

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Avaliação Bioquímica do Secretoma de Células de Adenocarcinoma de Mama - MACL-1

Rodrigo Junio Rodrigues Barros

Belo Horizonte

2017

Rodrigo Junio Rodrigues Barros

Avaliação Bioquímica do Secretoma de Células de Adenocarcinoma de Mama - MACL-1

Orientador: Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Andreia Laura Rodrigues Prates

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte do requisito para obtenção do título de Doutor.

Belo Horizonte

2017

“ Ah! É uma qualidade maravilhosa, um verdadeiro dom do céu. Você sabe, há sementes por toda parte. Não só no chão, mas nos telhados das casas, no parapeito das janelas, nas calçadas das ruas, nas cercas e nos muros. Milhares e milhares de sementes que não servem pra nada. Estão ali esperando que um vento as carregue para um jardim ou para um campo.”

Maurice Druon

Uma vez li uma frase de ELY, *You don't need many heroes if you choose carefully*, desde então, outro não é motivo a quem eu dedico este trabalho se não aos meus amigos e tutores Dr Jader Cruz e Drª Andreia Laura que souberam, com sua sensibilidade, tornar mero conhecimento em uma belíssima admiração. Gratidão eterna!!!

Agradecimentos

Às três mulheres mais importantes da minha vida, minha Mãe, minha Irmã e minha Sobrinha, vocês são minhas estrelas, minha fonte de força, meu conforto, meu bem mais precioso... todas as mais belas palavras ainda não bastam pra descrever o que vocês representam pra mim.

Ao meu orientador, Prof. Jader Cruz, exemplo de caráter, ética e inteligência, pessoa fundamental na minha formação. Não existem palavras pra descrever a minha admiração, carinho e gratidão. Obrigado pelo conhecimento, pelo convívio e pela oportunidade!

À minha co-orientadora, Prof^a Andréia Laura, que desde o início acreditou no meu trabalho (nosso trabalho), a quem sempre serei eternamente grato por tudo. Você foi a criadora desse sentimento de busca pelo conhecimento. Muitíssimo obrigado!!!

À querida Dr^a Luciana Silva, pelos inúmeros conhecimentos e risadas (DNA e RNA), sobretudo por ter me acolhido tão generosamente em seu Laboratório de Biologia Celular, foi um aprendizado sem igual.

Ao Zé Diou, meu irmão emprestado.

A minha família, em especial Tio José Pedro pelo apoio incondicional e incentivo de sempre.

Ao meu pai, que nas suas limitações, de uma forma ou de outra sempre me ajudou como soube.

Ao meu amigo Dedé pelos incansáveis bares e discussões (forever “Run Boom” mais uma vez).

As amigas, companheiras de trabalho, Dr^a Dayane Naves e Jaque Leal, que sempre fizeram parte dos meus piores e melhores momentos. Minhas maiores angústias e

felicidades foram compartilhadas com vocês.

Ao Daniel (Muriel) pelo apoio e incontroláveis risadas na hora do almoço.

À minha mais bela flor “campixxxxxta” Dr^a Pollyana Pimentel, cada taça de vinho um conhecimento a “maixxxx”...

Ao meu nobre e grande amigo Alex (little cat), suas orações como sempre fazendo parte da minha vida e me tornando uma pessoa cada vez melhor.

Aos companheiros (as) de trabalho do LAMEX, em especial a minha grande amiga Dr^a Tatiane Barreto, cada um de vocês é um cardiomiócito do meu coração.

Aos Dr. Frederico Crepaldi, Daniela Diniz e Dr^a Kathrina pelos experimentos com citometria.

Aos integrantes do Serviço de Biologia Celular da FUNED, em especial Ms. Fábio (pelas dívidas de chopp).

Aos integrantes do Laboratório de Toxinologia da FIOCRUZ-RJ, em especial Dr. Jonas Perales, André Ferreira (Pink) e Monique, sem vocês esse trabalho seria impossível.

Aos integrantes do Serviço de Proteômica e Aracnídeos (Spar) da FUNED, principalmente à Dr^a Márcia Borges e Dr^a Marta Cordeiro pelo aprendizado e colaborações.

Aos órgãos de financiamento: FAPEMIG, CAPES e CNPq.

Lista de Abreviações

ADAM-10	Desintegrinas do tipo 10
ADAMs	Desintegrinas
APARC	Proteína ácida secretada rica em cisteína
ATCC	American Type Culture Collection
b-FGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
BSA	Albumina do soro bovino
CAFs	Fibroblastos associados ao câncer
CAV1	Caveolina 1
CBA	Cytometric Bead Array
CCD19-Lu	Linhagem de fibroblastos (ATCC®CL-210)
CD44	Grupo de diferenciação 44 (<i>cluster of differentiation</i>)
CDK9	Quinase dependente de ciclina
CKAP5	Proteína 5 associada ao citoesqueleto
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CXCR2	Receptor de quimiocina 2
DAB	Diaminobenzidina
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCTN2	Dinactina
DDA	Data-dependent acquisition
DMEM	Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
EGF	Fator de crescimento epidermal
EIF4G1	Fator de iniciação da tradução eucariótica 4
EMEM	Meio de cultura Eagle's Minimum Essential Medium
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
ER	Receptores alfa de estrogênio
ESI	ionização feita por eletrospray
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FAP	Proteína de ativação de fibroblastos

FCDP	Fator de crescimento derivado de plaquetas
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FGF	mitógenos de células endoteliais angiogênicas
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblastos 2
FL1	Fluorescência do tipo 1
FL2	Fluorescência do tipo 2
FSC	Forward Angle Light Scatter (Tamanho celular)
FSP-1	Proteína 1 específica para fibroblastos
HER2	Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
IAA	Iodoacetamida
ICAM-1	Molécula-1 de adesão intercelular
IFN- γ	Interferon do tipo gama
IHC	Imuno-histoquímica
IKK β	Proteína IKB quinase beta
IL	Interleucina
IL-10	interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina-6
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JAK1	Tirosina quinase intracelular 1
LC-MS	Cromatografia líquida com espectrometria de massa
LIF	Fator inibidor da leucemia
MEGM	Meio de cultura Mammary Epithelial Cell Growth Medium
MMP-2	Metaloprotease do tipo 2
MMP-9	Metaloprotease do tipo 9
MMPs	Metaloproteases
MS	Espectrometria de massas
NF κ B	Fator nuclear kappa B
P4H	Prolil 4-Hidroxilase
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PDGF- α/β	Fator de crescimento derivado de plaquetas alfa/beta

PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGF-BB	Fator de crescimento derivado de plaquetas BB
PDGFR	Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFR β	Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas do tipo beta
PDGG-A	Fator de crescimento derivado de plaquetas isoforma A
PDGG-B	Fator de crescimento derivado de plaquetas isoforma B
PET	Poliéster
PKA	Proteína quinase AMPc-dependente
PP1	Fosfatase PP1-alfa
PP1- α	Proteína fosfatase 1-alfa
PP2A	Proteína fosfatase 2A
PR	Progesterona
PSA	Persulfato de amônia
PTPN6	proteína tirosina fosfatase do tipo 6
RAF	Proteína quinase
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RYR	Receptor de rianodina
SDF-1	Fator derivado de células estromais - 1
SDS	Sódio dodecil sulfato
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SMAD	Família de co-fatores de transcrição intercelular
SSC	Side Angle Light Scatter (Granulosidade celular)
STAT3	Proteína sinalizadora associada as quinases JAK
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilenodiamino
TFA	Ácido trifluoracético
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TGF-BrII	Receptor de serina/treonina quinase do tipo II
TNC	Tenascina C
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral do tipo alfa
TUBB4A	Tubulina do tipo beta 4

VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
Wnt	Família de proteínas - Wingless (gene de <i>Drosophila</i> homólogo em vertebrados)
Wnt7a	Proteína da família Wnt
α -SMA	Alfa actina de músculo liso

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	XIV
LISTA DE FIGURAS.....	XV
RESUMO.....	XVII
ABSTRACT.....	XVIII
1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Câncer de mama.....	19
1.1.1 Classificação molecular do câncer de mama.....	21
1.2 Câncer e o microambiente tuoral.....	22
1.2.1 Fibroblastos associados ao câncer (CAFs) no microambiente tumoral.....	24
1.2.1.1 Citocinas que desencadeiam a ativação de fibroblastos.....	27
1.2.1.2 Fatores de crescimento que desencadeiam a ativação de fibroblastos.....	29
1.2.1.3 Demais moléculas que promovem a ativação de fibroblastos.....	30
1.2.1.4 A inflamação ativa fibroblastos.....	32
1.2.1.5 Quimiorresistência induzida por cafs.....	33
1.2.2 O secretoma.....	34
1.3 Câncer de mama e cafs.....	36
1.4 Linhagem de células MACL-1.....	40

1.5 Proteômica e câncer.....	42
2 JUSTIFICATIVA.....	47
3 OBJETIVOS.....	49
3.1 Objetivo geral.....	49
3.2 Objetivos específicos.....	49
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1 Linhagens celulares e manutenção das culturas.....	50
4.2 Co-cultura em transwell®.....	50
4.3 Marcação das células para microscopia de fluorescência.....	51
4.4 Marcação das células por imunocitoquímica.....	52
4.5 Dosagem de citocinas por cytometric bead array (CBA).....	53
4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida sds page e western blotting.....	53
4.7 Extração do secretoma das células MACL-1.....	54
4.8 Extração de proteínas intracelulares das células MACL-1 e CCD19-Lu...55	
4.9 Ensaio de citotoxicidade do secretoma das células MACL-1 em células CCD19-Lu.....	56
4.10 Produção de superóxido mitocondrial em fibroblastos CCD19-Lu.....	57
4.11 Estratégias de análise das populações celulares por citometria de fluxo.....	58
4.12 Eletroforese em gel de poliacrilamida sds com substrato proteico copolimerizado.....	59

4.13 Análises proteômicas.....	60
4.14 Análise da interação entre as proteínas.....	62
4.15 Análise estatística.....	63
5 RESULTADOS.....	64
5.1 Aumento no número de células e alteração da morfologia das células CCD19-Lu em co-cultura com células MCF-10A, MACL-1 e MDA-MB-231 em matriz de poliéster (PET).....	64
5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida sds-page das proteínas do secretoma e das células MACL-1 e CCD19-Lu.....	68
5.3 Alteração da expressão de vimentina em fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células tumorais MACL-1.....	69
5.4 Expressão de proteína de ativação de fibroblatos (FAP) em fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células tumorais MACL-1.....	71
5.5 Aumento da expressão do fator de transcrição nuclear NFκB em fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células tumorais MACL-1.....	72
5.6 Aumento da expressão de IL-6 no sobrenadante de fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células tumorais de mama de MACL-1.....	73
5.7 Identificação de proteases nos fibroblastos expostos ao secretoma das células MACL-1.....	74
5.8 Verificação da citotoxicidade do secretoma das células tumorais MACL-1 em fibroblastos CCD19-Lu para determinação da concentração máxima a ser utilizada em procedimentos que não envolvam co-cultura.....	75
5.9 Aumento da produção de superóxido mitocondrial em fibroblastos CCD19-	

Lu expostos ao secretoma de células tumorais MACL-1.....	77
5.10 Identificação das proteínas intracelulares e no secretoma das células tumorais MACL-1.....	79
5.11 Interação entre as proteínas no secretoma das células tumorais MACL-1.....	82
6 DISCUSSÃO.....	85
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
8 CONCLUSÃO.....	98
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição dos cinco tipos de câncer mais incidentes em mulheres no ano de 2016, excluindo pele não melanoma.....	20
Tabela 2: Estimativa da ocorrência de novos casos de câncer em mulheres no Brasil no biênio 2016-2017, excluindo pele não melanoma.....	20
Tabela 3 – Principais proteínas de interesse relacionadas com regulação, sinalização, diferenciação e crescimento identificadas por LC-MS no secretoma e no lisado das células MACL-1 apresentando homologia taxonômica com Homo sapiens.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Carcinoma de mama in situ, invasivo e metástase.....	21
Figura 2: Microambiente tumoral.....	24
Figura 3: Marcadores moleculares de fibroblastos associados ao câncer (CAFs).....	26
Figura 4: Origens de fibroblastos associados ao câncer (CAFs).....	37
Figura 5: Morfologia das linhagens de câncer de mama MACL-1 e MGSO-3.....	41
Figura 6: Visão geral da proteômica <i>Shotgun</i>	45
Figura 7: Cultivo das células de mama MACL-1, MDA-MB-231, MCF-10A e fibroblastos CCD19-Lu em Transwell.....	51
Figura 8: Gráfico representativo da estratégia de análise utilizada para seleção de células expressando o percentual da molécula de interesse após tratamento com secretoma (50µg/mL).....	59
Figura 9: Células MCF-10A, MACL-1 e MDA-MB-231 cultivadas em matriz de Poliéster (PET) em Transwell com as células CCD19-Lu.....	65
Figura 10: Células CCD19-Lu expostas ao secretoma das células MACL-1.....	66
Figura 11: Alteração na morfologia de fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células MACL-1.....	67
Figura 12: Eletroforese do secretoma e lisado celular em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	68
Figura 13: Expressão de vimentina e desmina em células CCD19-Lu expostas ao secretoma das células MACL-1.....	69
Figura 14: Expressão proteica de vimentina e desmina em células CCD19-Lu	

expostas ao secretoma das células MACL-1.....	70
Figura 15: Expressão de vimentina e desmina em células CCD19-Lu expostas ao secretoma das células MACL-1.....	71
Figura 16: Expressão proteica de NFκB em células CCD19-Lu expostas ao secretoma das células MACL-1.....	72
Figura 17: Expressão de IL-6 em sobrenadante de cultura de células.....	73
Figura 18: Identificação de proteases no lisado das células CCD19-Lu por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo substrato proteico incorporado ao gel.....	75
Figura 19: Ensaio de Citotoxicidade e Viabilidade de fibroblastos CCD19-Lu expostos a diferentes concentrações de secretoma de células tumorais MACL-1.....	77
Figura 20: Determinação da produção de superóxido mitocondrial.....	79
Figura 21: Combinação de espectros de peptídeos.....	80
Figura 22: Categorização das proteínas.....	81
Figura 23: Rede de interações entre as proteínas identificadas e agrupadas de acordo com a função molecular.....	84
Figura 24: Representação esquemática das principais proteínas envolvidas nos mecanismos de alterações observadas em fibroblastos expostos ao secretoma.....	95

RESUMO

O câncer da mama continua sendo a segunda maior causa de morte em mulheres e a previsão é que a incidência desta doença aumente a cada ano. Apesar do grande número de pesquisas, estudos *in vitro* de linhagens celulares de câncer de mama derivadas de tumores não metastáticos têm sido raramente relatados ao passo que estes podem oferecer dados relevantes em relação a estágios de desenvolvimento do tumor e contribuir para um melhor entendimento da fisiopatologia da doença. O estudo dos componentes produzidos e secretados (secretoma) pelas células tumorais demonstraram a contribuição desses para o processo de tumorigênese em vários tipos de câncer, tais como câncer de mama e próstata. Entretanto, a atividade do secretoma das células MACL-1 sobre células não tumorais ainda não foi investigada e os componentes ainda não estão bem descritos. Para isso, fibroblastos CCD19-Lu foram expostos ao secretoma das células de adenocarcinoma de mama (MACL-1) verificando a morfologia, proliferação, expressão de proteínas e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Os ensaios de co-cultura em Transwell demonstraram que, quando expostas ao secretoma das células MACL-1, as células CCD19-Lu tiveram sua morfologia e proliferação alteradas, bem como aumento na expressão de Vimentina, da proteína de ativação de fibroblastos (FAP), do fator de transcrição nuclear NF κ B, de proteases e de IL-6. Essas alterações sugeriram uma mudança no fenótipo dessas células e as análises proteômicas indentificaram uma atividade específica de proteínas decorrente do aumento na produção de ROS pelas células CCD19-Lu expostas a esse secretoma e permitiram estabelecer uma correlação direta com as alterações fenotípicas observadas nesses fibroblastos. Desta forma, sugerimos que as células MACL-1 oriundas de um tumor de mama primário secretam proteínas com atividades capazes de alterar o fenótipo de fibroblastos CCD19-Lu levando à modificações principalmente na expressão de proteínas que apontam para uma possível transformação dessas células em fibroblastos associados ao câncer (CAFs).

Palavras chaves: câncer de mama, secretoma, CAFs, MACL-1.

ABSTRACT

Breast cancer remains the second cause of death in women and the incidence of this disease is growing every year. In spite the large studies in vitro of breast cancer cell lines derived from non-metastatic tumors have been rarely reported whereas they may offer relevant data regarding stages of tumor development and contribute to a better understanding of pathophysiology. The components studies produced and secreted (secretoma) by the tumor cells demonstrated their contribution to process of tumorigenesis in several types of cancer, such breast and prostate. However, MACL-1 cells secretome activity on non-tumor cells has not been investigated and components are still poorly described. Then, CCD19-Lu fibroblasts were exposed of MACL-1 cells secretome and we evaluated changes in morphology, proliferation rate, protein expression and reactive oxygen species (ROS) production. Co-cultures in Transwells assays showed that, when exposed to MACL-1 cells secretome, CCD19-Lu cells had their morphology and proliferation rate altered and an increased in Vimentin, fibroblast activation protein (FAP), nuclear transcription factor NF κ B, proteases and IL-6 expression. These results suggested a phenotype changes of cells and proteomic analyzes identified proteins specific activity to increase of ROS production by CCD19-Lu cells exposed MACL-1 cells secretome establish a direct correlation with the phenotypic alterations observed in fibroblasts. Thus, we suggest that MACL-1 cells from a primary breast tumor secrete proteins with biochemical activities capable of altering CCD19-Lu fibroblasts phenotype leading to modifications mainly in the proteins expression point to a possible transformation of these cells into cancer associated fibroblasts (CAFs).

Key words: breast cancer, secretome, CAFs, MACL-1.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama

O câncer é a segunda maior causa de morte com uma estimativa de 7,6 milhões mortes no mundo a cada ano (Torre, 2015; Siegel, 2015; Allemani et al. 2015). Atualmente, o câncer do pulmão, da mama e colo-retal são os mais comuns com uma incidência de aproximadamente um milhão de novos casos por ano (Allemani et al. 2015). Esses novos casos de câncer continuam a aumentar devido ao envelhecimento, o crescimento da população, hábitos de vida e um aumento no consumo de álcool e tabagismo (Noguchi et al. 2015).

As taxas de sobrevivência dependem diretamente de diversos fatores como, o tipo de tumor, idade, estágio da doença (a contar do momento do diagnóstico inicial) e do sexo do indivíduo, até mesmo da etnia e da região (Coleman et al. 2008; Siegel et al. 2012; Allemani et al. 2015). Embora o conhecimento do processo de carcinogênese, biologia do tumor e manejo clínico do câncer esteja crescendo rapidamente, os dados relacionados às taxas de sobrevivência não têm melhorado nesse sentido, e o câncer ainda é uma das doenças que mais matam no mundo (Jemal et al. 2011).

Apesar de ser uma doença multifatorial, o câncer conta com um acúmulo de alterações genéticas (induzidas e/ou herdadas) (Hanahan et al. 2000), isso implica dizer que a carcinogênese é um processo demorado, que requer uma série de alterações essenciais para dar origem a um tumor invasivo. Em teoria, isto iria permitir um tempo suficiente para detectar o tumor e fornecer vários alvos biológicos para atacá-lo. No entanto, na maioria dos casos, um tumor se desenvolve sem sintomas e, portanto, muitas vezes só é detectado nas fases finais. Além disso, as diversas alterações genéticas são difíceis de serem identificadas levando a tumores com um perfil heterogêneo que são difíceis de erradicar (Siegel et al. 2012).

O câncer de mama é o câncer mais comum entre as mulheres (Tabela 1) com uma taxa de mortalidade de aproximadamente 14% (Ferlay et al. 2010; Jemal et al. 2011). Todos os anos, mais de 500.000 mulheres de todo o mundo morrem devido a esta doença. E estima-se que para o ano de 2017 este câncer tenha um aumento de 3% em relação às últimas estatísticas (Tabela 2) A etiologia desse câncer envolve

vários fatores de risco sendo os principais: a idade, menarca precoce, menopausa atrasada, uso de contraceptivos orais, terapia de reposição hormonal, história familiar, história de doença benigna da mama e excesso de peso (Izquierdo et al. 2008; Badid et al. 2010; Gupta et al. 2012; Allemani et al. 2015).

Tabela 1 – Distribuição dos cinco tipos de câncer mais incidentes em mulheres no ano de 2016, excluindo pele não melanoma (INCA, 2016)

Localização Primária do Tumor	Procentagem (%)
Mama	25,2
Intestino	8,6
Colo de útero	7,9
Traquéia, brônquio e pulmão	5,3
Estômago	3,7

Tabela 2 – Estimativa da ocorrência de novos casos* de câncer em mulheres no Brasil no biênio 2016-2017, excluindo pele não melanoma** (INCA, 2016)

Localização Primária do Tumor	Procentagem (%)
Mama	28,1
Intestino	9,2
Trquéia, brônquio e pulmão	8,7
Colo do útero	7,9
Estômago	4,8

* Para 600 mil novos casos de câncer no Brasil.

** 180 mil novos casos em homens e mulheres.

O diagnóstico precoce do câncer de mama geralmente fornece um bom prognóstico com uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 80% (Allemani et al. 2015). No entanto, cerca de 5% dos pacientes desenvolvem metástase e 30% dos pacientes eventualmente podem ter reincidência da doença, e a maioria dessas pacientes têm um prognóstico ruim após o diagnóstico (Allemani et al. 2015). Além disso, alguns estudos afirmam que a incidência do câncer de mama deverá aumentar nos próximos anos (NCA, 2016). Estes dados apontam para a necessidade de maiores estudos no que tange ao entendimento e compreensão nas variações individuais da resposta das células tumorais no câncer de mama.

Embora existam diferentes tipos de câncer de mama, este segue uma classificação morfológica como demonstrada na Figura 1.

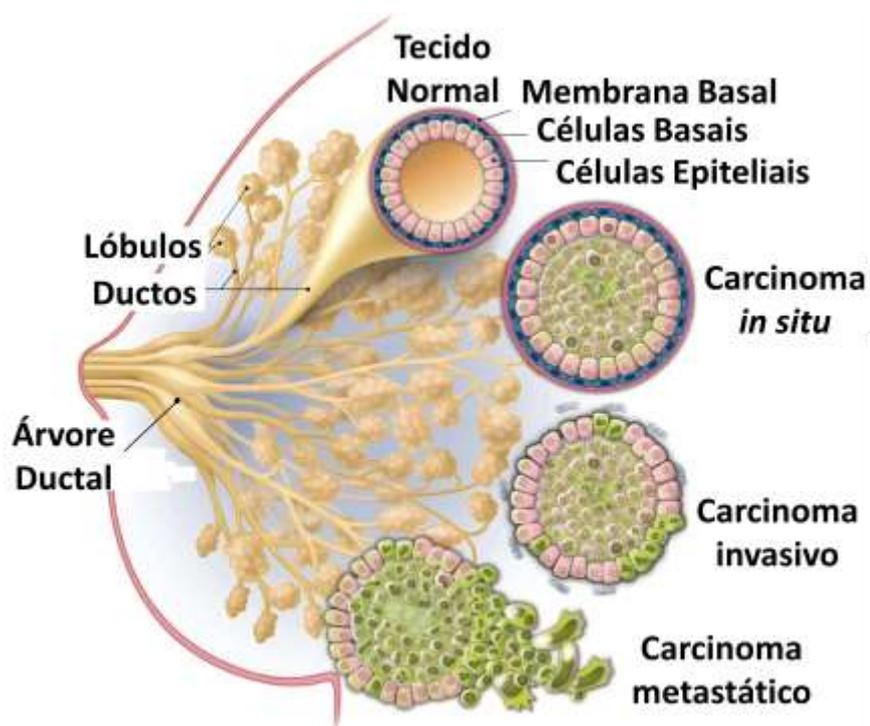


Figura 1 – Carcinoma de mama *in situ*, invasivo e metástase. Células epiteliais do ducto e alvéolo podem sofrer transformação maligna, gerando carcinomas. Quando a proliferação está restrita ao tecido, sem ruptura da lâmina basal, este é classificado como carcinoma *in situ*. Por outro lado, quando a membrana é rompida e as células assumem fenótipos com capacidade de invasão este carcinoma é denominado invasivo. E quando as células tumorais rompem a membrana basal e migram para outros órgão com capacidade de gerar um novo câncer é denominado metástase. (CapeRay modificado. http://www.caperay.com/blog/wp-content/uploads/2014/03/Science_DCIS.jpg. Acessado em: 19 de agosto de 2015).

Uma forma de melhorar a conduta clínica do câncer é através da identificação de biomarcadores que podem ser aplicados para a detecção precoce, diagnóstico, prognóstico ou tratamento (Ludwig et al. 2005). Além disso, alvos moleculares tem sido buscados de forma abrangente na biologia do tumor para servirem de alvos farmacológicos.

1.1.1 Classificação molecular do câncer de mama.

Classificar o câncer de mama em subtipos na obtenção de informações sobre o comportamento do tumor e predição da resposta desse aos possíveis tratamentos

(Rakha et al. 2010), incluem conhecimentos histopatológicos, caracterização molecular e análise da expressão gênica.

Com o objetivo de identificar possíveis caminhos entre lesões pré-malignas e invasivas foi proposto duas possíveis vias para a formação dos tipos de carcinoma mais frequentes (Simpson, 2005). A primeira explica a formação do carcinoma in situ ductal ou lobular o qual progride para o carcinoma invasivo ductal ou lobular. Em geral, associados a baixa gradação mitótica, positivos para a expressão dos receptores alfa de estrogênio (ER) e progesterona (PR), negativos para o receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2) e com estabilidade gênica. A segunda via explica o carcinoma ductal invasivo pouco diferenciado que apresenta alta atipia nuclear, em geral negativos para expressão de ER e PR, positivos para HER2 e ainda apresentam grande instabilidade gênica (Simpson, 2005; Kronewett et al. 2006; Sims et al. 2007).

Uma vez que existem vários tipos de câncer de mama, essa diferenciação entre os carcinomas ajudam a distinguir através do fenótipo celular os diferentes tipos de comportamento das células tumorais em relação a resposta terapêutica, capacidade mitótica; síntese e secreção molecular e até mesmo o prognóstico clínico (Prat & Perou, 2011). Nesse sentido, linhagens de células de tumor primário de mama podem ser classificadas como semelhante a célula basal (*Basal-like*) sendo negativas para os marcadores ER, PR e HER2, mas com um alto índice mitótico (Cheang et al. 2009).

1.2 Câncer e o microambiente tumoral

A iniciação e progressão do câncer são independentes da aquisição de várias alterações que ativam vias de oncogenes e de supressores de tumor (Vogelstein & Kinzler, 2004). Essas alterações permitem que as células envolvidas sofram desregulação do sistema de controle de processos fisiológicos como a divisão e morte célula, e favorece a manutenção das células afetadas e, como consequência, o aumento do numero dessas células. A manutenção do tumor é feita também, por um sistema complexo, estando a aquisição dessas mutações associadas a ocorrência de varias outras alterações genéticas que não necessariamente serão vantajosas na seleção de um grupo celular (Polyak, 2012).

Essas mutações que são conquistadas após vários ciclos de proliferação celular, permitem o surgimento de uma grande diversidade na população de células tumorais que compõe o corpo do tumor. Tais mutações ditas silenciosas são capazes de aumentar a plasticidade fenotípica das células tumorais repercutindo na grande heterogeneidade intratumoral por meio de desregulação da expressão genica e alterações epigenéticas (Polyak, 2012).

Com a progressão do câncer a homeostase tecidual mantida por uma regulação fina é por sua vez afetada pela comunicação cruzada entre os diferentes tipos celulares (Hanahan & Coussens, 2012; Balkwill et al. 2012). Nos tumores sólidos, tal diversidade compreende tanto a população de células tumorais quanto as células do estroma associado. Isso leva a formação de um microambiente anormal, menos estruturado e não uniforme (Figura 2) que aumenta ainda mais a variabilidade interna do tumor (Mao et al. 2012).

Esse complexo microambiente tumoral é composto por diversas populações celulares como células epiteliais, tumorais, fibroblastos, miofibroblastos, células-tronco mesenquimais, adipócitos, pericitos e infiltrado de células do sistema imune (Figura 2) que estão o tempo todo se comunicando através de secreção de componentes celulares (secretoma) ou da interação entre membranas. A comunicação entre os componentes celulares é realizada por uma complexa e dinâmica rede de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e inflamatórios, assim como de enzimas que remodelam a matrix extracelular (Mao et al. 2012). Esses componentes do secretoma tem um papel crítico na progressão do tumor, direcionando este para a malignidade através do aumento da taxa de divisão celular, da formação de vasos sanguíneos e da indução da transição epitélio-mesenquimal (Ouail & Joyce, 2013).

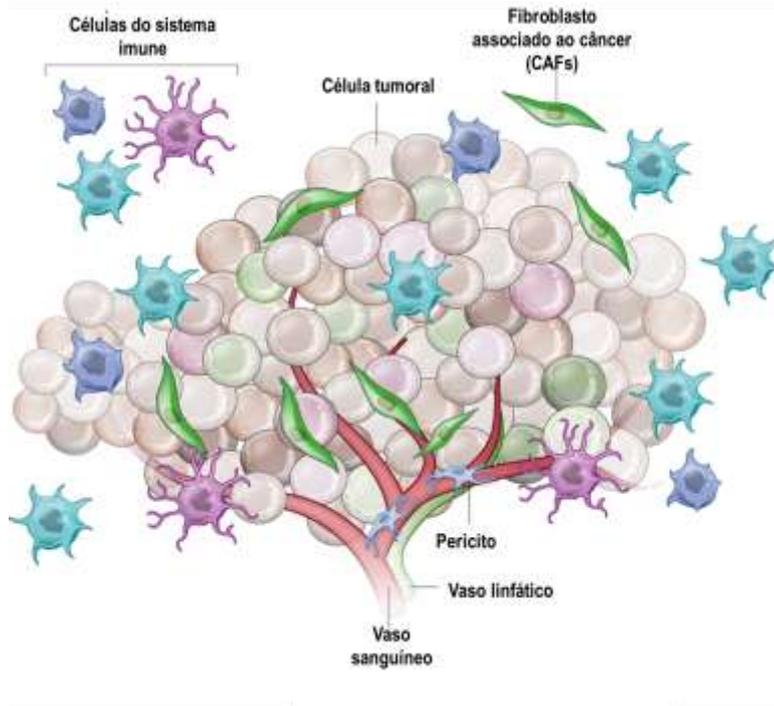


Figura 2 – Microambiente tumoral. (Jutilla & Salvage, 2013 – modificado). O microambiente tumoral é composto pelas células tumorais e o estroma associado. Nesse estroma estão presentes e em complexa interação diferentes tipos celulares como fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e células do sistema imune.

Além disso, estes componentes do secretoma também podem interferir no crescimento do tumor através da indução a morte celular, inibição da angiogênese e/ou recrutamento de células do sistema imune com modulação antitumoral (Hui & Chen, 2015)

1.2.1 Fibroblastos associados ao câncer (CAFs) no microambiente tumoral

Alguns estudos indicam que o desenvolvimento e progressão do tumor para uma transformação maligna depende não apenas da própria célula tumoral, mas também da influência de todos os componentes que compõe o microambiente tumoral (estroma) (Marsh et al. 2013), que podem, muitas vezes, acabar modulando o tumor (Finak et al. 2008; Ahn et al. 2012). Os fibroblastos constituem uma das populações mais abundantes não epiteliais com importantes funções no tecido conjuntivo, dentre elas síntese de colágeno, regulação de processos inflamatórios e diferenciação celular (Tomasek et al., 2002). Além disso, os fibroblastos são responsáveis pela produção das metaloproteinases que estão envolvidas na remodelação do tecido, proliferação celular, motilidade e apoptose.

A secreção de fatores de crescimento pelos fibroblastos também é uma função essencial, pois possibilita uma maior interação entre células mesenquimais e epiteliais (Wiseman & Werb 2002). A comunicação adequada entre as células é essencial para o crescimento e diferenciação do tecido mesenquimal e se baseia não apenas na interação de célula-célula, mas também na interação célula-moléculas. (Shaw & Martin 2009).

Alguns fibroblastos denominados miofibroblastos, representam uma subpopulação de células ativadas (Desmoulière 1995) que apresentam propriedades características de células musculares lisas que muitas vezes podem ser identificadas pela expressão de marcadores específicos, como o filamento intermediário de vimentina (Mørk et al., 1990) e desmina (Lazarides & Balzer 1978), o marcador mesenquimal alfa actina de músculo liso (α -SMA) (Tomasek et al., 2002) e a proteína de ativação de fibroblastos (FAP) (Rettig et al., 1993). Esses miofibroblastos são frequentes em processos inflamatórios bem como durante a formação de fibrose ocorrida após a cicatrização. Mais tarde esses fibroblastos chamaram a atenção de estudiosos pois apresentavam-se abundantes no microambiente tumoral surgindo assim diversas questões sobre o papel crítico dessas células na progressão do câncer (Bhowmick et al. 2004).

