, v.151, n.1, p.99-111, May, 2015.

Chiodoni et al. Matricellular proteins: from homeostasis to inflammation, cancer, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, v.29, n.2, p.295-307, Jun, 2010.

Chiquet-Ehrismann, R; Tucker, R. P. Tenascins and the Importance of Adhesion Modulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v.3, n.5, May, 2011.

Chong, H. C; Tan, C. K; Huang, R. L; Tan, N. S. Matricellular proteins: a sticky affair with cancers. *J Oncol*, v.2012, Feb, 2012.

Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res*, v.35, n.6, p.3147-54, Jun, 2015.

Daly CS, Flemban A, Shafei M, Conway ME, Qualtrough D, Dean SJ. Hypoxia modulates the stem cell population and induces EMT in the MCF-10A breast epithelial cell line. *Oncol Rep*, v.39, n.2, p.483-490, Feb, 2018.

Dang, I; Gautreau, A. Random Migration Assays of Mammalian Cells and Quantitative Analyses of Single Cell Trajectories. *Methods Mol Biol*, v.1749, p.1-9, 2018.

De Bessa Garcia, S. A; Pereira, M. C; Nagai, M. A. Expression Pattern of the pro-apoptotic Gene PAR-4 During the Morphogenesis of MCF-10<sup>a</sup> Human Mammary Epithelial Cells. *Cancer Microenviron*, v. 4, n.1, p. 33-8, Dec, 2010.

Debnath, J; Muthuswamy, S. K; Brugge, J. S. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods*, v. 30, n.3, p. 256-68, Jul, 2003.

Derakhshani, A; Rezaei, Z; Safarpour, H; Sabri, M; Mir, A; Sanati, M. A; Vahidian, F; Gholamiyan Moghadam, A; Aghadokht, A; Hajiasgharzadeh, K; Baradaran, B. Overcoming trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer using combination therapy. *J Cell Physiol*, Sep, 2019.

Dias, J. V; Benslimane-Ahmim, Z; Egot, M; Lokajczyk, A; Grelac, F; Galy-Fauroux, I; Juliano, L; Le-Bonniec, B; Takiya, C. M; Fischer, A. M; Blanc-Brude, O; Morandi V; Boisson-Vidal, C. A motif within the N-terminal domain of TSP-1 specifically promotes the proangiogenic activity of endothelial colony-forming cells. *Biochem Pharmacol*, v.84, n.8, p.1014-23, Oct, 2012.

Dickson C, Spencer-Dene B, Dillon C, Fantl V. Tyrosine kinase signalling in breast cancer: fibroblast growth factors and their receptors. *Breast Cancer Res*, v.2, n.3, p.191-6, Mar, 2000.

Do Amaral, J. B; Urabayashi, M. S; Machado-Santelli, G. M. Cell death and lumen formation in spheroids of MCF-7 cells. *Cell Biol Int*, v.34, n. 3, p. 267-

74, Feb, 2010.

Donnini, S; Morbidelli, L; Taraboletti, G; Ziche, M. ERK1-2 and p38 MAPK regulate MMP/TIMP balance and function in response to thrombospondin-1 fragments in the microvascular endothelium. *Life Sci*, v.74, n.24, p.2975-85, Apr, 2004.

Dunn WA, Connolly TP, Hubbard AL. Receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by rat hepatocytes: receptor pathway. *J Cell Biol*, v.102, n.1, p.24-36, Jan, 1986.

Dyrstad SW, Yan Y, Fowler AM, Colditz GA. Breast cancer risk associated with benign breast disease: systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*, v.149, n.3, p.569-75, Feb, 2015.

Elfenbein, A, Simons. M. Syndecan-4 signaling at a glance. *J Cell Sci*, v.1, n.126, p.3799-804, Sep, 2013.

Elfenbein, A; Lanahan, A; Zhou, T.X; Yamasaki, A; Tkachenko, E; Matsuda, M; Simons, M. Syndecan 4 regulates FGFR1 signaling in endothelial cells by directing macropinocytosis. *Sci Signal*, v.5, n.223, May, 2012.

Elston, C. W; Ellis, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, v.19, n.5, p.403-10, Nov, 1991.

Elzie, C. A; Murphy-Ullrich, J. E. The N-terminus of thrombospondin: the domain stands apart. *Int J Biochem Cell Biol*, v.36, n.6, p.1090-101, Jun, 2004.

Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2018.

Ferlay, J. et al. GLOBOCAN 2018, Cancer Today. Lyon, France: IARC, 2018. (IARC CancerBase, 15). Disponível em: Acesso em: 12 ago. 2019.

Ferlay, J; Soerjomataram, I; Dikshit, R; Eser, S; Mathers, C; Rebelo, M; Parkin, D. M; Forman, D; Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, v.136, n.5, p.E359-86, Mar, 2015.

Ferrara, N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw*, v.20, n4, p.158-63, Dec, 2009.

Ferrari do Outeiro-Bernstein, M. A; Nunes, S. S; Andrade, A. C; Alves, T. R; Legrand, C; Morandi, V. A recombinant NH(2)-terminal heparin-binding domain of the adhesive glycoprotein, thrombospondin-1, promotes endothelial tube formation and cell survival: a possible role for syndecan-4 proteoglycan. *Matrix Biol*, v.21, n.4, p.311-24, Jun, 2002.

Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, v. 285, n. 21, p. 1182-6, Nov, 1971.

Forsten-Williams, K; Chu, C.L; Fannon, M; Buczek-Thomas, J.A; Nugent M.A. Control of growth factor networks by heparan sulfate proteoglycans. *Ann Biomed Eng*,

v.36, n.12, p.2134-48, Dec, 2008.

Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*, v.363, n.20, p.1938-48, Nov, 2010.

Friedl P, Mayor R. Tuning Collective Cell Migration by Cell-Cell Junction Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v.9, n.4, Apr, 2017.

Friedl, P; Wolf, K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol*, v.188, n.1, p.11-9, Jan, 2010.

Froehlich, K; Haeger, J. D; Heger, J; Pastuschek, J; Photini, S. M; Yan, Y; Lupp, A; Pfarrer, C; Mrowka, R; Schleußner, E; Markert, U. R; Schmidt, A. Generation of Multicellular Breast Cancer Tumor Spheroids: Comparison of Different Protocols. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, v.21, n.3-4, p.89-98, Dec, 2016.

Garg, P; Yang, S; Liu, A; Pallero, M. A; Buchsbaum, D. J; Mosher, D. F; Murphy-Ullrich, J. E; Goldblum, S. E. Thrombospondin-1 opens the paracellular pathway in pulmonary microvascular endothelia through EGFR/ErbB2 activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v.301, n.1, p.L79-90, Jul, 2011.

Gehler, S; Ponik, S. M; Riching, K. M; Keely, P. J. Bi-directional signaling: extracellular matrix and integrin regulation of breast tumor progression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, v.23, n.2, p.139-57, 2013.

Geraghty RJ, Capes-Davis, A; Davis, J. M; Downward, J; Freshney, R. I; Knezevic, I; Lovell-Badge, R; Masters, J. R; Meredith, J; Stacey, G. N; Thraves, P; Vias, M; Cancer Research, U. K. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer*, v.111, n.6, p.1021-46, Sep, 2014.

Ghajar, C. M; Peinado, H; Mori, H; Matei, I. R; Evason, K. J; Brazier, H; Almeida, D; Koller, A; Hajjar, K. A; Stainier, D. Y; Chen, E. I; Lyden, D; Bissell, M. J. The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. *Nat Cell Biol*, v.15, n. 7, p. 807-17, Jul, 2013.

