

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

GUILHERME SASTRE DE SOUZA

**Identificação proteômica e análise da proteína Syndecan-4 na migração
celular durante o processo de transição epitélio mesenquimal em
células de câncer de mama**

Ribeirão Preto – SP

2024

GUILHERME SASTRE DE SOUZA

Identificação proteômica e análise da proteína Syndecan-4 na migração celular durante o processo de transição epitélio mesenquimal em células de câncer de mama

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências – Área de Concentração: Bioquímica.

Orientador: Vitor Marcel Faça

Ribeirão Preto – SP

2024

Souza, Guilherme Sastre

Identificação proteômica e análise da proteína Sindecán-4 na migração celular durante o processo de transição epitélio mesenquimal em células de câncer de mama. Ribeirão Preto, 2024.

100 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Vitor Marcel Faça

1. Cancer de Mama.
2. Transição epitélio-mesenquimal.
3. Análise proteômica.
4. Sindecán-4.
5. Lincitinibe.

SOUZA, GUILHERME SASTRE. Identificação proteômica e análise da proteína Syndecan-4 na migração celular durante o processo de transição epitélio mesenquimal em células de câncer de mama. 2024. 100 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof .Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

O presente trabalho foi realizado com o apoio financeiro da CAPES, CNPq e FAPESP em bolsa de pesquisa e suporte financeiro ao laboratório.

“It ain’t about how hard you hit.
It’s about how hard you can get hit and keep moving forward.
How much you can take and keep moving forward.
That’s how winning is done!”

Rochy Balboa

RESUMO

SOUZA, Guilherme Sastre. **Identificação proteômica e análise da proteína Sindecán-4 na migração celular durante o processo de transição epitélio mesenquimal em células de câncer de mama.** 2024. 100 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

O câncer de mama é uma das neoplasias mais comuns, ficando atrás apenas do câncer de pulmão em números brutos de casos. Possui uma alta taxa de sobrevida, cerca de 90%, no entanto, a progressão tumoral para metástase leva a uma diminuição expressiva da sobrevida do paciente para cerca de 25%, sendo considerada um dos principais maus prognósticos dessa neoplasia. No início do processo metastático, as células passam pela transição epitélio-mesenquimal (EMT), levando as células epiteliais a desenvolverem características de células mesenquimais, adquirindo motilidade à medida que perdem a adesão célula-célula. Além disso, esse processo afeta a expressão e sinalização de diversas proteínas da superfície celular. O objetivo nesse trabalho foi de avaliar a participação de proteínas de superfície durante a indução da EMT em células de câncer de mama. Para isso, utilizamos células de câncer de mama induzidas à EMT pelo tratamento com fator de crescimento epidérmico (EGF). Com essas células induzidas, coletamos dados proteômicos que indicaram alterações na expressão de proteínas de superfície, como o Síndecan-4 (SDC4) que apresentou uma diminuição em relação ao controle. Com o intuito de avaliarmos a participação dessa proteína durante o processo de EMT em células de câncer de mama, utilizamos um inibidor indireto de SDC4, o Lincitinibe (OSI-906), que age inibindo a autofosforilação de IGF-1R. A partir de ensaio de MTT e de apoptose com Anexina V, o tratamento foi estabelecido utilizando 72 nM de OSI-906 por 12 horas, no qual, foi possível verificar que, em ensaios de migração célula, a diminuição da expressão de SDC4 elevou a atividade migratória celular em células EMT positivas. Também foi observado, a partir de ensaios de zimografia e de “*Western blotting*” das proteínas secretadas, que durante a EMT ocorre um aumento na expressão e atividade da matriz metaloproteinase 9 (MMP-9), a qual está diretamente relacionada ao processo de clivagem proteolítica na superfície celular de diversas proteínas, incluindo o SDC4, o qual apresentou um aumento na porção extracelular liberada nas amostras de secretoma. No tratamento com OSI-0906, foi observado uma diminuição tanto da atividade da MMP-9 como na diminuição da clivagem de SDC4. Essa observação corrobora com nossos dados proteômicos, que mostraram um aumento na detecção de peptídeos da região extracelular do SDC4 nas amostras de secretoma. Ademais, nossos achados são sustentados por estudos que mostraram a eficiência da redução da expressão indireta de SDC4 utilizando compostos inibidores de IGF-1R. Além disso, Na literatura foi demonstrado que a depleção dessa proteína em MCF-7 aumenta a migração celular e que, o aumento do processo de clivagem proteolítica, está correlacionado com o aumento da atividade de MMP-2 e 9. O processo de clivagem pode ser uma forma de regulação da atividade aderente da proteína durante a progressão tumoral. Nossos resultados salientam a participação de SDC4 no processo de EMT, uma vez que, quando indiretamente inibida, promove um aumento no processo de migração celular. Sendo assim, futuros estudos com ativadores ou inibidores diretos de SDC4 podem favorecer o combate ao desenvolvimento de metástase no câncer de mama.

Palavras chave: Cancer de Mama, Transição epitélio-mesenquimal, Análise proteômica, Sindecán-4, Lincitinibe.

ABSTRACT

SOUZA, Guilherme Sastre. **Proteomic identification and analysis of the Syndecan-4 protein in cell migration during the epithelial-mesenchymal transition process in breast cancer cells.** 2024. 100 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