Sabe-se que as alterações que ocorrem dentro das células durante a carcinogênese não estão restritas às células epiteliais. Desta forma quando o epitélio sofre modificações o estroma, sob o controle de uma variedade de fatores moduladores, também é alterado gerando um microambiente favorável para o desenvolvimento tumoral (Bhowmick et al. 2004). O microambiente tumoral é modificado aumentando o número de componentes imunossupressores e células do sistema imune favorecendo o desenvolvimento e ativação dos fibroblastos. A partir daí essas células começaram a ser designadas pelo termo CAFs. Esse termo define os fibroblastos ativados exibindo um fenótipo similar aos miofibroblastos durante o processo de cicatrização (Mueller & Fusenig 2004).

Quanto a sua morfologia os CAFs aparecem como grandes células fusiformes com citoplasma abundante basófilo e núcleos recuados. Na microscopia eletrônica observa-se a presença do retículo endoplasmático com superfície irregular, ribossomos livres, complexo de Golgi bem desenvolvido e fibras de miofilamentos por todo citoplasma (De Wever et al. 2008).

Além de expressarem moléculas similares aos miofibroblastos como a α -SMA, FAP, vimentina e desmina, os CAFs também podem expressar tenascina C (TNC), Periostina, proteína ácida secretada rica em cisteína (SPARC), proteoglicano sulfato de condroitina, receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas do tipo beta (PDGFR β), prolil 4-Hidroxilase, integrina alfa 11 e proteína 1 específica para fibroblastos (FSP-1) (Kuzet & Gaggioli, 2016). Os níveis de expressão destes marcadores podem variar de uma célula para outra contribuindo para uma heterogeneidade das populações de CAFs, um fator que muitas vezes pode dificultar o tratamento do câncer. Sugimoto e colaboradores (2006) utilizaram dois modelos de câncer humano bem estudado em animais. Dentre os vários marcadores, a FSP-1 foi a que demonstrou uma localização e identificação mais seletiva de CAFs. Outros marcadores, tais como α -SMA e PDGFR β , também demonstraram, porém quando sobrepostos estes forneceram diferentes populações de CAFs evidenciando que estas células podem se diferenciar quanto a expressão de moléculas. Além disso, a FSP1 foi expressa em fibroblastos “normais” pela sua sobreposição com outros marcadores, indicando que os CAFs são constituídos por populações de células heterogêneas, podendo ter diferentes papéis na progressão do câncer (Sugimoto et al., 2006).

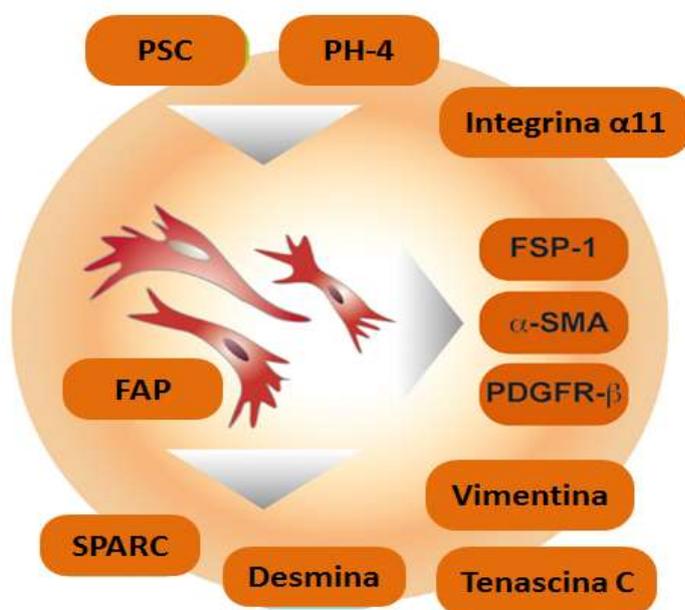


Figura 3 - Marcadores moleculares de fibroblastos associados ao câncer (CFAs). (Augusten, M., 2014 – Modificado). Os marcadores utilizados para identificação de CAFs que estão representados no desenho nem sempre estão expressos em 100% das células. No entanto a presença destes associados a outras moléculas constitutivas de fibroblastos normais servem para caracterização dos

CAFs. PH-4, prolil-4 hidroxilase; α -SMA, actina de músculo liso; FAP, proteínas de ativação de fibroblastos; SPARC, proteína ácida secretada rica em cisteína; PSC, proteoglicano sulfato de condroitina; PDGFR β , receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas do tipo beta; e FSP-1, proteína 1 específica para fibroblastos.

A presença de CAFs no microambiente tumoral está associada a um prognóstico desfavorável para pacientes com câncer (Shimoda et al., 2010). Sabe-se que os CAFs são capazes de induzir uma transição epitélio-mesenquimal (EMT) em células tumorais epiteliais, sendo este um processo que vai contribuir nos mecanismos de invasão (Allavena et al. 2008), progressão e metástase de diversos carcinomas. Desta forma, durante este processo invasivo, células tumorais tendem a perder seus antígenos epiteliais, alterando sua polaridade, no que tange ao crescimento, e morfologia, adquirindo um fenótipo maligno (Solinas et al. 2010).

A transição epitélio-mesenquimal (EMT) é um processo integral para a formação de muitos tecidos e órgãos durante o desenvolvimento e conta com uma sequência de eventos onde as células epiteliais sofrem uma perturbação ou degradação da membrana basal, desagregação da estrutura de tecido epitelial seguido por diferenciação de fenótipo mesenquimal (Radisky, 2005). É provável que diversos componentes, como enzimas, citocinas, fatores de crescimento dentre outras moléculas, possam ter participação nesse processo desempenhando um papel na morfogênese do tecido e na migração celular (Haugsten et al., 2010).

1.2.1.1 Citocinas que desencadeiam a ativação de fibroblastos

Para a transformação de fibroblastos em CAFs estes sofrem ativação através de diversos mecanismos onde as células tumorais podem secretar fatores de crescimento que estimulam o recrutamento e ativação desses fibroblastos. Entre esses fatores, o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) é o mais proeminente, devido à grande variedade de efeitos que exerce sobre a matriz extracelular (Roberts et al., 1992). Além disso, o TGF- β desempenha um papel central na síntese e degradação de moléculas, aumentando a expressão de fibronectina e colágenos (Ignatz & Massagué 1986) e a das metaloproteases (MMPs) envolvidas no remodelamento da matriz (Leask & Abraham, 2004).

Orimo e colaboradores (2005) demonstraram que os fibroblastos residentes podem ser ativados por sinalização cooperativa entre o complexo TGF- β /SMAD e receptores de quimiocinas como CXCL12 e CXCR4. Essas vias são conectadas em uma retroalimentação permitindo comunicação bidirecional entre células tumorais e outras populações celulares.

Os principais mecanismos de sinalização intracelular que medeiam uma resposta de fibroblastos à estimulação por TGF- β ocorrem pela ligação desta citocina ao receptor de serina/treonina quinase do tipo II (TGF- β RII) onde ocorre uma dimerização e ativação com TGF- β RI. Após essa ativação de TGF- β RI, o sinal é transduzido por uma família de co-fatores de transcrição intercelular, denominada SMAD (Derynck & Zhang 2003), que desempenham um papel central como efetores da ativação de fibroblastos dependentes de TGF- β e outras quimiocinas.

As quimiocinas, tais como CXCL12, CXCL10, CCL21, CCL25, CXCR4, CXCR3 e CCR9, podem induzir invasão e motilidade de células tumorais. Por este motivo tem sido dada grande importância ao papel das quimiocinas na ocorrência de metástases (Balkwill 2004). Além disso, quimiocinas, tais como CXCL12 podem promover a malignidade de células tumorais induzindo a proliferação celular, migração, e angiogênese (Balkwill 2004). Além disso, a sinalização promovida por TGF- β /SMAD é responsável pela secreção de exosomas de CXCL12-CXCR4 (Webber et al., 2015).

Além de TGF- β citocinas como a interleucina-6 (IL-6) também estão ligadas à mudança de fenótipo celular, principalmente através da inativação do oncogene c-Myc. Essas alterações promovidas por IL-6 também podem levar a inativação do complexo mTORC1 em fibroblastos deficientes de p62 causando aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenhando um papel imunossupressor (Valencia et al., 2014). Sabe-se que p62 é uma subunidade do fator nuclear kappa B (NF- κ B), um forte condutor da resposta inflamatória. Assim vários estudos tem focado na influência que o NF- κ B pode ter no microambiente tumoral uma vez que este é regulado por algumas quimiocinas (CXCL1, CXCL2 e CXCL5) e citocinas (IL-6 e IL-1 β) já descritas anteriormente (Karin & Greten 2005, Pikarsky et al., 2004).

Funcionalmente, a ativação de NF- κ B depende de I κ B quinase β (IKK β), um componente catalítico do complexo IKK, que pode apresentar funções supressoras e promotoras do tumor (Erez et al.2010). Além disso, foi demonstrado que a IKK β

exerce a sua função pró-tumoral através da regulação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6 (Koliaraki et al., 2015).

1.2.1.2 Fatores de crescimento que desencadeiam a ativação de fibroblastos

Além de todas essas vias o TGF- β também pode interagir com o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e com receptor de tirosina cinase (Bhowmick et al., 2004). O HGF é um fator mesenquimatoso ou estromal, que pode ser expresso por fibroblastos, que induz atividades mitóticas e morfológicas sobre diferentes tipos de células, predominantemente de uma forma paracrina, e é conhecido por estimular a angiogênese, tanto in vivo como in vitro (Bussolino et al., 1992). As células epiteliais em resposta a sinalização HGF/Met sofrem vários processos, tais como transição epitélio-mesequimal (EMT) e aumento da motilidade celular o que contribuiria para aquisição de um perfil metastático (Birchmeier et al. 2003; Thiery 2002).

Embora os CAFs não sejam considerados células malignas, principalmente por apresentarem características fenotípicas diferentes das células epiteliais malignas, estes fibroblastos podem sofrer influência direta de células tumorais bem como auxiliar essas células a adquirir uma potencial maligno. Wu e colaboradores (2013) demonstraram que a interação entre células cancerosas gástricas alteraram o fenótipo de fibroblastos “normais” em CAFs.

O FCDP e o fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2) são dois outros fatores de crescimento pró-fibróticos que são secretados por células tumorais e que induzem a ativação dos fibroblastos (Elenbaas & Weinberg 2001). O PDGF foi um dos primeiros fatores a serem descritos (Paul et al., 1971) e seu envolvimento em vários processos celulares, como proliferação, crescimento e angiogênese, tem sido bem estudado (Hannink & Donoghue 1989). Todas as cinco isoformas de PDGF funcionam como homodímeros secretados mas apenas PDGG-A e PDGG-B podem formar heterodímeros funcionais. O PDGF é um potente mitógeno e quimioatraente de células mesenquimais, incluindo fibroblastos, fortemente correlacionados com a progressão do câncer. Curiosamente, a maioria das células cancerígenas não expressam o receptor PDGFR, mas, apresentam um nível elevado de PDGF sugerindo que possivelmente este exerça sua função de forma estritamente paracrina em células do estroma, especialmente fibroblastos (Bronzert et al., 1987).

Isso foi observado por Helin e Westermark (1999) onde a secreção de PDGF-A por células tumorais não estimulou a síntese de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), mas promoveu o recrutamento de fibroblastos que participam do crescimento tumoral e da neo-angiogênese.

É importante notar que, ao contrário do TGF- β , que promove a ativação e a mudança fenotípica dos fibroblastos, as funções primárias do PDGF são de recrutamento e proliferação (Shao et al. 2000). Desta forma, Elenbaas e Weinberg (2001) propõem que o PDGF poderia agir indiretamente através de células do sistema imune que secretam TGF- β no microambiente para o recrutamento celular, aumento na vascularização tumoral e na produção de estrógeno pró-tumorigênico.

Os mitógenos de células endoteliais angiogênicas, também conhecidos como FGF, são moléculas pleiotrópicas que influenciam a atividade tanto em células epiteliais quanto em células mesenquimais (Strutz et al., 2000). Esta família de fatores de crescimento compreende nove membros diferentes, porém o FGF-2, é o que tem sido mais descrito principalmente por ser um potente indutor de angiogênese (Folkman et al., 1988). Além disso, a regulação de FGF-2 tem sido associada à fibrogênese e a alterações no fenótipo dos fibroblastos (Strutz et al., 2000) contribuindo para o processo de metástase principalmente pela interação com PDGF-BB (Nissen et al., 2007).

1.2.1.3 Demais moléculas que promovem a ativação de fibroblastos

Uma outra molécula que pode interagir com o TGF- β é a Wnt7a, uma proteína pertencente a superfamília das glicoproteínas Wnt envolvidas com a proliferação celular, que pode ser secretada por células tumorais agressivas e é capaz de induzir recrutamento e ativação de fibroblastos tanto in vitro como in vivo (Avgustinova et al., 2016). Evidências experimentais sugerem que a Wnt7a atua como um modulador da atividade do receptor de TGF- β principalmente nas linhagens de câncer de mama isoladas a partir de tumores ortotópicos. No entanto, como os tumores apresentam grandes diferenças na composição do estroma, o controle da sinalização de TGF- β pela Wnt7a vai depender de um momento celular específico. Assim, semelhante ao LIF (fator inibidor da leucemia), as proteínas Wnt são hipotetizadas para sustentar o que a sinalização por TGF- β pode promover o fenótipo dos CAFs (Avgustinova et al.,

2016). Em outras palavras, funcionalmente, a regulação positiva de Wnt induz uma resposta que é caracterizada pela aquisição de um fenótipo ativado dos fibroblastos.

Além disso, o LIF, um membro da família da citocina pró-inflamatória IL-6, é identificado em fibroblastos pró-invasivos, ativados recentemente (Albregues et al., 2014) e sua alta expressão por células tumorais correlaciona-se com potencial invasivo destas (García-Tuñón et al., 2008). Estudos realizados por Dees e colaboradores (2012) demonstraram que a estimulação de fibroblastos *in vitro* por LIF levaram a geração de uma subpopulação de CAFs capazes de estimular a invasão de células tumorais. Esta modificação constitutiva induzida pelo LIF nos fibroblastos é uma consequência de modificações epigenéticas que levam à perda da expressão da proteína tirosina fosfatase do tipo 6 (PTPN6) inativando a tirosina fosfatase SHP-1, uma proteína reguladora da via JAK/STAT, que altera o DNA (Albregues et al., 2015).

Embora muitas proteases tenham sido associadas com a disseminação do cancer, um grupo específico de aproximadamente 26 enzimas, denominadas coletivamente metaloproteases de matriz (MMPs), tem sido o foco de investigação de diversos estudos que visam uma melhor compreensão do cancer (Overall et al. 2002).

A remodelação da matriz é essencialmente regulada pela expressão coordenada de uma variedade de MMPs e seus inibidores, que, sob condições fisiológicas, orquestram a organização da matriz extracelular e a homeostase. Como no câncer a homeostase é interrompida, muitas vezes a atividade de MMPs facilitam a invasão e migração das células cancerosas principalmente através da degradação do colágeno (Gomes et al. 2015). A família de genes Timp de inibidores de MMPs controla uma ampla gama de MMPs e ADAMs (desintegrina e MMPs) por meio de uma inibição pós-translacional (Khokha et al., 2013). Pulkoski-Gross (2015) relata que a perda completa de Timp é o suficiente para que os fibroblastos adquiram um estado semelhante a CAFs. Além disso, exossomos secretados por fibroblastos que não expressam Timp são ricos em MMPs e ADAM-10 (Shimoda et al., 2014).

Dentre as MMPs, as funções de MMP-2 e MMP-9 são as de interesse especial, uma vez que estas tem sido encontradas em maiores concentrações em estados patológicos relacionados ao câncer. Essas gelatinases possuem uma região enriquecida com fibronectina do tipo II no interior dos seus domínios catalíticos o que possibilita uma maior degradação do colágeno, relacionando, muitas vezes, a

expressão aumentada dessas enzimas com o processo de metástase (Velinov et al. 2010; Fisher & Mobashery, 2010; Bauvois, 2012; Ren et al. 2015; Li et al. 2015; Salem et al. 2016; Xiang et al. 2016).

1.2.1.4 A Inflamação ativa fibroblastos

Além das moléculas citadas anteriormente, a inflamação também é definida como um fator considerável no desenvolvimento tumoral (Hanahan & Weinberg, 2000). Apesar do sistema imune ter como principal função proteger as células do corpo, esse pode desempenhar um papel duplo no desenvolvimento do câncer uma vez que a ativação de células imunes resulta na destruição de outras células, principalmente em resposta a uma ativação crônica destas mesmo o sistema imune fornecendo todos os ingredientes necessários para contornar a carcinogênese (DeNardo et al., 2010).

Na verdade, a inflamação muitas vezes é causada a partir de uma lesão tecidual que exige mecanismos de reparo para o tecido lesado. Vendo por esse lado a ativação dos fibroblastos é crucial nesse reparo tecidual. As respostas inflamatórias estão envolvidas em vários estágios do tumor, desde o desenvolvimento, iniciação, promoção, progressão maligna, invasão a metástase. Após a inflamação, o micro-ambiente tumoral fica infiltrado por células imunológicas, incluindo células da imunidade inata (macrófagos, neutrófilos, basófilos, mastócitos, células supressoras derivadas da linhagem mielóides, células dendríticas e células NK) e linfócitos (De Visser et al., 2006). Todas estas células imunes se envolvem com as células tumorais, seja por contatos diretos ou pela atividade de quimiocinas e citocinas que promovem e induzem ao crescimento e progressão tumoral. Além de fatores de crescimento, tais como TGF, FGF, EGF, TNF e VEGF, as citocinas IL-1 e IL-6 secretadas por células cancerosas tem demonstrado promover a tumorigênese (Calvo & Sahai 2011).

Nesse contexto, a indução de atividade pro-invasiva de fibroblastos pela estimulação dessas moléculas pode estar diretamente relacionada com vias de sinalização-dependente de JAK1 / STAT3. De fato, a atividade de JAK1 induz a criação de vias para modificação nos fibroblastos do estroma levando à remodelação da matriz extra-celular (Sanz-Moreno et al., 2011) além da ativação de proteases

pro-angiogênicas e/ou pró-invasivas como as MMPs, incluindo MMP-2 e MMP-9 (Grivennikov et al., 2010).

Além da expressão de todos estes diferentes fatores, os processos inflamatórios podem liberar ROS, que induzem mutagênese em células tumorais acelerando sua evolução deletéria (Hanahan & Weinberg, 2011).

Desta forma, as vias de sinalização dirigidas por JAK / STAT e o fator de transcrição nuclear NF- κ B são as vias mais proeminentes durante a resposta inflamatória contribuindo de forma representativa para os mecanismos que favorecem a progressão tumoral.

1.2.1.5 Quimiorresistência induzida por CAFs

Apesar dos notáveis progressos realizados no tratamento contra o câncer, ainda existem uma gama de tratamentos sem êxito. Embora exista diversas razões para a falha nesses tratamentos, grandes evidências sugerem que os CAFs fornecem algumas habilidades de sobrevivência necessárias para populações de células cancerosas fazendo com que estas adquiram a capacidade de se adaptar a tratamentos com alguns quimioterápicos (Paraiso & Smalley, 2013).

Aparentemente os CAFs podem interferir na distribuição de alguns medicamentos proporcionando maior resistência do tumor ao tratamento. Embora os mecanismos de quimiorresistência sejam complexos e dependam de uma variedade de vias de sinalização, a interação das células cancerosas com o estroma circundante oferece uma perspectiva interessante para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Hirata et al., 2015).

Entre os vários mecanismos de quimiorresistência, Crawford e colaboradores (2009) relataram que os CAFs secretam moléculas que medeiam a angiogênese levando pacientes tratados com Bevacizumab, Sorafenib ou Sunitinib a deixarem de responder a estes medicamentos. Além disso, tumores com resistência intrínseca a medicamentos anti-VEGF foram observados, mesmo quando os alvos específicos do fármaco são altamente expressos pelas células (Kerbel 2008).

Além disso, a secreção de outras moléculas, como o HGF, por CAFs também está envolvido na resistência aos tratamentos com os inibidores RAF, Vemurafenib e Dabrafenib, que são utilizados para o tratamento de melanoma (Straussman et al., 2012, Wilson et al., 2012).

Vários outros achados mostram que a remodelação proporcionada pelos CAFs perturba o acesso de quimioterápicos ao tumor, favorecendo um nicho quimioprotetor contribuindo assim para uma maior resistência aos tratamentos, o que muitos autores chamam de “fuga apoptótica” mediada pela resistência à fármacos antitumoral (Multhaupt et al., 2016). E parte desse mecanismo se deve principalmente a receptores de adesão que estão presentes na membrana celular dos CAFs, incluindo integrinas, receptores de colágeno e proteoglicanos (Multhaupt et al., 2016, Zeltz & Gullberg 2016).

Eke e Cordes (2015) verificaram que a presença de ácido hialurônico, um componente na matriz extra-celular, está associado a um mau prognóstico do câncer em humanos. A degradação dessa molécula desempenha um papel importante na resposta imune inata por interagir com o receptor celular CD44 (Iijima et al. 2011) formando uma barreira física que bloqueia o acesso das drogas ao tumor (Provenzano et al., 2012). Além disso, o aumento da atividade enzimática sobre o ácido hialurônico em adenocarcinomas pode levar a processos metastáticos (Provenzano et al., 2012).

Os CAFs também contribuem para o desenvolvimento de hipóxia, produzindo uma variedade de fatores de crescimento que aumentam a proliferação de células, tais como TGF- β , HGF e fatores pró-angiogênicos VEGF, PDGF e SDF1. A hipóxia pode modificar a eficácia dos tratamentos quimioterápicos, cuja ação é freqüentemente afetada pela oxigenação do microambiente tumoral. Como demonstrado in vivo e in vitro, os efeitos citotóxicos da ciclofosfamida e da doxorrubicina são dependentes de oxigênio e, por conseguinte, diminuídos em ambientes hipóxicos (Harrison & Blackwell 2004). Além disso, a hipóxia gera um ambiente ácido provocada pela produção de ácido láctico, impedindo assim a assimilação de agentes quimioterapêuticos pelas células cancerosas (Vukovic & Tannock, 1997).

1.2.2 O secretoma

O termo 'secretoma' foi utilizado pela primeira vez em 2000 para estudar o transporte de proteínas peptídeo-dependentes em *Bacillus subtilis* (Tjalsma et al. 2000). No entanto, em 2004, Celis e colaboradores foram os primeiros a apresentar

um método para estudar o secretoma em tumores da mama (Celis et al. 2004), a partir da análise do fluido intersticial de pequenos fragmentos de tecido da mama. Este procedimento é ainda largamente utilizado para estudar o secretoma (Celis et al. 2004; Gyolgy et al. 2011).

Atualmente, o termo "secretoma" é usado para descrever todas as substâncias secretadas de células ou tecidos sob certas condições e em um determinado momento, podendo conter na sua composição proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos dentre outras moléculas solúveis, bem como vesículas contendo essas moléculas (exossomas). Nos últimos anos, o interesse, em especial, por essas vesículas, que podem ser isoladas, demonstraram um papel importante na fisiopatologia dos tumores (Mathivanan et al. 2010; Gyolgy et al. 2011).

As células tumorais adquiriram vários recursos para desenvolverem o seu fenótipo maligno, tais como a estimulação e a produção de fatores de crescimento, a manipulação do conteúdo intracelular e da resposta imune, a indução da angiogênese e da invasão. (Hanahan et al. 2000). Para muitas dessas habilidades, o arsenal de fatores de secreção das células tumorais é de extrema importância, se não fundamental, e, juntos, eles representam o perfil do secretoma. Diversos estudos demonstraram que cada vez mais não só o estudo das proteínas intracelulares, mas também as proteínas secretadas difundidas no microambiente tumoral desempenham um papel fundamental nos processos que modulam a natureza maligna de um tumor (Yao et al. 2012; Tienneke et al. 2013; Tan et al. 2015).

A importante vantagem de estudar o conteúdo proteico do secretoma, em comparação com o conteúdo proteico intracelular (proteoma), é que as proteínas secretadas por células do tumor provavelmente sejam encontradas no sangue ou em outros fluidos corporais (Yao et al. 2012). Outra vantagem é que estudos do secretoma podem fornecer muitas informações sobre a biologia do micro-ambiente tumoral, além de interações e mecanismos moleculares entre as células tumorais e as células normais. (Tienneke et al. 2012)

Análise do secretoma de células ou tecidos tumorais por métodos baseados em técnicas avançadas de biologia molecular requer várias considerações, em comparação com a análise do proteoma celular. Estas considerações estão relacionadas principalmente à escolha do tipo de amostra, preparação, processamento e a análise dos dados adquiridos (Tienneke et al. 2012).

Linhagens de células de câncer de mama têm sido amplamente utilizadas como modelos *in vitro* para investigar proteínas secretadas diretamente relacionadas com a transformação maligna de diferentes linhagens celulares (Tan et al. 2015). Além dessa transformação maligna o desenvolvimento de resistência à quimioterapia também é um problema fundamental no tratamento do câncer de mama, e atualmente não é possível prever a resposta a determinados quimioterápicos. Yao e colaboradores (2012) caracterizaram os secretomas de células tumorais sensíveis a doxorubicina observando a presença de um grupo de proteínas específicas no soro de pacientes com metástase, indicando que diferentes tipos de câncer podem secretar as mesmas proteínas (Yao et al. 2012).

A verificação da constituição do secretoma tem se tornado um grande desafio uma vez que este é constituído por várias moléculas que variam desde pequenos peptídeos, passando por enzimas tipicamente ativas, como metaloproteases, e até mesmo exossomos, que podem conter toda uma via metabólica em seu interior. (Gronborg et al. 2006; Yao et al. 2012; Tan et al. 2015; Cox et al. 2015; Brandi et al. 2016).

Desde a primeira análise proteômica de secretomas vários estudos foram publicados e esse conhecimento tem se desenvolvido rapidamente. Métodos e abordagens têm sido refinados para permitir uma análise mais aprofundada da composição molecular de diversas amostras de secretoma. Até agora, os estudos de secretoma de células e tecidos tumorais visam a identificação de marcadores para os diversos estágios da doença, o prognóstico e a previsão da resposta ao tratamento. Estas análises necessitam ser incorporadas em uma série de experimentos consecutivos que levem a uma validação funcional elaborada a partir dos processos moleculares identificados e das proteínas envolvidas (Yu et al. 2006; Zhang et al. 2008; Schilekelman et al. 2011), levando ao maior uso da proteômica do secretoma para melhor investigar fisiologia tumoral (Schilekelman et al. 2011; Cox et al. 2015; Brandi et al. 2016).

1.3 Câncer de mama e CAFs

Como referido anteriormente a maioria dos fibroblastos que estão localizados no estroma tumoral é ativada e poucos estão quiescentes (Aboussekhra, 2011). A

ativação de CAFs no câncer de mama é irreversível e resulta na resistência à apoptose (Lou et al. 2015; Kalluri et al. 2006).

Apesar dos CAFs serem identificados em diferentes subtipos de câncer ainda são necessários marcadores moleculares mais específicos capazes de reconhecer esses fibroblastos no câncer de mama (Erez et al.2010). Atualmente são descritos quatro tipos de células (Figura 4) que podem dar origem a estes CAFs no câncer de mama (Xouri et al. 2010). O primeiro são a partir dos fibroblastos normais presentes no estroma. Acredita-se que 80% dos fibroblastos do estroma do câncer possam ser convertidos para este tipo (Vaughan et al. 2000). O segundo, a partir das células epiteliais mamárias que sofrem transição epitelial-mesenquimal (EMT) ou endotelial (Polyak et al. 2009). O terceiro é derivado da medula óssea através das células-tronco mesenquimais (MSCs) (Spaeth et al. 2009). E o último inclui células que sofrem diferenciação no tecido mamário, como pericitos, adipócitos ou células do músculo liso (Ronnov et al. 1995).

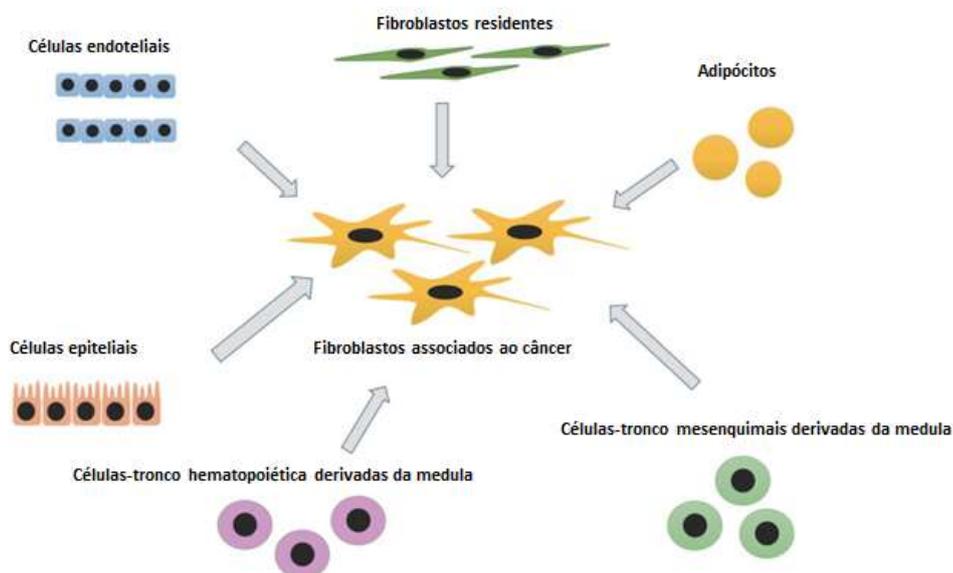


Figura 4 - Origens de fibroblastos associados ao câncer (CAFs). (Shiga et al. 2015 - modificado): Os CAFs são consideradas originários de várias células, tais como fibroblastos residentes, adipócitos, células epiteliais (através da transição mesenquial epitelial: EMT), células endoteliais (através da transição mesenquial endotelial: endMT) Células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea e células estaminais hematopoiéticas.

Com relação aos fibroblastos normais no estroma da mama que podem ser transformados em CAFs alguns estudos in vitro ou in vivo indicaram que TGF- β e o fator derivado de células estromais - 1 (SDF-1 / CXCL12), são indutores importantes na ativação desses fibroblastos (Kojima et al. 2010). Além desses fatores outras

citocinas produzidas pelas células cancerosas, tais como o fator de crescimento derivado de plaquetas α/β (PDGF- α/β), fator de crescimento fibroblástico básico (b-FGF) e interleucina-6 (IL-6), também ativam os fibroblastos normais (Hendrayani et al. 2014).

Os fibroblastos mamários podem induzir a reversão do fenótipo no câncer de mama (Romer et al. 2013), e os CAFs promovem proliferação e transformação maligna das células epiteliais. Kuperwasser e colaboradores (2004) verificaram que doses subletais de irradiação induzem fibroblastos normais a superexpressar TGF- β e fator de crescimento de hepatócitos (HGF); e que fibroblastos ativado co-transplantados com células epiteliais da mama sofrem transformação maligna. Em contraste, não ocorre formação de tumor quando as mesmas células epiteliais são co-transplantadas com fibroblastos normais. Outro grupo de pesquisadores utilizando co-cultura e co-implantação demonstrou que as células de câncer de mama MDA-MB-468 induzem CAFs a secretar HGF e aumentar a tumorigenicidade (Tyan et al. 2011). Estes estudos indicam que a conversão de fibroblastos normais em CAFs pode ocorrer na fase de iniciação do câncer de mama antes das alterações genéticas das células epiteliais e que os CAFs podem induzir a transformação maligna das células epiteliais da mama. Além disso, a ocorrência do câncer muitas vezes está intimamente relacionada à estimulação estrogênica. Desta forma, Shekhar e colaboradores (2001) demonstraram em um modelo de interação célula-célula que fibroblastos normais inibem o crescimento de células tumorais ao passo que os CAFs sintetizam estrógeno abundante e induzem a transformação maligna de células da linhagem MCF-10A e EIII8 (células epiteliais mamárias pré-cancerosas).

Uma vez adquiridas as características malignas o crescimento descontrolado é a condição prévia para invasão tumoral e metástase dessas células cancerosas. Orimo e colaboradores (2005) demonstraram que os CAFs podem promover um crescimento tumoral através de um modelo de xenoenxerto de tumor de co-implantação onde os CAFs extraídos do câncer de mama induzem mais crescimento tumoral em relação aos fibroblastos normais derivados dos mesmos indivíduos. E identificaram ainda que os CAFs promovem crescimento do tumor primário através da secreção de SDF-1, que pode se ligar preferencialmente aos receptores CXCR-4 em células de câncer estimulando a sua proliferação principalmente pela neovascularização.