Giatromanolaki ,A; Koukourakis, M. I; Sivridis, E; Chlouverakis, G; Vourvouhaki, E; Turley, H; Harris, A. L; Gatter, K. C. Activated VEGFR2/KDR pathway in tumour cells and tumour associated vessels of colorectal cancer. *Eur J Clin Invest*, v.37, n.11, p.878-86, Nov, 2007.

Giltane JM, Balko JM. Rationale for targeting the Ras/MAPK pathway in triple-negative breast cancer. *Discov Med*, v.17, n.95, p.275-83, May, 2014.

Giuliano, A. E; Connolly, J. L; Edge, S. B; Mittendorf, E. A; Rugo, H. S; Solin, L. J; Weaver, D. L; Winchester, D. J; Hortobagyi, G. N. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*, v.67, n.4, p.290-303, Jul, 2017.

Giuliano, A. E; Edge, S. B; Hortobagyi, G. N. Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. *Ann Surg Oncol*, v.25, n.7, p.1783-1785, Jul,

Goh, L. K; Sorkin, A. Endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v.5, n.5, May, 2013.

Good, D. J; Polverini, P. J; Rastinejad, F; Le Beau, M. M; Lemons, R. S; Frazier, W. A; Bouck, N. P. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.87, n.17, p.6624-8, Sep,1990.

Gourlaouen, M; Welte, J. C; Vasudev, N. S; Reynolds, A. R. Essential role for endocytosis in the growth factor-stimulated activation of ERK1/2 in endothelial cells. *J Biol Chem*, v.288, n.11, p.7467-80, Mar, 2013.

Grahovac, J; Wells, A. Matrikine and matricellular regulators of EGF receptor signaling on cancer cell migration and invasion. *Lab Invest*, v.94, n.1, p.31-40, Jan, 2014.

Guray M, Sahin AA. Benign breast diseases: classification, diagnosis, and management. *Oncologist*, v.11, n.5, p.435-49, May, 2006.

Guttery, D. S; Shaw, J. A; Lloyd, K; Pringle, J. H; Walker, R. A. Expression of tenascin-C and its isoforms in the breast. *Cancer Metastasis Rev*, v.29, n.4, p.595-606, Dec, 2010.

Haj, F.G; Verveer, P.J; Squire, A; Neel, B.G; Bastiaens, P.I. Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B on the surface of the endoplasmic reticulum. *Science*, v.295, n.5560, p.1708-11, Mar, 2002.

Han, W; Lo, H. W. Landscape of EGFR signaling network in human cancers: biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations. *Cancer Lett*, v. 318, n. 2, p. 124-34, May, 2012.

Hanahan, D; Coussens, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, v. 21, n.3, p. 309-22, Mar, 2012.

Hanahan, D; Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v.144, n.5, p.646-74, Mar, 2011.

Haque MM, Desai KV. Pathways to Endocrine Therapy Resistance in Breast Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*, Aug, 2019.

He L, Wirtz D. Switching from protease-independent to protease-dependent cancer cell invasion. *Biophys J*, v.107, n.11, p.2484-5, Dec, 2014.

Herrero, A; Casar, B; Colón-Bolea, P; Agudo-Ibáñez, L; Crespo, P. Defined spatiotemporal features of RAS-ERK signals dictate cell fate in MCF-7 mammary epithelial cells. *Mol Biol Cell*, v.27, n.12, Jun, 2016.

Herschkowitz, J. I; Simin, K; Weigman, V. J; Mikaelian, I; Usary, J; Hu, Z; Rasmussen, K. E; Jones, L. P; Assefnia, S; Chandrasekharan, S; Backlund, M. G; Yin, Y; Khramtsov, A. I; Bastein, R; Quackenbush, J; Glazer, R. I; Brown, P. H; Green, J. E; Kopelovich, L; Furth, P. A; Palazzo, J. P; Olopade, O. I; Bernard, P. S; Churchill, G. A; Van Dyke, T; Perou, C. M. Identification of conserved gene expression features between murine mammary

carcinomamodels and human breast tumors. *Genome Biol*, v.8, n.5, May,2007.

Hida, K; Maishi, N; Annan, D. A; Hida, Y. Contribution of Tumor Endothelial Cells in Cancer Progression. *Int J Mol Sci*, v.19, n.5, Apr, 2018.

Higgins, K. J; Liu, S; Abdelrahim, M; Vanderlaag, K; Liu, X; Porter, W; Metz, R; Safe S. Vascular endothelial growth factor receptor-2 expression is down-regulated by 17beta-estradiol in MCF-7 breast cancer cells by estrogen receptor alpha/Sp proteins. *Mol Endocrinol*, v.22, n.2, p.388-402, Feb, 2008.

Hobbs GA, Der CJ, Rossman KL. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *J Cell Sci*, v.129, n.7, p.1287-92, Apr, 2016.

Holliday, D.L; Speirs, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*, v.13, n.4, Aug, 2011.

Hopkins, M. M; Zhang, Z; Liu, Z; Meier, K. E. Eicosopentaneic Acid and Other Free Fatty Acid Receptor Agonists Inhibit Lysophosphatidic Acid-and Epidermal Growth Factor-Induced Proliferation of Human Breast Cancer Cells. *J Clin Med*, v.5, n.2, Jan, 2016.

Horowitz ,A; Seerapu, H. R. Regulation of VEGF signaling by membrane traffic. *Cell Signal*, v.24, n.9, p.1810-20, Sep, 2012.

Howe, G. A; Addison, C. L.  $\beta$ 1 integrin: an emerging player in the modulation of tumorigenesis and response to therapy. *Cell Adh Migr*, v.6, n.2, p.71-7, Apr, 2012.

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 inbreast carcinoma. *J Cell Sci*, v.108, p. 1945-57, May, 1995.

Høye, A. M; Eler, J. T. Structural ECM components in the premetastatic and metastatic niche. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 310, n. 11, p. C955-67, Jun, 2016.

Hu Z, Evarts RP, Fujio K, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Expression of fibroblast growth factor receptors flg and bek during hepatic ontogenesis and regeneration in the rat. *Cell Growth Differ*, v.6, n.8, p.1019-25, Aug, 1995.

Hu, M; Polyak, K. Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr Opin Genet Dev*, v.18, n.1, p.27-34, Feb, 2008.

Hu, M; Polyak, K. Molecular characterisation of the tumour microenvironment in breast cancer. *Eur J Cancer*, v.44, n.18, p.2760-5, Dec, 2008.

Huang T, Sun L, Yuan X, Qiu H. Thrombospondin-1 is a multifaceted player in tumor progression. *Oncotarget*, v.8, n.48, p. 84546-84558, Jul, 2017.

Hubbard, S. R. Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.5, n.6, p.464-71, Jun, 2004.

Hui, L; Chen, Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett*, v. 368, n. 1, p. 7-13, Nov, 2015.

Incardona, F; Lewalle, J. M; Morandi, V; Lambert, S; Legrand, Y; Foidart, J. M; Legrand, C. Thrombospondin modulates human breast adenocarcinoma cell adhesion to human vascular endothelial cells. *Cancer Res*, v.55, n.1, p.166-73, Jan, 1995.

Iozzo, R. V; Gubbiotti, M. A. Extracellular matrix: The driving force of mammalian diseases. *Matrix Biol*, v.71-72, p.1-9, Oct, 2018.

Iruela-Arispe, M. L. Regulation of thrombospondin1 by extracellular proteases. *Curr Drug Targets*, v. 9, n.10, p. 863-8, Oct, 2008.

Islam T, Resat H. Quantitative investigation of MDA-MB-231 breast cancer cell motility: dependence on epidermal growth factor concentration and its gradient. *Mol Biosyst*, v.13, n.10, p.2069-2082, Sep, 2017.