Breast cancer is one of the most common neoplasms, only behind to lung cancer in total case numbers. It has a high survival rate, around 90%; however, the presence of metastasis leads to a significant decrease in patient survival to about 25%, making it one of the major poor prognostic factors for this neoplasm. In the early stages of the metastatic process, cells undergo epithelial-mesenchymal transition (EMT), causing epithelial cells to develop mesenchymal characteristics, gaining motility as they lose cell-cell adhesion. Additionally, this process affects the expression and signaling of various cell surface proteins. The aim of this study was to evaluate the involvement of surface proteins during EMT induction in breast cancer cells. To achieve this, we used breast cancer cells induced to the EMT process through treatment with epidermal growth factor (EGF). With these induced cells, we collected proteomic data indicating changes in the expression of surface proteins, such as Syndecan-4 (SDC4), which showed a decrease compared to the control. To assess the involvement of this protein during the EMT process in breast cancer cells, we used an indirect inhibitor of SDC4, Lincitinib (OSI-906), which inhibits IGF-1R autophosphorylation. Through MTT assays and apoptosis with Annexin V, we established the treatment using 72 nM of OSI-906 for 12 hours, during which it was observed that, in cell migration assays, indirect inhibition of SDC4 increased cell migratory activity in EMT-positive cells. Furthermore, zymography assays and Western blotting of secreted proteins revealed an increase in the expression and activity of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) during EMT, which is directly related to proteolytic cleavage on the cell surface of various proteins, including SDC4. SDC4 showed an increase in the extracellular portion released in secretome samples. In the OSI-906 treatment, a decrease in both MMP-9 activity and SDC4 cleavage was observed. This observation aligns with our proteomic data, which showed an increase in the detection of peptides from the extracellular region of SDC4 in secretome samples. Moreover, our findings are supported by studies demonstrating the effectiveness of indirect SDC4 inhibition using IGF-1R inhibitor compounds. Additionally, literature has shown that inhibiting this protein in MCF-7 increases cell migration, and the increase in proteolytic cleavage is correlated with increased MMP-2 and 9 activity. Cleavage may be a form of regulation of the adhesive activity of the protein during tumor progression. Our results highlight the involvement of SDC4 in the EMT process, as indirect inhibition promotes an increase in cell migration. Thus, future studies with direct activators or inhibitors of SDC4 may aid in combating the development of metastasis in breast cancer.

Keywords: Breast Cancer, Epithelial-mesenchymal transition, Proteomic analysis, Syndecan-4, Lincitinib.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01: COMPILADO DOS “HALLMARKS” DO CÂNCER.....	19
FIGURA 02: CASCATA DE INVASÃO METASTÁTICA.....	20
FIGURA 03: TIPOS DE EMT (EMT-1; EMT-2 E EMT-3).....	23
FIGURA 04: PROCESSO DINÂMICO E TRANSICIONAL DA EMT E MET.....	24
FIGURA 05: CONGRUÊNCIAS DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DO IGF-1R E DO EGFR ENVOLVIDAS NA EMT.....	26
FIGURA 06: PAPEIS DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO SNAIL ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE EMT.....	27
FIGURA 07: ESTRUTURA PRINCIPAL DA MATRIZ EXTRACELULAR.....	28
FIGURA 08: CLASSIFICAÇÃO DAS MMPs HUMANAS.....	30
FIGURA 09: OS QUATRO TIPOS DE SDC DE HUMANOS E SEUS PROTEOGLICANOS.....	33
FIGURA 10: “WORKFLOW” DOS PROCESSOS BASE DA CULTURA CELULAR.....	38
FIGURA 11: “WORKFLOW” DAS ETAPAS PARA A INDUÇÃO DO PROCESSO DE EMT.....	40
FIGURA 12: “WORKFLOW” DOS PROCESSOS DE COLETA DE PROTEÍNAS COM AS AMOSTRAS DE MCF-7.....	40
FIGURA 13: SEQUÊNCIA EXEMPLIFICADA DO PROTOCOLO DO ENSAIO DE MTT.....	45
FIGURA 14: ESQUEMA DO ENSAIO DE APOPTOSE UTILIZANDO ANEXINA V E IP FRENTE AO COMPOSTO OSI-906.....	46
FIGURA 15: ESQUEMA DO PROCESSO DE INDUÇÃO DE EMT E REDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE SDC4.....	47
FIGURA 16: ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PROCESSO DE AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR.....	48
FIGURA 17: ESQUEMA REPRESENTATIVO DO ENSAIO DE ZIMOGRÁFIA.....	50
FIGURA 18: ESQUEMA DOS PROCESSOS DO ENSAIO DE “WESTERN BLOTTING”.....	51
FIGURA 19: ANÁLISE MORFOLÓGICA DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA INDUZIDAS A EMT.....	54
FIGURA 20: AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE EMT POR EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS-CHAVE.....	55
FIGURA 21: ANÁLISE DA INTERAÇÃO DAS 30 PROTEÍNAS COM O MAIOR NÚMERO DE PEPTÍDEOS IDENTIFICADOS NAS AMOSTRAS.....	59
FIGURA 22: “HEATMAPS” DO NÚMERO DE PEPTÍDEOS IDENTIFICADOS DE MCF-7 INDUZIDAS A EMT.....	60
FIGURA 23: ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR DE MCF-7 FRENTE AO COMPOSTO OSI-906.....	63
FIGURA 24: ESTRATÉGIA DE “GATES” UTILIZADA PARA A SELEÇÃO DAS CÉLULAS A SEREM ANALISADAS PELO CITÔMETRO.....	64
FIGURA 25: ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR DE MCF-7 FRENTE AO COMPOSTO OSI-906 PELO ENSAIO DE DETECÇÃO DA APOPTOSE POR ANEXINA V.....	65
FIGURA 26: ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA TRATADAS COM OSI-906 POR 12 HORAS....	67
FIGURA 27: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CDH1 E SNAIL POR ENSAIO DE “WESTERN BLOTTING” DURANTE O PROCESSO DE EMT E COM OSI-906.....	67
FIGURA 28: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS IRS1 E IGF-1R POR “WESTERN BLOTTING” DURANTE A EMT E TRATADAS COM OSI-906.....	68
FIGURA 29: ANÁLISE DO PROCESSO DE DEPLEÇÃO DE SDC4 POR “DOT BLOT”.....	69
FIGURA 30: ANÁLISE DA MIGRAÇÃO CELULAR POR ENSAIO DE “WOUND HEALING”.....	71
FIGURA 31: ANÁLISE DO PROCESSO DE “SHEDDING” DA PROTEÍNA SDC4 A PARTIR DE DADOS PROTEÔMICOS.....	72
FIGURA 32: ANÁLISE DO PROCESSO DE “SHEDDING” POR “DOT BLOT” DE SDC4.....	74
FIGURA 33: ZIMOGRÁFIA PARA AMOSTRAS DO EXTRATO TOTAL E DE PROTEÍNAS SECRETADAS.....	75
FIGURA 34: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS MMPs 9 E 2 POR “WESTERN BLOTTING” DURANTE A EMT E TRATADAS COM OSI-906.....	77