A angiogênese é essencial e crucial para o crescimento, invasão e metástase de tumores e geralmente é induzida por células cancerosas (Hanahan et al. 2011). No entanto, estudos recentes sugeriram que os CAFs estromais também participam na angiogênese tumoral. Estudos sugeriram que o SDF-1 secretado pelos CAFs se ligam ao receptor CXCR4 de células endoteliais para promover a angiogênese e recrutar outras células progenitoras endoteliais (Orimo et al. 2005). Outros fatores de crescimento derivados dos CAFs, tais como FGF, PDGF, TGF e fator de crescimento endotelial vascular, também papel importante na promoção da proliferação e diferenciação das células endoteliais e na indução da angiogênese de tumores de mama (Raica et al. 2009).

Além dos processos neovasculares os CAFs também participam de múltiplos passos que envolvem a invasão e metástase no câncer de mama (Katz et al. 2011) principalmente pela indução da transição epitélio-mesenchimal (EMT) das células cancerígenas (Gao et al. 2010). Soon e colaboradores (2013) estudaram a correlação de marcadores moleculares com a invasão de células MCF7 de câncer de mama co-cultivadas com CAFs ou fibroblastos normais e observaram que os CAFs induzem a EMT significativamente maior quando comparadas com os fibroblastos normais principalmente pela ativação de fatores de crescimento, tais como TGF- β 1, EGF, PDGF, HGF, e metaloproteases de matriz (MMPs). Outros estudiosos identificaram que os CAFs localizados em zonas de interface entre tumor e o tecido normal são fortes indutores da EMT (Gao et al. 2010). Como já retado anteriormente as MMPs produzidas por CAFs também estão envolvidas na modulação do microambiente tumoral (Kessenbrock et al. 2010). Wang e colaboradores (2002) observaram que MMP-9 derivada de CAFs facilita a invasão de células da linhagem MDA-MB-231 em co-cultura com fibroblastos humanos

Os CAFs são as células mais abundantes no estroma do câncer de mama, e deles derivam vários componentes de ECM, fatores de crescimento, citocinas, proteínas, enzimas e hormônios. Isso faz com estas células ativadas participem do desenvolvimento e progressão do câncer de mama de forma representativa principalmente estimulando a transformação maligna das células epiteliais, crescimento de tumores, degradação de ECM, angiogênese, invasão e metástase de células cancerígenas. No entanto, muitas questões permanecem obscuras, como a relação entre CAFs e outras células mesenquimais, o mecanismo preciso da fulga

ao ataque imunológico e a influência que outras células podem ter sobre estes fibroblastos (Aixiu et al. 2016).

1.4 Linhagem de células MACL-1

Uma parte considerável do conhecimento sobre carcinomas da mama baseia-se em estudos *in vivo* e *in vitro* realizados com linhagens de células de câncer de mama. Estas são capazes de fornecer uma fonte ilimitada de material auto-replicável e homogêneo, isento de contaminantes, como células do estroma, e facilidade no cultivo e manutenção (Lacroix et al. 2004; Brazova et al. 2007). Até o presente momento mais de 100 linhagens imortalizadas de células de mama já foram obtidas desde a primeira linhagem estabelecida, a BT20, e a maioria dessas são originadas de tumores metastáticos e, portanto, representam populações celulares em estágio tardio de progressão tumoral (Lacroix et al. 2004).

Mais de dois terços de todos os estudos que relatam linhagens de células de câncer de mama são derivadas de derrames pleurais, tendo como principais representantes as linhagens: MCF-7, MDA-MB-231 e T-47D (Burdall et al. 2003). Outra forma de obter células para estudos *in vitro* é a partir das linhagens celulares estabelecidas diretamente de pacientes com câncer de mama. Estas também são úteis e importantes ferramentas para estudar propriedades biológicas, pesquisa de novos marcadores tumorais para diagnóstico, ou para investigar uma nova abordagem terapêutica. No entanto, a cultura de células neoplásicas, bem como o estabelecimento bem sucedido das mesmas têm sido raramente relatado a partir de células de carcinoma primário de mama (Mc Callum et al. 1996).

Dentre as culturas de tecido tumoral as linhagens celulares de câncer de mama primário estão entre as mais difíceis de serem estabelecidas (Livak et al. 2001). A fim de estabelecer novos modelos *in vitro* de câncer de mama primário Correa e colaboradores (2009), coletaram, processaram e cultivaram cinco amostras de tecidos da mama. Destas amostras, duas linhagens imortais foram estabelecidas, MACL-1 e MGSO-3. Tais células são diferentes de outras linhagens celulares de câncer da mama mais comumente utilizadas, uma vez que são derivadas de tumores primários, ao passo que as outras são derivadas de metástases, como é o

caso das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. Desta forma, estas linhagens celulares podem não representar a natureza real das células tumorais primárias.

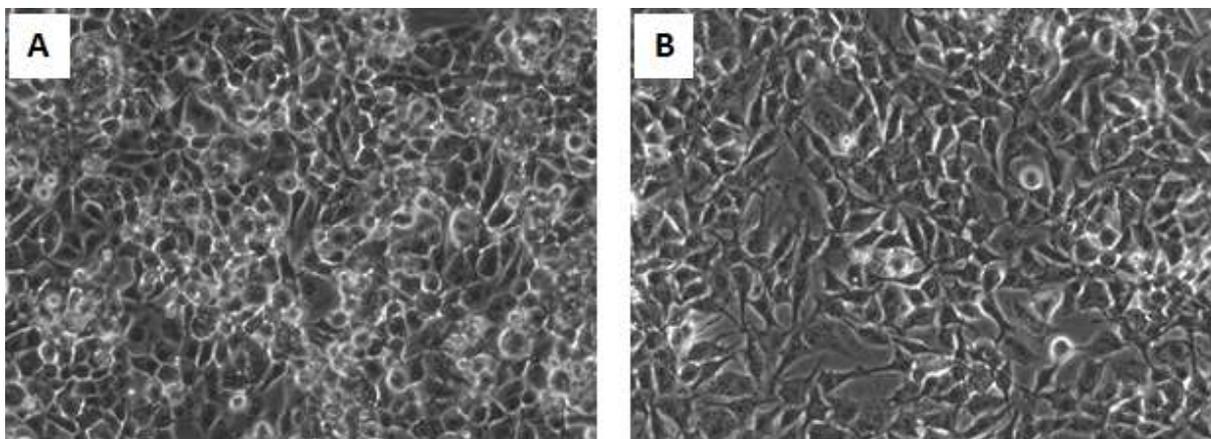


Figura 5 - Morfologia das linhagens de câncer de mama MACL-1 e MGSO-3. Microscopia óptica demonstrando as linhagens de células de câncer de mama MACL-1 (A) e MGSO-3 (B) após 7 dias de crescimento em cultura (Correa et al. 2009).

Assim, aumentar o número de linhagens de células primárias imortalizadas bem como caracterizar em nível molecular essas células, pode aumentar as chances de desenvolver modelos mais adequados para o estudo do câncer de mama (Correa et al. 2009). Por outro lado, as células MACL-1 e MGSO-3 são as únicas linhagens celulares brasileiras de câncer de mama disponíveis para estudos comparativos (Corrêa et al. 2012).

Corrêa e colaboradores (2012) avaliaram a presença de receptores hormonais, proliferação, diferenciação e marcadores de células-tronco, através de coloração imuno-histoquímica, bem como xenotransplantes implantados em camundongos imunodeficientes e também a capacidade das linhagens celulares MACL-1 e MGSO-3 para formar colônias e alterar o número de cópias por hibridização genômica comparativa. A análise histopatológica demonstrou que o tumor primário invasivo do qual a linhagem celular MACL-1 foi derivada, era um carcinoma de subtipo luminal A, enquanto que o carcinoma ductal in situ que deu origem a linhagem celular MGSO-3 era um tumor de subtipo HER2+, ambas apresentando diferentes níveis de proliferação.

Sabe-se há muito tempo que alguns tipos de câncer tem a propensão de metastatizar para certos órgãos, criando assim uma distribuição não-randômica de locais de recidiva distante, um fenômeno conhecido como "organotropismo

metastático" (Wei & Seagal, 2017). Alguns destes exemplos incluem os cânceres de ovário, próstata e pâncreas primários com metástase para cavidade abdominal, osso e fígado respectivamente (Choi et al. 2014). Em contraste, outros tipos de tumores, tais como carcinoma de células mamárias e renais, podem gerar metástase em múltiplos órgãos. Por outro lado, estudos recentes revelaram que os subtipos de câncer de mama diferem não apenas nas características do tumor primário, mas também no seu comportamento metastático, principalmente os tumores luminais pelo seu notável fenótipo de indução tumoral (Wei & Seagal, 2017).

O carcinoma ductal in situ é uma categoria de tumor primário não invasivo da mama definido pela proliferação intraductal de células epiteliais mamárias malignas. Este tipo de carcinoma apresenta-se de forma heterogênea composta de múltiplos subtipos moleculares incluindo luminal, HER2 e tipo basal-like. Diversos estudos sugerem que o carcinoma ductal in situ é um precursor não obrigatório de carcinoma de mama invasivo (Lee et al. 2016)

1.5 Proteômica e câncer

A complexidade e heterogeneidade do câncer torna claro que a doença evolui por múltiplas vias que na verdade é o resultado de uma combinação da tumorigênese, recidiva tumoral e metástase envolvendo uma rede de proteínas complexas associadas a diversos eventos moleculares. Uma vez que a transformação celular culmina em células tumorais envolvendo alterações na expressão de proteínas, modificações pós-traducionais e degradação de moléculas, os quais, por sua vez, influenciam em toda maquinaria dessas células, é óbvio que a análise de proteínas é uma boa ferramenta de identificação das modificações e interações (Ferlay et al. 2015).

As proteínas são moléculas envolvidas em praticamente todos os fenômenos biológicos, desde o fornecimento da estrutura a regulação das respostas do hospedeiro à infecção (Morris et al. 2015). Pode-se então supor que desvendar as muitas interações entre estas moléculas é fundamental para melhor compreensão e intervir em qualquer processo patológico, incluindo o do câncer. Desta forma, estudos proteômicos são necessários para enfrentar essa tarefa tão complexa, onde dados genômicos provaram ser insuficientes no sentido de compreender a interação

e função dos processos biológicos regulados por proteínas. Isso ocorre porque mecanismos como a regulação alostérica, modificações pós-traducionais e interações proteína-proteína não são compatíveis com uma previsão genética, uma vez que não é possível prever com precisão a abundância de proteínas que estes processos podem acarretar (Picotti et al. 2013).

Desenvolvimentos recentes na análise de formas de recolher informações sobre a biologia das proteínas no câncer, podem ser obtidas a partir de análises globais associando genômica integrada e as análises proteômica fornecendo melhores resultados no que tangem a fenótipos celulares. Nesse sentido, esses estudos proteômicos ajudam sistematicamente e simultaneamente a identificar diferentes proteínas expressas num dado tipo de célula ou fluido secretado por esta, permitindo ao mesmo tempo o monitoramento de mudanças estruturais e outras interações envolvendo proteínas (Rai et al. 2005).

A adoção de abordagens proteômicas tem representado nos últimos tempos uma mudança estratégica para desvendar os processos envolvendo o câncer. A identificação ou quantificação de espécies proteicas específicas como preditores dos estados fisiológicos das células cancerosas ainda tem sido feita por outras técnicas como ensaios imunológicos, tais como ELISA, Western blot (WB) e outras ferramentas de imuno-histoquímica (IHC). No entanto, estes tipos de métodos de quantificação são trabalhosos e dispendiosos e muitas vezes não permitem ensaios multiplexados nem representam a abundância absoluta das moléculas constitutivas de uma amostra biológica (Aebersold et al. 2013).

As ferramentas proteômicas, por outro lado, têm progredido ao longo dos anos e muitas vezes tem substituído os métodos acima mencionados em alguns estudos do câncer. Ao longo da última década, experimentos baseados em gel foram parcialmente substituídos por técnicas baseadas em espectrometria de massas (MS). No entanto, as abordagens baseadas em gel 2D ainda são usadas em alguns estudos de forma geral, e no próprio câncer (Guo et al. 2016). Apesar de ser um método laborioso e demorado, que apresenta menor taxa de transferência quando comparado ao líquido, a concepção de novas estratégias para o fracionamento, rotulagem, processamento e análise de amostras através de ferramentas de bioinformática, combinadas com a velocidade e a sensibilidade cada vez maiores da geração mais recente de espectrômetros de massa, impulsionou o campo do estudo proteômico até um ponto em que é possível identificar, quantificar

e monitorar conjuntos robustos de dados sobre a expressão de proteínas, modificações pós-traducionais e outros aspectos moleculares do câncer e outras doenças (Tan et al. 2012).

Há muitas maneiras de se realizar uma pesquisa baseada em proteômica de câncer e recentemente uma mudança de paradigma vem ocorrendo, em que os avanços tecnológicos podem ser facilmente vistos coexistindo com mudanças na dinâmica das técnicas baseadas na descoberta como é o caso da *shotgun*. Dentre as técnicas de proteômica baseada em MS a *shotgun* ainda é a abordagem mais utilizada principalmente para se obter uma visão geral das proteínas numa análise comparativa de diferentes características celulares e tem sido muito utilizada como uma ferramenta de alto rendimento, principalmente nas pesquisas envolvendo câncer (Nwabo et al. 2014).

Geralmente essa técnica é altamente eficiente em termos de classificação de centenas ou mesmo milhares de proteínas envolvidas em um certo momento experimental servindo para comparar condições experimentais separadas, diferente da proteômica tradicional, na qual os desenhos experimentais são concebidos para respostas complexas a questões não específicas, isto é, identificando um grande número de proteínas que poderiam estar pouco expressas em condições experimentais diferentes (Ellis et al. 2013).

Na proteômica *shotgun* (Figura 6) as proteínas são digeridas enzimaticamente e os peptídeos resultantes são separados por cromatografia multidimensional para ser posteriormente injetado em um espectrômetro de massa para ionização e análise. No interior do espectrômetro de massa, os peptídeos ionizados são lançados num campo electromagnético e analisados de acordo com a sua massa, no qual os íons precursores podem então ser selecionados para fragmentação por diferentes métodos MS/MS. Milhares de espectros MS/MS são obtidos e podem fornecer informações sobre as sequências de aminoácidos dos peptídeos e as sequências relativas (ou em alguns casos, absoluta) das respectivas proteínas na amostra original (Boja et al.2014).

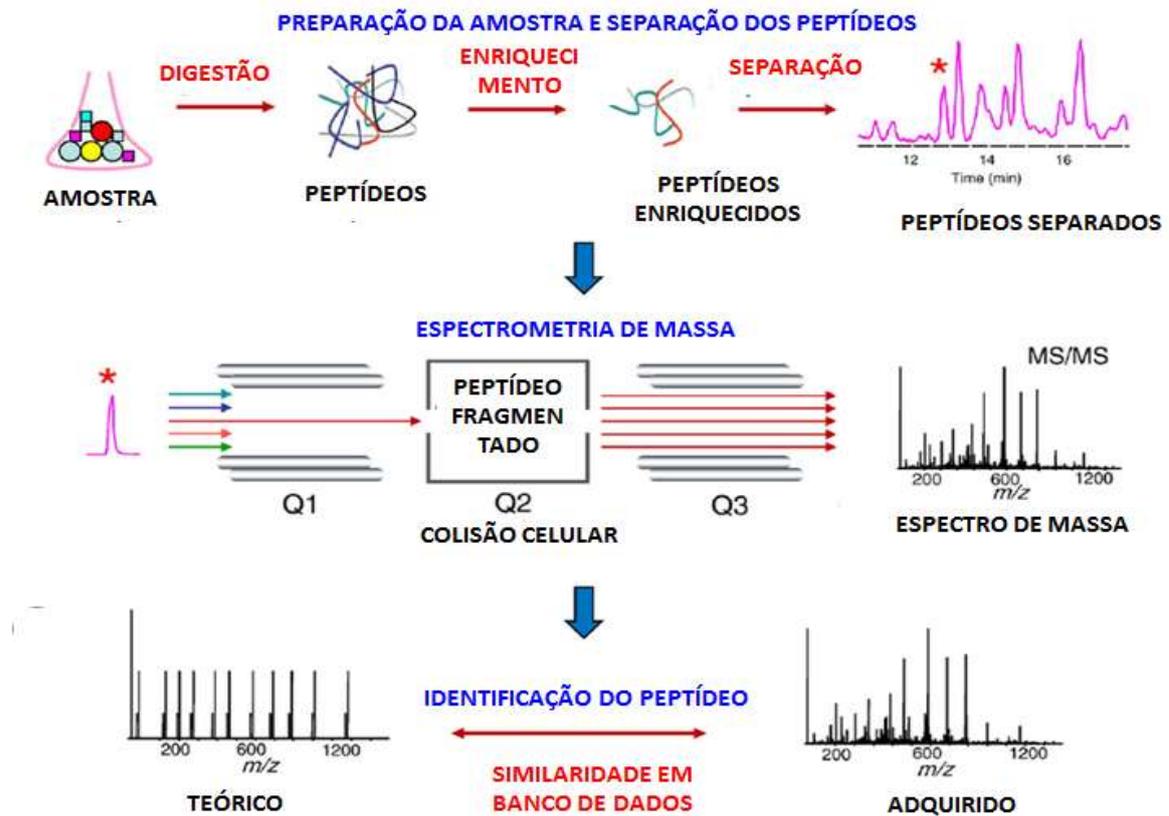


Figura 6 - Visão geral da proteômica *Shotgun*. Esquema demonstrando os processos da análise proteômica por *shotgun*. As proteínas de amostra são digeridas em peptídeos utilizando enzimas tais como tripsina. As misturas de peptídeos resultantes são processadas para capturar uma classe particular de peptídeos e depois separadas utilizando um sistema de cromatografia líquida (LC) ligado online a um espectrômetro de massa. Os peptídeos então são submetidos à análise de espectrometria de massa em tandem (MS/MS) que resulta na aquisição de espectros. Por fim a atribuição correta dos espectros MS/MS a sequências peptídicas é o primeiro passo no processamento de dados proteômicos. (Nesvizhskii, A., 2010 – modificado).

Embora essa abordagem promova a identificação de milhares de proteínas em um único experimento com alta precisão e resolução, os peptídeos fragmentados em maior abundância tendem a identificar proteínas mais abundantes negligenciando outras proteínas menos abundantes. Todavia a mera identificação de um grande número de proteínas presentes em diferentes condições biológicas, ainda não é suficiente para fornecer resultados absolutos sendo necessária uma abordagem mais direcionada, baseada em hipóteses, que levem em consideração dados biológicos conhecidos trabalhando em conjunto e de maneira mais específica (Chen et al. 2007).

Entretanto, é importante ser claro que os métodos proteômicos de descoberta não são irrelevantes ou mero desperdício de tempo. Essas estratégias de análise tem traçado um caminho através do qual a proteômica moderna se coloca numa plataforma mais eficiente para explorar componentes inexplorados, possibilitando uma investigação mais específica, reprodutível e baseada em questões mais direcionadas principalmente no que tange a doenças como o câncer, ajudando na identificação de moléculas relevantes para uma maior compreensão dos mecanismos tumorais (Chen et al. 2007).

2 JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é um problema de saúde pública presente em todo o mundo, sendo uma das principais doenças causadoras da morte de milhares de mulheres (INCA, 2016). Embora existam diversos estudos sobre o câncer, conhecer os mecanismos responsáveis pelo estabelecimento dessa doença ainda é algo intrigante. Diferentes teorias tentam explicar o surgimento de células neoplásicas e o desenvolvimento do tumor. (Stratton et al. 2009; Siegel et al. 2012).

Em alguns estudos os dados obtidos demonstraram que as células do câncer apresentam alterações nas vias de regulação, de proliferação celular e homeostase (Celis et al. 2005; Vargo-Gogola & Rosen, 2007; Zhang et al. 2009; Yu et al. 2010; Smart et al. 2013), principalmente no que tange a mecanismos relacionados a produção de espécies reativas de oxigênio (Rodrigues et al. 2007; Maiese et al. 2010; Davis et al. 2013; Johar et al. 2015, Hecht et al. 2016). Apesar dos rápidos avanços na pesquisa do câncer, a compreensão dos mecanismos de ação que induzem o aparecimento do tumor ainda permanecem como um grande desafio para a comunidade científica (American Cancer Society, 2010; Siegel et al. 2012).

Assim como vários tipos de câncer, o câncer de mama tem uma parte considerável do conhecimento a seu respeito baseado em estudos *in vitro* realizados com culturas de células comerciais cultivadas em monocamada (Celis et al. 2005; Gjerdrum et al. 2010; Davis et al. 2013), e parte desses trabalhos utilizam células tumorais em estágio avançado (Vargo-Gogola & Rosen, 2007; Davis et al. 2013). Diferente disso a linhagem MACL-1, estabelecidas por Correa e colaboradores (2009), a partir de fragmentos de tumores primários de mama, demonstram potencial para serem usadas como modelos no estudo de aspectos moleculares e celulares do câncer de mama, uma vez que esta linhagem mimetiza as fases iniciais do tumor.

Embora Corrêa e colaboradores (2012) demonstraram uma caracterização geral dessa linhagem celular avaliando aspectos genéticos e alguns receptores ainda assim existem muitos parâmetros a serem investigados principalmente em nível molecular.

Além disso, não há conhecimento a respeito do que é produzido e secretado (secretoma) por essa linhagem de células, quando cultivadas individualmente e juntamente com outra linhagem celular. Para superar essa limitação, o secretoma obtido a partir das células MACL-1 poderá ser uma ferramenta importante, uma vez

que diversos trabalhos tem demonstrado que o secretoma de células tumorais tem um potencial de alterar o microambiente tumoral (Nagai & Brentani, 2008; Mathivanan et al. 2010; Mao et al. 2012; Hoshino et al. 2015). Logo, avaliar as respostas desse produto celular, seria relevante para a determinação de diversos parâmetros até então inexplorados no câncer.

Desta forma, em função de haver pouco conhecimento a respeito dessas células tumorais, a condução de um estudo que investigue de forma ampla a composição bioquímica, no que tange às proteínas, e as possíveis atividades fisiológicas desse secretoma seria importante para identificar e esclarecer alguns dos mecanismos mais relevantes envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar e caracterizar as proteínas no conteúdo secretado (secretoma) pela célula da linhagem de câncer de mama humano MACL-1.

3.2 Objetivos específicos

1. Verificar as possíveis alterações fenotípicas em fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células tumorais de mama MACL-1 e MDA-MB-23, e células não-tumorais de mama, MCF-10A;
2. Correlacionar o secretoma de células tumorais e não-tumorais de mama bem como a capacidade de alteração fenotípica de fibroblastos CCD19-Lu;
3. Verificar as principais proteínas alteradas em fibroblastos CCD19-Lu mediante a exposição destes ao secretoma das células tumorais de mama MACL-1.
4. Identificar e caracterizar as principais proteínas que compõe o secretoma das células tumorais de mama MACL-1 por análise proteômica;
5. Caracterizar funcionalmente as proteínas de maior relevância no que tange a processos de alteração do fenótipo celular dos fibroblastos expostos ao secretoma;
6. Correlacionar as proteínas de maior relevância com as alterações celulares observadas nos fibroblastos CCD19-Lu.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens celulares e manutenção das culturas

As células MACL-1 (linhagem primária de câncer de mama humano), estabelecidas por Correa e colaboradores (2009), MDF-10A (célula glandular da mama humana) (ATCC[®]), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama) (ATCC[®]) e CCD-19 Lu (fibroblasto pulmonar humano) (ATCC[®]) foram mantidas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) alta glicose (SIGMA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO), Mammary Epithelial Cell Growth Medium (MEGM[™]) (Lonza/ Clonetics Corporation) e Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (SIGMA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO) respectivamente de acordo com as recomendações propostas pela American Type Culture Collection (ATCC[®]). As culturas celulares foram feitas em frascos de cultura T-75 (TPP[®]) em estufa úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C (Forma[™] 310 – Thermo Scientific), os repiques eram feitos de acordo com a confluência celular de aproximadamente 80-90% e o meio de cultura era substituído a cada 2 ou 3 dias.

4.2 Co-cultura em Transwell[®]

As células MACL-1, MCF10A, MDA-MB-231 e CCD19-Lu foram coletadas dos frascos de cultura por meio de incubação a 37°C com tripsina (GIBCO) por aproximadamente 5 minutos ou até que estivessem soltas dos frascos, posteriormente, inativou-se a tripsina com os respectivos meios de cultura de cada linhagem celular suplementado com 10% SFB. A suspensão de células foi transferida para um tubo Falcon[®] estéril, centrifugada a 800 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 1 mL de meio de cultura DMEM. Após a contagem em câmara de Neubauer, as células foram plaqueadas em triplicatas nas placas de Transwell[®] (Corning) com membranas de poliéster (PET) e/ou colágeno ambas com poro 0,4µm, numa densidade de $1,0 \times 10^4$ células/poço e mantidas em estufa úmida, contendo 5% de CO₂, a 37 °C por 5 dias. Vale ressaltar

que esta co-cultura foi realizada seguindo o organograma mostrado na Figura 7 e a cada 24 horas as células eram contadas e observadas em microscópio eletrônico (Zeiss Axiovert 200M) obtendo as imagens no mesmo momento através do programa Carl Zeiss AxioVision Rel. 4.8 Software®. Procurou-se demarcar um quadrante para obter as mesmas imagens por 5 dias de cultura sempre no mesmo campo.

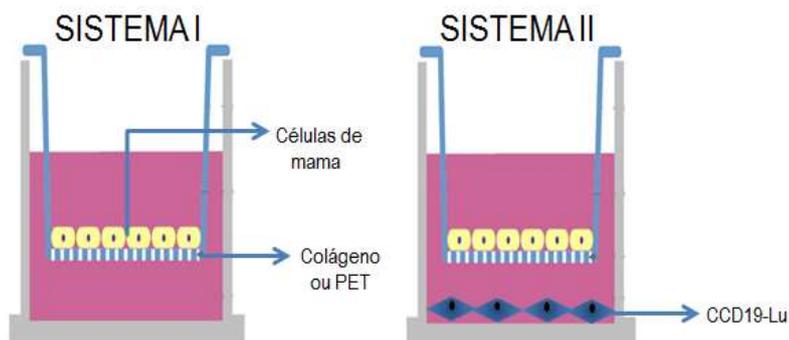


Figura 7 - Cultivo das células de mama MACL-1, MDA-MB-231, MCF-10A e fibroblastos CCD19-Lu em Transwell®. Esquema demonstrando como foi feita a co-cultura das células tumorais de mama MACL-1 e MDA-MB-231, não tumorais MCF-10A e dos fibroblastos CCD19-Lu na placa de Transwell® dispostas em 2 sistemas (I, e II). Sistema I corresponde a disposição das células de mama na membrana de poliéster e Sistema II corresponde a disposição das células de mama na membrana e os fibroblastos no fundo do well.

4.3 Marcação das células para microscopia de fluorescência

O meio de cultura contido em cada poço foi delicadamente aspirado, descartado e as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x. As células foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% (p/v) em PBS1x por 1 hora a temperatura ambiente. Depois de lavadas três vezes com PBS 1x, as células foram permeabilizadas com Triton-X 100 0,1% (v/v) por 10 minutos a temperatura ambiente e novamente lavadas com PBS 1x por 3 vezes (5 minutos cada). Uma parte das células em placas de Transwell® foram incubadas com Faloidina conjugada a Alexa Fluor 488 (Invitrogen) de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante e DAPI (Sigma) 300nM por 5 minutos a temperatura ambiente e em seguida foram lavadas com PBS 1x por 2 vezes.

Outra parte das células foi incubada com solução de bloqueio contendo 1% (p/v) de albumina sérica bovina (BSA) em PBS 1x por uma hora, a temperatura

ambiente. Após nova lavagem com PBS 1x as placas foram incubadas com o anticorpo primário anti-vimentina (Life Technologies) e anti-desmina (Santa Cruz Biotechnology) diluídos de acordo com as recomendações do fabricante, deixando as células overnight em contato com a solução em câmara úmida, a 4 °C.

Após a incubação com o anticorpo primário, os poços foram lavados três vezes com PBS1x por 5 minutos cada lavagem. Em seguida, as células foram colocadas em contato com 100 µl da solução de anticorpo secundário diluído 1:500 em PBS contendo 1% (p/v) de BSA por uma hora em câmara úmida, ao abrigo da luz e a temperatura ambiente. Foi usado o anticorpo conjugado a Alexa Fluor 594 (Molecular Probes – Life Technologies). Os poços foram novamente lavados três vezes com PBS1x por 5 minutos cada lavagem. A marcação nuclear foi realizada com DAPI (Sigma) 300nM por 5 minutos a temperatura ambiente, sendo, em seguida, lavadas com PBS 1x por três vezes e mantidas ao abrigo da luz. Ao final deste processamento, as lâminas foram analisadas por meio de microscopia de fluorescência convencional (Zeiss Axiovert 200M), usando-se o programa Carl Zeiss AxioVision Rel. 4.8 Software®.

4.4 Marcação das células por imunocitoquímica

O meio de cultura contido em cada poço foi delicadamente aspirado, descartado e as células foram lavadas com PBS 1x por 5 minutos. As células foram lavadas duas vezes com PBS 1x + Triton-X 100 0,1% (v/v) por 10 minutos a primeira lavagem e por 5 minutos a segunda lavagem, em seguida foram incubadas em solução peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3,5% em PBS 1x por 30 minutos e lavadas com PBS 1x por 5 minutos. Após as células foram incubadas com leite em pó diluído em PBS 1x por 30 minutos.

Após nova lavagem com PBS 1x as placas foram incubadas com o anticorpo primário anti-FAP (Dako), diluídos de acordo com as recomendações do fabricante, e deixados por 1 hora em câmara úmida a 37 °C, passado foram feitas duas lavagens com PBS 1x por 5 minutos cada e uma lavagem com Triton-X 100 0,1% por mais 5 minutos. Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo secundário (amarelo) (Dako) por 30 minutos, procedeu-se com o mesmo processo de lavagem feito anteriormente para o anticorpo primário acrescentando o anticorpo

terciário (vermelho) (Dako), incubando por mais 30 minutos. Feito o mesmo processo de lavagem anteriormente descrito, as células foram submetidas a revelação por Diaminobenzidina (DAB) diluído em H₂O₂ (0,005%). Os poços foram novamente lavados com PBS1x por 5 minutos. Ao final deste processamento, as lâminas foram analisadas por meio de microscopia de fluorescência convencional (Zeiss Axiovert 200M), usando-se o programa Carl Zeiss AxioVision Rel. 4.8 Software®.

4.5 Dosagem de citocinas por Cytometric Bead Array (CBA)

As citocinas humanas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α) foram determinadas usando o kit Cytometric Bead Array™(CBA; BD Biosciences, San Jose, CA). O sobrenadante das culturas de fibroblastos CCD19-Lu expostas e não-expostas ao secretoma das células tumorais MACL-1 foram coletados, concentrados e misturados com um mix de *beads* de captura para cada citocina. Após a mistura, foram adicionados os anticorpos anti-IL-2, anti-IL-4, anti-IL-5, anti-IL-10, anti-IFN- γ e anti-TNF- α humanos conjugados com ficoeritrina (PE) (BD Company, San Diego, CA) por 3 horas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

Os tubos foram então centrifugados (720 x *g* por 7 minutos) e os sobrenadantes cuidadosamente aspirados e descartados. O *pellet* contendo as *beads* foi ressuspensão e as amostras foram analisadas no citômetro Fortessa BD™ (BD Company, San Diego, CA) e os dados obtidos foram analisados pelos softwares BD™ FACSDiva e FCAP Array. Os resultados foram expressos em intensidade média da fluorescência.

4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS PAGE e Western Blotting

As amostras de lisado dos fibroblastos CCD19-Lu expostos e não expostos ao secretoma das células MACL-1 foram submetidas a separação eletroforética, sob condições não-redutoras, em gel SDS-PAGE 10%, como descrito por Laemmli (1970).

Para a análise da expressão da desmina (35µg), da vimentina (35µg) e NFκB (35µg), as amostras foram aplicadas em canaletas de gel SDS-PAGE preparado em placas de vidro com dimensão de 10,0 x 8,0 x 0,2 cm, com espaçadores de 1 mm, para separação das proteínas de acordo com sua massa molecular. Os géis foram feitos de modo descontínuo, apresentando gel de concentração de 4% (v/v) de solução de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,125M pH6,8; 0,1% (p/v) de SDS; 50 mM de Persulfato de amônia (PSA); e 0,025% (v/v) de TEMED, aplicado acima do gel de separação de 12,5% (v/v) de solução de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,5M pH8,8; 0,1% (p/v) de SDS; 50 mM de PSA; e 0,025% (v/v) de TEMED. Todos os géis foram preparados num sistema de eletroforese Mini-PROTEAN® tetra cell (Bio-Rad).