Jang M, Kim E, Choi Y, Lee H, Kim Y, Kim J, Kang E, Kim SW, Kim I, Park S. FGFR1 is amplified during the progression of in situ to invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res*, v.14, n.4, Aug, 2012.

Jayachandran A, Anaka M, Prithviraj P, Hudson C, McKeown SJ, Lo PH, Vella LJ, Goding, CR, Cebon J, Behren A. Thrombospondin 1 promotes an aggressive phenotype through epithelial-to-mesenchymal transition in human melanoma. *Oncotarget*, v.5, n.14, p.5782-97, Jul, 2014.

Jo, M; Thomas, K. S; Takimoto, S; Gaultier, A; Hsieh, E. H; Lester, R. D; Gonias, S. L. Urokinase receptor primes cells to proliferate in response to epidermal growth factor. *Oncogene*, v.26, n.18, p.2585-94, Apr, 2007.

John, A. S; Rothman, V. L, Tuszynski, G. P. Thrombospondin-1 (TSP-1) Stimulates Expression of Integrin alpha6 in Human Breast Carcinoma Cells: A Downstream Modulator of TSP-1-Induced Cellular Adhesion. *J Oncol*, 2010.

Johnston, C. L; Cox, H. C; Gomm, J. J; Coombes, R. C. Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) localize in different cellular compartments. A splice variant of FGFR-3 localizes to the nucleus. *J Biol Chem*, v.270, n.51, p.30643-50, Dec, 1995.

Jones, S; Rappoport, J.Z. Interdependent epidermal growth factor receptor signalling and trafficking. *Int J Biochem Cell Biol*, v.51, p.23-8, Jun, 2014.

Kao J, Salari K, Bocanegra M, Choi YL, Girard L, Gandhi J, Kwei KA, Hernandez-Boussard T, Wang P, Gazdar AF, Minna JD, Pollack JR. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS One*, v.4, n.7, Jul, 2009.

Katz M, Amit I, Yarden Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta*, v.1773, n.8, p.1161-76, Aug, 2007.

Kaushik, S; Pickup, M. W; Weaver, V. M. From transformation to metastasis: deconstructing

the extracellular matrix in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*, v. 35, n.4 , p. 655-667, Dec, 2016.

Kazerounian, S; Yee, K. O; Lawler, J. Thrombospondins in cancer. *Cell Mol Life Sci*, v.65, n.5, p.700-12, Mar, 2008.

Keinan, O; Kedan, A; Gavert, N; Selitrennik, M; Kim, S; Karn, T; Becker, S; Lev, S. The lipid-transfer protein Nir2 enhances epithelial-mesenchymal transition and facilitates breast cancer metastasis. *J Cell Sci*, v.127, n. Pt21, p.4740-9, Nov, 2014.

Kenny et al. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol*, v.1, n.1, p.84-96, Jun, 2007.

Key, T.J; Verkasalo, P. K; Banks, E. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol*, v. 2, n.3, p.133-40, Mar, 2001.

Kidger AM, Keyse SM. The regulation of oncogenic Ras/ERK signalling by dual-specificity mitogen activated protein kinase phosphatases (MKPs). *Semin Cell Dev Biol*, v.50, p.125-32, Feb, 2016.

Kim, B.M; Kim, D.H; Park, J.H; Surh, Y.J; Na, H.K. Ginsenoside Rg3 Inhibits Constitutive Activation of NF- $\kappa$ B Signaling in Human Breast Cancer (MDA-MB-231) Cells: ERK and Akt as Potential Upstream Targets. *J Cancer Prev*, v.19, n.1, p.23-30, Mar, 2014.

Kim, J; Kong, J; Chang, H; Kim, H; Kim, A. EGF induces epithelial-mesenchymal transition through phospho-Smad2/3-Snail signaling pathway in breast cancer cells. *Oncotarget*, v.7, n.51, p.85021-85032, Dec, 2016.

Kleiman,L.B; Maiwald,T; Conzelmann,H; Lauffenburger,D.A; Sorger, P.K. Rapid phospho-turnover by receptor tyrosine kinases impacts downstream signaling and drug binding. *Mol Cell*, v.43, n.5, p.723-37, Sep, 2011.

Knizetova, P; Ehrmann ,J; Hlobilkova, A; Vancova, I; Kalita, O; Kolar, Z; Bartek, J. Autocrine regulation of glioblastoma cell cycle progression, viability and radioresistance through the VEGF-VEGFR2 (KDR) interplay. *Cell Cycle*, v.7, n.16, p.2553-61, Aug, 2008.

Koka, R; Ioffe, O. B. Breast carcinoma: is molecular evaluation a necessary part of current pathological analysis? *Semin Diagn Pathol*, v.30, n.4, p.31-8, Nov, 2013.

Kurokawa H, Arteaga CL. Inhibition of erbB receptor (HER) tyrosine kinases as a strategy to abrogate antiestrogen resistance in human breast cancer. *Clin Cancer Res*, v.7, n.12, p.4436s-4442s, Dec, 2001.

Kyriakopoulou, K; Kefali, E; Piperigkou, Z; Bassiony, H; Karamanos, N. K. Advances in targeting epidermal growth factor receptor signaling pathway in mammary cancer. *Cell Signal*, v. 51, p. 99-109, Nov, 2018.

Lahlou, H; Muller, W. J.  $\beta$ 1-integrins signaling and mammary tumor progression in transgenic mouse models: implications for human breast cancer. *Breast Cancer Res*, v.13, n.6, Nov, 2011.

Lakhani S, Ellis I, Schnitt S, et al.: WHO Classification of Tumours of the Breast, 4th ed. Lyon, IARC Press, 2012.

Lam, I; Pickering, C. M; Mac Gabhann, F. Context-dependent regulation of receptor tyrosine kinases: Insights from systems biology approaches. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, Mar, 2019.

Langley, R. R, Fidler, I. J. The seed and soil hypothesis revisited - the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer*, v.128, n.11, p.2527-35, Jun, 2011.

Langlois, B; Perrot, G; Schneider, C; Henriot, P; Emonard, H; Martiny, L; Dedieu, S. LRP-1 promotes cancer cell invasion by supporting ERK and inhibiting JNK signaling pathways. *PLoS One*, v.5, n.7, Jul, 2010.

Lawler, J.W; Slayter, H.S. The release of heparin binding peptides from platelet thrombospondin by proteolytic action of thrombin, plasmin and trypsin. *Thromb Res*, v.22, n.3, p.267-79, May, 1981.

Lee, G.Y, Kenny, P. A; Lee, E. H; Bissell, M. J. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat Methods*, v.4, n.4, p.359-65, Apr, 2007.

Lee, N. V; Sato, M; Annis, D. S; Loo, J. A; Wu, L; Mosher, D. F, Iruela-Arispe, M. L.. ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2. *EMBO J*, v.25, p.5270–5283, 2006.

Legrand, C; Thibert, V; Dubernard, V; Bégault, B; Lawler, J. Molecular requirements for the interaction of thrombospondin with thrombin-activated human platelets: modulation of platelet aggregation. *Blood*, v.79, n.8, p.1995-32003, Apr, 1992.

Lemmon et al. The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v.6, n.4, Apr, 2014.

Lemmon, M. A; Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, v.141, n.7, p.1117-34, Jun, 2010.

Lendorf, M.E; Manon-Jensen, T; Kronqvist, P; Multhaupt, H. A; Couchman, J. R. Syndecan-1 and syndecan-4 are independent indicators in breast carcinoma. *J Histochem Cytochem*, v.59, n.6, p.615-29, Jun, 2011.