LISTA DE TABELAS:

TABELA 01: CLASSIFICAÇÃO DOS EVENTOS DETECTADOS PELO CITÔMETRO DE FLUXO PARA O ENSAIO DE APOPTOSE	47
TABELA 02: DADOS DOS ANTICORPOS UTILIZADOS.....	52
TABELA 03: AS 30 PROTEÍNAS TRANSMEMBRANARES MAIS ABUNDANTES NO SECRETOMA	57
TABELA 04: AS 30 PROTEÍNAS TRANSMEMBRANARES MAIS ABUNDANTES NO EXTRATO TOTAL	58
TABELA 05: EVENTOS DETECTADOS PARA CADA 100 CÉLULAS ANALISADAS	65

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ADAM:	A Desintegrina e Metaloproteinase
AKT:	Proteína Quinase B
BME:	Azul de Bromofenol
BSA:	Albumina sérica bovina
CAA:	Cloroacetamida
CDH-1:	E-Caderina
CDH-2:	N-caderina
DDA-PASSEF:	<i>Data Dependent Acquisition-Parallel Accumulation Serial Fragmentation</i>
DMEM-F12:	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
EGF:	Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR:	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
EMT:	Transição Epitelial-Mesenquimal
EPM:	Erro padrão da Média
ERK:	Quinases Reguladas por Sinal Extracelular
EUA:	Estados Unidos da Améfrica
GAPDH:	Gliceraldeino-3-fosfato desidrogenase
IGF-1:	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1
IGF-1R:	Receptor do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1
IP:	Iodeto de Propídio
kDa:	Kilo Dalton
MAPK:	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MCF-7:	Células epiteliais de adenocarcinoma de cnfer de mama
MEC:	Matriz Extracelular
MET:	Transição mesenquimal-epitelial
miRNA:	MicroRNA
MMP:	Matriz Metaloproteinase
MS:	Espectrometria de Massas
MTT:	Brometo de tiazolil azul de tetrazólio
OSI-906:	Lincitinibe
PBS:	Tampão Fosfato de Sódio
pH:	Potencial Hidrogeniônico
PI3K:	Fosfoinositídeo 3-quinase
RPM:	Rotações por minuto
SCD4:	Sindecana-4
SDC:	Sindecana
SDC1:	Sindecana-1
SDC2:	Sindecana-2
SDC3:	Sindecana-3
SDS:	Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE:	Eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil-sulfato de sódio
SFB:	Soro Fetal bovino
siRNA:	RNA de interferência pequeno
SLUG:	Zinc Finger Protein SNAI2
SNAIL:	Zinc Finger Protein SNAI1
TBS:	Tampão Tris Salino
TBS-T:	Tampão Tris Salino com Tween
TCEP:	Cloridrato de tris(2-carboxietil) fosfina
TWIST1:	Twist-related protein 1
UHPLC:	Ultra-High-Performance Liquid Chromatography
VIM:	Vimentina
ZEB-1/2:	Zinc Finger E-Box-binding Homeobox 1 e 2

SUMÁRIO:

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 CÂNCER	15
1.1.1 Câncer de mama	17
1.2 MARCAS DO CÂNCER	18
1.2.1 Metástase	20
1.3 TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL	22
1.4 MATRIZ EXTRACELULAR	28
1.4.1 Matrix Metaloproteinases	29
1.4.2 Syndecan	32
1.4.2.1 Syndecan-4	33
2. OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 CULTURA CELULAR	38
3.1.1 Modelo de indução da EMT com EGF	39
3.2 COLETA E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SECRETOMA E DO EXTRATO CELULAR	40
3.2.1 Coleta de proteínas do Secretoma	41
3.2.2 Coleta de proteínas para extrato total	41
3.2.3 Quantificação proteica pelo método de Bradford	42
3.3 ANÁLISE PROTEÔMICA	42
3.3.1 Preparo, tripsinização e extração das amostras	42
3.3.2 Desalting	43
3.3.3 Análise por espectrometria de massas	44
3.4 ENSAIOS FUNCIONAIS PARA VALIDAÇÃO DOS DADOS PROTEÔMICOS UTILIZANDO INIBIDOR DE IGF-1R	44
3.4.1 Análise da viabilidade celular com MTT	44
3.4.2 Ensaio de detecção de apoptose	45
3.4.3 Modelo de indução da EMT e diminuição da expressão de SDC4	47
3.4.4 Ensaio de migração celular	48
3.5 ENSAIO DE ZIMOGRAFIA	49
3.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA POR “WESTERN BLOTING”	50

3.6.1 Eletroforese de proteína e transferência.....	50
3.6.2. Bloqueio da membrana e detecção da proteína	51
4. RESULTADOS.....	53
4.1 VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE EMT UTILIZANDO EGF COMO INDUTOR.....	54
4.2 ANÁLISE PROTEÔMICA DE CÉLULAS MCF-7 INDUZIDAS AO PROCESSO DE EMT.	55
4.2.1 Avaliação da interação entre os grupos proteicos identificados a partir dos dados proteômicos.	59
4.2.2 Análise de expressão dos grupos proteicos a partir dos dados proteômicos.....	60
4.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR FRENTE AO COMPOSTO OSI-906.	62
4.3.1 Avaliação por ensaio de MTT	62
4.3.2 Avaliação por ensaio de apoptose com Anexina V	63
4.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM CÉLULAS INDUZIDAS A EMT TRATADAS COM OSI-906.....	66
4.5 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR POR ENSAIO DE “WOUND HEALING”	69
4.6 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE CLIVAGEM PROTEOLÍTICA DA PROTEÍNA SDC4.....	72
4.6.1 Avaliação do processo de “shedding” em amostras de secretoma	73
4.6.2 Avaliação da atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9	75
4.6.3 Análise da expressão das MMPs por “Western blotting”	76
5. DISCUSSÃO	78
6. CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS	90

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Câncer é o termo empregado para caracterizar um conjunto de doenças multifatoriais que possuem algumas características em comum, tais como crescimento celular desordenado, alterações genéticas e desregulação do ciclo celular. Essas células podem invadir tecidos e órgãos adjacentes, ou mesmo se propagar para outras regiões do corpo, causando uma disseminação sistêmica. O câncer inicia-se com episódios de mutações no ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico que, com o tempo, levam a uma desestabilização do ciclo celular, ocasionando mais mutações. Isso desencadeia a evolução tumoral das células afetadas (GOODALL; WICKRAMASINGHE, 2021).