As amostras protéicas foram misturadas ao tampão de amostra 2X concentrado para SDS-PAGE (Tris-HCl 0,0625M pH 6,8; glicerol a 10%; β-mercaptoetanol 5%; 2% de SDS e 0,001% de azul de bromofenol) em proporções variadas afim de obter uma concentração final de 35µg de amostra por canaleta. As soluções foram aquecidas a 96°C por 3 minutos em banho-seco e aplicadas no gel de eletroforese. Foi usado padrão de massas moleculares de 180, 115, 82, 64, 49, 37, 26, 19, 15 e 6 KDa (Invitrogen). A corrida eletroforética foi realizada verticalmente com tampão de corrida (TRIS-HCl 0,025 M, Glicina 0,192 M com SDS a 0,1% pH 8,3) sob tensão de 150V e a temperatura ambiente.

Após a corrida as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, foi feito o bloqueio da membrana com leite em pó (5%) diluído em PBS-Tween (0,3 %) por 1h. A membrana foi incubada (12 horas) com uma solução contendo 5% de leite em pó (diluído em PBS-Tween - 0,3%) com anticorpos das proteínas de interesse – desmina (diluição 1:500µl), vimentina (1:1000µl) e NFκB (diluição 1:500µl). Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário por 2 horas. Logo após esse processo, a membrana foi revelada por detecção quimioluminescente (Amersham Biosciences do Brasil Ltda).

4.7 Extração do secretoma das células MACL-1

As células MACL-1 foi cultivada em meio DMEM suplementado com SFB a 10% até atingirem uma confluência de 80-90%. Em seguida, esse meio foi removido

e as células lavadas por cinco vezes com solução salina tamponada com fosfato 1x (PBS1x) estéril sendo a última lavagem feita com meio DMEM alta glicose sem suplementação. Foi adicionado meio DMEM alta glicose sem suplementação às células e estas foram acondicionadas em estufa úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas. Passado este tempo, o meio foi retirado, filtrado em filtro de 0,22 µm (Millipore), distribuído em microtubos estéreis de 2mL (Eppendorf) e concentrado através de sistema de concentração a vácuo (SpeedVac™ Concentrator – Thermo Scientific). As amostras concentradas foram reunidas, passadas em coluna PD-10 Desalting Column (GE Healthcare Life Sciences) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, coletadas em microtubos “low binding capacity” (Eppendorf) e concentradas novamente em sistema de concentração a vácuo (SpeedVac™ Concentrator – Thermo Scientific). Todo o procedimento descrito foi realizado com meio DEMEM sem suplementação como controle.

Por fim foi feita uma estimativa da quantidade de proteínas nas duas amostras através da dosagem em equipamento com leitura a uma absorvância de 280nm (NanoVeu Plus™ - GE Healthcare Life Sciences) e essas amostras foram armazenadas em freezer -80°C. Vale ressaltar que todo o procedimento realizado evitou-se ao máximo variações na temperatura das amostras mantendo estas o tempo todo em banho de gelo até o seu armazenamento final.

4.8 Extração de proteínas intracelulares das células MACL-1 e CCD19-Lu

As células MACL-1 e CCD19-Lu em cultura, após atingirem uma confluência de 80-90%, tiveram o meio removido, filtrado em filtro 0,22µm e coletado em tubos Falcon ® de 50 mL estéreis. As garrafas de cultura com as células foram lavadas por três vezes com PBS1x gelado, foram adicionados 5 mL de DMEM a cada garrafa e, com o auxílio de um raspador de células estéril, as células foram desprendidas mecanicamente. O conteúdo de cada garrafa foi transferido para os tubos correspondentes. As garrafas foram lavadas duas vezes com 5 mL de DMEM, que também foi recolhido. Os tubos foram centrifugados a 830 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi lavado com 5 mL de DMEM. Após nova centrifugação, as células foram suspensas em 1 mL de DMEM. A suspensão foi transferida para tubos de 2 mL e centrifugada a 12800 g durante 5

minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente removido a fim de que o precipitado de células estivessem livre de DMEM.

Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, o pellet ressuspendido em tampão de lise (Uréia 8M, Tiouréia 2M, CHAPS 4%, DTT 65mM, Tris 40mM, Bio-Lyte 0,2%, AEBSF 2mM, EDTA 1mM, Bestatina 130uM, E-64 14uM, Leupeptina 1uM e Aprotinina 0,3uM) numa proporção 1:3 (v/v) e deixado por 2 horas a temperatura ambiente sob agitação leve. Passado este tempo, a solução foi sonicada ou passada por 10 vezes em seringa com agulha de 26G, não deixando formar bolhas, sendo centrifugada em seguida por 30 minutos a 20.000g, onde o sobrenadante foi coletado em um novo tubo. A concentração de proteínas foi determinada utilizando 2D Quant kit (Amersham Biosciences) e as amostras foram armazenadas a -80 °C.

4.9 Ensaio de citotoxicidade do secretoma das células MACL-1 em Células CCD19-Lu

Para avaliar a toxicidade do secretoma das células de adenocarcinoma de mama (MACL-1) em fibroblastos CCD19-Lu, foi utilizado o Kit LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity kit for mammalian cells (Molecular Probes). O kit fornece um ensaio de viabilidade celular com dois marcadores de fluorescência que se baseia na determinação simultânea de células vivas e mortas com duas sondas (Iodeto de propídeo e calceína) que mensuram os parâmetros de reconhecimento de viabilidade celular: atividade intracelular da esterase e integridade da membrana plasmática. As células vivas são distinguidas pela presença ubíqua da atividade da esterase intracelular, determinada pela conversão enzimática da calceína AM, permeável à célula, virtualmente não fluorescente para calceína intensamente fluorescente. A calceína marcada polianiónica é bem retida no interior de células vivas, produzindo uma intensa e uniforme fluorescência verde (ex/em ~ 495 nm / ~ 515 nm). O iodeto de propídeo entra nas células com membranas danificadas e sofre um aumento de fluorescência de 40 vezes por ligação ao DNA, produzindo assim uma fluorescência vermelha brilhante em células tardiamente apoptóticas ou necróticas (ex/em ~ 495 nm / ~ 635 nm).

As Células CCD19-Lu utilizadas para esse ensaio. foram plaqueadas numa densidade de $2,0 \times 10^5$ células/poço em placas de 96 poços, expostas a diferentes

concentrações do secretoma das células MACL-1 e incubadas em estufa úmida contendo 5% de CO₂ à 37°C por 24 e 48 horas. Após esse período o meio foi descartado, as células foram lavadas três vezes com tampão HEPES, para remoção do meio de cultura e foi adicionado ao poço 200 µL da combinação de reagentes do kit Live/Dead® (Molecular Probes – Invitrogen) (2,5 mL de HEPES + 5 µL de iodeto de propídeo + 1,25 µL de calceína). As células então foram incubadas por 30 minutos para incorporação dos reagentes marcados, lavadas com PBS1x por duas vezes e analisadas por microscopia de fluorescência (Zeiss Axiovert 200M), usando-se o programa Carl Zeiss AxioVision Rel. 4.8 Software®.

Foi utilizada a objetiva com aumento de 10x e os filtros com excitação a 495 nm e emissão 500-550 nm para detecção da calceína, e excitação 536 nm e emissão a partir de 617 nm para detecção do iodeto de propídeo. Imagens de 10 campos foram coletadas e analisadas, onde as células vivas e mortas foram contadas em cada imagem. Foram utilizados grupos controle sem tratamento e grupo controle de morte, no qual as células foram incubadas com Peróxido de Hidrogênio 2 mM.

4.10 Produção de superóxido mitocondrial em fibroblastos CCD19-Lu

A produção de superóxido mitocondrial foi monitorada em fibroblastos CCD19-Lu. As células foram plaqueadas numa densidade de $2,0 \times 10^5$ células/poço em placas de 96 poços, subsequentemente foram incubadas com 200µL de solução de MitoSOX® (5µM) (Molecular Probes) em HBSS durante 30 minutos a 37°C.

Após esse período o sobrenadante foi descartado e as células lavadas com PBS 1x por duas vezes. A obtenção das imagens por microscopia de fluorescência (Zeiss Axiovert 200M), utilizando o Carl Zeiss® AxioVision Rel. 4.8 Software, foi feita em três (0s, 900s e 1500s) momentos distintos onde as imagens eram capturadas antes e após a adição do secretoma (50 µg de proteínas/mL) diluído em PBS 1x.

Foi utilizada a objetiva de 10x e o filtro para excitação a 510 nm e emissão a 580 nm para a detecção de superóxido mitocondrial. Imagens do mesmo campo foram coletadas e analisadas em intervalos de 60 segundos, onde se obteve as imagens das células para análise posterior. Como controle foi utilizado células expostas ao meio DEMEM processado da mesma forma que o secretoma.

Este mesmo procedimento foi feito para quantificação da produção de superóxido mitocondrial por citometria de fluxo durante 1500 segundos através do equipamento FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA). Cerca de 20.000 eventos por amostra foram adquiridos conforme parâmetro de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC).

4.11 Estratégias de análise das populações celulares por citometria de fluxo

O citômetro de fluxo (FACScan - Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA) utilizado neste trabalho é equipado com um laser que permite a avaliação básica de 5 parâmetros: tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), fluorescência do tipo 1 (FL1), fluorescência do tipo 2 (FL2) e fluorescência do tipo 3 (FL3). A identificação de moléculas de interesse, bem como a determinação do valor percentual destas, foram feitas através de um sistema de computador e do software "FlowJo7.6.5™ Tree Star (Ashland, OR, EUA).

Foram coletados 20.000 eventos durante 1500 segundos para análise de todas as amostras. Esse software fornece um perfil de células de acordo com o tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Utilizando este perfil, selecionam-se as células que se deseja analisar, de acordo com o tipo de experimento. A análise leva em consideração aquela população de células selecionadas, avaliando o perfil da molécula de interesse por emissão de fluorescência. A Figura 8 ilustra a distribuição da população das células de interesse (R1), após os ajustes de ganhos de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Após a seleção do *gate* de interesse, analisa-se a intensidade de fluorescência apresentada pelas células presentes neste *gate*, utilizando-se de gráficos de fluorescência 1 (FL1) versus fluorescência 2 (FL2) (Figura 8) ou gráficos de histograma.

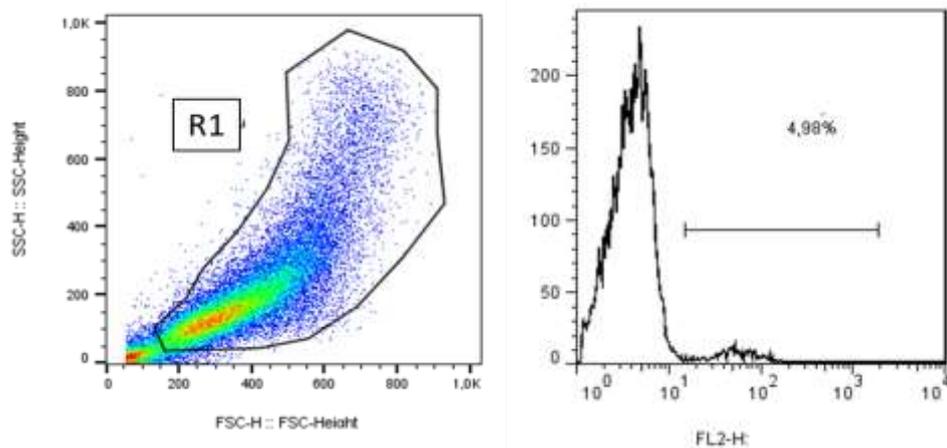


Figura 8 - Gráfico representativo da estratégia de análise utilizada para seleção de células expressando o percentual da molécula de interesse após tratamento com secretoma (50µg/mL). Gráficos do tipo dot-plots demonstram a população de células de interesse selecionadas (Região R1) de acordo com os parâmetros morfológicos tamanho e granulidade (FSCxSSC). A partir de R1 construiu-se o gráfico em histograma com a expressão da molécula de interesse em FL1 ou FL2.

4.12 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS com substrato proteico copolimerizado

A eletroforese com substrato proteico (gelatina) copolimerizado no gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com Heussen & Dowdle (1980), tendo como objetivo identificar a presença de proteases no conteúdo intracelular dos fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células tumorais de mama MACL-1.

Os géis foram feitos de modo descontínuo, apresentando gel de concentração de 4% (Tris-HCl 0,5M, SDS 10%, PSA 10% e TEMED), aplicado acima do gel de separação de 12,5% (Tris-HCl 2M, SDS 10%, gelatina 0,1%, PSA 10% e TEMED), mantendo a relação de Acrilamida/Bis-Acrilamida em 0,8%:30%. Todos os géis foram preparados num sistema de eletroforese Mini-PROTEAN® tetra cell (Bio-Rad).

As amostras proteicas utilizadas foram o lisado de fibroblastos CCD19-Lu (FN), lisado de fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células MACL-1 (FS) e lisado de fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células MACL-1 acrescido de 10mM de EDTA (FSE), ambas dissolvidas em tampão (Tris-HCl 0,0625M pH 6,8; glicerol a 10%; 2% de SDS e 0,001% de azul de bromofenol) em proporções variadas afim de obter uma concentração final de 30ug de amostra por

canaleta. As soluções foram mantidas em banho de gelo para impedir variação na temperatura no gel de eletroforese. Foi usado padrão de massas moleculares de 220, 180, 115, 82, 64, 49, 37, 26, 19, 15, 10 e 6 kDa (Invitrogen).

A corrida eletroforética foi realizada com tampão de corrida (TRIS-HCl 0,025 M, Glicina 0,192 M com SDS a 0,1% pH 8,3) sob tensão de 50 V a 4°C, sendo aumentada para 150 V após 1 hora de corrida. Após o tempo de eletroforese (aproximadamente 1:30h) indicado pelo azul de bromofenol ao final do gel, este foi retirado da placa e submerso em solução de triton X-100 2,5% durante 1 hora sob agitação leve para remoção do SDS. Em seguida o gel foi lavado com água destilada para remover a solução de triton e incubado com tampão fosfato 0,2M pH=8,0 por 4 horas a 37°C.

Decorrido o tempo de incubação, os géis foram corados com *Coomassie Blue* R-250 0,2% em solução de ácido acético, metanol e água Milli-Q® na proporção de 1:4:5 (v/v) durante 1 hora, sob agitação leve, e descorados em solução descorante de ácido acético, metanol e água Milli-Q® na mesma proporção, para a revelação das bandas onde houveram atividade proteolítica.

4.13 Análises proteômicas

As análises proteômicas foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Toxinologia da Fundação Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz-RJ) sob a orientação do Dr. Jonas Enrique Perales Aquilar.

As proteínas foram extraídas do secretoma e do lisado das células tumorais de mama MACL-1 entre as passagens 18 a 25 para que houvesse padronização do momento fisiológico. Inicialmente as proteínas das amostras foram precipitadas utilizando ácido tricloroacético (TCA) a 100% corrigido com água ultrapura para 25% de acordo com a concentração das amostras, ficando esta solução a 4°C por 12 horas. Posteriormente as soluções foram centrifugadas a 14.000 rpm a 4°C por 40 minutos, descartando o sobrenadante, sem dispersar os precipitados, e acrescentando 500uL de acetona P.A. Em seguida as amostras foram novamente centrifugadas a 14.000 rpm a 4°C por 10 minutos descartando novamente o sobrenadante e deixando os precipitados secarem a temperatura ambiente.

Com os precipitados secos as proteínas das amostras foram submetidas a digestão, sendo inicialmente acrescentado ureia 8M e Tri (2-cloetil) fosfato (TCEP) 10mM incubando as amostras por 15 minutos a 56°C. Posteriormente foi acrescentada iodoacetamida (IAA) 100mM e nova incubação por 15 minutos ao abrigo da luz. Por fim as soluções foram completadas com 125uL de água ultrapura e 15uL de bicarbonato de amônio 1M. A Tripsina (Promega) foi adicionada na proporção 1/50 (m/m)^a de enzima por substrato, sendo as amostras incubadas a 37°C por 24 horas com interrupção da reação por ácido acético P.A. seguido de uma breve centrifugação.

A Dessalinização das amostras foi feita utilizando membrana Empore 3M e resina R2 Salf Pack poros 20 (Thermofisher), onde a coluna foi lavada inicialmente com acetonitrila 100%, seguido de ácido trifluoracético (TFA) 1% para equilibrar a coluna. Foi adicionado TFA às amostras suficiente para que tenha uma concentração final de de 1% de TFA, então cada amostra foi transferida para uma coluna que posteriormente foi lavada por 5 vezes com TFA 0,1%. As amostras foram eluídas em TFA 0,1% e acetonitrila 70% sendo recolhidas em microtubos novos para posterior concentração em Speed Vac.

A análise proteômica de cada amostra foi obtida pelo método *Label-free* (sem manipulação da amostra) com quantificação absoluta a partir de LC-MS realizada em um equipamento LTQ Orbitrap XL-ETD (Thermo Fisher Scientific) e LC-ESI-Ion Trap (Thermo Fisher Scientific) acoplados a MS acoplado a um analisador de massas. O sistema Q-TOF foi operado em modo positivo e negativo, com ionização feita por eletrospray (ESI) em full scan, compreendendo análises de alta performance com frequência de 1 scan/seg. Modo de aquisição data-dependent acquisition (DDA) foi utilizado nas triagens iniciais e durante as análises a calibração externa do modo MS/MS foi realizada utilizando os fragmentos de massas conhecidas gerados a partir do Glu1-fibrinopeptídeo B. Foi também aplicada uma lista de exclusão referente às massas provenientes de tripsina e queratina, possíveis contaminates das amostras.

Os dados produzidos pela análise em LC-MS foram processados para remover o ruído favorecendo o alinhamento das amostras. Todos os dados obtidos nos sistemas analíticos foram primariamente tratados de forma similar e o processamento inicial dos dados percorreu 3 etapas básicas. A primeira foi a verificação da qualidade dos cromatogramas (alinhamento), a segunda a dinâmica

da aquisição e finalmente a contagem dos espectros gerando assim a identificação das proteínas.

Para gerar a lista de proteínas identificadas pelo equipamento foi utilizado o software PEAKS DB (Zhang et al. 2012). Por este programa foi feito o sequenciamento de larga escala em “de novo” (o programa busca em diversos bancos de dados uma lista de peptídeos). Feita a obtenção fez-se uma busca dentro do banco de dados onde o software localizou quais proteínas estavam presentes nas amostras fornecendo a análise estatística do próprio programa.

4.14 Análise da interação entre as proteínas

As proteínas de interesse foram carregadas na base de dados do STRING (<http://string-db.org/>) utilizado para extrair as possíveis interações existentes proteína-proteína. Para tal verificação utilizou-se os códigos das 645 proteínas presentes no secretoma e no lisado das células tumorais MACL-1 fornecidos pelo banco de dados disponível no Uniprot (www.uniprot.org). O banco de dados dos parâmetros de pesquisa incluídos foi demarcado para “múltiplas proteínas” incluídas no organismo *Homo sapiens*. Foram consideradas fontes de interação ativa todos os parâmetros disponibilizados pelo programa com score de interação mínimo de 0.900 de confiança.

As proteínas que apresentaram interações entre si foram agrupadas de acordo com as funções de regulação, sinalização, diferenciação e crescimento celular, e as que não apresentaram nenhuma interação foram excluídas da análise restando 129 proteínas. Destas proteínas 3 foram selecionadas mediante ao critério de interação entre si e com outras proteínas que tivessem relevância às funções moleculares apresentadas anteriormente. Também foi levada em consideração a inserção dessas proteínas nas vias de sinalização que apresentassem correlação direta e/ou indireta com os resultados observados neste estudo. Para esse identificação utilizou-se o banco de dados fornecidos pela Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes - KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

4.15 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística das análises proteômicas foi realizada pelo software PEAKS DB (estatística multivariada com análise de componentes principais (PCA), análise de mínimos quadrados parciais (PLS) e análises de projeções ortogonais para estruturas latentes (OPLS), e estatística univariada utilizando t-student para os dados paramétricos e Mann Whitney para os não paramétricos), durante a obtenção dos resultados. Para as demais análises foram aplicados testes de t-student pareado, Twoway ANOVA com pós teste de Bonferroni, Mann Whitney, t-test não pareado com correção de Welch's. Os testes estatísticos foram aplicados de acordo com as características de cada experimento. Foram utilizados os softwares Excel 2013 (Microsoft Corporation), GraphPad Prism versão 5.0.3 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA), R x64 3.1.3 (The R foundation for statistical computing, 015-03-09) e FCAP Array Software versão 3.0 (Biosciences) assumindo significância estatística $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Aumento do número de células e alteração da morfologia das células CCD19-Lu em co-cultura com células MCF-10A, MACL-1 e MDA-MB-231 em matriz de Poliéster (PET).

Células MCF-10A, MACL-1 e MDA-MB231 cultivadas em transwell® na matriz de poliéster (PET) com poro de 0,4 µm apresentaram crescimento compatível com o tempo de cultura de 96 horas (Figura 9C, E e G). As Células CCD19-Lu cultivadas no fundo dos poços (abaixo da matriz de Poliéster) em co-cultura com células MCF-10A ou MDA-MB-231 (Figura 9D e H) apresentaram um número de células semelhante ao controle (Figura 9B). Entretanto as células CCD19-Lu cultivadas com as células MACL-1 apresentaram um aumento no número de células (Figuras 9F e 10A) em relação ao controle (Figuras 9B e 10A).

Além do aumento no número de células, os fibroblastos expostos ao secretoma das células MACL-1 apresentaram alterações na sua morfologia, quando comparados ao controle, onde as características morfológicas mais evidentes foram o aumento na expressão de fibras do citoesqueleto (Figura 11D) e nucléolos mais proeminentes (Figura 11F).

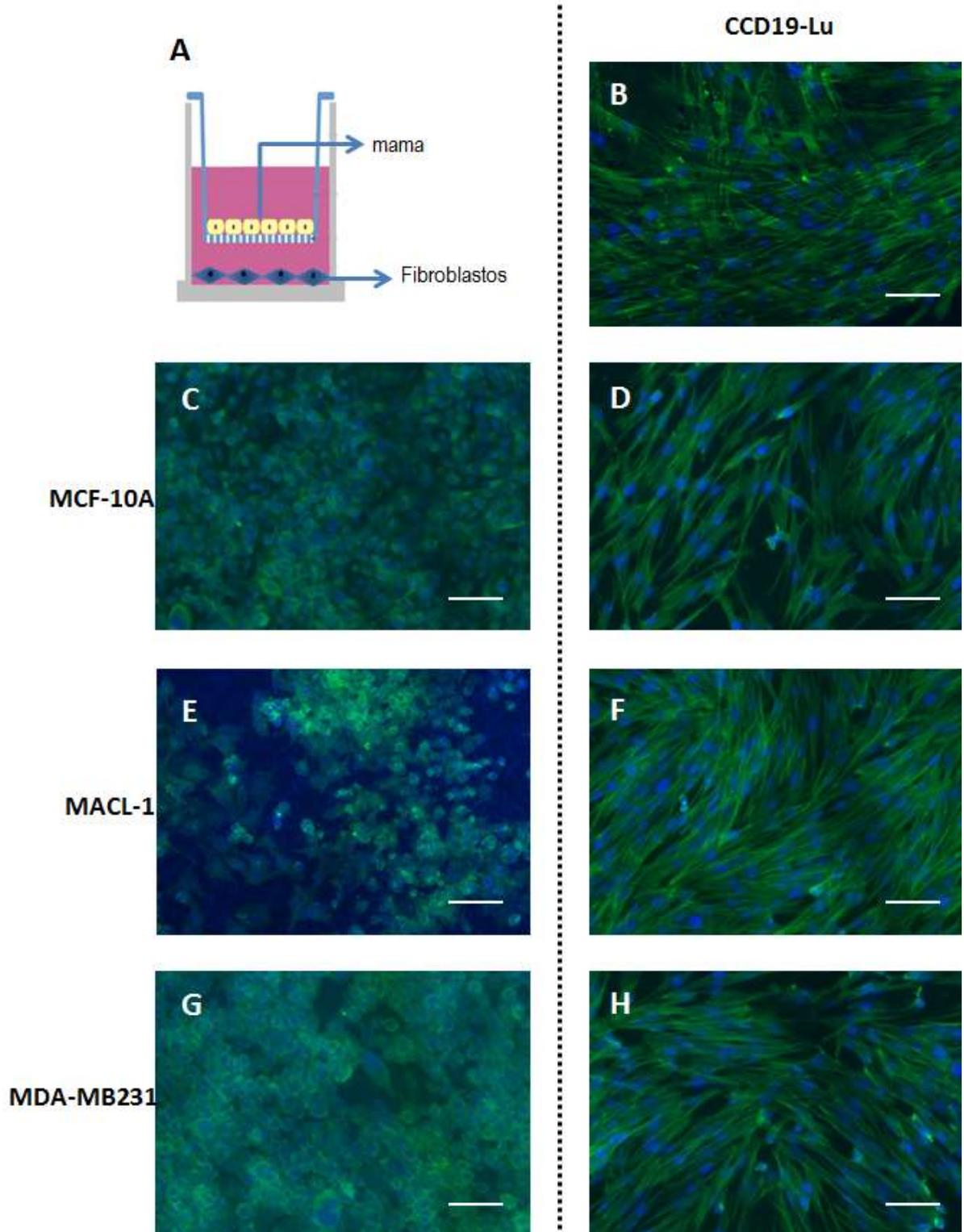


Figura 9 - Células MCF-10A, MACL-1 e MDA-MB-231 cultivadas em matriz de Poliéster (PET) em Transwell com as células CCD19-Lu. As imagens representam ensaios em Transwell® com as células MCF-10A (C), MACL-1 (E) e MDA-M-231 (G) cultivadas na matriz de poliéster (PET) com poro de 0,4 μ m e células CCD19-Lu (B, D, F e H) cultivadas no fundo das placas, ambas coradas com faloidina (verde) e DAPI (azul) como descrito em materiais e métodos. Barra: 20 μ m

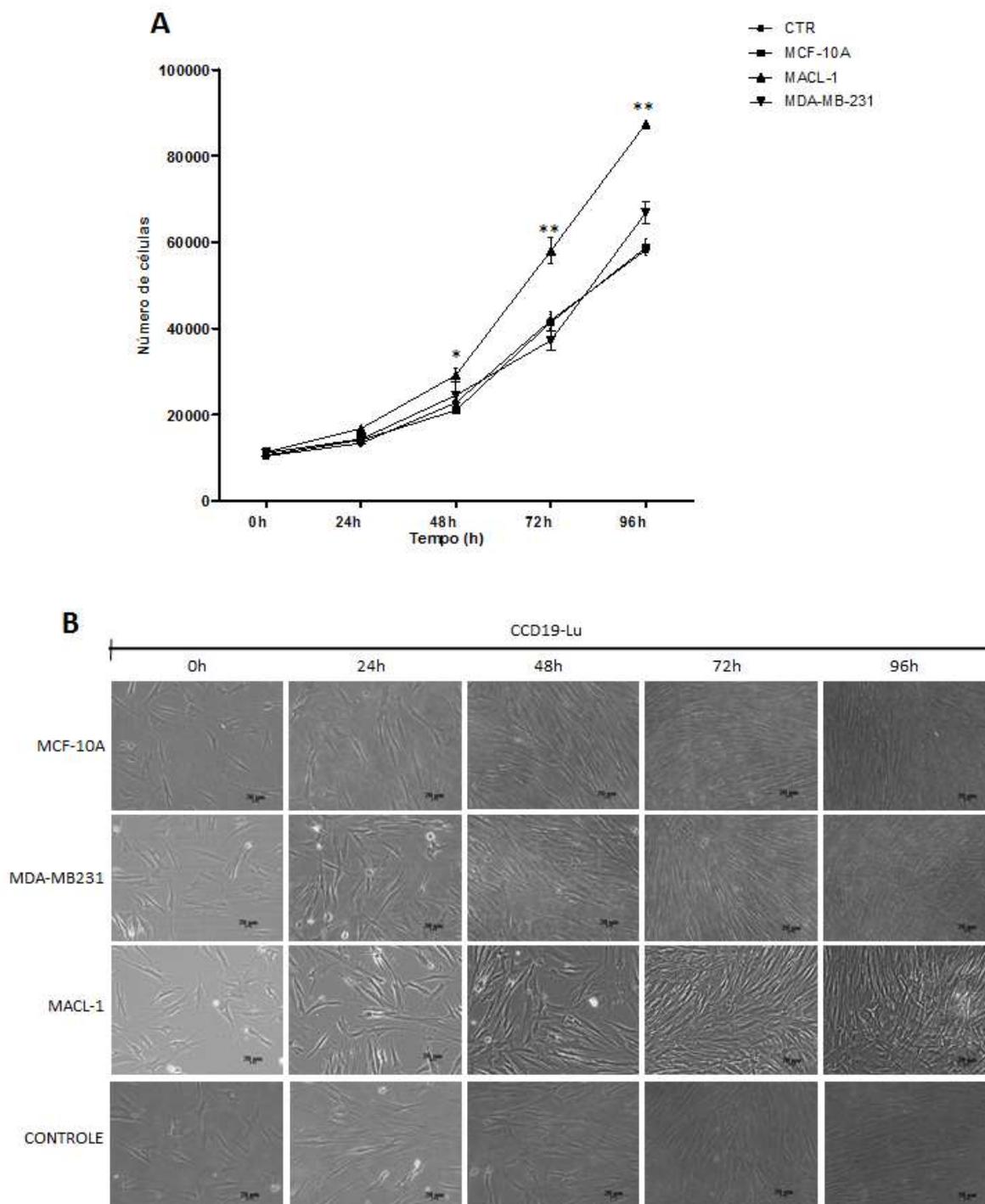


Figura 10 - Células CCD19-Lu expostas ao secretoma das células MACL-1. (A) Gráfico do ensaio de proliferação das células CCD19-Lu cultivadas em transwell com as células MCF-10A, MACL-1 e MDA-MB-231 em membrana de poliéster (PET) durante 96 horas. O crescimento celular em relação ao controle foi quantificado por contagem das células em câmara de Neubauer com a média de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em triplicata (para cada experimento). (B) Microscopia referente ao ensaio de proliferação das células CCD19-Lu cultivadas em transwell com as células MCF-10A, MACL-1 e MDA-MB-231 em membrana de poliéster (PET) durante 96 horas. Os resultados são representados como média \pm desvio padrão ($n > 3$). (*) significância $p < 0,05$; (**) significância $p < 0,001$.

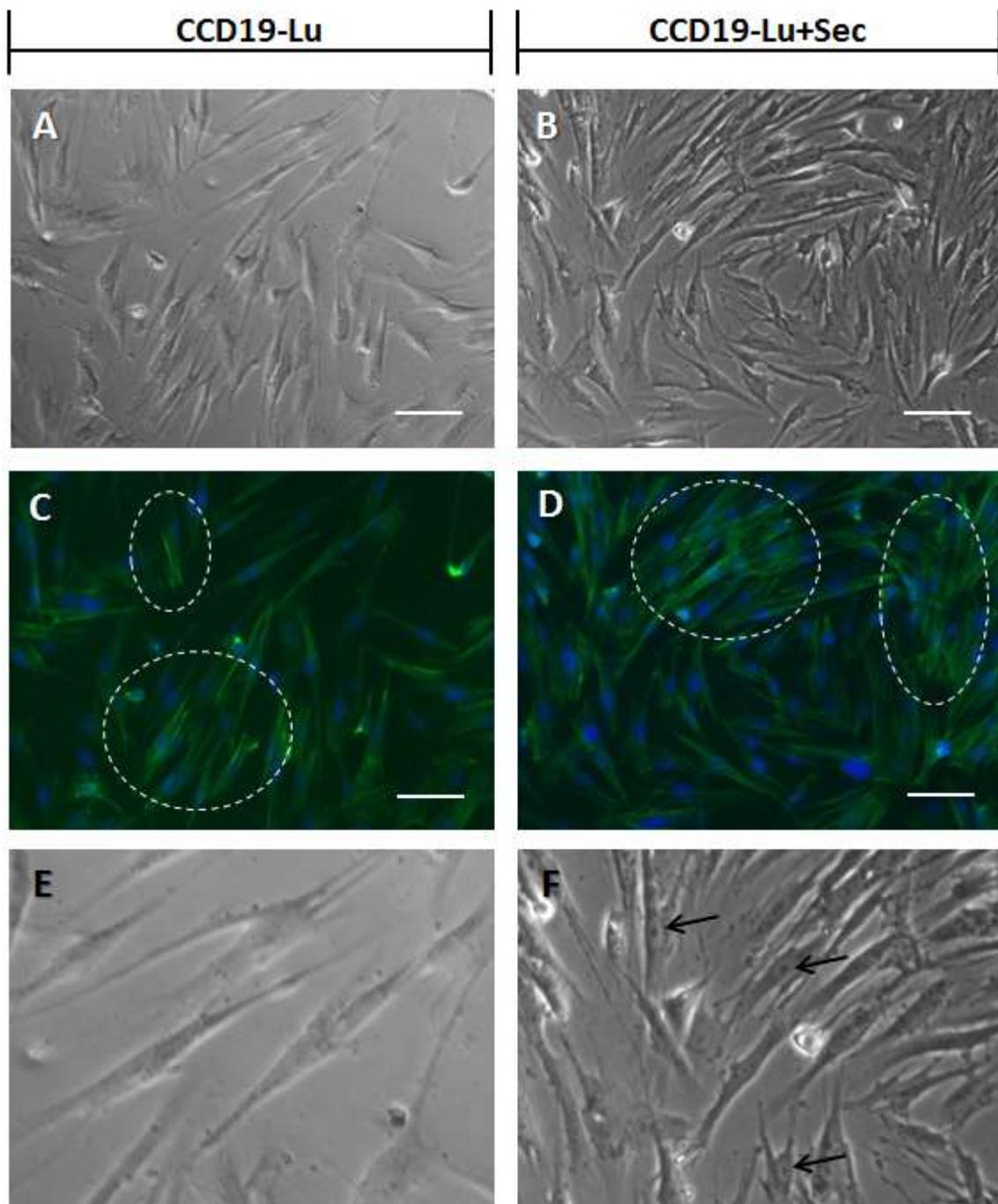


Figura 11 – Alteração na morfologia de fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células MACL-1. As imagens representam os fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células tumorais de mama MACL-1 (CCD19-Lu+Sec) e os fibroblastos normais (CCD19-Lu) obtidas a partir de microscopia em menor (20x) (A, B, C e D) e maior (40x) (E e F) aumento coradas com faloidina (verde) e DAPI (azul) (C e D) como descrito em materiais e métodos. Os círculos (C e D) evidenciam a marcação do citoesqueleto por faloidina e as setas (F) os nucléolos. Barra: 20µm

5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE das proteínas do secretoma e das células MACL-1 e CCD19-Lu

Para melhor verificação e avaliação do conteúdo proteico do secretoma bem como do conteúdo intracelular das células MACL-1 e dos fibroblastos CCD19-Lu, essas amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida onde os resultados foram usados para caracterizar o perfil proteico de cada amostra.