Lim, H.C; Multhaupt, H. A, Couchman, J. R. Cell surface heparan sulfate proteoglycans control adhesion and invasion of breast carcinoma cells. *Mol Cancer*, v.14, n.15, Jan, 2015.

Liu K, Newbury PA, Glicksberg BS, Zeng WZD, Paithankar S, Andrechek ER, Chen B. Evaluating cell lines as models for metastatic breast cancer through integrative analysis of g

enomic data. *Nat Commun*, v.10, n.1, May, 2019.

Liu, A; Garg, P; Yang, S; Gong, P; Pallero, M. A; Annis, D. S; Liu, Y; Passaniti, A; Mann, D; Mosher, D. F, Murphy-Ullrich, J. E; Goldblum, S. E. Epidermal growth factor-like repeats of thrombospondins activate phospholipase C $\gamma$  and increase epithelial cell migration through indirect epidermal growth factor receptor activation. *J Biol Chem*, v.284, n.10, p.6389-402, Mar, 2009.

Liu, A; Mosher, D. F; Murphy-Ullrich, J. E; Goldblum, S. E. The counteradhesive proteins, thrombospondin 1 and SPARC/osteonectin, open the tyrosine phosphorylation-responsive paracellular pathway in pulmonary vascular endothelia. *Microvasc Res*, v. 77, n.1, p.13-20, Jan, 2009.

Liu, H; Radisky, D. C; Wang, F; Bissell, M. J. Polarity and proliferation are controlled by distinct signaling pathways downstream of PI3-kinase in breast epithelial tumor cells. *J Cell Biol*, v.164, n.4, p.603-12, Feb, 2004.

Longatto-Filho A, Pinheiro, C; Martinho, O; Moreira, M. A; Ribeiro, L. F; Queiroz G. S; Schmitt, F. C; Baltazar, F; Reis, R. M. Molecular characterization of EGFR, PDGFRA and VEGFR2 in cervical adenosquamous carcinoma. *BMC Cancer*, v.9, n.212, Jun, 2009.

Lu et al. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*, v.196, n.4, p.395-406, Feb, 2012.

Malhotra, G. K; Zhao, X; Band, H; Band, V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther*, v.10, n.10, p.955-60, Nov, 2010.

Maquart et al. Regulation of cell activity by the extracellular matrix: the concept of matrikines]. *J Soc Biol*, v.193, n.4-5, p.423-8, 1999.

Martin, J. L; Weenink, S. M; Baxter, R. C. Insulin-like growth factor-binding protein-3 potentiates epidermal growth factor action in MCF-10A mammary epithelial cells. Involvement of p44/42 and p38 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, v.278, n.5, p.2969-76, Jan, 2003.

Martin-Manso, G; Calzada, M. J; Chuman, Y; Sipes, J. M; Xavier, C. P; Wolf, V; Kuznetsova, S. A; Rubin, J. S; Roberts, D. D. sFRP-1 binds via its netrin-related motif to the N-module of thrombospondin-1 and blocks thrombospondin-1 stimulation of MDA-MB-231 breast carcinoma cell adhesion and migration. *Arch Biochem Biophys*, v.509, n.2, p.147-56, May, 2011.

Masuda et al. Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, v.136, n.2, p.331-45, Nov, 2012.

McIntosh, J; Dennison, G; Holly, J. M; Jarrett, C; Frankow, A; Foulstone, E. J; Winters, Z. E; Perks, C. M. IGFBP-3 can either inhibit or enhance EGF-mediated growth of breast epithelial cells dependent upon the presence of fibronectin. *J Biol Chem*, v.285, n.50, p.38788-800, Dec, 2010.

McKay, M. M; Morrison, D. K. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*,

v.26, n.22, p.3113-21, May, 2007.

Mikhailenko, I; Krylov, D; Argraves, K. M; Roberts, D. D; Liao, G; Strickland, D. K. Cellular internalization and degradation of thrombospondin-1 is mediated by the amino-terminal heparin binding domain (HBD). High affinity interaction of dimeric HBD with the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem*, v.272, n.10, p.6784-91, Mar, 1997.

Mitchell, R. A; Luwor, R. B; Burgess, A. W. Epidermal growth factor receptor: Structure-function informing the design of anticancer therapeutics. *Exp Cell Res*, v. 371, n. 1, p. 1-19, Oct, 2018.

Miyake, T; Parsons, S. J. Functional interactions between Choline kinase  $\alpha$ , epidermal growth factor receptor and c-Src in breast cancer cell proliferation. *Oncogene*, v.31, n.11, p.1431-41, Mar, 2012.

Moerkens M, Zhang Y, Wester L, van de Water B, Meerman JH. Epidermal growth factor receptor signalling in human breast cancer cells operates parallel to estrogen receptor  $\alpha$  signalling and results in tamoxifen insensitive proliferation. *BMC Cancer*, v. 2014 Apr 23;14:283. doi: 10.1186/1471-2407-14-283.

Mohammadi, M; Dikic, I; Sorokin, A; Burgess, W. H; Jaye, M; Schlessinger, J. Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Mol Cell Biol*, v.16, n.3, p.977-89, Mar, 1996.

Molinie, N; Gautreau, A. Directional Collective Migration in Wound Healing Assays. *Methods Mol Biol*, v.1749, p.11-19, 2018.

Morandi V. The N-terminal domain of thrombospondin-1: a key for the dual effect of TSP-1 in angiogenesis and cancer progression? *ScientificWorldJournal*, v.9, p.133-6, Feb, 2009.

Morandi V, Edelman L, Legrand YJ, Legrand C. Characterization of a novel monoclonal antibody (V58A4) raised against a recombinant NH2-terminal heparin-binding fragment of human endothelial cell thrombospondin. *FEBS Lett*, v.346, n.2-3, p.156-60, Jun, 1994.

Morini, M; Mottolese, M; Ferrari, N; Ghiorzo, F; Buglioni, S; Mortarini, R; Noonan, D. M; Natali, P. G; Albinim A. The alpha 3 beta 1 integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (MMP-9) activity. *Int J Cancer*, v.87, n.3, p.336-42, Aug, 2000.

Mosher, D. F; Adams, J. C. Adhesion-modulating/matricellular ECM protein families: A structural, functional and evolutionary appraisal. *Matrix Biol*, v.31, n.3, p.155-61, Apr, 2012.

Mostovich, L. A; Prudnikova, T. Y; Kondratov, A. G; Loginova, D; Vavilov, P. V; Rykova, V. I; Sidorov, S. V; Pavlova, T. V; Kashuba, V. I; Zabarovsky, E. R; Grigorieva, E. V. Integrin alpha9 (ITGA9) expression and epigenetic silencing in human breast tumors. *Cell Adh Migr*, v.5, n.5, p.395-401, Sep-Oct, 2011.

Mukherjee, S; Tessema, M; Wandinger-Ness, A. Vesicular trafficking of tyrosine kinase

receptors and associated proteins in the regulation of signaling and vascular function. *Circ Res*, v.98, n.6, p.743-56, Mar, 2006.

Mukhopadhyay R, Theriault RL, Price JE. Increased levels of alpha6 integrins are associated with the metastatic phenotype of human breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis*, v.17, n.4, p.325-32, Jun, 1999.

Mundhenke, C; Meyer, K; Drew, S; Friedl, A. Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor-2 receptor binding in breast carcinomas. *Am J Pathol*, v.160, n.1, p.185-94, Jan, 2002.

Murakami, M; Elfenbein ,A; Simons, M. Non-canonical fibroblast growth factor signalling in angiogenesis. *Cardiovasc Res*, v.78, n.2, p.223-31, May, 2008.