Mutações são classificadas de acordo com a origem do agente mutagênico, podendo ser de origem interna ou externa, ambas com capacidade de danificar o DNA genômico. As mutações internas derivam de problemas associados ao mau funcionamento da maquinaria genética, como, por exemplo, os sistemas de reparo de pareamento do DNA. Já as externas estão ligadas a causas ambientais, como exposição à radiação, a compostos tóxicos e à ação de microrganismos. Devido à vasta maquinaria de reparação do genoma, a maioria desses danos, quando identificados, são reparados. No entanto, se essas mutações escapam aos sistemas de defesa do genoma e causam alterações significativas, a célula pode tornar-se tumoral. (GOODALL; WICKRAMASINGHE, 2021; SIEGEL et al., 2021; STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009).

Por mais que as células possam ter um ciclo celular altamente regulado, elas também possuem mecanismos de segurança para suprimir alterações que levariam a neoplasias. Contudo, células neoplásicas, após o dano a nível de DNA, vão acumulando, gradualmente, mutações genéticas e epigenéticas, o que resulta em alterações no padrão da expressão e funcionalidade de vários genes, levando a um funcionamento anormal do ciclo celular. Esse processo de desregulação que leva à expansão tumoral é conhecido como tumorigênese. Primeiramente, uma célula sofre uma mutação que lhe dá a capacidade de evasão de inibidores do ciclo celular, tais como a morte programada, o que permite uma maior atividade do ciclo, levando à formação do tumor. Com a multiplicação acelerada, abre-se espaço para a possibilidade de novas mutações ocorrerem, o que estimula o desenvolvimento de novas habilidades, tais como evasão do sistema imune, proliferação, invasão e migração. (HANAHAN; WEINBERG, 2011; REECE, et al., 2011)

Desde o século XX até os dias atuais, a taxa de morbidade e mortalidade pelo câncer vem diminuindo anualmente. Isso se deve, principalmente, à diminuição de riscos abióticos como o desuso do tabaco, uso de proteção contra raios ultravioleta e melhora no diagnóstico precoce. Esse último é altamente atrelado a uma maior taxa de sobrevivência do paciente, pois quanto antes detectado, menor a

agressividade e maiores as chances de sucesso do tratamento (OMS, 2023). Devido a isso, o diagnóstico de câncer segue em constante desenvolvimento e muitas técnicas sensíveis já são amplamente utilizadas, tais como detecção de marcadores tumorais, tomografia e ultrassom. Essas técnicas auxiliam os médicos a detectarem neoplasias nos pacientes mesmo em estágios iniciais, elevando a sobrevida do paciente (ZOU; WANG, 2018).

Por outro lado, com relação ao tratamento dessas neoplasias, as estratégias mais utilizadas ainda são a radioterapia e a quimioterapia, estandardizadas há décadas e sem grandes alterações ao longo dos anos. Uma problemática dessas terapias é sua baixa especificidade em células tumorais, o que causa diversos efeitos colaterais e danosos ao paciente. Essas complicações fazem com que a porcentagem de abandono da terapia e, por consequência, baixa sobrevida, sejam elevados. Esse tratamento convencional foca, majoritariamente, na inibição da proliferação celular, impedindo a expansão do tumor (ŚLIŻEWSKA; MARKOWIAK-KOPEĆ; ŚLIŻEWSKA, 2021). Atualmente, sabemos que um dos fatores mais agravantes associados ao câncer, responsável por 90% dos casos de morte, é o processo conhecido como metástase. Nesse estágio, a doença adquire a capacidade invasiva, migratória e de resistência aos agentes terapêuticos (DE IESO; YOOL, 2018; NGUYEN; BOS; MASSAGUÉ, 2009).

A medicina moderna vem, cada vez mais, utilizando terapias personalizadas para o tratamento de doenças à medida que o entendimento da relação gene-doença-hospedeiro se aprofunda. Esses tratamentos são direcionados ao paciente baseado no estilo de vida e na variabilidade genética intra e intertumoral, além de considerar o próprio sistema imune. Dentre eles, podemos citar a terapia CAR-T e o uso de anticorpos monoclonais, os quais fazem uso de tratamentos específicos para cada paciente e, nos últimos anos, vêm demonstrando resultados positivos (HOEBEN; JOOSTEN; VAN DEN BEUKEN-VAN EVERDINGEN, 2021; SALATI; SPALLANZANI, 2022; STERNER; STERNER, 2021; ZAHAVI; WEINER, 2020).

Neste contexto, o câncer destaca-se como uma das doenças com maior taxa de morte no mundo, com mais de 10 milhões de registros no ano de 2020, isso decorre, principalmente, devido a sua alta complexidade. Estima-se um aumento de até 70% em novos casos para as próximas décadas, principalmente devido ao maior envelhecimento da população (FERLAY et al., 2015; OMS, 2022). Somente nos Estados Unidos da América (EUA), em 2020, foram registrados cerca de 600 mil óbitos de pacientes com algum tipo de câncer. Para 2023, no mesmo país, estima-se cerca de 1,9 milhão de novos casos. (SIEGEL et al., 2023). Ademias, cerca de 40% da população americana pode desenvolver algum tipo de neoplasia ao longo da vida e, para o ano de 2038, os EUA estimam um gasto superior a

240 bilhões de dólares relacionados ao câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021). Os cânceres com maior incidência esperada para o ano de 2023 nos EUA são: o câncer de mama com 27% de todos os casos, de próstata (26%), pulmão (22%), cólon/reto (14%) e melanoma de pele (9%) (SIEGEL et al., 2023). Já no Brasil, também para o ano de 2023, o câncer de pele não melanoma se encontra em primeiro com 31% do total dos casos, seguido do câncer de mama feminino (10,5%), próstata (10%), colón e reto (6,5%), pulmão (5%) e estomago com 3% (INCA, 2022).