A canaleta onde foi aplicado o meio de cultura DMEM sem suplementação (M) não apresentou nenhuma banda (Figura 12). Ao contrário, todas as outras canaletas (SM, IM, FN e FS) apresentaram diversas bandas com diferentes massas moleculares em maior ou em menor número (Figura 12).

Diversas proteínas com diferentes massas moleculares presentes no secretoma das células MACL-1 (SM) apareceram no lisado dessas células (IM). No entanto tal resultado não se reproduz para o lisado de fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células MACL-1 (FS) e os não expostos (FN) onde o número, densidade e localização das bandas no gel se apresentaram diferentes quando comparadas essas duas amostras (Figura 12).

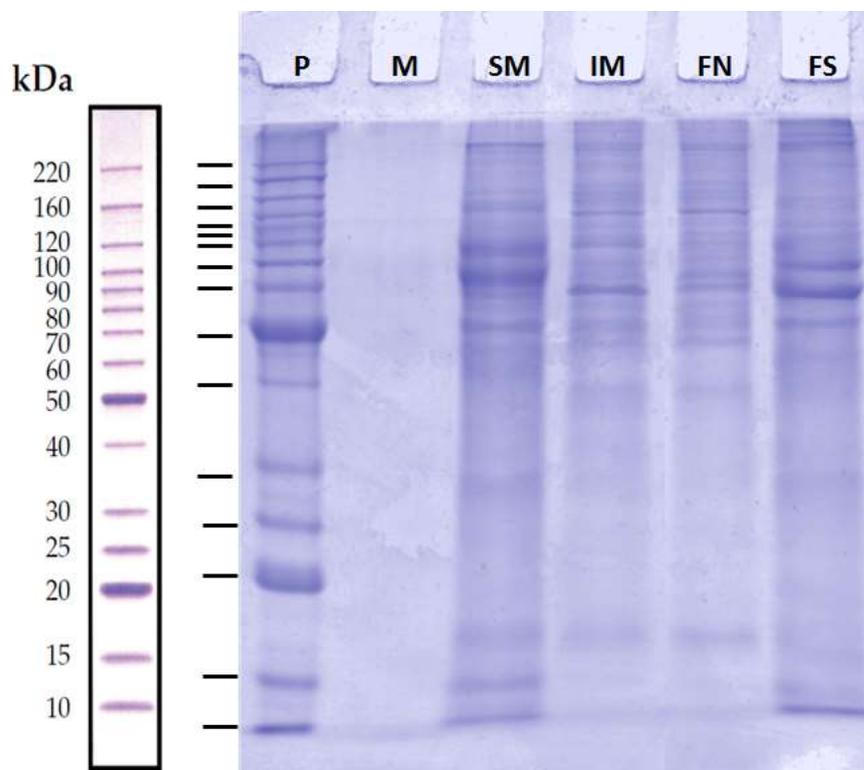


Figura 12 - Eletroforese do secretoma e lisado celular em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Amostras: (P) padrão de peso molecular 220–10 KDa, (M) meio de cultura DMEM sem suplementação, (SM) secretoma das células MACL-1(30µg), (IM) lisado das células MACL-1(30µg),

(FN) lisado das células CCD19-Lu não expostos ao secretoma das células MACL-1(30 μ g) e lisado das células CCD19-Lu expostos ao secretoma das células MACL-1(30 μ g). Gel de acrilamida a 12,5% em Tris-HCl 1,0M pH 8,4. A corrida foi desenvolvida por, aproximadamente, 2 horas a 100V e coloração por Comassie Blue.

5.3 Alteração da expressão de vimentina em fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células tumorais MACL-1.

Devido a alteração na proliferação e morfologia dos fibroblastos CCD19-Lu cultivados em Transwell com as células tumorais MACL-1, verificou-se possíveis alterações na expressão das proteínas estruturais desmina e vimentina. Foi observado um aumento significativo na expressão de vimentina (Figura 12B) quando comparado com o controle (Figura 12A) corroborando com outros estudos que encontraram o mesmo resultado (Kalluri & Zeisberg, 2006; Li et al. 2011; Scott et al. 2013).

No caso a desmina não apresentou alterações significativas no padrão de expressão (Figura 12D) quando comparada ao controle (Figura 12C).

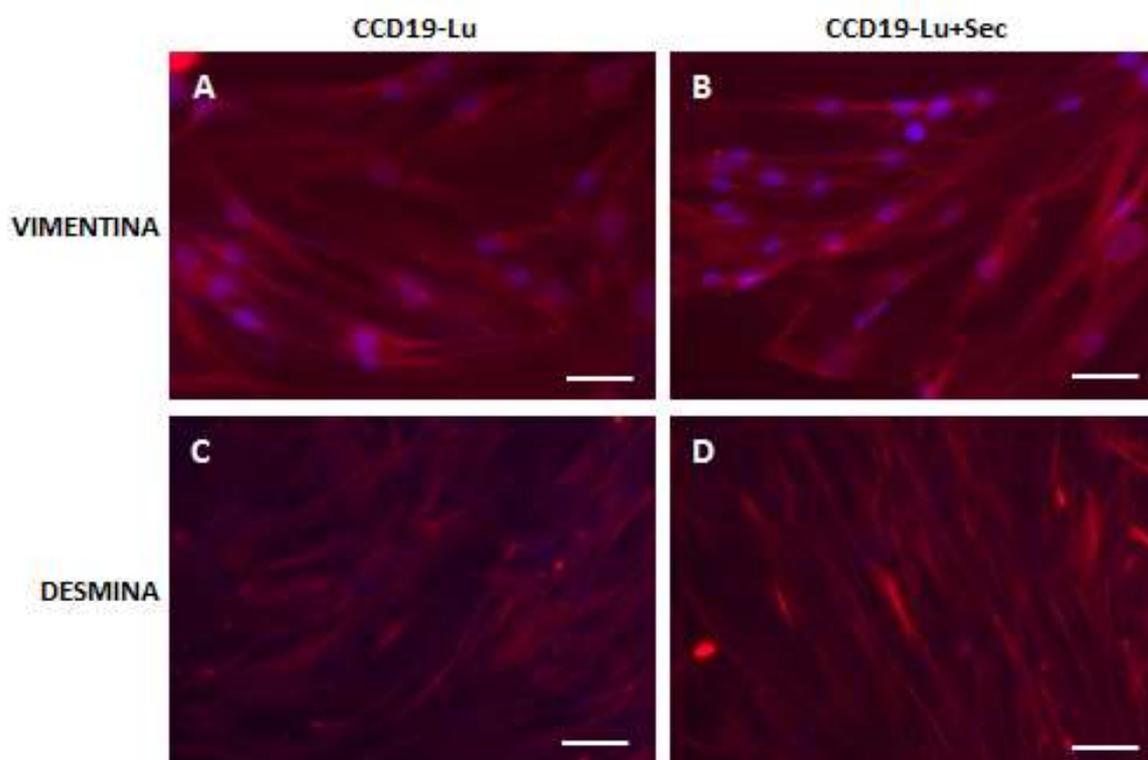


Figura 13 - Expressão de vimentina e desmina em células CCD19-Lu expostas ao secretoma das células MACL-1. As imagens representam imagens obtidas por microscopia de fluorescência

com as células CCD19-Lu expostas (CCD19-Lu+Sec) e não expostas (CCD19-Lu) ao secretoma das células tumorais marcadas com anticorpos anti-vimentina (A e B) e anti-desmina (C e D) ambos conjugados com Alexa Fluor 594 (vermelho) e DAPI (azul). Barra: 20µm (40x).

Uma vez verificado o aumento na expressão da vimentina, optou-se por quantificá-la observando um aumento significativo desta proteína em fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células tumorais MACL-1 em relação ao controle (Figura 14A e B). Vale ressaltar que embora a desmina aparentemente não tenha apresentado alteração significativa na sua expressão, ainda sim foi feita uma quantificação desta. Nesse caso também observou-se que não há alteração da expressão em fibroblastos CCD19-Lu expostos as células tumorais MACL-1 (Figura 14A e B).

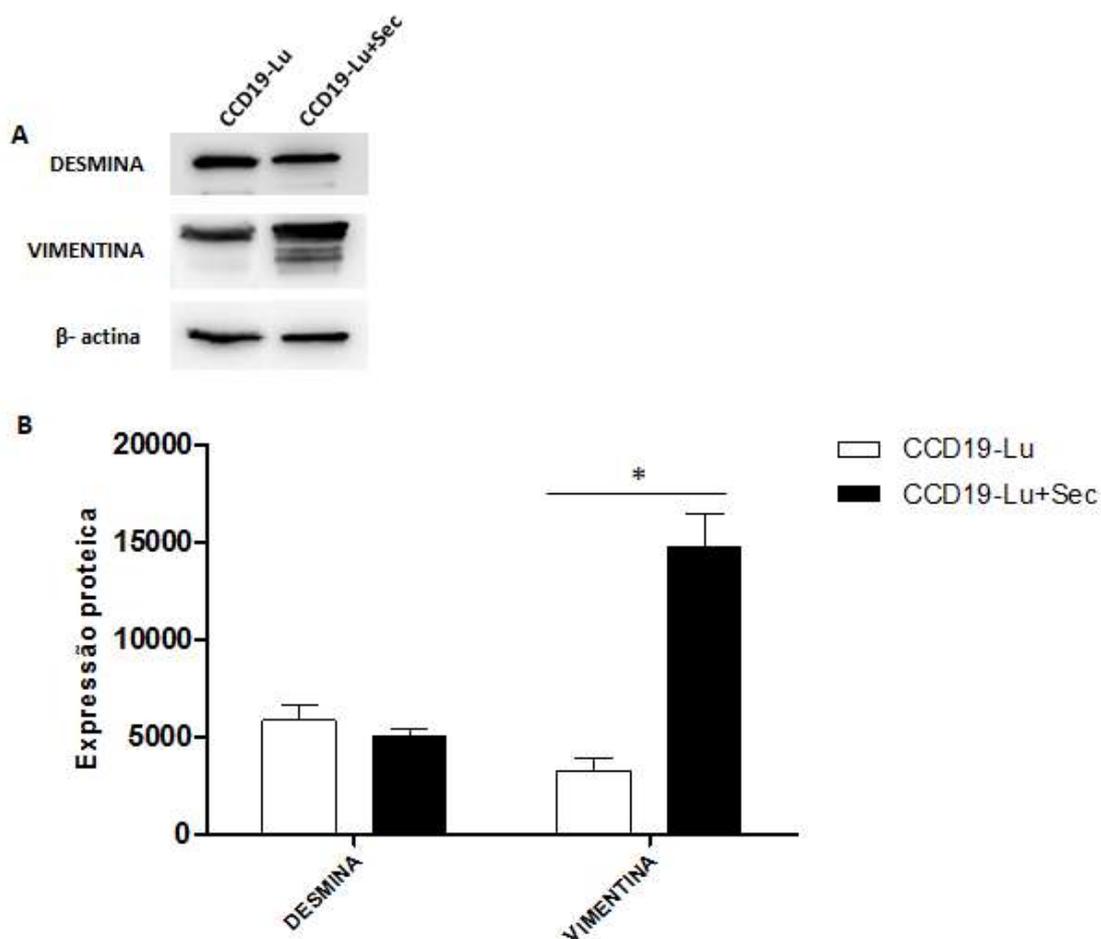


Figura 14 - Expressão proteica de vimentina e desmina em células CCD19-Lu expostas ao secretoma das células MACL-1. As imagens representam o Western blot (A) e o gráfico (B) comparativo entre fibroblastos expostos ao secretoma das células tumorais MACL-1 (CCD19-Lu+Sec) e fibroblastos não expostos ao secretoma (CCD19-Lu). Os resultados são representados com média ± desvio padrão. (*) significância $p < 0,001$.

5.4 Expressão de Proteína de Ativação de Fibroblatos (FAP) em fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células tumorais MACL-1.

Apesar do aumento na expressão da vimentina sugerir uma possível alteração do fenótipo dos fibroblastos, esta proteína ainda pode ser encontrada em fibroblastos normais. Desta forma, verificou-se a expressão de uma proteína mais específica dos CAFs, a Proteína de Ativação de Fibroblatos (FAP), cujo a expressão demonstrou-se aumentada em praticamente todos os fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células MACL-1 (Figura14C e D) se comparados aos fibroblastos que não foram expostos. (Figura14A e B).

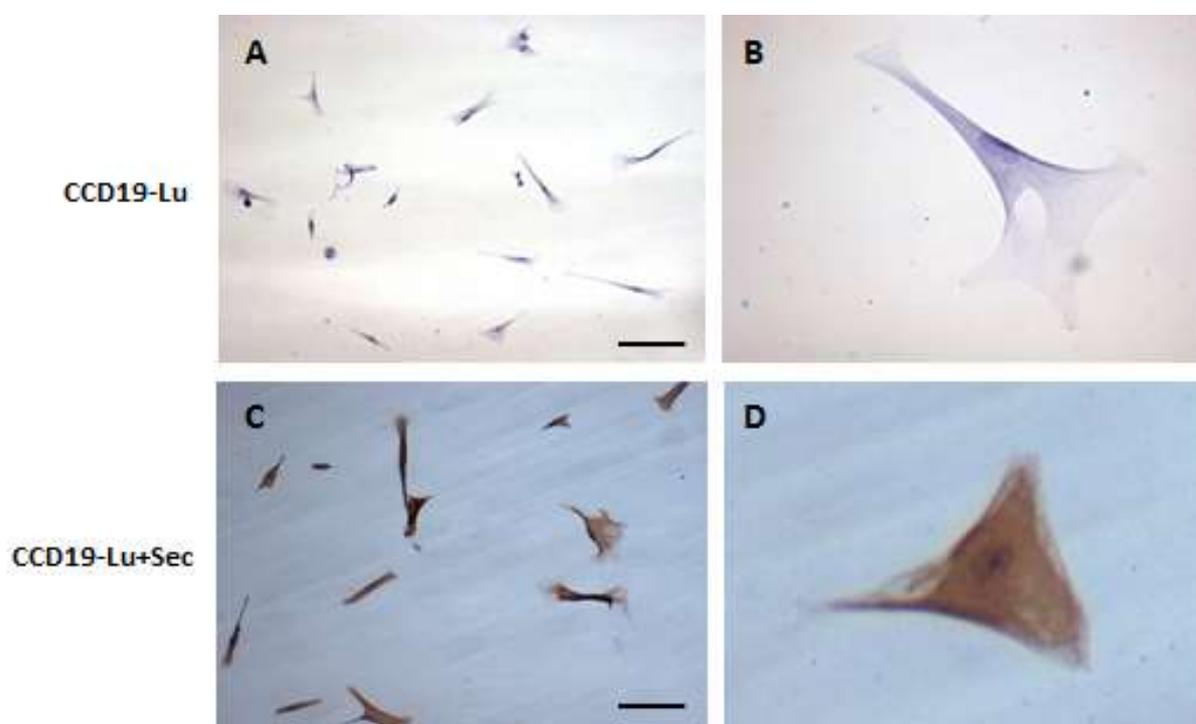


Figura 15 - Expressão da FAP em células CCD19-Lu expostas ao secretoma das células MACL-1. As imagens obtidas por microscopia representam ensaios em Transwell® com as células CCD19-Lu marcadas com anticorpos anti-FAP. Barra: 20µm.

5.5 Aumento da expressão do Fator de Transcrição Nuclear NFκB em fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células tumorais MACL-1.

Mediante as alterações moleculares observadas, até o presente momento, nos fibroblastos CCD19-Lu hipotetizou-se se tais mudanças poderiam estar correlacionadas a algum fator de transcrição nuclear. Desta forma, verificou-se a expressão do fator de transcrição nuclear NFκB onde observou-se um aumento significativo da expressão desse fator (Figura 15A e B) dos fibroblastos CCD19-Lu que foram expostos ao secretoma das células tumorais MACL-1 em relação aos fibroblastos que não foram expostos (Figura 15A e B)

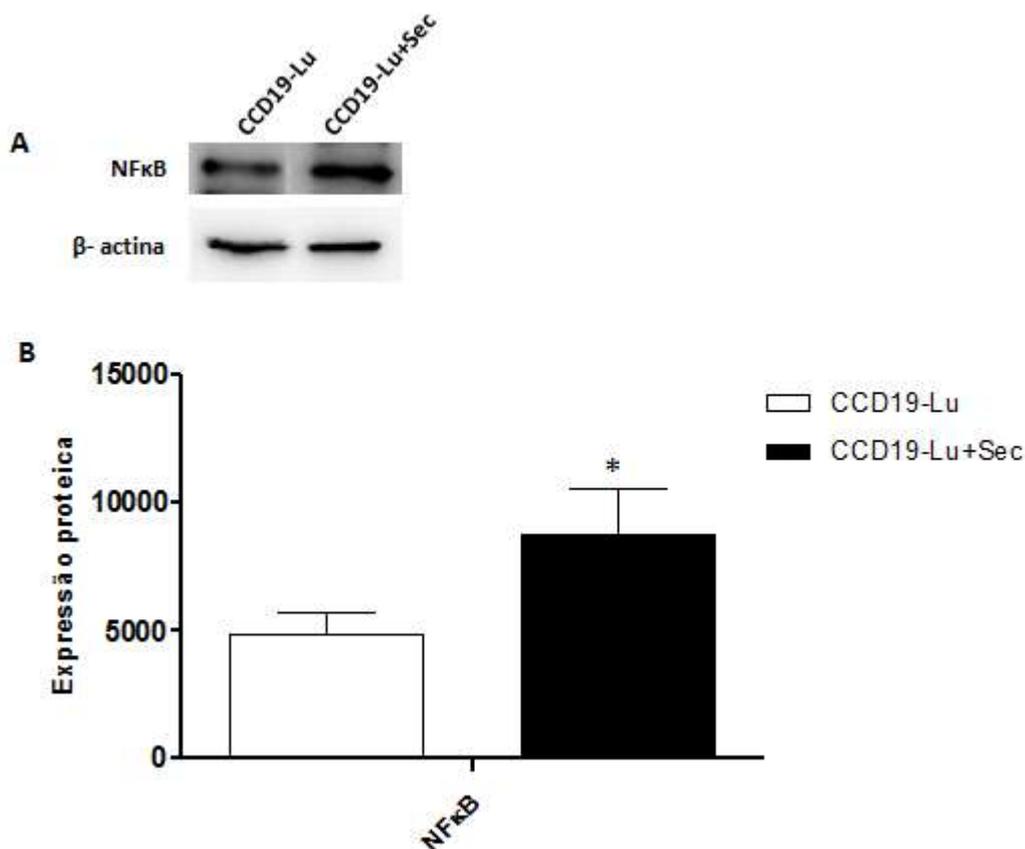


Figura 16 - Expressão proteica de NFκB em células CCD19-Lu expostas ao secretoma das células MACL-1. As imagens representam o Western blot (A) e o gráfico (B) comparativo entre fibroblastos expostos ao secretoma das células tumorais MACL-1 (CCD19-Lu+Sec) e fibroblastos não expostos ao secretoma (CCD19-Lu). Os resultados são representados com média \pm desvio padrão. (*) significância $p < 0,001$.

5.6 Aumento da expressão de IL-6 no sobrenadante de fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células tumorais de mama de MACL-1

O aumento da expressão do fator de transcrição nuclear NF κ B em fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células tumorais MACL-1 sugere que provavelmente a expressão de algumas citocinas, como TGF- β e IL-6, relacionadas a ativação de fibroblastos estarão aumentadas. A expressão dessas duas citocinas no sobrenadante foi avaliada e observou-se um aumento na expressão de IL-6 no sobrenadante da cultura de fibroblastos CCD19-Lu que foram expostos ao secretoma das células tumorais de mama MACL-1 (SecCCD19-Lu+MACL-1) em relação às outras culturas (Figura 16). Vale ressaltar que o TGF- β assim como as outras citocinas não foram detectadas pela metodologia executada.

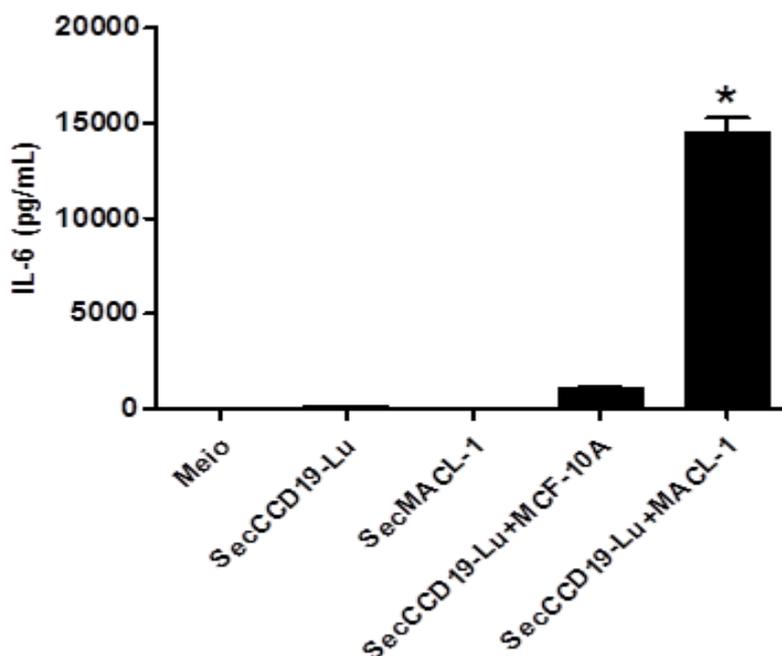


Figura 17 - Expressão de IL-6 em sobrenadante de cultura de células. O gráfico representa a expressão de IL-6 quantificada por CBA no sobrenadante das culturas de células, fibroblastos CCD19-Lu (SecCCD19-Lu), MACL-1 (Sec MACL-1), fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma de células não-tumorais de mama (Sec CCD19-Lu+MCF-10A), fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma de células tumorais de mama (Sec CCD19-Lu+MACL-1) e meio de cultura. Os resultados são representados com média \pm desvio padrão. (*) significância $p < 0,001$.

5.7 Identificação de proteases nos fibroblastos expostos ao secretoma das células MACL-1

Como já mencionado anteriormente sabe-se que algumas enzimas estão diretamente relacionadas com a disseminação do câncer (Overall et al. 2002). Afim de verificar a presença de proteases foi feita uma eletroforese em gel de poli-acrilamida com substrato proteico (gelatina) copolimerizado, onde é possível detectar a presença de proteases e por meio da atividade sobre a gelatina, no qual a banda correspondente a proteína degradada não é corada pelo corante Comassie Blue ficando mais clara em relação a todo o gel. Quando usa-se inibidores misturados as amostras, as bandas podem não aparecer no gel, indicando que não houve atividade desta protease sobre o substrato proteico incorporado ao gel de poli-acrilamida. Dependendo do inibidor utilizado pode-se identificar a família a qual a protease pertence.

Afim de verificar a presença dessas proteases aplicou-se em diferentes canaletas do gel o lisado de fibroblastos CCD19-Lu (FN), lisado de fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células MACL-1 (FS) e lisado de fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células MACL-1 acrescido de 10mM de EDTA (FSE).

Após corrida, incubação em tampão fosfato e coloração do gel foram visualizadas na canaleta FS duas bandas com maior intensidade em relação as outras bandas com massa molecular de aproximadamente 60 kDa (Figura 17). Já nas canaletas onde foram aplicadas as demais amostras (FN e FSE) não houve aparecimento das bandas quando comparadas a canaleta FS (Figura 17).

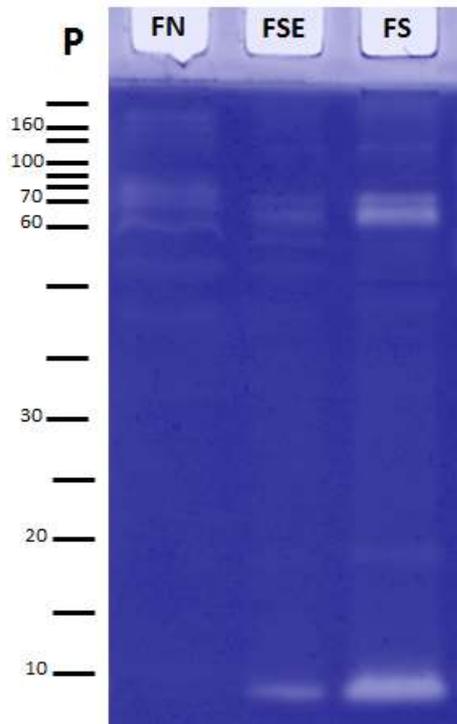


Figura 18 - Identificação de proteases no lisado das células CCD19-Lu por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo substrato proteico incorporado ao gel. Amostras: (P) padrão de massa molecular 220–6 kDa, (FN) lisado de fibroblastos CCD19-Lu (30 μ g), (FSE) lisado de fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células tumorais MACL-1 com EDTA a 10mM e (FS) lisado de fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células tumorais MACL-1 (30 μ g). Gel de poliacrilamida–SDS a 12,5% em Tris-HCl pH 8,8 com gelatina (substrato proteico incorporado) a 0,1%. A corrida foi desenvolvida por, aproximadamente, 2 horas a 100V com remoção do SDS por Triton X-100 (2,5%), incubação com tampão fosfato 0,2M pH8,0 por 4 horas a 37°C e coloração por Comassie Blue.

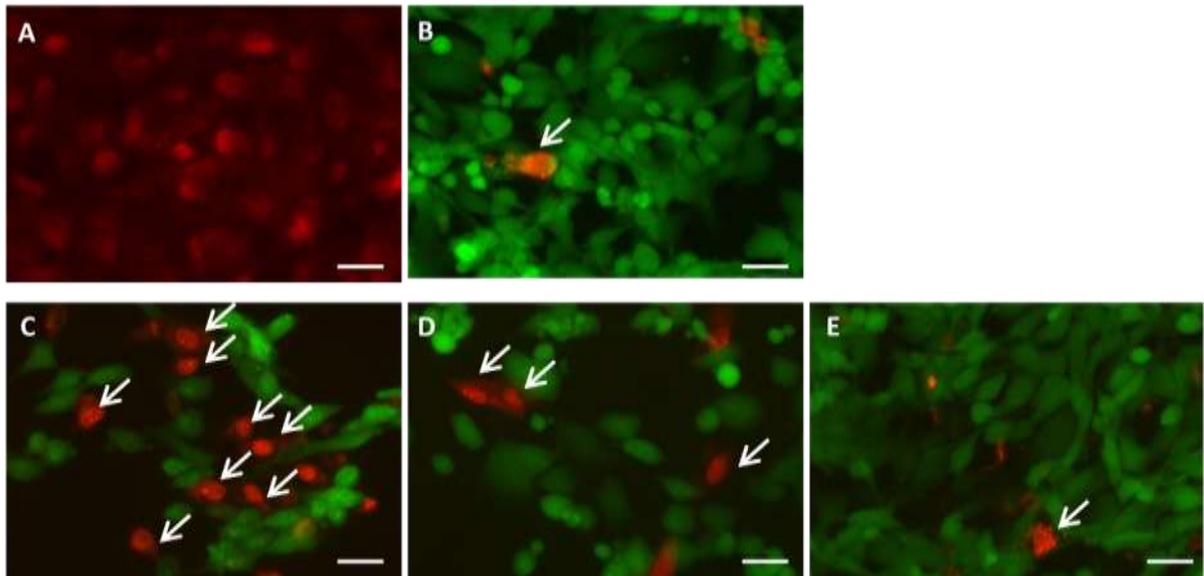
5.8 Verificação da citotoxicidade do secretoma das células tumorais MACL-1 em fibroblastos CCD19-Lu para determinação da concentração máxima a ser utilizada em procedimentos que não envolvam co-cultura

Como já verificado anteriormente, a presença de algumas proteínas no secretoma, principalmente proteases, reforça a ideia de que uma grande concentração destas proteínas poderia levar a morte das células. Como um efeito citotóxico por um excesso de proteases poderia fornecer falsos resultados neste trabalho, decidiu-se identificar qual seria a concentração capaz de produzir um efeito, e que ao mesmo tempo preservasse ao máximo a viabilidade celular. Desta

forma verificou-se a viabilidade celular mediante a diferentes concentrações do secretoma.

A análise das imagens coletadas em microscopia de fluorescência mostraram simultaneamente as células vivas em verde e as células mortas com o núcleo corado em vermelho (Figura 18A). Os grupos foram controle não tratado (Figura 18B), controle de morte usando Peróxido de hidrogênio 2 mM (Figura 18A) e fibroblastos CCD19-Lu expostos as concentrações de 200 (Figura 18C), 100 (Figura 18D), 50 (Figura 18E), 25 (não mostrado) e 12,5 (não mostrado) μg de proteínas/mL do secretoma de células tumorais MACL-1.

Os resultados mostraram que praticamente 100% dos fibroblastos CCD19-Lu não tratados com secretoma e células tratadas com até 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do secretoma por 24 horas permanecem vivas (Figura 18B e 18E). No controle de morte celular (Peróxido de Hidrogênio a 2 mM) 100% das células estavam mortas (Figura 18A e F).



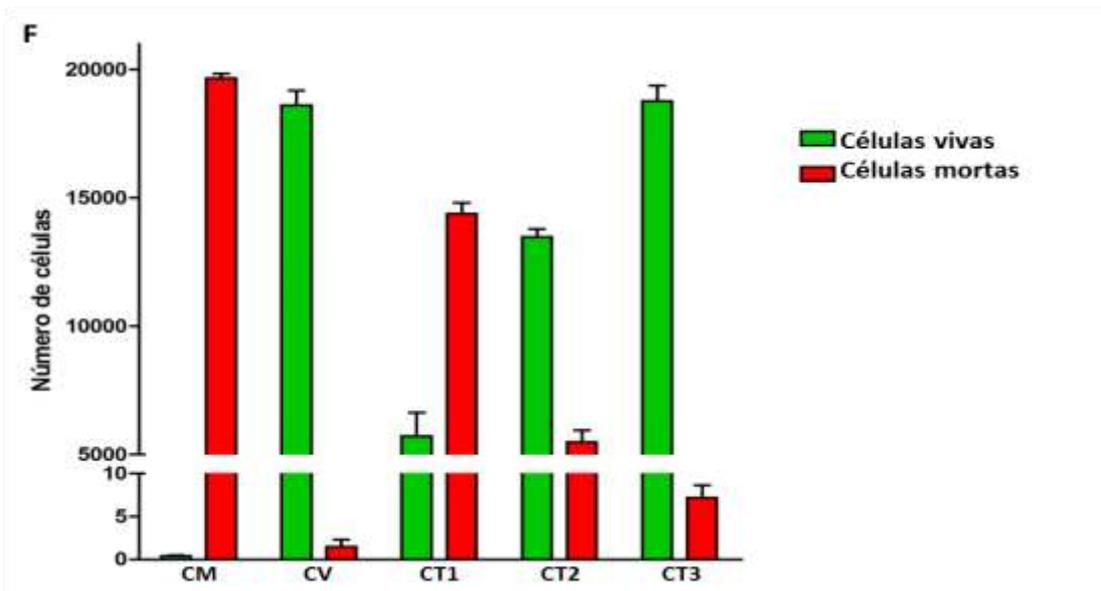


Figura 19 - Ensaio de Citotoxicidade e Viabilidade de fibroblastos CCD19-Lu expostos a diferentes concentrações de secretoma de células tumorais MACL-1. Microscopia de fluorescência dos fibroblastos CCD19-Lu viáveis (verde) e mortos (vermelho) corados com Kit de citotoxicidade e viabilidade LIVE/DEAD® tratados com diferentes concentrações do secretoma das células MACL-1 por 24 horas. (A) Controle de morte com células expostas ao Peróxido de Hidrogênio 2mM; (B) Controle de células viáveis sem nenhum tratamento; (C) Células tratadas com secretoma a 200µg/mL; (D) Células tratadas com secretoma a 100µg/mL; e (E) Células tratadas com secretoma a 50µg/mL. Barra: 20µm; (F) Gráfico de citotoxicidade de fibroblastos com a relação entre células vivas (verde) e mortas (vermelho) mediante ao tratamento com secretoma das células tumorais MACL-1 por 24 horas a 200µg/mL (CT1), 100µg/mL (CT2), 50µg/mL (CT3), sem tratamento (CV) e expostas ao peróxido de hidrogênio (CM). Os resultados são representados com média \pm desvio padrão. Para todos os grupos $P < 0,001$.