Murphy-Ullrich, J. E. The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J Clin Invest*, v.107, n.7, p.785-90, Apr, 2001.

Murphy-Ullrich, J. E; Iozzo, R. V. Thrombospondins in physiology and disease: new tricks for old dogs. *Matrix Biol*, v. 31, n. 3, p. 152-4, Apr, 2012.

Nagashima T, Shimodaira H, Ide K, Nakakuki T, Tani Y, Takahashi K, Yumoto N, Hatakeyama,M.Quantitative transcriptional control of ErbB receptor signaling undergoes graded to biphasic response for cell differentiation. *J Biol Chem*, v.282, n.6, p.4045-56, Feb, 2007.

Nath, S; Devi, G. R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther*, v. 163, p. 94-108, Jul, 2016.

Nazari, S. S; Mukherjee, P. An overview of mammographic density and its association with breast cancer. *Breast Cancer*, v.25, n.3, p.259-267, May, 2018.

Nobes, C. D; Hall, A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol*, v.144, n.6, p.1235-44, Mar, 1999.

Noronha NC, Mizukami A, Caliári-Oliveira C, Cominal JG, Rocha JLM, Covas DT, Swiech K, Malmegrim KCR, Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cell Res Ther*, v.10, n.1, May, 2019.

Nucera, C; Porrello, A; Antonello, Z. A; Mekel, M; Nehs, M. A; Giordano T. J; Gerald, D; Benjamin, L. E; Priolo, C; Puxeddu, E; Finn, S; Jarzab, B; Hodin, R. A; Pontecorvi, A; Nose, V; Lawler, J; Parangi, S. B-Raf(V600E) and thrombospondin-1 promote thyroid cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.107, n.23, p.10649-54, Jun, 2010.

Nunes, S. S; Outeiro-Bernstein, M. A; Juliano, L; Vardiero, F; Nader, H. B; Woods A; Legrand, C; Morandi, V. Syndecan-4 contributes to endothelial tubulogenesis through interactions with two motifs inside the pro-angiogenic N-terminal domain of thrombospondin-1. *J Cell Physiol*, v.214, n.3, p.828-37, Mar, 2008.

Nunes-Xavier CE, Martín-Pérez J, Elson A, Pulido R. Protein tyrosine phosphatases as novel targets in breast cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*, v.1836, n.2, p.211-26, Dec, 2013.

Ohga, N; Ishikawa, S; Maishi, N; Akiyama, K; Hida, Y; Kawamoto, T; Sadamoto, Y; Osawa, T; Yamamoto, K; Kondoh, M; Ohmura, H; Shinohara, N; Nonomura, K; Shindoh, M; Hida, K.

Heterogeneity of tumor endothelial cells: comparison between tumor endothelial cells isolated from high- and low-metastatic tumors. *Am J Pathol*, v. 180, n. 3, p. 1294-307, Mar, 2012.

Okamoto M, Ono M, Uchiumi T, Ueno H, Kohno K, Sugimachi K, Kuwano M. Up-regulation of thrombospondin-1 gene by epidermal growth factor and transforming growth factor beta in human cancer cells--transcriptional activation and messenger RNA stabilization. *Biochim Biophys Acta*, v.1574, n.1, p.24-34, Feb, 2002.

Orr, A,W; Pallero, M. A; Xiong, W. C; Murphy-Ullrich, J. E. Thrombospondin induces RhoA inactivation through FAK-dependent signaling to stimulate focal adhesion disassembly. *J Biol Chem*, v.279, n.47, p.48983-92, Nov, 2004.

Orr, A. W; Pallero, M. A; Murphy-Ullrich, J. E. Thrombospondin stimulates focal adhesion disassembly through Gi- and phosphoinositide 3-kinase-dependent ERK activation. *J Biol Chem*, v.277, n.23, p.20453-60, Jun, 2002.

Orr, A. W; Pallero, M. A; Xiong, W. C; Murphy-Ullrich, J. E. Thrombospondin induces RhoA inactivation through FAK-dependent signaling to stimulate focal adhesion disassembly. *J Biol Chem*, v. 279, n. 47, p. 48983-92, Nov, 2004.

Osborne, C. K; Hamilton, B; Titus, G; Livingston, R. B. Epidermal growth factor stimulation of human breast cancer cells in culture. *Cancer Res*, v.40, n.7, p.2361-6, Jul, 1980.

Oskarsson,T. Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. *Breast*, v.22, Suppl 2, p.S66-72, Aug, 2013.

Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet*, v.133, p.571–573, 1889.

Pandya, P; Orgaz,J.L; Sanz-Moreno,V. Modes of invasion during tumour dissemination. *Mol Oncol*, v.11, n.1, p.5-27, Jan, 2017.

Park, C.C., Zhang, H., Pallavicini,M., Gray, J.W., Baehner, F., Park, C.J., Bissell, M.J., 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 Research*, p. 1526–1535, 2006.

Perou, C. M; Sørlie, T; Eisen, M. B; van de Rijn, M; Jeffrey, S. S; Rees, C. A; Pollack, J. R; Ross, D. T; Johnsen, H; Akslen, L. A; Fluge, O; Pergamenschikov, A; Williams, C; Zhu, S. X; Lønning, P. E; Børresen-Dale, A. L; Brown, P. O; Botstein, D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, v. 406, n. 6797, p. 747-52, Aug, 2000.

Petersen, O.W., Ronnov-Jessen, L., Howlett, A.R., Bissell, M.J. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.89, p. 9064–9068, 1992.

Pickup, M. W.; Mouw, J. K.; Weaver, V. M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep*, v.15, n.12, p.1243-53, Dec, 2014.

Pinilla-Macua, I.; Grassart, A.; Duvvuri, U.; Watkins, S. C.; Sorkin, A. EGF receptor signaling, phosphorylation, ubiquitylation and endocytosis in tumors in vivo. *Elife*, v.6, Dec, 2017.

Polyak, K.; Kalluri, R. The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v.2, n.11, Nov, 2010.

Poujade, M.; Grasland-Mongrain, E.; Hertzog, A.; Jouanneau, J.; Chavrier, P.; Ladoux, B.; Buguin, A.; Silberzan, P. Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.104, n.41, p.15988-93, Oct, 2007.

Prat, A.; Parker, J. S.; Karginova, O.; Fan, C.; Livasy, C.; Herschkowitz, J. I.; He, X.; Perou, C. M. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*, v.12, n.5, Sep, 2010.

Provenzano, E.; Ulaner, G. A.; Chin, S. F. Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clin*, v.13, n.3, p. 325-338, Jul, 2018.

Prudovsky I, Savion N, Zhan X, Friesel R, Xu J, Hou J, McKeehan WL, Maciag T. Intact and functional fibroblast growth factor (FGF) receptor-1 trafficks near the nucleus in response to FGF-1. *J Biol Chem*, v.269, n.50, p.31720-4, Dec, 1994.

Qian, X.; Wang, T. N.; Rothman, V. L.; Nicosia, R. F.; Tuszynski, G. P. Thrombospondin-1 modulates angiogenesis in vitro by up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in endothelial cells. *Exp Cell Res*, v.235, n.2, p.403-12, Sep, 1997.

Qian, C. N. Hijacking the vasculature in ccRCC-co-option, remodelling and angiogenesis. *Nat Rev Urol*, v. 10, n. 5, p. 300-4, May, 2013.

Qin, Y.; Zhu, Y.; Luo, F.; Chen, C.; Chen, X.; Wu, M. Killing two birds with one stone: dual blockade of integrin and FGF signaling through targeting syndecan-4 in postoperative capsular opacification. *Cell Death Dis*, v.8, n.7, Jul, 2017.