1.1.1 Câncer de mama

Dentre as cinco principais neoplasias que afetam os pacientes, podemos destacar o câncer de mama. Esta neoplasia é mais comum em mulheres do que em homens, correspondendo apenas a 1% de todos os casos de câncer de mama detectados. Outro fator importante no câncer de mama é a idade do paciente, pois essa neoplasia, considerada rara em jovens, tem correlação positiva entre a incidência e a idade elevada, apresentando maior incidência no Brasil próximo dos 50 anos (INCA, 2022). Somente esta neoplasia é responsável por mais de 30% de todos os casos de câncer em mulheres adultas e corresponde a mais de 15% das mortes de mulheres com câncer, apenas nos EUA. Além disso, estima-se cerca de 300 mil novos diagnósticos e 40 mil mortes para o ano de 2023, somente nos EUA (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2023; SUNG et al., 2021). Já no Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2022), foram registrados mais de 66 mil casos desse tipo de câncer em 2022 e, considerando os anos subsequentes até 2025, com um total de 700 mil novos casos de câncer, cerca de 70 mil serão, exclusivamente, de câncer de mama feminino, podendo apresentar uma taxa de mortalidade de, em média, 16%.

Esta neoplasia está muito relacionada a fatores genéticos, como a presença dos genes BRCA1 e 2, além do “*KRAS-variant*”, mas não exclusivamente, pois possui diversas associações externas, como consumo de álcool e obesidade (CDC, 2023). O agravamento desse tipo de câncer ocorre, principalmente, devido à metástase, facilitada pela proximidade com os linfonodos axilares e mamários internos, o que favorece a disseminação das células metastáticas pelo resto do corpo. Esse fator resulta em uma diminuição da taxa de resolução da doença e da sobrevida da paciente, reduzindo-a para menos de 25%. Contudo, o diagnóstico precoce do câncer de mama leva a uma maior taxa de sobrevida e a uma melhor resposta ao tratamento convencional. De fato, se os tratamentos iniciarem antes desses agravantes, a taxa de sobrevida se eleva para mais de 90% dos casos (SEELY; ALHASSAN, 2018).

1.2 MARCAS DO CÂNCER

O desenvolvimento tumoral é um processo que engloba dezenas de etapas conhecidas, as quais levam células saudáveis a um estado neoplásico por meio de um desenvolvimento progressivo. Esse processo consiste em alterações genéticas, bioquímicas e fenotípicas originalmente descritas por Hanahan e Weinberg, que servem como guia para estudos modernos da progressão tumoral. Além disso, os autores, em seu primeiro estudo, denominaram essas alterações como "*hallmarks*" do câncer. Assim, eles propuseram seis marcadores que seriam compartilhados pela maioria dos tumores e, juntos, forneceriam uma base para a compreensão da diversidade das neoplasias (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Hannahan e Weinberg determinaram seis "*hallmarks*" adquiridos pelas células durante o desenvolvimento tumoral. Esses incluem a autossuficiência em sinais proliferativos, estimulando a produção de fatores de crescimento celular. Além disso, há a insensibilidade a sinais anti-tumorais, caracterizada pelo bloqueio de vias de controle celular. A resistência à morte celular é outro aspecto destacado, envolvendo a produção de fatores evasivos da apoptose. O potencial replicativo ilimitado é alcançado por meio da super ativação do ciclo celular. Adicionalmente, indução da angiogênese pela produção do fator de crescimento do endotélio vascular. Por fim, a ativação da invasão tecidual e metástase é evidenciada, dentre várias coisas, pela subexpressão de proteínas fixadoras (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Após avanços significativos nos estudos relacionados ao câncer, os mesmos autores, já em 2011, publicaram uma complementação de seus trabalhos, expandindo o conceito dos "*hallmarks*". Nesse novo trabalho, eles revisaram os seis "*hallmarks*" originais, consideraram quatro novas características e ampliaram o entendimento do papel do estroma estrutural na neoplasia. Hanahan e Weinberg (2011), observaram que os tumores não são simplesmente massas isoladas de células cancerígenas em proliferação, mas sim tecidos complexos compostos por distintos grupos celulares que mantêm interações heterotípicas.

No contexto apresentado, os autores afirmaram que o estroma associado ao tumor desempenha um papel ativo na tumorigênese, opondo-se à visão prevalecente na época. Por conta disso, eles incorporaram as contribuições do 'microambiente tumoral' a esse processo. Além disso, eles identificaram a desregulação metabólica (aumento da glicólise anaeróbica mesmo na presença de oxigênio) e a evasão da vigilância imunológica (secreção de citocinas imunossupressoras) como novas características essenciais no desenvolvimento tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Adicionalmente, acrescentaram duas novas habilidades, chamadas de 'características facilitadoras', que estão correlacionadas ao desenvolvimento de outros “*hallmarks*” durante a tumorigênese. Essas características facilitadoras são: instabilidade genômica e mutação (aumento de fatores desestabilizantes genéticos) e a inflamação promovida pelo tumor (produção de citocinas pró-inflamatórias) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Mais recentemente, em 2021 e 2022, novos avanços foram feitos com o trabalho publicado por Senga e Grose (2021) e por Hanahan (2022) nos quais ficou proposto novos “*hallmarks*” e novas características facilitadoras. Estes novos parâmetros foram: a plasticidade fenotípica (desdiferenciação e transdiferenciação que levam a célula a um estado celular progenitor); reprogramação epigenética não mutacional (alteração da expressão genética regulada puramente por via epigenética); microbiomas polimórficos (diferentes microbiotas tumorais podem interferir na progressão do tumor e sustentar o desenvolvimento de outros “*hallmarks*”); células senescentes (contribuem para a proliferação, bloqueio da apoptose, induz angiogênese, estimulando invasão e metástases e suprime a imunidade tumoral) (**Figura 01**), (HANAHAN, 2022; SENGA; GROSE, 2021).