5.9 Aumento da produção de superóxido mitocondrial em fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma de células tumorais MACL-1.

A formação de superóxido mitocondrial (ROS) está diretamente relacionada a diversas ocorrências como alteração da função e estrutura de proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, interferindo no metabolismo celular, nas vias de sinalização, vias que regulam a expressão gênica, proliferação celular e apoptose (Chandra et al, 2000; Poli et al, 2004; Kim et al. 2013).

Nos resultados obtidos por microscopia de fluorescência (Figura 19A. B e C) os fibroblatos CCD19-Lu carregados com a sonda MitoSOX® apresentaram baixa

fluorescência antes da adição do secretoma (Figura 19A). A adição do secretoma aos fibroblastos provocou um aumento da formação de ROS indicada pela intensidade da fluorescência (cor vermelha) (Figura 19B) que foi aumentando em função do tempo (Figura 19C).

A quantificação da produção de ROS por citometria de fluxo permitiu uma detecção simples e rápida (Figura 19E). Desta forma, observou-se a formação aguda de ROS em fibroblastos CCD19-Lu expostos a 50µg de proteínas/mL do secretoma das células tumorais MACL-1 durante 1500 segundos de exposição demonstrando um aumento significativo em relação ao tempo 0 (antes da exposição ao secretoma) (Figura 19D).

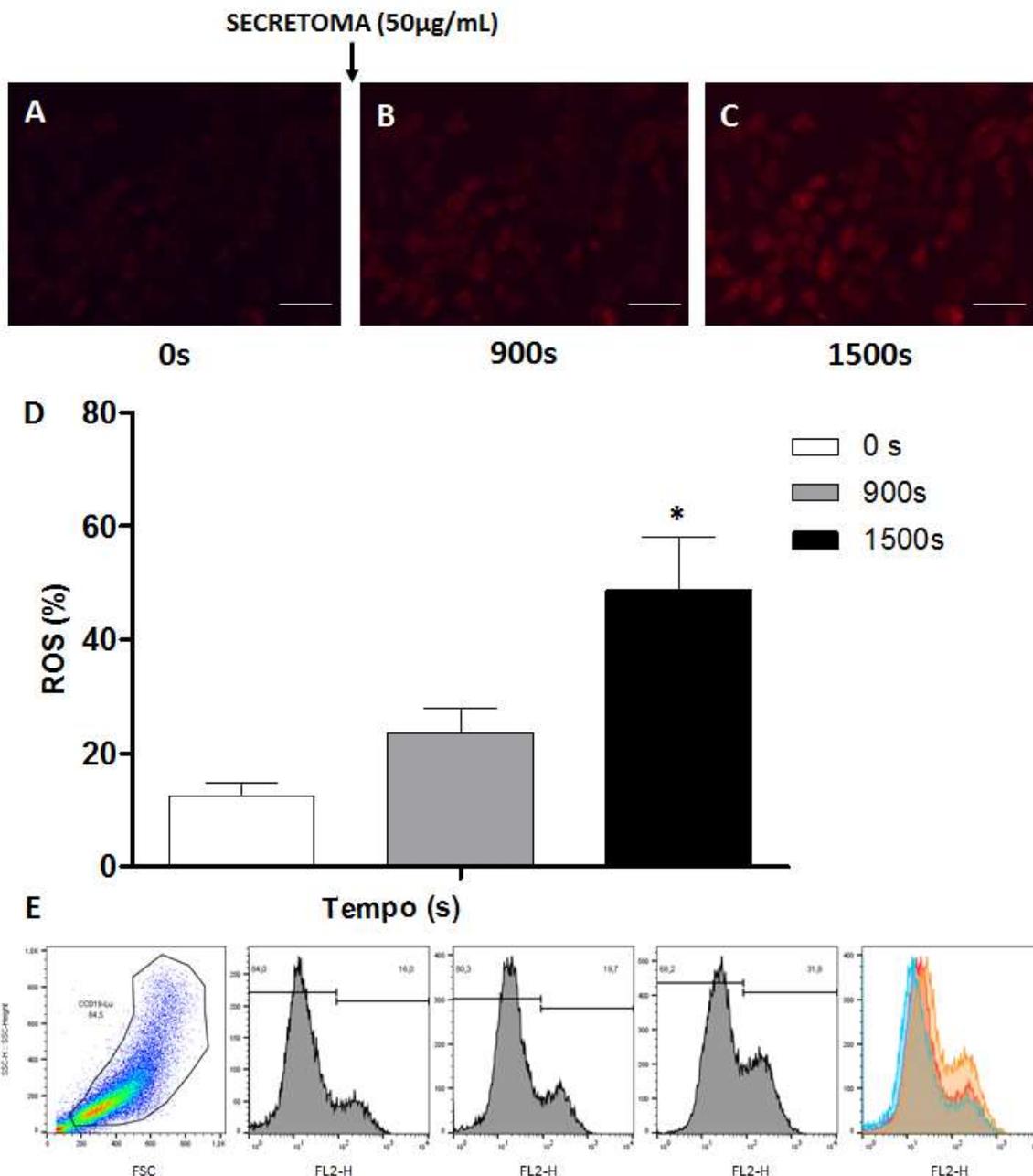


Figura 20 - Determinação da produção de superóxido mitocondrial. Caracterização da produção de superóxido mitocondrial (ROS) a partir de imagens obtidas por microscopia de fluorescência (A, B e C) dos fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células tumorais MACL-1 (50µg/mL) durante 1500 segundos (s) utilizando sonda MitoSOX®, onde a maior produção de ROS é indicada pela intensidade da cor vermelha. (B e C). Barra: 20µm. Gráfico (D) e montagem representativa de imagens de do Dot Plot tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) e histogramas obtidos por citometria de fluxo (E) demonstrando alteração da intensidade de fluorescência de ROS produzido pelos fibroblastos CCD19-Lu expostos a 50µg/mL de secretoma das células MACL-1 durante 1500 segundos (s). (*) significância $p < 0,05$.

5.10 Identificação das proteínas intracelulares e no secretoma das células tumorais MACL-1

Após análise proteômica por *shotgun*, foram identificados 14.141 peptídeos (7.144 intracelulares e 6.997 do secretoma) e 2.200 proteínas (1.185 intracelulares e 1.015 do secretoma) através do software PEAKS DB (Zhang et al. 2012). Os peptídeos identificados LC-MS apresentaram homogeneidade de forma e abundância, variando minimamente em seus tempos de retenção. Os resultados foram filtrados em bancos de dados através da especificação da taxa de “falsa descoberta” (FDR) a partir de peptídeos de correspondência (Figura 21). Os resultados foram validados utilizando o maior ponto de cobertura dos peptídeos identificados na sequência de aminoácidos adquirida.

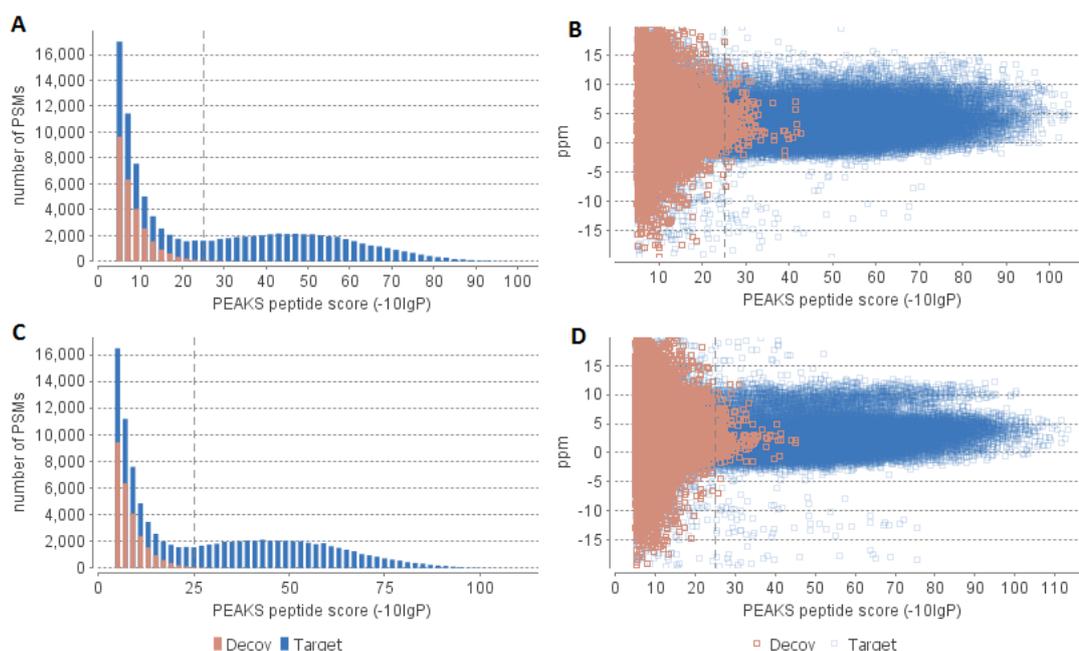


Figura 21 - Combinação de espectros de peptídeos. Gráficos da distribuição dos espectro de peptídeos (PSM) fornecido pelo software PEAKS DB das amostras de lisado (A e B) e secretoma (C e D) das células tumorais MACL-1. O gráfico de PSM (A e C) e o diagrama de dispersão de peptídeos (B e D) foram gerados automaticamente pelo software PEAKS DB a partir de uma pesquisa em bancos de dados filtrando os resultados a partir de peptídeos de correspondência.

Do total de proteínas identificadas no secretoma das células tumorais MACL-1, 645 são comuns às proteínas encontradas na amostra do conteúdo intracelular dessas mesmas células. Essas proteínas foram categorizadas funcionalmente (Figura 22A), processos biológicos (Figura 22B), componentes celulares (Figura 22C) e classes de proteínas (Figura 22D) a partir das anotações de três bancos de dados: GENE Ontology (<http://www.geneontology.org/>); PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) e Uniprot (www.uniprot.com).

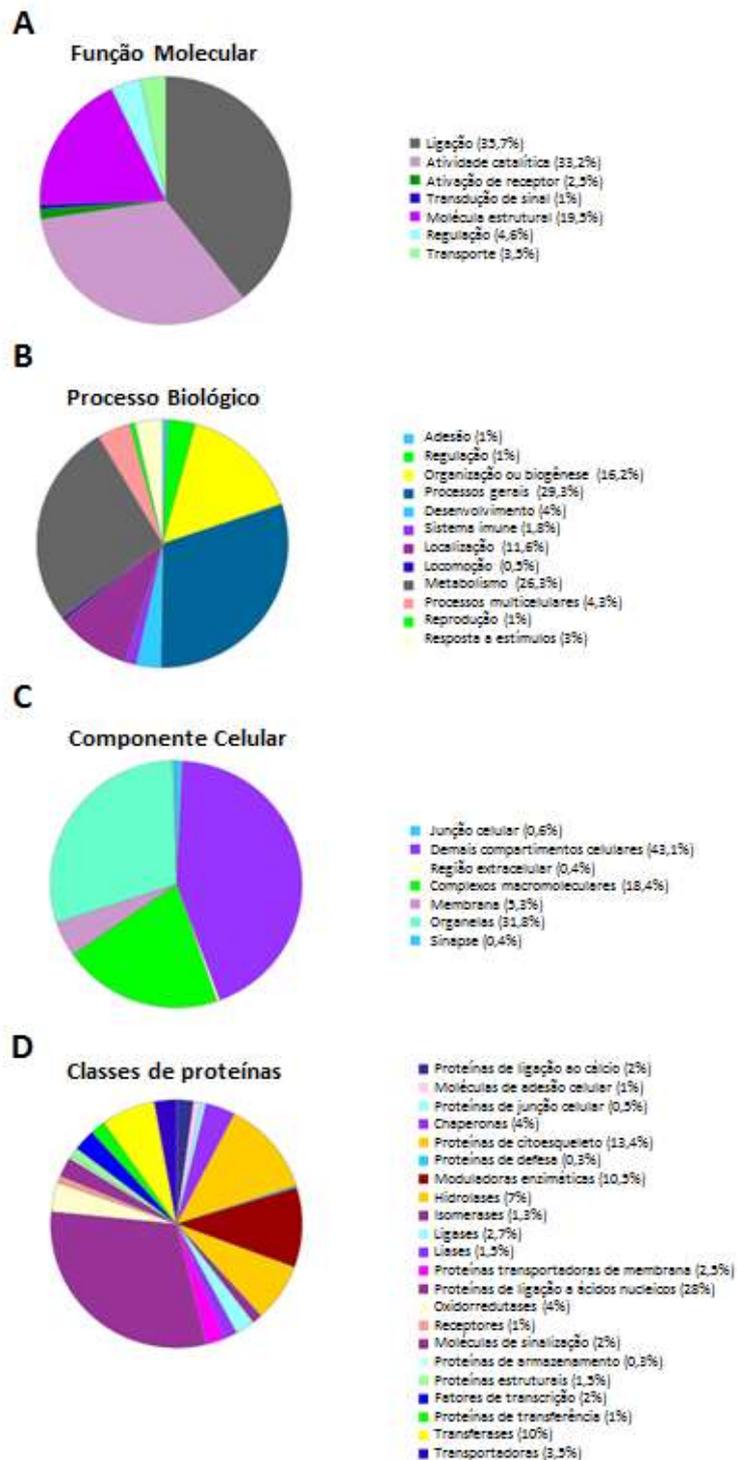


Figura 22 - Categorização das proteínas. Os gráficos de pizza mostram a categorização (*clusters*) das 645 proteínas identificadas tanto no secretoma quanto no lisado das células tumorais MACL-1. Os clusters representam o número de proteínas identificadas (%) agrupadas de acordo com função molecular (A), processos biológicos (B), componente celular (C) e classes de proteínas (D).

5.11 Interação entre as proteínas no secretoma das células tumorais MACL-1

As proteínas identificadas foram carregadas na base de dados do STRING (<http://string-db.org/>) afim de obter as possíveis interações existentes proteína-proteína. Os 645 códigos identificadores obtidos a partir da análise proteômica forneceram interações entre 333 proteínas com intervalo de confiança de 0.9. As proteínas que não tiveram interação foram excluídas chegando a um total de 129 proteínas. Foram selecionadas 3 proteínas (Tabela 3) (1 com grande número de interações e 2 correlacionadas a esta única proteína) relacionadas com regulação, sinalização, diferenciação e crescimento (Figura 23).

Tabela 3 – Principais proteínas de interesse relacionadas com regulação, sinalização, diferenciação e crescimento identificadas por LC-MS no secretoma e no lisado das células MACL-1 apresentando homologia taxonômica com Homo sapiens.

MACL-1	Proteína ID	nº de acesso Uniprot	Sequência de eptídeos	Descrição	Score (%)	Cobertura (%)
Proteína fosfatase 2 subunidade A alfa – PPP2R1A						
Secretoma	50	A8K7B7	K.SEIIPMFSNLSDEQDSVR.L; R.LNIISNLDC(+57.02)VNEVIGIR.Q; R.AISHEHSPSDLEAHFVPLVK.R; K.SALASVIMGLSPILGK.D; K.DNTIEHLLPLFLAQLKDEC(+57.02)PEVR.L; R.MAGDPVANVR.F; K.VLAMSGDPNYLHR.M; K.LTQDQDQVDVK.Y; R.NLC(+57.02)SDDTPMVR.R; R.QLSQSLLPAIVELAEDA.W; K.ELVSDANQHV.K.S; K.LSTIALALGVER.T; R.YMVADKFTTELQK.A; R.TSAC(+57.02)GLFSVC(+57.02)YPR.V; R.QLSQSLLPAIVELAEDA.KWR.V; K.TDLVPAFQNL.MK.D; K.IGPILDNSTLQSEVKPILEK.L; R.LAGGDWFTSR.T; K.VKEFC(+57.02)ENLSADC(+57.02)R.E; K.VLELDNVK.S; K.DNTIEHLLPLFLAQLK.D; K.AVGPEITK.T; K.HMLPTVLR.M; R.NEDVQLR.L	Protein phosphatase 2 (Formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), alpha isoform	99.2	50
Intracelular	50	A8K7B7	K.SEIIPMFSNLSDEQDSVR.L; R.LNIISNLDC(+57.02)VNEVIGIR.Q; R.YMVADKFTTELQK.A; K.SALASVIMGLSPILGK.D; K.DNTIEHLLPLFLAQLKDEC(+57.02)PEVR.L; R.QLSQSLLPAIVELAEDA.W; R.LAGGDWFTSR.T; K.ELVSDANQHV.K.S; R.NLC(+57.02)SDDTPMVR.R; R.AISHEHSPSDLEAHFVPLVK.R; R.MAGDPVANVR.F; K.LTQDQDQVDVK.Y; K.IGPILDNSTLQSEVKPILEK.L; K.VLAMSGDPNYLHR.M; K.TDLVPAFQNL.MK.D; K.YFAQEALTVLSLA; R.QLSQSLLPAIVELAEDA.KWR.V; K.VLELDNVK.S	Protein phosphatase 2 (Formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), alpha isoform	99.2	45
Proteína quinase AMPc-dependente alfa – PRKACA						
Secretoma	1110	P17612	K.NLDQEQLSQVLDAMFER.I; R.GTYDILVTK.D; K.DGGNQEVEIAR.C; R.AASAYAVGDVK.C; K.MFESFIESVPLLK.S; K.GQYFGELALVTNKPR.A; R.NISHYEEQLVK.M; R.KMFESFIESVPLLK.S; R.LLGPC(+57.02)MDIMK.R	cAMP-dependent protein kinase subunit alpha	99.2	35
Intracelular	1110	P17612	K.NLDQEQLSQVLDAMFER.I; K.GQYFGELALVTNKPR.A	cAMP-dependent protein kinase subunit alpha	97.5	57
Fofatase PP1 alfa – PPP1CA						
Secretoma	211	P62136	K.TFTDC(+57.02)FNC(+57.02)LPAAIVDEK.I; R.AHQVVEDGYEFFAK.R; R.EIFLSQPILLELEAPLK.I; K.IFC(+57.02)C(+57.02)HGGLSPDLQSMEQIR.R; K.IKYPENFFLLR.G; K.SREIFLSQPILLELEAPLK.I; K.IC(+57.02)GDIHGQYYDLLR.L; K.HDLDLIC(+57.02)R.A; K.FLHKHDLDLIC(+57.02)R.A; R.GKQSLETIC(+57.02)LLLAYK.I; R.IYGFYDEC(+57.02)K.R; K.YPENFFLLR.G; R.LLEVR.G	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha	99.2	42
Intracelular	211	P62136	K.TFTDC(+57.02)FNC(+57.02)LPAAIVDEK.I; R.AHQVVEDGYEFFAK.R; R.EIFLSQPILLELEAPLK.I; K.IFC(+57.02)C(+57.02)HGGLSPDLQSMEQIR.R; K.NVQLQENEIR.G; K.IKYPENFFLLR.G; K.SREIFLSQPILLELEAPLK.I; K.HDLDLIC(+57.02)R.A; K.IC(+57.02)GDIHGQYYDLLR.L; K.FLHKHDLDLIC(+57.02)R.A; R.IYGFYDEC(+57.02)K.R; K.IFC(+57.02)C(+57.02)HGGLSPDLQSMEQIRR.I; R.GKQSLETIC(+57.02)LLLAYK.I; K.KKPNATRPVTPPR.G; R.LLEVR.G	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha	99.2	50

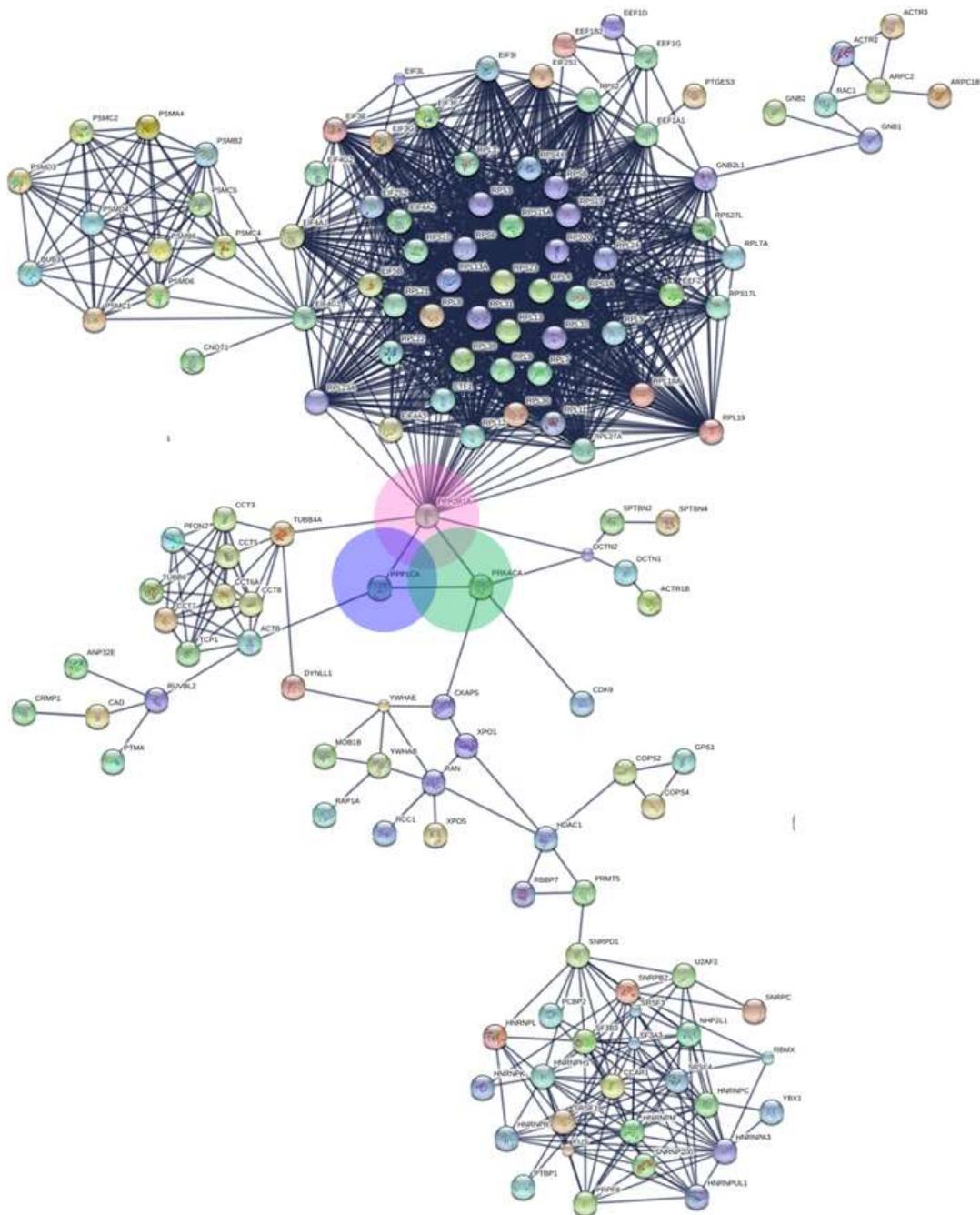


Figura 23 - Rede de interações entre as proteínas identificadas e agrupadas de acordo com a função molecular. O diagrama demonstra as interações entre as 129 proteínas presentes no secretoma das células tumorais MACL-1 identificadas por shotgun e selecionadas de acordo com os critérios descritos anteriormente. As redes de interações foram geradas utilizando configurações padrão do programa de análise String (<http://www.string-db.org>) onde as proteínas foram agrupadas de acordo com as funções moleculares de interação, atividade catalítica, ativação de receptores, transdução de sinais, moléculas estruturais, regulação, sinalização e transporte. As três proteínas (PPP2R1A, PPP1CA e PRKACA) demarcadas representam Fosfatase 2A (subunidade alfa), Fosfatase PP1-alfa e Proteína quinase AMPc-dependente alfa respectivamente (<http://www.uniprot.org>).

6 DISCUSSÃO

De fato, as interações entre as células cancerosas e outras linhagens celulares que estão presentes no microambiente tumoral podem contribuir significativamente para a conhecida progressão "eferente", nas quais as células tumorais estimulam uma resposta reativa de outras células no estroma, e "aferente", nas quais células estromais ativadas podem influenciar a malignidade de outras células tumorais e não tumorais (Hanahan et al. 2011; Swartz et al. 2012). No câncer de mama, o microambiente tumoral tem uma importância relevante no início e progressão do carcinoma (Fleming et al. 2010). Como já referido anteriormente, o estroma é composto por componentes não-celulares, bem como diversos tipos de células incluindo células endoteliais, células imunes e os próprios fibroblastos (Weaver et al. 2012).

Funcionalmente, os fibroblastos sintetizam a matriz extracelular (ECM), contribuem para processos inflamatórios e também desempenham papéis cruciais na cicatrização de feridas. Considerando que os tumores são como feridas que nunca cicatrizam, Sappino e colaboradores (1988) afirmam que proximadamente 80% dos fibroblastos estromais de câncer de mama adquirem um fenótipo agressivo. Em particular, a ativação destes fibroblastos pró-carcinogênicos não é reversível, semelhantes aos miofibroblastos relacionados à ferida (Kalluri et al. 2016). Além disso, várias linhas de evidência revelaram que fibroblastos ativos contribuem para uma "reprogramação no microambiente tumoral" (Orimo et al. 2005; Pavlides et al. 2012) e na tentativa de verificar essa relação entre células cancerosas e fibroblastos normais este trabalho optou por utilizar procedimentos que mimetizassem o microambiente tumoral *in vitro*.

O presente estudo demonstrou que não houve alteração no número de fibroblastos expostos ao secretoma das células tumorais e não-tumorais de mama MDA-MB-231 e MCF-10A, demonstrando que estas células, aparentemente, não influenciam de forma significativa na proliferação destes fibroblastos. Segundo Smart e colaboradores (2013) em co-culturas algumas células, por apresentarem um metabolismo mais "acelerado", podem consumir mais nutrientes reduzindo a biodisponibilidade destes, o que interfere no metabolismo de outras linhagens celulares. No entanto a baixa disponibilidade de nutrientes, possivelmente, iria influenciar na morfologia celular, fenômeno que não foi observado nos resultados

apresentados. Todavia esse fato não isenta estas células de mama de terem produzido algum outro tipo de alteração nos fibroblastos CCD19-Lu.

Por outro lado, os fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células tumorais de mama MACL-1 apresentaram um aumento no número de células (Figuras 9F e 10) em relação ao controle (Figuras 9B e 10) sugerindo que as células tumorais possam estar envolvidas nesse processo de proliferação. Corroborando com estes dados Tan e colaboradores (2015) observaram o aumento na proliferação de células em co-cultura com linhagens tumorais MCF-7 a partir da liberação de fatores de crescimento por células.

Além da proliferação, este estudo procurou identificar as alterações nos fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células tumorais MACL-1 identificando características morfológicas bem como a expressão de marcadores específicos para os CAFs. Embora não exista uma definição molecular precisa para os CAFs, alguns autores preferem definir esta célula operacionalmente. Assim, os CAFs podem representar o principal componente celular do estroma tumoral no qual a principal fonte de componentes teciduais da ECM e várias classes de moléculas (citocinas, enzimas e outras moléculas) (Kalluri & Zeisberg, 2006; Pietras & Ostman, 2010).

Os fibroblastos normais exibem uma morfologia fina, ondulada e fibras intracitoplasmáticas pouco evidentes (Figura 11E), já os CAFs são frequentemente descritos como fibroblastos “imaturos” e aparecem como grandes células, em forma fusiforme com fibras intracitoplasmáticas bem evidentes e nucléolos proeminentes (Ha et al. 2014). Tais características morfológicas foram observadas neste estudo em fibroblastos expostos ao secretoma das células tumorais MACL-1 (Figura 11F) sugerindo que possivelmente essas células poderiam ter tido seu fenótipo alterado.

A referência mais utilizada para a aquisição de um fenótipo dos CAFs é o marcador de miócito α -actina do músculo liso (α -SMA) (Ronnov-Jessen et al. 1995) novos marcadores de CAFs surgiram contribuindo assim para aumentar o número de subpopulações dessas células (Kalluri & Zeisberg 2006; Ozdemir et al. 2014). Junto aos diversos marcadores, já citados anteriormente, tanto a desmina quanto vimentina são moléculas que compõem a estrutura do citoesqueleto de fibroblastos. Embora essas duas proteínas estejam juntas integrando os filamentos intermediários do citoesqueleto dos fibroblastos, neste estudo a desmina não alterou seu nível de expressão (Figuras 12D e 13), se comparada com o controle (Figuras 12C e 13).

Tal achado pode ser explicado pelo fato desta molécula estar presente em estágios de modificação celular tardio (Fuchs & Weber, 1994) logo, sua alteração não seria tão evidente, talvez pelo tempo insuficiente de exposição do fibroblasto ao secretoma. Antagônico a esse resultado a vimentina pode ser utilizada para identificar células mesenquimais ou que sofreram uma transformação mesenquimal (Russell et al. 2001). Desta forma, o aumento da expressão de vimentina nos fibroblastos expostos ao secretoma das células tumorais de mama MACL-1 (Figura 12B e 13) pode ser mais um forte indicativo de uma modificação fenotípica corroborando com outros estudos que encontraram o mesmo resultado em outras linhagens celulares (Kalluri & Zeisberg, 2006; Rasanen & Vaheri, 2010; Augsten, 2014).

Apesar desses resultados apontarem para uma alteração do fenótipo normal dos fibroblastos, uma outra molécula também poderia fornecer uma melhor caracterização da transformação maligna dos fibroblastos, como é o caso da proteína de ativação de fibroblastos (FAP) (Giannoni et al. 2010; Rasanen & Vaheri, 2010; Augsten, 2014). Desta forma, afim de evidenciar a mudança fenotípica dos fibroblastos verificou-se a expressão desta molécula constitutiva de CAFs que demonstrou-se aumentada em fibroblastos CCD19-Lu expostos ao secretoma das células tumorais MACL-1 (Figura 14C e D).

Logo outras moléculas também poderiam ser verificadas neste estudo, no entanto, o uso da proteína de ativação de fibroblastos (FAP) está atrelado ao fato desta proteína juntamente com outros marcadores, como a osteonectina, podoplanina, metaloproteinasas (MMPs), e o fator de transcrição *Forkhead 1* (FOXF1), serem propostos para predizerem sobrevida dos pacientes com câncer (Augsten, 2014; Ohlund et al. 2014; Ha et al. 2014). Todavia, a presença única da maioria destas proteínas não caracteriza os CAFs, uma vez que não são CAF-específicas (Augsten 2014, Ohlund et al., 2014) necessitando assim de um maior número de moléculas para uma identificação mais precisa dessas células.

Os fatores de crescimento são uma grande família de mitógenos para células tumorais e alguns membros, como o fator de crescimento do hepatócito (HGF), o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator básico de crescimento de fibroblastos (BFGF), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), foram relatados como sendo produzidos por CAFs (Tyan et al. 2011). Embora, as células cancerosas induzam a

produção de fatores de crescimento em CAFs (Tyan et al. 2011) neste estudo não houve expressão de TGF- β talvez pelo fato das células secretarem esse fator de crescimento em níveis muito baixos ao ponto de não serem detectáveis. Desta forma tal detecção pode ter sido inviável devido a metodologia empregada.

Por outro lado através da mesma metodologia empregada para verificar a expressão de TGF- β conseguiu-se identificar o aumento de IL-6 no sobrenadante de cultura de fibroblastos expostos ao secretoma das células tumorais de mama MACL-1 (Figura 16). Este resultado é um forte indicativo de que estas células passaram a secretar essa citocina em resposta a uma alteração fenotípica, o que corrobora com alguns estudos (Pikarsky et al., 2004; Karin & Greten 2005). Além dos fatores de crescimento, as citocinas são também um importante grupo de moléculas que podem ser produzidas por CAFs e vão atuar como indutores de proliferação como é o caso da interleucina-6 (IL-6), principalmente através da inativação do oncogene c-Myc, o que conseqüentemente levaria a uma inibição da apoptose (Valencia et al., 2014).