Qu Y, Han B, Yu Y, Yao W, Bose S, Karlan BY, Giuliano AE, Cui X. Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells. *PLoS One*, v.10, n.7, Jul, 2015.

Ren, B.; Yee, K. O.; Lawler, J.; Khosravi-Far, R. Regulation of tumor angiogenesis by thrombospondin-1. *Biochim Biophys Acta*, v.1765, n.2, p.178-88, Apr, 2006.

Resovi, A.; Pinessi, D.; Chiorino, G.; Taraboletti, G. Current understanding of the thrombospondin-1 interactome. *Matrix Biol*, Jan, 2014.

Ribatti, D.; Djonov, V. Intussusceptive microvascular growth in tumors. *Cancer Lett*, v. 316, n. 2, p. 126-31, Mar, 2012.

Ricard-Blum, S.; Salza, R. Matricryptins and matrikines: biologically active fragments of

the extracellular matrix. *Exp Dermatol*, v.23, n.7, p.457-63, Jul, 2014.

Roberts, D. D; Kaur, S; Isenberg, J. S. Regulation of Cellular Redox Signaling by Matricellular Proteins in Vascular Biology, Immunology, and Cancer. *Antioxid Redox Signal*, v. 27, n. 12, p. 874-911, Oct, 2017.

Rohrs, J. A; Sulistio, C. D; Finley, S. D. Predictive model of thrombospondin-1 and vascular endothelial growth factor in breast tumor tissue. *NPJ Syst Biol Appl*, v.2, Oct, 2016.

Roskoski,R. Jr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res*, v.79, p.34-74, Jan, 2014.

Russnes, H. G; Lingjærde, O. C; Børresen-Dale, A. L; Caldas, C. Breast Cancer Molecular Stratification: From Intrinsic Subtypes to Integrative Clusters. *Am J Pathol*, v.187, n.10, p. 2152-2162, Oct, 2017.

Sachs, N; de Ligt, J; Kopper, O; Gogola, E; Bounova, G; Weeber, F; Balgobind, A. V; Wind, K; Gracanin, A; Begthel, H; Korving, J; van Boxtel, R; Duarte, A. A; Lelieveld, D; van Hoeck, A; Ernst, R. F; Blokzijl, F; Nijman, I. J; Hoogstraat, M; van de Vem, M; Egan, D. A; Zinzalla, V; Moll, J; Boj, S. F; Voest, E. E; Wessels, L; van Diest, P. J; Rottenberg, S; Vries, R. G. J; Cuppen, E; Clevers, H. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell*, v.172, n.1-2, p. 373-386, Jan, 2018.

Saunus JM, Smart CE, Kutasovic JR, Johnston RL, Kalita-de Croft P, Miranda M, Rozali EN, Vargas AC, Reid LE, Lorsy E, Cocciardi S, Seidens T, McCart Reed AE, Dalley AJ, Wockner LF, Johnson J, Sarkar D, Askarian-Amiri ME, Simpson PT, Khanna KK, Chenevix-Trench G, Al-Ejeh F, Lakhani SR. Multidimensional phenotyping of breast cancer cell lines to guide preclinical research. *Breast Cancer Res Treat*, v.167, n.1, p.289-301, Jan, 2018.

Schmidt, M.M; Wittrup, K. D. A modeling analysis of the effects of molecular size and binding affinity on tumor targeting. *Mol Cancer Ther*, v.8, n.10, p.2861-71, Oct, 2009.

Seddighzadeh, M; Zhou, J. N; Kronenwett, U; Shoshan, M. C; Auer, G; Sten-Linder, M; Wiman, B; Linder, S. ERK signalling in metastatic human MDA-MB-231 breast carcinoma cells is adapted to obtain high urokinase expression and rapid cell proliferation. *Clin Exp Metastasis*, v.17, n.8, p.649-54, 1999.

Shaw, K. R; Wrobel, C. N; Brugge, J. S. Use of three-dimensional basement membrane cultures to model oncogene-induced changes in mammary epithelial morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, v. 9, n. 4, p. 297-310, Oct, 2004.

Shen, J; Cao, B; Wang, Y; Ma, C; Zeng, Z; Liu, L; Li, X; Tao, D; Gong, J; Xie, D. Hippo component YAP promotes focal adhesion and tumour aggressiveness via transcriptionally activating THBS1/FAK signalling in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, v.37, n.1, Jul, 2018.

Shen, Y; Quan, J; Wang, M; Li, S; Yang, J; Lv, M; Chen, Z; Zhang, L; Zhao, X; Yang, J.

Tumor vasculogenic mimicry formation as an unfavorable prognostic indicator in patients with breast cancer. *Oncotarget*, v. 8, n. 34, p. 56408-56416, Apr, 2017.

Sigismund, S; Avanzato, D; Lanzetti, L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol*, v.12, n.1, p. 3-20, Jan, 2018.

Simian,M; Bissell,M.J.Organoids:A historical perspective of thinking in three dimensions. *J Cell Biol*, v. 216, n. 1, p. 31-40, Jan, 2017.

Simpson, K. J; Selfors, L. M; Bui, J; Reynolds, A; Leake, D; Khvorova, A; Brugge, J. S. Identification of genes that regulate epithelial cell migration using an siRNA screening approach. *Nat Cell Biol*, v.10, n.9, p.1027-38, Sep, 2008.

Sinn, H. P; Kreipe, H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care (Basel)*,v.8, n.2, p. 149-54, May, 2013.

Skandalis SS, Afratis N, Smirlaki G, Nikitovic D, Theocharis AD, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Cross-talk between estradiol receptor and EGFR/IGF-IR signaling pathways in estrogen-responsive breastcancers: focus on the role and impact of proteoglycans. *Matrix Biol*, v.35, p.182-93, Apr, 2014.

Smith, J. W; Cheresh, D. A.Integrin (alpha v beta 3)-ligand interaction. Identification of a heterodimeric RGD binding site on the vitronectin receptor. *J Biol Chem*, v.265, n.4, p.2168-72, Feb, 1990.

Song,R.X; Zhang,Z; Chen,Y; Bao,Y; Santen,R.J.Estrogen signaling via a linear pathway involving insulin-like growth factor I receptor, matrixmetalloproteinases, and epidermal growth factor receptor to activate mitogen-activated proteinkinase in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology*, v.148, n.8, p.4091-101, Aug, 2007.

Sørlie, T; Perou, C. M; Tibshirani, R; Aas, T; Geisler, S; Johnsen, H; Hastie, T; Eisen, M. B; van de Rijn, M; Jeffrey, S. S; Thorsen, T; Quist, H; Matese, J. C; Brown, P. O; Botstein, D; Lønning, P. E; Børresen-Dale, A. L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.98, n.19, p.10869-74, Sep, 2001.

Sorlie, T; Tibshirani, R; Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.100, n.14, p.8418-23, Jul, 2003.

Soula-Rothhut, M; Coissard, C; Sartelet, H; Boudot, C; Bellon, G; Martiny, L; Rothhut, B. The tumor suppressor PTEN inhibits EGF-induced TSP-1 and TIMP-1 expression in FTC-133 thyroid carcinoma cells. *Exp Cell Res*, v. 304, n.1, p.187-201, Mar, 2005.

Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Peterson WD Jr, Brenz R, McGrath CM, Russo J, Pauley RJ, Jones RF, Brooks SC. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res*, v.50, n.18, p.6075-86, Sep, 1990.