Figura 01: Compilado dos “*hallmarks*” do câncer

Fonte: traduzido (HANAHAN, 2022).

1.2.1 Metástase

Dentre os "*hallmarks*", a metástase é conhecida por promover a capacidade invasiva e migratória do tumor, destacando-se como um dos processos mais letais que um paciente diagnosticado pode enfrentar (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Isso ocorre porque, além de ter que combater o tumor inicial, agora é necessário enfrentar a disseminação e a formação de novos tumores em outros órgãos. De fato, entre os casos de morte associados ao câncer, em 90% deles, a doença adquire a capacidade invasiva e migratória para os demais tecidos por meio da metástase, tornando o diagnóstico de metástase um mau prognóstico para o paciente (SIEGEL et al., 2023).

A migração celular envolve a translocação de organismos multicelulares e unicelulares para promover sua sobrevivência em diferentes ambientes. No entanto, para células de mamíferos, esse processo é mais comum durante o desenvolvimento embrionário e diminui à medida que as células finalizam a etapa de diferenciação. Em circunstâncias patológicas, como nas neoplasias, a célula pode sofrer desdiferenciação, e a habilidade de migração pode ser ativada, ocasionando a metástase (GERSTBERGER; JIANG; GANESH, 2023).

Metástase é um processo composto por diversos fatores que desencadeiam a perda das junções intercelulares, desarranjo na matriz extracelular (MEC) e levam a célula a adquirir a capacidade de mobilidade e invasão (SUHAIL et al., 2019). Esses fatores fazem parte da cascata de invasão metastática, subdividida em três etapas conhecidas como disseminação, dormência e colonização como pode ser visualizado na **figura 02** (TALMADGE; FIDLER, 2010).

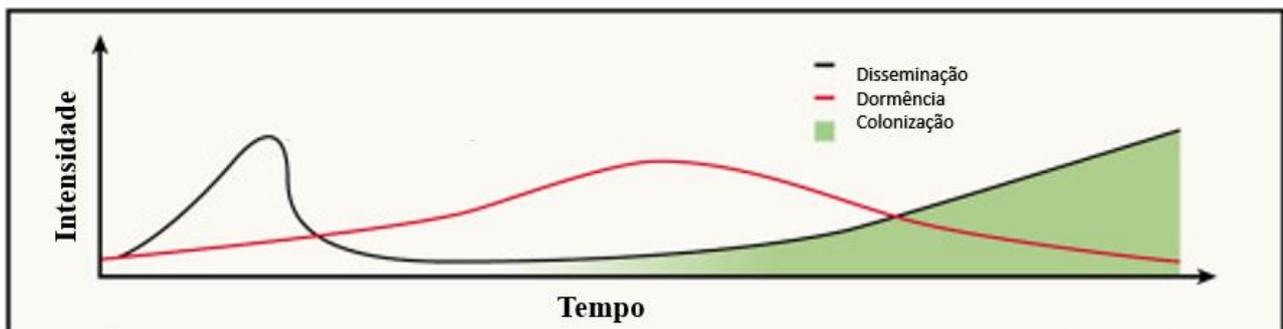


Figura 02: Cascata de invasão metastática

Fonte: traduzido (GERSTBERGER; JIANG; GANESH, 2023).

Durante a primeira etapa da cascata, a disseminação, as células tumorais perdem as interações célula-célula ao subexpressarem moléculas de adesão celular e invadem as camadas mais profundas

do tecido através da membrana basal. Esse início pode ocorrer por meio de diversos processos, sendo a Transição Epitelial-Mesenquimal (EMT) um dos mais destacados. Na EMT, as células tumorais passam por transformações fenotípicas, perdendo suas características epiteliais e adquirindo características mesenquimais. Além disso, há um aumento na atividade proteolítica da MEC que envolve a célula, permitindo um aumento da mobilidade (RIBATTI; TAMMA; ANNESE, 2020).

Existem vários grupos diferentes de moléculas de adesão celular, como as caderinas, integrinas, selectinas e a superfamília de imunoglobulinas. Entre elas, destacamos a E-caderina (CDH1), considerada um supressor tumoral, pois a sua subexpressão está correlacionada ao aumento da motilidade celular, metástase e a um mau prognóstico no câncer (CORSO et al., 2020; GERSTBERGER; JIANG; GANESH, 2023).

Após a disseminação, as células promovem o intravasamento para os vasos sanguíneos ou linfáticos e, por fim, o extravasamento para órgãos distantes. Uma vez na circulação, essas células tumorais enfrentam processos de estresse oxidativo, imunológico e físico que dificultam a proliferação e colonização em um novo tecido. Devido a isso, algumas células podem entrar em dormência (segunda etapa), caracterizada pelo desenvolvimento tumoral lento (GERSTBERGER; JIANG; GANESH, 2023). Devido à dormência e ao ambiente hostil para as células tumorais circulantes, o processo como um todo é considerado ineficiente. De fato, estima-se que menos de 1% das células tumorais circulantes consigam colonizar outros tecidos. Essa baixa taxa de sucesso deve-se principalmente aos estresses celulares mencionados anteriormente, que afetam a célula em circulação ao longo da cascata de invasão metastática (SETHI; KANG, 2011).

Por fim, a última etapa é caracterizada pela estabilização das células metastáticas no novo tecido, formando um novo tumor macroscópico devido ao aumento da proliferação e ao desenvolvimento do microambiente tumoral. Após esse processo, o tumor pode se desenvolver no novo tecido, levando à disfunção do órgão, colapso sistêmico e, por fim, à morte do paciente (GERSTBERGER; JIANG; GANESH, 2023).

A progressão de um tumor primário para o estágio de metástase é um processo complexo que envolve várias etapas, cada uma com intrincadas interações entre a célula tumoral e seu ambiente não celular. Após o processo da EMT, um dos pontos mais importantes na cascata metastática é a degradação parcial dos componentes que formam o microambiente tumoral composto pela MEC (MEC) (VENNING; WULLKOPF; ERLER, 2015).