O aumento na expressão de algumas citocinas muitas vezes está diretamente correlacionada ao aumento da expressão em alguns fatores de transcrição nuclear, uma vez que estes são ativados em respostas a inúmeros processos que envolvem ativação e regulação. Como mencionado anteriormente, os CAFs também desencadeiam a ativação da sinalização de NF κ B, que é reconhecido como um promotor endógeno da inflamação (Liao et al. 2009). Seguida do aumento da expressão de IL-6 observou-se o aumento do fator de transcrição nuclear NF κ B em fibroblastos expostos ao secretoma das células tumorais MACL-1 (Figura 15). A ativação desse fator pode ser um indicativo de funções supressoras, promotoras do tumor (Erez et al. 2010) e inflamatória, que desempenha um papel representativo na iniciação e progressão de muitos tipos de câncer (Calotta et al. 2009).

A presença de citocinas no microambiente tumoral são capazes de recrutar células como macrófagos e neutrófilos para criar um processo inflamatório que pode promover a proliferação e sobrevivência de células malignas, angiogênese, imunoevasão e metástases tumorais (Galdiero et al. 2012). Nesse sentido, os CAFs contribuem de forma crucial, secretando citocinas e quimiocinas que vão recrutar células imunes no microambiente tumoral contribuindo para a manutenção da inflamação crônica e da imunossupressão (Galdiero et al. 2012). Assim, pode-se inferir que uma alteração fenotípica de fibroblastos normais fazendo com que estes

aumentem de forma significativa a expressão de IL-6 e NFκB (Figuras 15 e 16) contribui para um estado pró-inflamatório que fornece um suporte à progressão maligna, estabelecendo um círculo vicioso entre as células tumorais, CAFs e inflamação.

Algumas substâncias produzidas durante a atividade do sistema imune como, os fatores de crescimento, quimiocinas, interferons e interleucinas (IL) também podem levar a produção de espécies reativas de oxigênio (Vera- Ramirez et al., 2011). Essas alterações promovidas por IL-6, citadas anteriormente, também podem levar ao aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenhando um papel imunossupressor. Tal aumento também foi observado neste estudo nos fibroblastos expostos ao secretoma das células tumorais MACL-1 (Figura 19) corroborando com os dados encontrados por Karin e Greten (2005). Levando em consideração o metabolismo celular no microambiente tumoral onde os CAFs realizam glicólise aeróbica e secretam metabolitos ricos em energia (como lactato e piruvato) para alimentar diretamente as células do câncer e a respiração mitocondrial de outras células tumorais adjacentes (Karin & Greten, 2005).

Em relação a esse processo metabólico, a hipoxia intratumoral parece ser o gatilho para as possíveis alterações no microambiente tumoral, uma vez que pode produzir espécies reativas de oxigênio (ROS), predominantemente como peróxido de hidrogênio, e se espalhar para fibroblastos adjacentes e induzir um estresse oxidativo diminuindo a expressão de Caveolina 1 (CAV1), resultando na sub-regulação de HIF- α , na ativação de NFκB e na aquisição do fenótipo de fibroblastos estromais em CAFs (Martinez-Outschoorn et al. 2010). Logo o aumento de ROS observado neste estudo produzido pelo secretoma das células tumorais MACL-1 (Figura 19) poderia levar diferenciação de fibroblastos corroborando com os achados observados por Martinez-Outschoorn e colaboradores (2010).

Sabe-se que o aumento na produção de radicais livres altera a estrutura de diversas moléculas incluindo proteínas, lípideos e ácidos nucleicos, além de diversas funções celulares incluindo metabolismo celular, vias de sinalização, vias que regulam a expressão gênica, proliferação celular e apoptose (Chandra et al, 2000; Poli et al, 2004; Kim et al. 2013). Desta forma, o estresse oxidativo está envolvido em diversos danos às células possibilitando o surgimento de muitos tipos de doenças degenerativas e inflamatórias (Gonenc et al., 2005; Aldini et al. 2010; Kruk & Duchnik, 2014).

Giannoni e colaboradores (2012) demonstraram que as ROS produzidas por células tumorais parecem induzir ainda mais a EMT, a resistência e a transformação de outras células tumorais e não-tumorais via sinalização por COX-2/NFκB/HIF-1. O fator nuclear NF-κB, como já referido, está envolvido em diversos mecanismos que tem sua atividade aumentada em resposta ao estresse oxidativo e ao peróxido produzido mediante a reoxigenação desempenhando um papel importante na mudança do perfil celular e até mesmo na progressão do câncer (Storz, 2005; Kimbro & Simons, 2006). Tal informação corrobora com os resultados encontrados neste estudo tanto pelo aumento da produção de superóxido (Figura 19) quanto pela expressão de NFκB em fibroblastos expostos ao secretoma das células tumorais de mama MACL-1 (Figura 15), reforçando a possível mudança fenotípica desses fibroblastos.

Baseado em outros estudos, uma outra questão interessante que pode ser observada com relação ao aumento da superprodução de ROS por fibroblastos expostos ao secretoma de células tumorais de mama MACL-1, é a disfunção mitocondrial que pode induzir uma instabilidade genômica. Logo, esta disfunção poderia ser um dos mecanismos que pudesse explicar a alteração no fenótipo desses fibroblastos expostos ao secretoma das células tumorais. No entanto, segundo Martinez-Outschoorn e colaboradores (2010) este ciclo parece ser transitório, uma vez que algumas células demonstraram uma alteração no metabolismo de ROS se tornando receptoras ao invés de dadoras destas espécies reativas, sofrendo assim um acoplamento metabólico, em outras palavras, as ROS produzidas em uma célula pode influenciar em outra célula.

Além desses mecanismos citados anteriormente, o aumento das ROS podem levar a liberação de MMPs (Barrera, 2012; Chiarugi & Fiaschi, 2012; Sosa et al. 2013). O estresse oxidativo nas células tumorais de mama podem estimular algumas enzimas, na sua maioria proteases, fornecendo um nicho adequado para a migração celular e metástase. As MMPs tem sido associadas com EMT na progressão do câncer por meio de três mecanismos distintos: (a) níveis elevados das MMPs no microambiente tumoral pode induzir diretamente células epiteliais; (b) células tumorais que se submetem a EMT podem produzir mais MMPs, facilitando a invasão celular e metástases; e (c) células ativadas podem gerar EMT levando a produção de fator estromal (*stromal-like*), que impulsionam a progressão do câncer via

atividade de metaloproteases a partir da degradação direta dos componentes do tecido conjuntivo do estroma e da membrana basal. Outra atividade desse grupo de proteases é por meio da clivagem de fatores de crescimento ligados à membrana ou de fatores pró-apoptóticos que induzem um fenótipo mais agressivo por causa da geração de resistência apoptótica, e de fatores que regulam a angiogênese do tumor. (Sternlicht et al. 2000).

Algumas Metaloproteases (MMPs), principalmente MMP-1 e MMP-2, são secretadas por efeito do estresse oxidativo e estão envolvidas na angiogênese, devido ao aumento da estimulação de crescimento nos vasos sanguíneos que irrigam o tumor (Velinov et al. 2010; Bauvois, 2012; Lin et al. 2015), e na metástase de células de câncer de mama (Ren et al. 2015). Além disso, sabe-se que os CAFs produzem um amplo espectro de MMPs (MMP-1, -2, -3, -9, -11, -13, -14, -19) e plasminogênios ativadores para degradar diretamente a ECM.

Neste estudo observou-se a atividade de proteases a partir do lisado de fibroblastos expostos ao secretoma das células tumorais de mama MACL-1, a mesma amostra foi somada a 10 mM de EDTA e teve sua atividade diminuída (Figura 17). Embora não tenha sido feita nenhuma marcação específica para identificar MMPs tal metodologia teve o propósito de demonstrar que as proteases envolvidas na degradação do substrato incorporado ao gel poderiam ser MMPs uma vez que estas enzimas tem sua atividade inibida por EDTA (Brown & Giavazzi 1995).

Em doenças como o câncer a atividade de MMPs pode estar relacionada a diversos fatores, dentre eles o estresse oxidativo, que pode estimular de forma consistente a forma como estas enzimas vão interagir dentro do microambiente tumoral (Gencer et al. 2013; Lee et al. 2013). Tal informação corrobora com os resultados deste trabalho onde pode-se correlacionar aumento da produção de superóxido (Figura 19) a presença de MMPs em fibroblastos expostos ao secretoma da células tumorais de mama (Figura 17).

Demonstrar a presença dessas proteases neste estudo é importante, pois a invasão e o extravasamento promovidos pelas MMPs secretadas pelos CAFs são dois processos importantes entre os múltiplos passos metastáticos, uma vez que existe uma barreira endotelial a qual as células tumorais tem que atravessar e estas não conseguiriam sozinhas. E na tentativa de explicar melhor esse mecanismo, ainda mal compreendido, Choi e colaboradores (2014) demonstraram que os CAFs

promovem a transmigração celular de células tumorais através de células endoteliais em modelos tridimensionais *in vitro*.

Assim, reforçando a ideia de Choi e colaboradores (2014), acredita-se que os CAFs através do aumento da expressão de MMPs possam ser cúmplices de células tumorais nesses passos metastáticos e também contribuem para a sobrevivência e proliferação celular no local secundário durante o estágio de crescimento no foco metastático (Kang et al. 2014) fortalecendo a ideia da hipótese "semente e solo" (Peinado et al. 2011). No entanto, extrapolar nesta hipótese sobre o papel definido dos CAFs na formação de tumores ainda precisa de maiores estudos.

Embora se tenha muito a descobrir com relação ao câncer observa-se que maioria dos trabalhos ainda se concentram no que ocorre dentro das células tumorais. No entanto esta perspectiva tem mudado bastante fazendo com que diversos estudos repensem sobre a possibilidade do desenvolvimento do câncer ser co-mediado pelo microambiente tumoral em vez de ser um processo autônomo das células tumorais (Marx et al. 2008). Para atender a esta lacuna, o presente estudo baseado em outros trabalhos (O'Neil et al. 2017; Szász et al. 2016) usufruiu de técnicas proteômicas para buscar uma melhor compreensão dos mecanismos envolvendo as alterações fenotípicas nos fibroblastos expostos ao secretoma das células tumorais MACL-1.

Dentre as proteínas que interagem com diferentes grupos funcionais destacaram-se a proteína fosfatase 2A (PPP2A), a proteína quinase AMPc-dependente (PKA) e a proteína fosfatase 1-alfa (PP1-alfa) identificadas na Tabela 3. Destas a PP2A é a que interage com maior número de outras proteínas (Figura 22), principalmente as que estão envolvidas com síntese proteica, tais interações provavelmente estão relacionadas com a subunidade PR65 desta proteína, que serve como uma molécula *Scaffold* para coordenar funções catalíticas e reguladoras (Tang et al. 2006). Dessa interação entre PP2A e esse grupo funcional merece destaque o fator de iniciação da tradução eucariótica 4 (EIF4G1), que está envolvido no reconhecimento do cap de RNAm, desdobramento de estrutura secundária e recrutamento de RNAm para o ribossomo (Castello et al. 2012). Esse fator também está ligado a um grupo diversas proteínas envolvidas com diferenciação celular (Kanayama et al. 1996). A mudança observada no fenótipo do fibroblastos expostos ao secretoma das células MACL-1 poderia ter correlação direta com essas interações corroborando com Siddiqui & Sonenberg (2015).

A PP2A também interage com tubulina β 4 (TUBB4A) e a dinactina (DCTN2) como observou-se na análise deste estudo (Figura 22), a primeira proteína é a principal constituinte dos microtúbulos, que estão presentes na estrutura do citoesqueleto das células (Sulimenko et al. 2017). A dinactina está relacionada com proliferação, através da modulação da ligação da dineína citoplasmática a moléculas responsáveis pela mitose, e com a ancoragem de microtúbulos aos centrossomas (Rolland et al. 2014). Desta forma as alterações, como o aumento na expressão da vimentina e da proliferação de fibroblastos expostos ao secretoma das células tumorais MACL-1, observadas neste estudo (Figuras 9F, 10, 12B e 13) poderiam ser justificadas por estas interações da PP2A com essas proteínas.

Outra proteína encontrada no secretoma e demarcada neste estudo é a PKA, responsável pela fosforilação de um grande número de moléculas, ativando diversos mecanismos como regulação, diferenciação, inibição e proliferação (Guan et al. 2005; Pasqualucci et al. 2006; Xu et al. 2008; Wang et al. 2010; Ermish et al. 2011; Lignitto et al. 2011). Essa gama de funções está relacionada a atividade dessa proteína no receptor de rianodina (RYR) que potencializa a liberação de Ca^{2+} citosólico (Vetter et al. 2011). Uma atividade da PKA que merece destaque é a ativação do fator de transcrição nuclear NF κ B, que poderia justificar o aumento da expressão desta molécula em fibroblastos expostos ao secretoma das células MACL-1 (Figura 15). Como já descrito anteriormente esse aumento pode estar correlacionado a outros resultados encontrados neste estudo, e somado a estes Gambaryan e colaboradores (2010) demonstraram uma via de sinalização relacionada a transição embrionária e morfogênese reforçando assim a ideia de proliferação e alteração fenotípica observada no presente estudo.

A PKA interage com outras três proteínas a proteína 5 associada ao citoesqueleto (CKAP5), dinactina e quinase dependente de ciclina (CDK9) (Figura 22). A CKAP5 liga-se à extremidade dos microtúbulos protegendo estes da despolimerização durante a organização dos pólos do fuso na divisão celular contribuindo para a integridade do centrossomo (Both et al. 2011). A dinactina, que também interage com a PP2A, está relacionado a proliferação celular, como descrito anteriormente (Rolland et al. 2014). A CDK9 está envolvida na regulação de transcrição (Wada et al. 1998). Esta proteína forma complexos que regulam as redes de transcrição indutíveis por citocinas facilitando o reconhecimento do promotor de fatores de transcrição alvo (por exemplo a sinalização de STAT3 induzindo IL-6)

(Hou et al. 2007) promovendo a síntese de RNA, processamento e exportação de RNAm (Pirngruber et al. 2009), e recuperação do ciclo celular a partir da preservação do DNA (Liu et al. 2010). Neste contexto, a presença de CDK9 no secretoma das células MACL-1 correlaciona-se com o aumento na expressão de NFκB e IL-6 no sobrenadante de fibroblastos CCD19-Lu expostos a este secretoma (Figuras 15 e 16).

Diferente da PKA e PP2A, a Fosfatase PP1-alfa (PP1) obteve poucas interações (Figura 22). Esta proteína se associa a mais de 200 proteínas reguladoras para formar holoenzimas altamente específicas que desfosforilam centenas de alvos biológicos (Song et al. 1993). A PP1 é essencial para a divisão celular e participa da regulação do metabolismo do glicogênio (Schmutz et al. 2011), da contratilidade muscular (Song et al. 2015), da síntese protéica (Mi et al. 2007) e da regulação de condutâncias a íons como o Ca^{2+} (Song et al. 2015). Um dos complexos mais importantes da PP1 é o PTW/PP1, que desempenha um papel no controle da estrutura da cromatina e da progressão do ciclo celular durante a transição da mitose (Yu et al. 2015). Observou-se que a PP1 possui uma interação com a β -actina (Figura 22), uma proteína altamente conservada expressa em diversos compartimentos celulares e que está envolvida em funções moleculares como interação entre proteínas (Rual et al. 2005), constituição de citoesqueleto (Toyama, 1984) e atividade enzimática como a da óxido-nítrico sintase (Ji et al. 2007). Esta última função molecular é a que desperta um maior interesse sugerindo que o aumento das ROS/RNS, observada neste estudo (Figura 19), por fibroblastos expostos aos secretoma das células possa estar correlacionada a uma atividade entre PP1 e a β -actina.

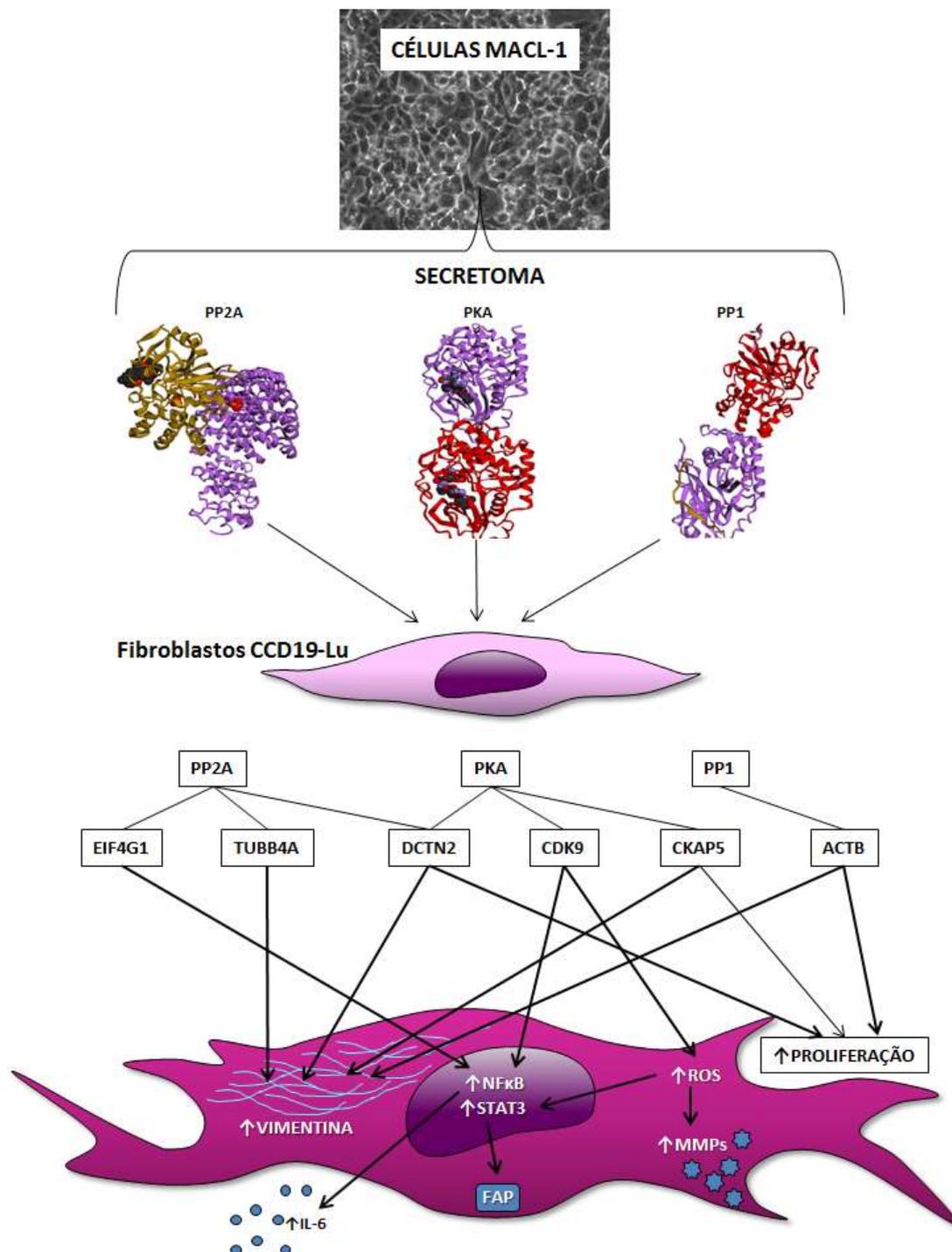


Figura 24 - Representação esquemática das principais proteínas envolvidas nos mecanismos de alterações observadas em fibroblastos expostos ao secretoma. Esquema sugerindo as principais proteínas identificadas neste estudo, suas interações e seu envolvimento nos mecanismos de alteração do fenótipo dos fibroblastos expostos ao secretoma das células MACL-1.

Embora obtenha-se um número elevado de interações e possíveis mecanismos que possam explicar as alterações fenotípicas observadas neste estudo (Figura 24) é importante ter em mente que para mencionar o real potencial transformador do

secretoma nos fibroblastos normais ainda é necessário somar a esse desafio, que os CAFs coexistem como populações heterogêneas sobrepostas, muitas das vezes definidas pela expressão de vários marcadores. Essa heterogeneidade dos CAFs é resultante das múltiplas origens já mencionadas neste estudo, embora que a maioria ainda se origine da ativação de fibroblastos residentes (Kalluri & Zeisberg et al. 2006; Radisky et al., 2007; Quante et al., 2011) e, corroborando com o presente estudo, de fatores secretados pelo tumor (Chen et al., 2015).

Além das diferenças fenotípicas os CAFs exibem diferenças funcionais dependendo do ambiente do tumor em que eles evoluem (Orimo & Weinberg, 2007). Esta observação tem ramificações importantes para a prevenção, estratificação de risco, diagnósticos e tratamento.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um dos aspectos fundamentais deste estudo foi a verificação da influência do secretoma produzido a partir das células tumorais de mama sobre os fibroblastos normais na busca de uma melhor compreensão da fisiologia do microambiente e como as células tumorais podem coordenar outras populações celulares no direcionamento pró-tumoral.

Apesar dos grandes esforços dedicados à compreensão dos mecanismos moleculares por trás da ativação pró-tumoral dos fibroblastos e seus papéis na progressão do câncer, várias questões ainda necessitam de maiores esclarecimentos. Várias abordagens metodológicas utilizadas neste estudo revelaram a complexidade de novos caminhos tais como os mecanismos de ativação de fibroblastos expostos ao secretoma celular de células tumorais de mama. Muito embora a mudança do fenótipo dos fibroblastos ainda seja intrigante, uma vez que diversos estudos tem demonstrado que depende muitas vezes de sinais bidirecionais, a comunicação entre esses fibroblastos e o secretoma das células tumorais se demonstrou uma possível via que influencia diretamente as alterações no perfil desses fibroblastos.

Por outro lado quando se propõe mecanismos que possam levar a possíveis alterações fenotípicas dos fibroblastos, um fato que requer atenção é a presença de diversas subpopulações de CAFs no estroma tumoral; estes constituem uma família de células de origens e localizações diversas que desempenham papéis distintos na tumorigênese. Um fato interessante é que vários resultados encontrados neste estudo apontam, não somente para uma possível alteração fenotípica dos fibroblastos, mas para transformações celulares que podem promover fatores anti-tumorigênicos dos CAFs. Sob esse prisma perspectivas podem ser delineadas para um futuro trabalho que deve levar em consideração abordagens destinadas a desvendar alterações em fibroblastos que possam implicar em atividades anti-tumorais.

8 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos pode-se concluir que o secretoma produzido pelas células de adenocarcinoma de mama MACL-1, diferente do secretoma produzido pelas das linhagens comerciais de mama MCF-10A e MDA-MB-231, pode induzir o aumento do número dos fibroblastos CCD19Lu, bem como promover alterações fenotípicas principalmente no que tange a expressão de proteínas como a vimentina e a proteína de ativação de fibroblastos, permitindo inferir que a alteração do fenótipo dos fibroblastos expostos ao secretoma das células MACL-1 apontam para uma possível transformação desses em CAFs. E que esta transformação pode ser proporcionada por proteínas presentes no secretoma cujo a interação destas entre si e com outras moléculas estão relacionadas às vias de sinalização que explicariam alterações como o aumento ações na proliferação, produção de espécies reativas de oxigênio, liberação de citocinas, como IL-6, expressão de fatores de transcrição nuclear e proteínas do citoesqueleto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERSOLD, R.; BURLINGAME, A.L.; BRADSHAW, R.A. Western blots versus selected reaction monitoring assays: time to turn the tables? *Mol Cell Proteomics*, v. 12, p. 2381–2. 2013.

AHN, S., CHO, J., SUNG, J., LEE, J.E., NAM, S.J., KIM, K.M., CHO, E.Y. The prognostic significance of tumor-associated stroma in invasive breast carcinoma. *Tumour Biol.* 33. p. 1573- 1580. 2012.

AIXIU, Q.; FENG, G.; XIAOJING, G.; XINMIN, Z.; LI, F. Breast cancer-associated fibroblasts: their roles in tumor initiation, progression and clinical applications. *Front Med.* Mar;10(1) p. 33-40. 2016.

ALLAVENA, P., SICA, A., SOLINAS, G., PORTA, C., MANTOVANI, A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol.* 66. p. 1-9. 2008.

ALLEMANI, C.; SANT, M.; WEIR, H.K.; RICHARDSON, L.C.; BAILI, P.; STORM, H.; SIESLING, S.; TORRELLA-RAMOS, A.; VOOGD, A.C. ; AARELEID, T.; ARDAMAZ, E.; BERRINO, F.; BIELSKA-LASOTA, M.; BOLICK, S.; CIRILLI, C.; COLONNA, M.; CONTIERO, P.; CRESS, R.; CROCETTI, E.; FULTON, J.P.; GROSCLAUDE, P.; HAKULINEN, T.; IZARZUGAZA, M.I.; MALMSTROM, P.; PEIGNAUX, K.; PRIMIC-ZAKELI, M.; RACHTAN, J.; SAFAEI, D.C.; SANCHEZ, M.J.; SCHYMURA, J.; SHEN, T.; TRAINA, A.; TRYGGVADOTTIR, L.; TUMINO, R.; VELTEN, M.; VERCELLI, M.; WOLF, H.J.; WORONOFF, A.S.; WU, X.; COLEMAN, M.P. Breast cancer survival in the US and Europe: a CONCORD high-resolution study. *Int. J. Cancer*, v. 1, p. 1170–1181. 2013.

ALLEMANI, C.; SANT, M.; WEIR, H.K.; RICHARDSON, L.C.; BAILI, P.; STORM, H.; SIESLING, S.; TORRELLA-RAMOS, A.; VOOGD, A.C. ; AARELEID, T.; ARDAMAZ, E.; BERRINO, F.; BIELSKA-LASOTA, M.; BOLICK, S.; CIRILLI, C.; COLONNA, M.; CONTIERO, P.; CRESS, R.; CROCETTI, E.; FULTON, J.P.; GROSCLAUDE, P.; HAKULINEN, T.; IZARZUGAZA, M.I.; MALMSTROM, P.; PEIGNAUX, K.; PRIMIC-ZAKELI, M.; RACHTAN, J.; SAFAEI, D.C.; SANCHEZ, M.J.; SCHYMURA, J.; SHEN,

T.; TRAINA, A.; TRYGGVADOTTIR, L.; TUMINO, R.; VELTEN, M.; VERCELLI, M.; WOLF, H.J.; WORONOFF, A.S.; WU, X.; COLEMAN, M.P. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries. *Lancet*, London, v. 85, n. 9972, p. 977-1010. 2015.

AUGSTEN, M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front Oncol.* Mar 27;4:62. 2014.

BAUVOIS, B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim Biophys Acta.* Jan;1825(1):29-36. 2012.

BOJA, E.S.; RODRIGUEZ, H. Proteogenomic convergence for understanding cancer pathways and networks. *Clin Proteomics.* 11:22. 2014.

BOOTH, D.G.; HOOD, F.E.; PRIOR, I.A.; ROYLE, S.J. A TACC3/ch-TOG/clathrin complex stabilises kinetochore fibres by inter-microtubule bridging. *EMBO J.* 30:906-919. 2011.

BRANDI, J. POZZA, E. D. DANDO, I. BIONDANI, G. ROBOTTI, E. JENKINS, R. ELLIOTT, V. PARK, K. MARENGO, E. COSTELLO, E. SCARPA, A. PALMIERI, M. CECCONI, D. Secretome protein signature of human pancreatic cancer stem-like cells. *J. Proteomics:* 136. p. 1-12. 2016.

BROWN, P. D.; GIAVAZZI, R. Matrix metalloproteinase inhibition: a review of anti-tumour activity. *Ann Oncol.* Dec;6(10):967-74. Review 1995.

CASTELLO, A.; FISCHER, B.; EICHELBAUM, K.; HOROS, R.; BECKMANN, B.M.; STREIN, C.; DAVEY, N.E.; HUMPHREYS, D.T.; PREISS, T.; STEINMETZ, L.M.; KRIJGSVELD, J.; HENTZE, M.W. Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell*, v. 149, n. 6, p. 1393-1406. 2012.

CELIS, J. E.; MOREIRA, J. M.; CABEZON, T.; GROMOV, P.; FRIIS, E.; RANK, F. ; GROMOVA, I. Identification of extracellular and intracellular signaling components of the mammary adipose tissue and its interstitial fluid in high risk breast cancer

patients: toward dissecting the molecular circuitry of epithelial-adipocyte stromal cell interactions. *Mol Cell Proteomics*, v. 4, n. 4, Apr, p. 492-522. 2005.

CELIS, J.E.; GROMOV, P.; CABEZON, T.; MOREIRA, J.M.; AMBARTSUMIAN, N.; SANDELIN, K.; RANK, F.; GROMOVA, I. Proteomic characterization of the interstitial fluid perfusing the breast tumor microenvironment: a novel resource for biomarker and therapeutic target discovery, *Mol. Cell Proteomics* 3, p. 327–344. 2004.

CHEN, E.I.; YATES, J.R. Cancer proteomics by quantitative shotgun proteomics. *Mol Oncol* 1:144–59. 2007

CHOI, W.; CZERNIAK, B.; OCHOA, A.; SU, X.; SIEFKER-RADTK, A.; DINNEY, C.; MCCONKEY, D.J. Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Nat Rev Urol*, Jul 11(7) p. 400-10. 2014.

CHOI, Y.P.; LEE, J.H.; GAO, M.Q.; KIM, B.G.; KANG, S.; KIM, S.H. CHO, N.H. Cancer-associated fibroblast promote transmigration through endothelial brain cells in threedimensional in vitro models, *Int. J. Cancer* 135: 2024–2033. 2014.

COLEMAN, M.P.; QUARESMA, M.; BERRINO, F.; LUTZ, J.M.; DE, A.R.; CAPOCACCIA, R.; BAILI, P.; RACHET, B.; GATTA, G.; HAKULINEN, T.; MICHELI, A.; MICHELI, M.; WEIR, H.K.; ELWOOD, J.M.; TSUKUMA, H.; KOIFMAN, S.; STORM, E.S.; FRANCISCI, G.A.; SANTAQUILANI, M.; VERDECCHIA, H.H. YOUNG, J.L. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD), *Lancet Oncol*, v. 9, p. 730–756. 2008.

CORREA, C. R.; BERTOLLO, C. M.; GOES, A. M. Establishment and characterization of MACL-1 and MGSO-3 cell lines derived from human primary breast cancer. *Oncol Res*, v. 17, n. 10, p. 473-482. 2009.

COX, T. R., SCHOOF, E. M., GARTLAND, A., ERLER, J. T., LINDING, R. Dataset for the proteomic inventory and quantitative analysis of the breast cancer hypoxic secretome associated with osteotropism. *Data Brief*. 23;5. p. 621-5. 2015.

DAVIS, F. M.; AZIMI, I.; FAVILLE, R. A.; PETERS, A. A.; JALINK, K.; PUTNEY, J. W.; GOODHILL, G. J.; THOMPSON, E. W.; ROBERTS-THOMSON, S. J.;

MONTEITH, G. R. Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. *Oncogene*. May 20. 2013.

DE WEVER, O.; DEMETTER, P.; MAREEL, M.; BRACKE, M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer* 123(10) p. 2229–2238. 2008

D'SOUZA T.; AGARWAL R.; MORIN, P.J. Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *J. Biol. Chem.* 280:26233-26240. 2005.

ELENBAAS, B.; WEINBERG, R.A. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp. Cell Res.* 264. p.169–184. 2001.

ELLIS, M.J.; GILLETTE, M.; CARR, S.A.; PAULOVICH, A.G.; SMITH, R.D.; RODLAND, K.K.; TOWNSEND, R.R.; KINSINGER, C.; MESRI, M.; RODRIGUEZ, H.; LIEBLER, D.C. Connecting genomic alterations to cancer biology with proteomics: the NCI clinical proteomic tumor analysis consortium. *Cancer Discov* 3:1108–12. 2013.

EREZ, N.; TRUITT M.; OLSON, P.; ARRON, S.T.; HANAHAN, D. Cancer-associated fibroblasts are activated in incipient neoplasia to orchestrate tumor-promoting inflammation in an NF- κ B-dependent manner. *Cancer Cell* 2010, 17(2): 135–147.

ERMISCH, M.; FIRLA, B.; STEINHILBER, D. Protein kinase A activates and phosphorylates ROR γ 4 in vitro and takes part in ROR γ activation by CaMK-IV. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408:442-446. 2011.

ESTIMATIVA 2012: incidencia de cancer no Brasil. Instituto Nacional de Cancer. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

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. p. E359–86. 2015.

FERLAY, J.; SHIN, H.R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D.M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008, *Int. J. Cancer* 127, p. 2893–2917. 2010.

FIASCHI, T.; CHIARUGI, P. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. *Int J Cell Biol.* 2012:762825. 2012.