Soung YH, Clifford JL, Chung J. Crosstalk between integrin and receptor tyrosine kinase signaling in breast carcinoma progression. *BMB Rep*, v.43, n.5, p.311-8, May, 2010.  
Soysal, S. D; Tzankov, A; Muenst, S. E. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology*, v. 82, n.(3-4), p.142-52, Sep, 2015.

Stallaert, W; Brüggemann, Y; Sabet, O; Baak, L; Gattiglio, M; Bastiaens, P. I. H. Contact inhibitory Eph signaling suppresses EGF-promoted cell migration by decoupling EGFR activity from vesicular recycling. *Sci Signal*, v.11, n.541, Jul, 2018.

Staniszewska, I; Zaveri, S; Del Valle L; Oliva, I; Rothman, V. L; Croul, S. E, Roberts, D. D; Mosher, D. F; Tuszynski, G. P; Marcinkiewicz, C. Interaction of  $\alpha 9 \beta 1$  integrin with thrombospondin-1 promotes angiogenesis. *Cir Res*, v.100, n.9, p.1308-16, May, 2007.

Stoscheck CM, Carpenter G. Characterization of the metabolic turnover of epidermal growth factor receptor protein in A-431 cells. *J Cell Physiol*, v.120, n.3, p.296-302, Sep, 1984.

Streuli, C. H; Akhtar, N. Signal co-operation between integrins and other receptor systems. *Biochem J*, v.418, n.3, p.491-506, Mar, 2009.

Subik, K; Lee, J. F; Baxter, L; Strzepek, T; Costello, D; Crowley, P; Xing, L; Hung M. C; Bonfiglio, T; Hicks, D. G; Tang, P. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer (Auckl)*, v.4, p.35-41, May, 2010.

Suh, E. J; Kabir, M. H; Kang, U. B; Lee, J. W; Yu, J; Noh, D. Y; Lee, C. Comparative profiling of plasma proteome from breast cancer patients reveals thrombospondin-1 and BRWD3 as serological biomarkers. *Exp Mol Med*, v.44, n.1, p. 36-44, Jan, 2012.

Suyama, K; Shapiro, I; Guttman, M; Hazan, R. B. A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell*, v.2, n.4, p.301-14, Oct, 2002.

Svensson, C. M; Medyukhina, A; Belyaev, I; Al-Zaben, N; Figge, M. T. Untangling cell tracks: Quantifying cell migration by time lapse image data analysis. *Cytometry A*, v.93, n.3, p.357-370, Mar, 2018.

Szatmary, A. C; Nossal, R. Determining whether observed eukaryotic cell migration indicates chemotactic responsiveness or random chemokinetic motion. *J Theor Biol*, v.425, p.103-112, Jul, 2017.

Taddei I, Faraldo MM, Teulière J, Deugnier MA, Thiery JP, Glukhova MA. Integrins in mammary gland development and differentiation of mammary epithelium. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, v.8, n.4, p.383-94, Oct, 2003.

Tait L, Soule HD, Russo J. Ultrastructural and immunocytochemical characterization of an immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res*, v.50, n.18, p.6087-94, Sep, 1990.

Tan K, Duquette M, Liu JH, Zhang R, Joachimiak A, Wang JH, Lawler J. The structures of the thrombospondin-1 N-terminal domain and its complex with a synthetic pentameric

heparin. *Structure*, v.14, n.1, p.33-42, Jan, 2006.

Taraboletti, G; Morbidelli, L; Donnini, S; Parenti, A; Granger, H. J; Giavazzi, R; Ziche, M. The heparin binding 25 kDa fragment of thrombospondin-1 promotes angiogenesis and modulates gelatinase and TIMP-2 production in endothelial cells. *FASEB J*, v.14, n.12, p.1674-6, Sep, 2000.

Theocharis AD, Skandalis SS, Neill T, Mulhaupt HA, Hubo M, Frey H, Gopal S, Gomes A, Afratis N, Lim HC, Couchman JR, Filmus J, Sanderson RD, Schaefer L, Iozzo RV, Karamanos NK. Insights into the key roles of proteoglycans in breast cancer biology and translational medicine. *Biochim Biophys Acta*, v.1855, n.2, p.276-300, Apr, 2015.

Timoshenko, A. V; Rastogi, S.; Lala, P. K. Migration-promoting role of VEGF-C and VEGF-C binding receptors in human breast cancer cells. *Br J Cancer*, v.97, n.8, p.1090-8, Oct, 2007.

Tomas et al. EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends Cell Biol*, v.24, n.1, p.26-34, Jan, 2014.

Torre, L.A; Siegel, R.L; Ward, E.M; Jemal, A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends - An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v.25, n.1, p.16-27, Jan, 2016.

Trinh, X. B; Tjalma, W. A; Vermeulen, P. B; Van den Eynden, G; Van der Auwera, I; Van Laere, S. J; Helleman, J; Berns, E. M; Dirix, L. Y; van Dam, P. A. The VEGF pathway and the AKT/mTOR/p70S6K1 signalling pathway in human epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer*, v.100, n.6, p.971-8, Mar, 2009.

Trotter, T. N; Yang, Y. Matricellular proteins as regulators of cancer metastasis to bone. *Matrix Biol*, v.52-54, p. 301-314, May-Jul, 2016.

Tsonis, A. I; Afratis, N; Gialeli, C; Ellina, M. I; Piperigkou, Z; Skandalis, S. S; Theocharis, A. D; Tzanakakis, G. N; Karamanos, N. K. Evaluation of the coordinated actions of estrogen receptors with epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor in the expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans and cell motility in breast cancer cells. *FEBS J*, v.280, n.10, p.2248-59, May, 2013.

Turner, N; Pearson, A; Sharpe, R; Lambros, M; Geyer, F; Lopez-Garcia, M. A, Natrajan R; Marchio, C; Iorns, E; Mackay, A; Gillett, C; Grigoriadis, A; Tutt, A; Reis-Filho J. S; Ashworth, A. FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res*, v.70, n.5, p.2085-94, Mar, 2010.

Vacca, A; Di Marcotullio, L; Giannini, G; Farina, M; Scarpa, S; Stoppacciaro, A; Calce, A; Maroder, M; Frati, L; Screpanti, I; Gulino, A. Thrombospondin-1 is a mediator of the neurotypic differentiation induced by EGF in thymic epithelial cells. *Exp Cell Res*, v. 248, n.1, p.79-86, Apr, 1999.

Vardiero, F. M. Papel de Catepsinas na Angiogênese Induzida por TSP HepII, um peptídeo derivado do Domínio N-terminal da Trombospondina-1. 2012. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, UERJ, Rio de Janeiro.