A MEC atua como uma barreira física para a migração celular para outras regiões do corpo e é regulada pela expressão e atividade de diferentes proteínases. Em condições de progressão tumoral, a regulação entre as proteínases é perdida, favorecendo o processo de invasão celular, uma vez que a barreira física, a MEC, está sendo degradada (FIGUEIRA, 2006).

1.3 TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL

O processo de alteração fenotípica da célula e ganho de mobilidade durante a disseminação na metástase é conhecido como EMT. Esse processo é caracterizado pela alteração fenotípica das células, suprimindo suas características epiteliais e superexpressando as mesenquimais (YANG et al., 2020; ZHENG; KANG, 2014) Dentre essas características, destacam-se a diminuição de marcadores epiteliais como a CDH1; aumento de marcadores mesenquimais como a N-caderina (CDH2); reorganização do citoesqueleto e degradação da membrana basal. Essas transformações resultam na perda da polaridade apical-basal das células epiteliais, além da redução do contato entre elas, culminando na aquisição de mobilidade e capacidades invasivas e migratórias (CHAFFER et al., 2016).

Existem três principais variedades distintas da EMT, não limitadas a processos patológicos, como pode ser visto na **figura 03**. A EMT-1 é observável durante as fases iniciais da embriogênese. Nessa etapa, as três camadas germinativas formam-se através do processo ontogenético denominado gastrulação. Esse processo envolve o movimento de células epiteliais dependentes da EMT, resultando na formação do mesênquima migratório. Esse mesênquima progride ao longo da linha primitiva e se multiplica em novas áreas do embrião que evoluem para a mesoderme e a endoderme (MOUSTAKAS; HELDIN, 2007; YANG et al., 2020). Além disso, essas células também são capazes de reverter o processo da EMT, conhecido como Transição Mesenquimal-Epitelial (MET), responsável pela geração dos epitélios secundários (BRABLETZ et al., 2021).

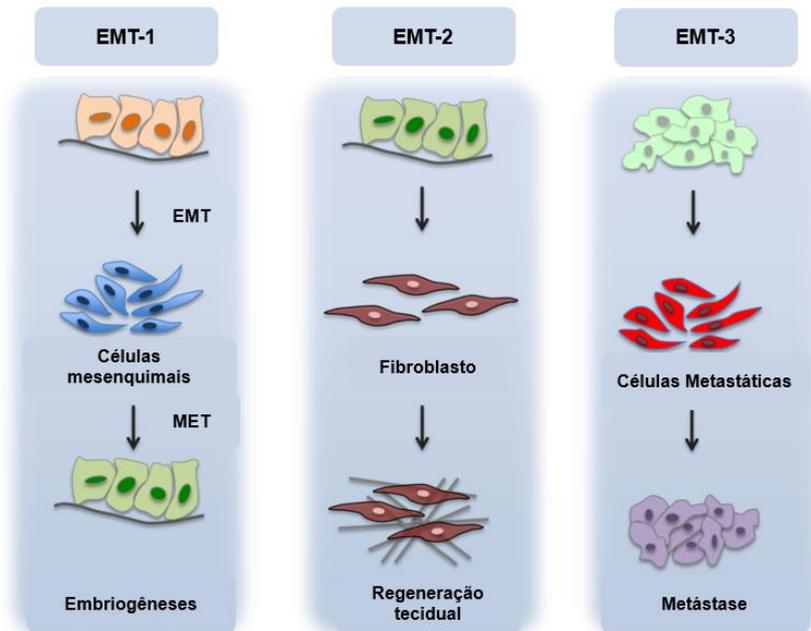


Figura 03: Tipos de EMT (EMT-1; EMT-2 e EMT-3)

Fonte: traduzido (MARCONI et al., 2021).

A EMT do tipo 2 está associada à cicatrização de feridas, regeneração de tecidos e fibrose de órgãos (**Figura 03**). Esse tipo de EMT ocorre como parte de um processo inflamatório associado à reparação, no qual fibroblastos e células imunológicas regionais liberam citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas, ao entrarem em contato com células epiteliais adjacentes, estimulam o processo. Estas células, quando estimuladas, se diferenciam em células mesenquimais semelhantes a miofibroblastos com o objetivo de promover a reparação tecidual causada por inflamações ou lesões. No entanto, se o processo inflamatório for crônico, a formação anormal de miofibroblastos pode resultar em uma fibrose progressiva que causa a destruição do parênquima do órgão devido à deposição excessiva da MEC (MARCONI et al., 2021).

Ao contrário das EMT-1 e 2, que estão associadas a atividades fisiológicas, a EMT-3 é exclusiva de processos patológicos, como o processo metastático em pacientes com neoplasias (**Figura 03**). A EMT-3 ocorre à medida que as células epiteliais sofrem modificações e adquirem características mesenquimais, como mobilidade, essencial para a progressão tumoral, tornando-se metastáticas. Assim como na EMT-1, a MET é vital para a formação do tumor secundário (MARCONI et al., 2021).

O processo de EMT é induzido por um conjunto de fatores genéticos e epigenéticos, principalmente por fatores de transcrição, tais como Zinc Finger E-Box-binding Homeobox 1 e 2 (ZEB1 e 2), Zinc Finger Protein SNAI 1 (SNAIL), Zinc Finger Protein SNAI2 (SLUG) e Twist-related

protein 1 (TWIST). Esses fatores são conhecidos por suprimirem proteínas epiteliais, como a CDH1, e ativarem proteínas mesenquimais, como a Vimentina (VIM), a Fibronectina e a CDH2 (BRABLETZ et al., 2021). A designação 'transição' na EMT deriva da existência de fenótipos intermediários que, ao longo do processo, apresentam maior ou menor expressão desses marcadores. Nesse processo, as extremidades representam estados integrais tanto epitelial quanto mesenquimal. Assim, essas moléculas podem ser consideradas marcadores da EMT, indicando o estado do fenótipo celular como pode ser visto na **figura 04** (ZHANG; WEINBERG, 2018).