FINAK, G., BERTOS, N., PEPIN, F., SADEKOVA, S., SOULEIMANOVA, M., ZHAO, H., CHEN, H., OMEROGU, G., METERISSIAN, S., OMEROGU, A., HALLET, M., PARK, M. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med.* 14. p. 518- 527. 2008.

FISHER, J. F., MOBASHERY, S. Mechanism-based profiling of MMPs. *Methods Mol Biol.* 622:471-87. 2010.

FLEMING, J.M.; LEIBOWITZ, B.J.; KERR, D.E.; COHICK, W.S. IGF-I differentially regulates IGF-binding protein expression in primary mammary fibroblasts and epithelial cells, *J. Endocrinol.* 186 (2005) 165–178. 2005.

FLEMING, J.M.; MILLER, T.C., QUINONES, M.; XIAO, Z.; XU, X.; MEYER, M.J.; GINSBURG, E.; VEENSTRA, T.D.; VONDERHAAR, B.K. The normal breast microenvironment of premenopausal women differentially influences the behavior of breast cancer cells in vitro and in vivo. *BMC Med.* 8, p. 27. 2010.

FUCHS, E.; WEBER, K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem.* 63:345-82. Review. 1994.

GALDIERO, M.R.; GARLANDA, C. JAILLON, S. MARONE, G. MANTOVANI, A. Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression, *J. Cell. Physiol.* v. 228, p. 1404–1412. 2012.

GAMBARYAN, S.; KOBASAR, A.; RUKOYATKINA, N.; HERTERICH, S.; GEIGER, J., SMOLENSKI, A.; LOHMANN, S.M., WALTER, U. Thrombin and collagen induce a feedback inhibitory signaling pathway in platelets involving dissociation of the catalytic subunit of protein kinase A from an NFkappaB-IkappaB complex. *J. Biol. Chem.* 285:18352-18363. 2010.

GAO, M.Q.; KIM, B.G.; KANG, S.; CHOI, Y.P.; PARK, H.; KANG, K.S.; CHO, N.H. Stromal fibroblasts from the interface zone of human breast carcinomas induce an epithelial-mesenchymal transition-like state in breast cancer cells in vitro. *J Cell Sci*, 123(20) p. 3507– 3514 . 2010.

GENCER, S., CEBECI, A., IRMAK-YAZICIOGLU, M. B. Matrix metalloproteinase gene expressions might be oxidative stress targets in gastric cancer cell lines. *Chin J Cancer Res. Jun*;25(3), p.322-33. 2013.

GIANNONI, E.; PARRI, M. CHIARUGI, P. EMT and oxidative stress: a bidirectional interplay affecting tumor malignancy, *Antioxid. Redox Signal*, v, 16 p. 1248–1263. 2012.

GJERDRUM, C.; TIRON, C.; HOIBY, T.; STEFANSSON, I.; HAUGEN, H.; SANDAL, T.; COLLETT, K.; LI, S.; MCCORMACK, E.; GJERTSEN, B. T.; MICKLEM, D. R.; AKSLEN, L. A.; GLACKIN, C. ; LORENS, J. B. Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, n. 3, Jan 19, p. 1124-1129. 2010.

GOMES, A. M., BHAT, R., CORREIA, A. L., MOTT, J. D., ILAN, N., VLODAVSKY, I., PAVÃO, M. S., BISSELL, M. Mammary Branching Morphogenesis Requires Reciprocal Signaling by Heparanase and MMP-14. *J Cell Biochem. Aug*;116(8), p.1668-79. 2015.

GRONBORG, M.; KRISTIANSEN, T.Z.; IWAHORI, A.; CHANG, R.; REDDY, R.; SATO, N.; MOLINA, H.; JESEN, O.N.; HRUBAN, R.H.; GOGGINS, M.G.; MAITRA, A.; PANDEY, A. Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach. *Mol. Cell Proteomics* 5, p. 157–171. 2006.

GUAN H.; HOU S.; RICCIARDI, R.P.J. DNA binding of repressor nuclear factor-kappaB p50/p50 depends on phosphorylation of Ser337 by the protein kinase A catalytic subunit. *Biol. Chem.* 280:9957-9962. 2005.

GUO, L.; ZHANG, C.; ZHU, J.; YANG, Y.; LAN, J.; SU, G.; XIE, X. Proteomic identification of predictive tissue biomarkers of sensitive to neoadjuvant chemotherapy in squamous cervical cancer. *Life Sci*, v. 151 p. 102–8. 2016.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer, *Cell* n. 100, p. 57–70. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5) p. 646–674. 2011.

HECHT, F., PESSOA, C. F., GENTILE, L. B., ROSENTHAL, D., CARVALHO, D. P., FORTUNATO, R. S. The role of oxidative stress on breast câncer development and therapy. *Tumour Biol*. Jan 27. 2016.

HENDRAYANI, S.F.; AL-KHALAF, H.H.; ABOUSSEKHRA, A. The cytokine IL-6 reactivates breast stromal fibroblasts through transcription factor STAT3-dependent up-regulation of the RNA-binding protein AUF1. *J Biol Chem*. 289(45) p. 30962–30976. 2014.

HOU, T.; RAY, S.; BRASIER, A.R. The functional role of an interleukin 6-inducible CDK9/STAT3 complex in human gamma-fibrinogen gene expression. *J. Biol. Chem*. 282:37091-37102. 2007.

MARX, J. All in the stroma: cancer's Cosa Nostra. *Cancer biology*. *Science* 320. p. 38–41. 2008.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M.M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin*. 61, p. 69–90. 2011.

JI, X. W.; ZHANG, A. Y.; GUAN, L. X. Association between angiotensin-converting enzyme and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and risk of coronary artery disease. *Nov*;35(11):1024-8. 2007.

JOHAR, R., SHARMA, R., KAUR, A., MUKHERJEE, T. K. Role of reactive oxygen species in estrogen dependant breast cancer complication. *Anticancer Agents Med Chem*.16(2), p.190-9 2015.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer, *Nat. Rev. Cancer* 6, p.392–401. 2006.

KANAYAMA, H.O.; TAMURA T.; UGAI S.; KAGAWA S.; TANAHASHI N.; YOSHIMURA T.; TANAKA K.; ICHIHARA A. Demonstration that a human 26S proteolytic complex consists of a proteasome and multiple associated protein components and hydrolyzes ATP and ubiquitin-ligated proteins by closely linked mechanisms. *Eur. J. Biochem*, v. 206, p. 567-578. 1992.

KANG, N.; SHAH, V.H.; URRUTIA, R. Membrane-to-nucleus signals and epigenetic mechanisms formyofibroblastic activation and desmoplastic stroma: potential therapeutic targets for liver metastasis?. *Mol. Cancer Res.* 13(4) p. 604-12. 2014.

KARIN, M.; GRETEN, F. R. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol.* Oct;5(10):749-59. Review. 2005.

KATZ, E.; DUBOIS-MARSHALL, S.; SIMS, A.H.; GAUTIER, P.; CALDWELL, H.; MEEHAN, R.R.; HARRISON, D.J. An in vitro model that recapitulates the epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human breast cancer. *PLoS ONE*, 6(2): e17083.. 2011.

KIMBRO, K. S.; SIMONS, J. W. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* Sep;13(3):739-49. 2006.

KOJIMA, Y.; ACAR, A.; EATON, E.N.; MELLODY, K.T.; SCHEEL, C.; BEN-PORATH, I.; ONDER, T.T.; WANG, Z.C.; RICHARDSON, A.L.; WEINBERG, R.A.; ORIMO, A. Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 p. 20009–14. 2010.

KUPERWASSER, C.; CHAVARRIA, T.; WU, M.; MAGRANE, G.; GRAY, J.W.; CAREY, L.; RICHARDSON, A.; WEINBERG, R.A. Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(14) p. 4966–4971. 2004.

LEE, D. E., CHUNG, M. Y., LIM, T. G., HUH, W. B., LEE, H. J., LEE, K. W. Quercetin suppresses intracellular ROS formation, MMP activation, and cell motility in human fibrosarcoma cells. *J Food Sci.Sep*;78(9), p.1464-9. 2013.

LEE, S.H.; KIM, Y.S.; HAN, W.; RYU, HS.; CHANG, J.M, CHO, N.; MOON, W.K. Tumor growth rate of invasive breast cancers during wait times for surgery assessed by ultrasonography. *Medicine*, 95(37):e4874. 2016.

LI, C., YANG, D., ZHAO, Y., QIU, Y., CAO, X., YU, Y., GUO, H., GU, X., YIN, X. Inhibitory Effects of Isorhamnetin on the Invasion of Human Breast Carcinoma Cells by Downregulating the Expression and Activity of Matrix Metalloproteinase-2/9. *Nutr Cancer*. 67(7), p.1191-200. 2015.

LIAO, D.; LUO, Y.; MARKOWITZ, D.; XIANG, R.; REISFELD, R.A. Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model, *PLoS ONE* 4. e7965. 2009.

LIGNITTO, L.; CARLUCCI, A.; SEPE, M.; STEFAN, E.; CUOMO, O.; NISTICO, R.; SCORZIELLO, A.; SAVOIA, C.; GARBI, C.; ANNUNZIATO, L.; FELICIELLO, A. Control of PKA stability and signalling by the RING ligase praja2. *Nat. Cell Biol.* 13:412-422. 2011.

LIU, H.; HERRMANN, C.H.; CHIANG, K.; SUNG, T.L.; MOON, S.H., DONEHOWER, L.A. Rice A.P.55K isoform of CDK9 associates with Ku70 and is involved in DNA repair. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397:245-250. 2010.

LUDWIG, J. A.; WEINSTEIN, J.N. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat. Rev. Cancer* v. 5, p. 845–856. 2005.

MAIESE, K., CHONG, Z. Z., HOU, J., SHANG, Y. C. Oxidative stress: Biomarkers and novel therapeutic pathways. *Exp Gerontol.* Mar;45(3), p.217-34. 2010.

MAO, Y., KELLER, E.T., GARFIELD, D.H., SHEN, K., WANG, J. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 32. p. 303-315. 2012.

MARSH, T., PIETRA, K., MC ALLISTER, S.S. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1832. P. 1070-1078. 2013.

MARTINEZ-OUTSCHOORN, U.E.; BALLIET, R.M.; RIVADENEIRA, D.B.; CHIAVARINA, B.; PAVLIDES, S.; WANG, C.; WHITAKER-MENEZES, D.; DAUMER, K.M.; LIN, Z.; WITKIEWICZ, A.K.; FLOMENBERG, N.; HOWELL, A.; PESTELL, R.G.; KNUDSEN, E.S.; SOTGIA, F.; LISANTI, M.P. Oxidative stress in cancer associated fibroblasts drives tumor-stroma co-evolution: a new paradigm for understanding tumor metabolism, the field effect and genomic instability in cancer cells, *Cell Cycle*, v. 9, n. 16, p. 3256–3276. 2010.

MATHIVANAN, S.; JI, H.; SIMPSON, R.J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J. Proteomics* 73, p. 1907–1920. 2010.

MI, J.; GUO, C.; BRAUTIGAN, D. L.; LARNER, J. M. Protein phosphatase-1alpha regulates centrosome splitting through Nek2. *Cancer Res.* Feb 1;67(3):1082-9 2007.

MORRIS, C.F, TAHIR, M.; ARSHID, S.; CASTRO, M.S. Fontes W. Reconciling the IPC and two-hit models: dissecting the underlying cellular and molecular mechanisms of two seemingly opposing frameworks. *J Immunol Res*, 2015 p. 697193. 2015.

NAGAI, M. A.; BRENTANI, M M. Gene expression profiles in breast cancer to identify estrogen target genes. *Med Chem*, v. 8, p. 448-454, 2008.

NOGUCHI, J. L.; LISS, M. A.; PARSONS, J. K. Obesity, physical activity and bladder cancer. *Current urology reports, Philadelphia*, v.16, n.10, p. 74. 2015.

NWABO KAMDJE, A.H.; SEKE ETET, P.F.; VECCHIO L.; MULLER JM.; KRAMPERA M.; LUKONG K.E. Signaling pathways in breast cancer: therapeutic targeting of the microenvironment. *Cell Signal*, 26, p. 2843–56. 2014.

O'NEILL, JR.; PAK, H.S, PAIRO-CASTINEIRA, E.; SAVE, V.; PATERSON-BROWN, S.; NENUTIL, R.; VOJTĚŠEK, B.; OVERTON, I.; SCHERL, A.; HUPP, T.R. Quantitative shotgun proteomics unveils candidate novel oesophageal adenocarcinoma-specific proteins. *Mol Cell Proteomics*. 2017.

ORIMO, A.; GUPTA, P.B.; SGROI, D.C.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; DELAUNAY, T.; NAEEM, R.; CAREY, V.J.; RICHARDSON, A.L.; WEINBERG, R.A. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and

angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 121(3): 335–348. 2005.

OVERALL, C. M.; LOPEZ-OTIN, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: Innovations for the post-trial era. *Nat. Rev. Cancer*. 2, p.657–672. 2002.

PASQUALUCCI, L.; KITaura, Y.; GU H.; DALLA-FAVERA, R. PKA-mediated phosphorylation regulates the function of activation-induced deaminase (AID) in B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:395-400. 2006.

PAVLIDES, S.; VERA, I.; GANDARA R.; SNEDDON S.; PESTELL R.G.; MERCIER I.; MARTINEZ-OUTSCHOORN, U.E.; WHITAKER-MENEZES, D.; HOWELL, A.; SOTGIA, F.; LISANTI, M.P. Warburg meets autophagy: cancer-associated fibroblasts accelerate tumor growth and metastasis via oxidative stress, mitophagy, and aerobic glycolysis. *Antioxid. Redox Signal.* n. 16, p. 1264–1284. 2012.

PEINADO, H.; LAVOTSHKIN, S.; LYDEN, D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts, *Semin. Cancer Biol.* 21. p. 139–146. 2011.

PICOTTI, P.; BODENMILLER, B.; AEBERSOLD, R. Proteomics meets the scientific method. *Nat Methods* 10:24–7. 2013.

PIETRAS, K.; OSTMAN, A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res.* May 1;316(8):1324-31. 2010.

PIKARSKY, E.; RONEN, A.; ABRAMOWITZ, J.; LEVAVI-SIVAN, B.; HUTORAN, M.; SHAPIRA, Y.; STEINITZ, M.; PERELBERG, A.; SOFFER, D.; KOTLER, M. Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. *J Virol.*Sep;78(17):9544-51. 2004.

POLYAK, K.; WEINBERG, R.A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*. 9(4): 265-273. 2009.

RAI, A.J.; GELFAND, C.A.; HAYWOOD, B.C.; WARUNEK, D.J.; YI J, SCHUCHARD, M.D.; MEHIGH, R.J.; COCKRILL, S.L.; SCOTT, G.B.; TAMMEN, H.; SCHULZ-

KNAPPE, P.; SPEICHER, D.W.; VITZTHUM, F.; HAAB, B.; SIEST, G.; CHAN, D.W. HUPO plasma proteome project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. *Proteomics*.5:3262–77. 2005

RAICA, M.; CIMPEAN, A.;M, RIBATTI, D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur J Cancer*, 45(11) p.1924–1934. 2009.

RASANEN, K.; VAHERI, A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res*.Oct 15;316(17):2713-22. 2010.

REN, F., TANG, R., ZHANG, X., MADUSHI, W. M., LUO, D., DANG, Y., LI, Z., WEI, K., CHEN, G. Overexpression of MMP family members functions as prognostic biomarker for breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. Aug 13;10(8). 2015.

RODRIGUES, M. A.; GOMES, D. A.; LEITE, M. F.; GRANT, W.; ZHANG, L.; LAM, W.; CHENG, Y. C.; BENNETT, A. M. ; NATHANSON, M. H. Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. *J Biol Chem*, v. 282, n. 23, Jun 8, p. 17061-17068. 2007.

ROLLAND, T.; TASAN, M.; CHARLOTEAUX, B.; PEVZNER S.J.; ZHONG, Q.; SAHNI, N.; YI, S.; LEMMENS, I.; FONTANILLO, C.; MOSCA, R.; KAMBUROV, A.; GHIASSIAN, S.D.; YANG, X.; GHAMSARI, L.; BALCHA, D.; BEGG, B.E.; BRAUN, P. BREHME, M., BROLY, M.P., CARVUNIS, A.R., CONVERY-ZUPAN, D., COROMINAS, R.; COULOMBE-HUNTINGTON, J.; DANN, E.; DREZE, M., DRICOT, A.; FAN, C.; FRANZOSA, E.; GEBREAB, F.; GUTIERREZ, B.J.; HARDY, M.F.; JIN, M.; KANG, S.; KIROS, R.; LIN, G.N.; LUCK, K.; MACWILLIAMS, A.; MENCHE, J.; MURRAY, R.R.; PALAGI, A.; POULIN, M.M.; RAMBOUT, X.; RASLA ,J.; REICHERT, P.; ROMERO, V.; RUYSSINCK, E.; SAHALIE, J.M.; SCHOLZ, A.; SHAH, A.A.; SHARMA, A.; SHEN, Y.; SPIROHN, K.; TAM, S.; TEJEDA, A.O.; TRIGG, S.A.; TWIZERE, J.C.; VEJA, K.; WALSH, J.; CUSICK, M.E.; XIA, Y.; BARABASI, A.L.; IAKOUCHEVA L.M., ALOY P., DE LAS RIVAS J., TAVERNIER J., CALDERWOOD M.A.; HILL, D.E.; HAO, T.; ROTH, F.P.; VIDAL. M. A proteome-scale map of the human interactome network. *Cell*, v. 159, p. 1212-1226. 2014.

ROMER, A.M.; LÜHR, I.; KLEIN, A.; FRIEDL, A.; SEBENS, S.; RÖSEL F.; ARNOLD, N.; STRAUSS, A.; JONAT, W.; BAUER, M. Normal mammary fibroblasts induce reversion of the malignant phenotype in human primary breast cancer. *Anticancer Res*, 33(4) p. 1525–1536. 2013.

RONNOV-JESSEN, L.; PETERSEN, O.W.; KOTELIANSKY, V.E.; BISSELL, M.J. The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. *J Clin Invest*; 95(2): 859–873 . 1995.

RUAL, J.F.; VENKATESAN, K.; HAO, T.; HIROZANE-KISHIKAWA, T.; DRICOT, A.; LI, N.; BERRIZ, G.F.; GIBBONS, F.D.; DREZE, M.; AYIVI-GUEDEHOUSSOU, N.; KLITGORD, N.; SIMON, C.; BOXEM, M.; MILSTEIN, S.; ROSENBERG, J.; GOLDBERG, D.S.; ZHANG, L.V.; WONG, S.L.; FRANKLIN, G.; LI, S.; ALBALA, J.S.; LIM, J.; FRAUGHTON, C.; LLAMOSAS, E.; CEVIK, S.; BEX, C.; LAMESCH, P.; SIKORSKI, R.S.; VANDENHAUTE, J.; ZOGHBI, H.Y.; SMOLYAR, A.; BOSAK, S.; SEQUERRA, R.; DOUCETTE-STAMM, L.; CUSICK, M.E.; HILL, D.E.; ROTH, F.P.; VIDAL, M. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* 437:1173-1178. 2005.

RUSSELL, R. L.; CAO, D.; ZHANG, D.; HANDSCHUMACHER, R. E.; PIZZORNO, G. Uridine phosphorylase association with vimentin. Intracellular distribution and localization. *J Biol Chem*. Apr 20;276(16):13302-7. 2001.

SALEM, N. KAMAL, I. AL-MAGHRABI, J. ABUZENADAH, A. PEER-ZADA, A. A. QARI, Y. AL-AHWAL, M. AL-QAHTANI, M. BUHMEIDA, A. High expression of matrix metalloproteinases:MMP-2 and MMP-9 predicts poor survival outcome in colorectal carcinoma. *Future Oncol*. Feb;12(3):323-31. 2016.

SAPPINO, A.P.; SKALLI, O.; JACKSON B.; SCHURCH, W.; GABBIANI, G. Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues. *Int. J. Cancer* 41, p. 707–712. 1988.

SCHMUTZ, I.; WENDT, S.; SCHNELL, A.; KRAMER, A.; MANSUY, I.M.; ALBRECHT, U. Protein phosphatase 1 (PP1) is a post-translational regulator of the mammalian circadian clock. *PLoS ONE* 6:E21325-E21325. 2011.

SCOTT, R. W., CRIGHTON, D., OLSON, M. F. Modeling and imaging 3-dimensional collective cell invasion. *J Vis Exp*. Dec 7. 2011.

SHEKHAR, M.P.; WERDELL, J.; SANTNER, S.J.; PAULEY, R.J.; TAIT, L. Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: implications for tumor development and progression. *Cancer Res*, 61(4) p. 1320–1326. 2001.

SIDDIQUI, N.; SONENBERG, N. Signalling to eIF4E in cancer. *Biochem Soc Trans*, v. 43, n. 5, p. 763-72. 2015.

SIEGEL, R.; DESANTIS, C.; VIRGO, K.; STEIN, K.; MARIOTTO, A.; SMITH, T.; COOPER, D.; GANSLER, T.; LERRO, C.; FEDEWA, S.; LIN, C.; LEACH, C.; CANNADY, R.S.; CHO, H.; SCOPPA, S.; HACHEY, M.; KIRCH, R.; JEMAL, A.; WARD, E. Cancer treatment and survivorship statistics. *J. Clin. Oncol.* 62, p. 220–241. 2012.

SIEGEL, L. et al. *Cancer Statistics, 2015*. CA, New York v. 65, n. 1. 2015. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21254/pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2016.

SMART, C. E., MORRISON, B. J., SAUNUS, J. M., VARGAS, A. C., KEITH, P., REID, L., WOCKNER, L., ASKARIAN-AMIRI, M., SARKAR, D., SIMPSON, P. T., CLARKE, C., SCHMIDT, C. W., REYNOLDS, B. A., LAKHANI, S. R., LOPEZ, J. A. In vitro analysis of breast cancer cell line tumourspheres and primary human breast epithelia mammospheres demonstrates inter- and intrasphere heterogeneity. *PLoS One*. Jun 4. 2013.

SMITH, B.D.; SMITH, G.L.; HURRIA, A.; HORTOBAGYI, G.N.; BUCHHOLZ, T.A. Future of cancer incidence in the United States: burdens upon an aging, changing nation, *J. Clin. Oncol.* 27, p. 2758–2765. 2009.

SOLINAS, G., SCHIREA, S., LIGUORI, M., FABBRI, M., PESCE, S., ZAMMATARO, L., PASQUALINI, F., NEBULONI, M., CHIABRANDO, C., MANTOVANI, A., ALLAVENA, P. Tumor-conditioned macrophages secrete migration-stimulating factor:

a new marker for M2- polarization, influencing tumor cell motility. *J Immunol.* 185, p. 642-652. 2010.

SONG, H.; PU, J.; WANG, L.; WU, L.; XIAO, J.; LIU, Q.; CHEN, J.; ZHANG, M.; LIU Y.; NI, M.; MO, J.; ZHENG, Y.; WAN, D.; CAI, X.; CAO, Y.; XIAO, W.; YE, L.; TU, E.; ZHANG, Z. ATG16L1 phosphorylation is oppositely regulated by CSNK2/casein kinase 2 and PPP1/protein phosphatase 1 which determines the fate of cardiomyocytes during hypoxia/reoxygenation. *Autophagy* 11:1308-1325.2015.

SONG, Q.; KHANNA, K.K.; LU, H.; LAVIN, M.F. Cloning and characterization of a human protein phosphatase 1-encoding cDNA. *Gene* 129:291-295. 1993.

SPAETH, E.L.; DEMBINSKI, J.L.; SASSER, A.K.; WATSON, K.; KLOPP, A.; HALL, B.; ANDREEFF, M.; MARINI, F. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS ONE*; 4(4): e4992 . 2009.

STERNLICHT, M. D.; BISSELL, M. J.; WERB, Z. The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. *Oncogene.* Feb 21;19(8):1102-13. Review. 2000.

STORZ, P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci.* May 1;10:1881-96. Review. 2005.

STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. A. The cancer genome. *Nature,* v. 458, n. 7239, Apr 9, p. 719-724. 2009.

SULIMENKO, V.; HÁJKOVÁ, Z.; KLEBANOVYCH, A.; DRÁBER, P. Regulation of microtubule nucleation mediated by γ -tubulin complexes. *Protoplasma,* v. 254, n. 3, p. 1187-1199. 2017.

SWARTZ, M.A.; IIDA, N.; ROBERTS, E.W.; SANGALETTI, S.; WONG, M.H.; YULL, F.E.; COUSSENS, L.M.; DECLERK, Y.A. Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. *Cancer Res.* 72, p. 2473–2480. 2012.

SZÁSZ, A.M; GYÖRFFY, B.; MARKO-VARGA, G. Cancer heterogeneity determined by functional proteomics. *Semin Cell Dev Biol.* 2016.

TAN, A.; PHANG, W.; GOPINATH, S. C. B.; HASHIM, O. H.; KIEW, L. V.; CHEN, Y. Revealing Glycoproteins in the Secretome of MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *BioMed Research International*. 2015.

TAN, H.T.; LEE, Y.H.; CHUNG, M.C. Cancer proteomics. *Mass Spectrom Rev* (2012) 31:583–605.

TANG, Z.; SHU, H.; QI, W., MAHMOOD, N.A.; MUMBY, M.C., YU, H. PP2A is required for centromeric localization of Sgo1 and proper chromosome segregation. *Dev Cell*. v. 10, n. 5, p. 575-85. 2006.

THE history of cancer. American Cancer Society Inc. New York, 22 mar. 2010. Disponível em: <http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_6x_the_history_of_cancer_72.asp>. Acesso em: 23 jun. 2010.

TIENEKE, B. M.; SCHAAIJ-VISSER, T. B.; WIT, M.; LAM, S. W.; JIMÉNEZ, C. R. The cancer secretome, current status and opportunities in the lung, breast and colorectal cancer context. *Biochim Biophys Acta*. Nov;1834(11). p. 2242-58. 2013.

TJALSMA, H.; BOLHUIS, A.; JONGBLOED, J.D.; BRON, S.; VAN DIJL, J.M. Signal peptiddependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, p. 515–547. 2000.

TORRE, L. A et al. Global statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, New York, v. 65, n. 2, p. 87-108. 2015.

TOYAMA, S.; TOYAMA, S. A variant form of beta-actin in a mutant of KB cells resistant to cytochalasin B. *Cell* 37:609-614. 1984.

TYAN, S.W.; KUO, W.H.; HUANG, C.K.; PAN, C.C.; SHEW, J.Y.; CHANG, K.J.; LEE, E.Y.; LEE, W.H. Breast cancer cells induce cancer-associated fibroblasts to secrete hepatocyte growth factor to enhance breast tumorigenesis, *PLoS ONE* 6 (2011) e15313. 2011.

VALENCIA, T.; KIM, J. Y.; ABU-BAKER, S.; MOSCAT-PARDOS, J.; AHN, C. S.; REINA-CAMPOS, M.; DURAN, A.; CASTILLA, E. A.; METALLO, C. M.; DIAZ-MECO, M. T.; MOSCAT, J. Metabolic reprogramming of stromal fibroblasts through p62-

mTORC1 signaling promotes inflammation and tumorigenesis. *Cancer Cell*. Jul 14;26(1):121-35. 2014.

VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J. M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat Rev Cancer*, v. 7, n. 9, Sep, p. 659-672. 2007.

VAUGHAN, M.B.; HOWARD, EW.; TOMASEK, J.J. Transforming growth factor- β 1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res*. 257(1): 180–189. 2000.

VELINOV, N., POPTODOROV, G., GABROVSKI, N., GABROVSKI, S. The role of matrixmetalloproteinases in the tumor growth and metastasis. *Khirurgiia (Sofia)*. (1):44-9. 2010.

VETTER, M.M.; ZENN, H.-M.; MENDEZ, E., VAN DEN BOOM, H.; HERBERG, F.W., SKAALHEGG, B.S. The testis-specific C β 2 subunit of PKA is kinetically indistinguishable from the common C β 1 subunit of PKA. *BMC Biochem*. 12:40-40. 2011.

WADA, T.; TAKAGI, T.; YAMAGUCHI, Y.; WATANABE, D.; HANDA, H. Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription in vitro. *EMBO J*. 17:7395-7403. 1998.

WANG, T.N.; ALBO, D.; TUSZYNSKI, G.P. Fibroblasts promote breast cancer cell invasion by upregulating tumor matrix metalloproteinase-9 production. *Surgery*, 132(2) p. 220–225. 2002.

WANG, W.; ZHANG, X.; ZHENG, J.; YANG, J. High glucose stimulates adipogenic and inhibits osteogenic differentiation in MG-63 cells through cAMP/protein kinase A/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Mol. Cell. Biochem*. 338:115-122(2010)

WEBER, C.E.; KOTHARI, A.N.; WAI, P.Y.; LI, N.Y.; DRIVER, J.; ZAPF, M.A.; FRANZEN, C.A.; GUPTA, G.N.; OSIPO, C.; ZLOBIN, A.; SYN, W.K.; ZHANG, J.; KUO, P.C.; MI, Z. Osteopontin mediates an MZF1-TGF- β 1-dependent

transformation of mesenchymal stem cells into cancer-associated fibroblasts in breast cancer. *Oncogene*, 2014.

WEAVER, Z.; DIFILIPPANTONIO, S.; CARRETERO, J.; MARTIN, P. L.; EL MESKINI, R.; IACOVELLI, A. J.; GUMPRECHT, M.; KULAGA, A.; GUERIN, T.; SCHLOMER, J.; BARAN, M.; KOZLOV, S.; MCCANN, T.; MENA, S.; AL-SHAHROUR, F.; ALEXANDER, D.; WONG, K. K.; VAN DYKE, T. Temporal molecular and biological assessment of an erlotinib-resistant lung adenocarcinoma model reveals markers of tumor progression and treatment response. *Cancer Res.* Nov 15;72(22):5921-33. 2012.

WEI, S.; SIEGAL, G.P. Metastatic Organotropism: An Intrinsic Property of Breast Cancer Molecular Subtypes. *Adv Anat Pathol.* Mar, 24(2). P. 78-81. 2017.

XIANG, T. XIA, X. YAN, W. Expression of matrix metalloproteinases-2/-9 is associated with microvessel density in pancreatic cancer. *Am J Ther.* Feb 5. 2016.

XIAO, B.; TIAN, X.; XIE, W.; JONES, P.P.; CAI, S.; WANG, X.; JIANG, D.; KONG, H.; ZHANG, L.; CHEN, K.; WALSH, M.P.; CHENG, H.; CHEN, S.R.W. Functional consequence of protein kinase A-dependent phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor: sensitization of store overload-induced Ca²⁺ release." *J. Biol. Chem.* 282:30256-30264. 2007.

XOURI, G.; CHRISTIAN, S. Origin and function of tumor stroma fibroblasts. *Semin Cell Dev Biol.* 21(1): 40–46. 2010.

XU, H.; WASHINGTON, S.; VERDERAME, M.F.; Manni, A. Activation of protein kinase A (PKA) signaling mitigates the antiproliferative and antiinvasive effects of alpha-difluoromethylornithine in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 107:63-70(2008).

YAO, L.; LAO, W.; ZHANG, Y.; TANG, X.; HU, X.; HE, C.; HU, X.; XU, L.X. Identification of EFEMP2 as a serum biomarker for the early detection of colorectal cancer with lectin affinity capture assisted secretome analysis of cultured fresh tissues, *J. Proteome Res.* 11, p. 3281–3294. 2012.

YU, J. I.; CHOI, D. H.; PARK, W.; HUH, S. J.; CHO, E. Y.; LIM, Y. H.; AHN, J. S.; YANG, J. H. ; NAM, S. J. Differences in prognostic factors and patterns of failure between invasive micropapillary carcinoma and invasive ductal carcinoma of the breast: Matched case-control study. *Breast*, Mar 19, p. 2010.

YU, X.; HARRIS, S.L.; LEVINE, A.J. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res.* 66, p. 4795–4801. 2006.

ZHANG, F.; HU, Y.; HUANG, P., TOLEMAN, C.A., PATERSON, A.J., KUDLOW, J.E. Proteasome function is regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase through phosphorylation of Rpt6. *J. Biol. Chem.* 282:22460-22471. 2007.

ZHANG, F.; ZHANG, L.; ZHANG, B.; WEI, X.; YANG, Y.; QI, R. Z.; YING, G.; ZHANG, N. ; NIU, R. Anxa2 plays a critical role in enhanced invasiveness of the multidrug resistant human breast cancer cells. *J Proteome Res*, v. 8, n. 11, Nov, p. 5041-5047. 2009.

ZHANG, H.; FAN, Y.; XIA, L.; GAO, C.; TONG, X.; WANG, H.; SUN, L.; JI, T.; JIN, M.; GU, B.; FAN, B. The impact of advanced proteomics in the search for markers and therapeutic targets of bladder cancer. *Tumour Biol.* 39(3):1010428317691183. 2017.