- Vedula, S. R; Ravasio, A; Lim, C. T; Ladoux, B. Collective cell migration: a mechanistic perspective. *Physiology (Bethesda)*, v.28, n.6, p. 370-9, Nov, 2013.
- Vergara, D; Valente, C. M; Tinelli, A; Siciliano, C; Lorusso, V; Acierno, R; Giovino, G; Santino, A; Storelli, C; Maffia, M. Resveratrol inhibits the epidermal growth factor-induced epithelial mesenchymal transition in MCF-7 cells. *Cancer Lett*, v.310, n.1, p.1-8, Nov, 2011.
- Viallard, C; Larrivée, B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*, v. 20, n. 4, p. 409-426, Nov, 2017.
- Vidi, P. A; Bissell, M. J; Lelièvre, S. A. Three-dimensional culture of human breast epithelial cells: the how and the why. *Methods Mol Biol*, v.945, p.193-219, 2013.
- Villaseñor, R; Kalaidzidis, Y; Zerial, M. Signal processing by the endosomal system. *Curr Opin Cell Biol*, v.39, p.53-60, Apr, 2016.
- Vogel T, Guo NH, Krutzsch HC, Blake DA, Hartman J, Mendelovitz S, Panet A, Roberts DD. Modulation of endothelial cell proliferation, adhesion, and motility by recombinant heparin-binding domain and synthetic peptides from the type I repeats of thrombospondin. *J Cell Biochem*, v.53, n.1, p.74-84, Sep, 1993.
- Vogel, C. L; Cobleigh, M. A; Tripathy, D; Gutheil, J. C; Harris, L. N; Fehrenbacher, L; Slamon, D. J; Murphy, M; Novotny, W. F; Burchmore, M; Shak, S; Stewart, S. J; Press, M. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, v.20, n.3, p.719-26, Feb, 2002.
- Wang, F; Weaver, V. M; Petersen, O. W; Larabell, C. A; Dedhar, S; Briand, P; Lupu, R; Bissell, M. J. Reciprocal interactions between beta1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, n. 25, p. 14821-6, Dec, 1998.
- Wang, H; Jin, H; Beauvais, D. M; Rapraeger, A. C. Cytoplasmic domain interactions of syndecan-1 and syndecan-4 with  $\alpha 6 \beta 4$  integrin mediate human epidermal growth factor receptor (HER1 and HER2) -dependent motility and survival. *J Biol Chem*, v.289, n.44, p.30318-32, Oct, 2014.
- Wang, H; Jin, H; Rapraeger, A. C. Syndecan-1 and Syndecan-4 Capture Epidermal Growth Factor Receptor Family Members and the  $\alpha 3 \beta 1$  Integrin Via Binding Sites in Their Ectodomains: novel synstatins prevent kinase capture and inhibit  $\alpha 6 \beta 4$ -integrin-dependent epithelial cell motility. *J Biol Chem*, v.290, n.43, p.26103-13, Oct, 2015.
- Wang, T. N; Albo, D; Tuszynski, G. P. Fibroblasts promote breast cancer cell invasion by upregulating tumor matrix metalloproteinase-9 production. *Surgery*, v.132, n.2, p.220-5, Aug, 2002.
- Wang, T. N; Qian, X. H; Granick, M. S; Solomon, M. P; Rothman, V. L; Tuszynski, G. P. The effect of thrombospondin on oral squamous carcinoma cell invasion of collagen. *Am J Surg*, v.170, n.5, p.502-5, Nov, 1995.

- Wang, T. N; Qian, X; Granick, M. S; Solomon, M. P; Rothman, V. L; Berger, D. H; Tuszynski, G. P. Thrombospondin-1 (TSP-1) promotes the invasive properties of human breast cancer. *J Surg Res*, v.63, n.1, p.39-43, Jun, 1996.
- Weaver, V. M; Lelièvre, S; Lakins, J. N; Chrenek, M. A; Jones, J. C; Giancotti, F; Werb, Z; Bissell, M. J. Beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell*, v. 2, n.3, p.205-16, Sep, 2002.
- Wee, P; Wang, Z. Cell Cycle Synchronization of HeLa Cells to Assay EGFR Pathway Activation. *Methods Mol Biol*, v.1652, p.167-181, 2017.
- Weiger, M. C; Vedham, V; Stuelten, C. H; Shou, K; Herrera, M; Sato, M; Losert, W; Parent, C. A. Real-time motion analysis reveals cell directionality as an indicator of breast cancer progression. *PLoS One*, v.8, n.3, 2013.
- Wiley, H. S. Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. *Exp Cell Res*, v.284, n.1, p.78-88, Mar, 2003.
- Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Bröcker EB, Friedl P. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol*, v.160, n.2, p.267-77, Jan, 2003.
- Wong, G. S; Rustgi, A. K. Matricellular proteins: priming the tumour microenvironment for cancer development and metastasis. *Br J Cancer*, v. 108, n. 4, p. 755-61, Mar, 2013.
- Woods A, Couchman JR. Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol Biol Cell*, v.5, n.2, p.183-92, Feb, 1994.
- Xu Y, Tan LJ, Grachtchouk V, Voorhees JJ, Fisher GJ. Receptor-type protein-tyrosine phosphatase-kappa regulates epidermal growth factor receptor function. *J Biol Chem*, v.280, n.52, p.42694-700, Dec, 2005.
- Yabkowitz, R; Mansfield, P. J; Dixit, V. M; Suchard, S. J. Motility of human carcinoma cells in response to thrombospondin: relationship to metastatic potential and thrombospondin structural domains. *Cancer Res*, v.53, n.2, p.378-87, Jan, 1993.
- Yaeger R, Corcoran RB. Targeting Alterations in the RAF-MEK Pathway. *Cancer Discov*, v.9, n.3, p.329-341, Mar, 2019.
- Yang, J. P; Liao, Y. D; Mai, D. M; Xie, P; Qiang, Y. Y; Zheng, L. S; Wang, M. Y; Mei, Y; Meng, D. F; Xu, L; Cao, L; Yang, Q; Yang, X. X; Wang, W. B; Peng, L. X; Huang, B. J; Qian, C. N. Tumor vasculogenic mimicry predicts poor prognosis in cancer patients: a meta-analysis. *Angiogenesis*, v.19, n.2, p. 191-200, Apr, 2016.
- Yanovich, G; Agmon, H; Harel, M; Sonnenblick, A; Peretz, T; Geiger, T. Clinical Proteomics of Breast Cancer Reveals a Novel Layer of Breast Cancer Classification. *Cancer Res*, v.78, n.20, p.6001-6010, Aug, 2018.

Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*, v.64, n.4, p.841-8, Feb, 1991.

Yee KO, Connolly CM, Duquette M, Kazerounian S, Washington R, Lawler J. The effect of thrombospondin-1 on breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res Treat*, v. 114, n.1, p.85-96, Mar, 2009.

Yeo, S. K; Guan, J. L. Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? *Trends Cancer*, v.3, n.11, p. 753-760, Nov, 2017.

Yoshimura, N; Sano, H; Hashiramoto, A; Yamada, R; Nakajima, H; Kondo, M; Oka T. The expression and localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF receptor-1 (FGFR-1) in human breast cancer. *Clin Immunol Immunopathol*, v.89, n.1, p.28-34, Oct, 1998.

Zeng, F; Harris, R.C. Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. *Semin Cell Dev Biol*, v.28, p.2-11, Apr, 2014.

Zhang, X; Lawler, J. Thrombospondin-based antiangiogenic therapy. *Microvasc Res*, v.74, n.2-3, p.90-9, Sep-Nov, 2007.

Zhao, C; Isenberg, J. S; Popel, A. S. Human expression patterns: qualitative and quantitative analysis of thrombospondin-1 under physiological and pathological conditions. *J Cell Mol Med*, v.22, n.4, p.2086-2097, Apr, 2018.

Zhou, J. N; Ljungdahl, S; Shoshan, M.C; Swedenborg, J; Linder, S. Activation of tissue-factor gene expression in breast carcinoma cells by stimulation of the RAF-ERK signaling pathway. *Mol Carcinog*, v.21, n.4, p.234-43, Apr, 1998.

Zhu, J; Xiong, G; Trinkle, C; Xu, R. Integrated extracellular matrix signaling in mammary gland development and breast cancer progression. *Histol Histopathol*, v. 29, n.9, Sep, 2014.

Zou, L; Cao, S; Kang, N; Huebert, R. C; Shah, V. H. Fibronectin induces endothelial cell migration through  $\beta 1$  integrin and Src-dependent phosphorylation of fibroblast growth factor receptor-1 at tyrosines 653/654 and 766. *J Biol Chem*, v.287, n.10, p.7190-202, Mar, 2012.