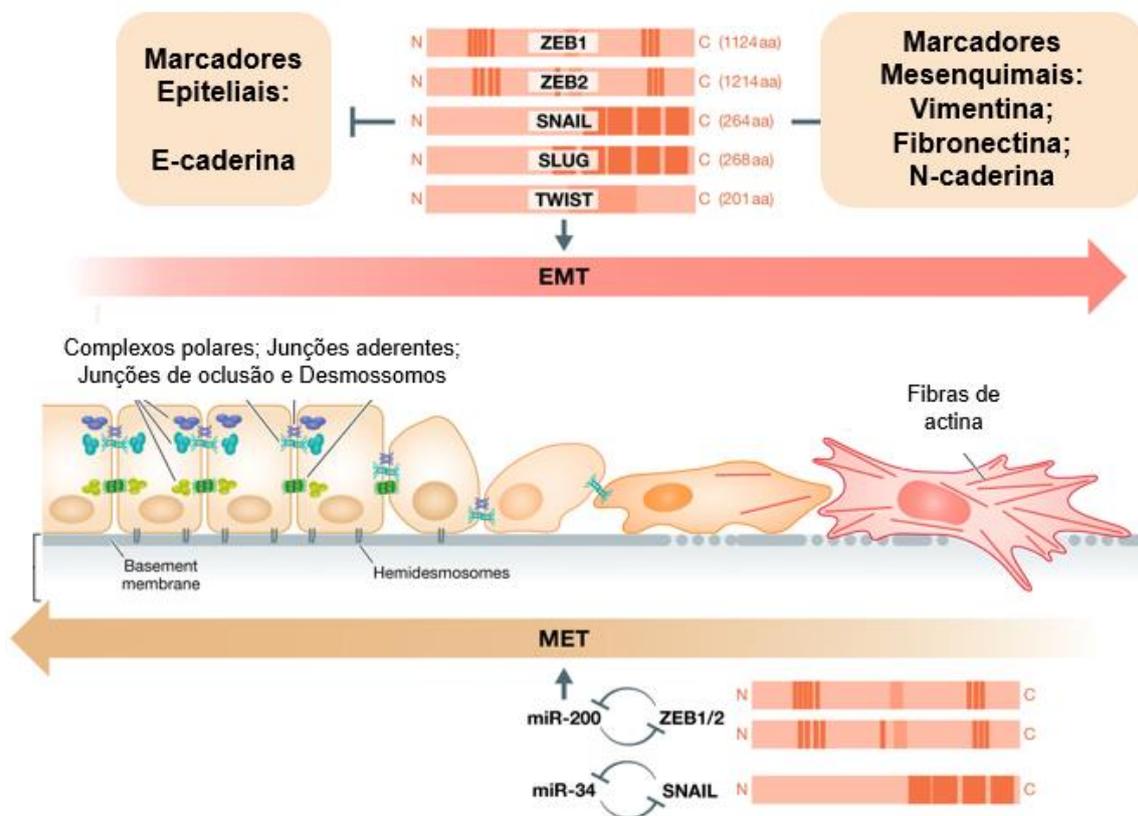


Figura 04: Processo dinâmico e transicional da EMT e MET

Fonte: Adaptado (BRABLETZ et al., 2021).

Na extremidade epitelial, as células exibem polaridade apical-basal e são mantidas juntas por proteínas de adesão, como as junções intercelulares "*tight junctions*", as junções aderentes "*adherens junctions*", os desmossomos e as junções comunicantes "*gap junctions*", as quais são ancoradas à membrana basal subjacente por hemidesmossomos como pode ser visualizado na **figura 04** (BRABLETZ et al., 2021). Com o aumento da expressão dos fatores de transcrição mencionados anteriormente, as células vão diminuindo a expressão das proteínas de adesão e, simultaneamente, aumentando a expressão das proteínas de caráter mesenquimal, tornando-as móveis e invasivas. Na extremidade mesenquimal, as células já exibem características fenotípicas com a expressão de

proteínas de superfície e do citoesqueleto que conferem mobilidade, como a VIM e a CDH2 (DAS et al., 2019).

Além disso, como vimos, o processo da EMT pode ser reversível, permitindo que a célula suprima os marcadores mesenquimais e volte a expressar os epiteliais. Esse processo é conhecido como MET e é frequentemente observado no desfecho da metástase, quando as células tumorais circulantes se fixam em um novo tecido formando, primeiramente, a micro metástase e podendo evoluir para a macro metástase (PEI et al., 2019). A MET é principalmente mediada pela ação de microRNAs, como das famílias miR-200 e mir-34, que regulam um ciclo de feedback negativo para os genes ZEB1/2 e SNAIL, levando à restauração da expressão das proteínas de adesão e dos marcadores epiteliais (**Figura 04**) (BRABLETZ et al., 2021).

Diversos mecanismos biomoleculares estão envolvidos na indução e regulação do processo da EMT, incluindo vias interconectadas ou independentes e moléculas de sinalização. Esses mecanismos são ativados por fatores de crescimento celular ou diferentes componentes intra e extracelulares que desencadeiam uma variedade de redes de sinalização, resultando na indução do processo de EMT na célula (DAS et al., 2019; ZHENG; KANG, 2014). Dentre esses mecanismos, podemos destacar o papel de várias moléculas de sinalização, como o Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), o Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β), o Fator de Crescimento Hepático, o Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1 (IGF-1), o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas e as vias de sinalização NF- κ B e WNT (YANG et al., 2002).

Essas proteínas e vias são responsáveis pela indução ou ativação de uma ampla gama de fatores de transcrição que desencadeiam o processo de EMT, como SNAIL, SLUG, ZEB1 e 2, TWIST1. Contudo, para o desenvolvimento desse processo, são necessárias outras vias de sinalização intracelular, tais como as Quinases Reguladas por Sinal Extracelular (Erk)/Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK), Fosfoinosítideo 3-quinase /Proteína Quinase B (PI3K)/(AKT), Smads, RhoB, Beta-catenina, Fator de Ligação do Intensificador Linfóide, Ras e c-Fox (BRABLETZ et al., 2021). Além disso, os fatores de transcrição, quando superexpressos na célula, também são capazes de ativar, *in vitro*, o próprio processo de EMT (PALMA, 2018; PASTUSHENKO; BLANPAIN, 2019).

No que diz respeito aos receptores de EGF, como o EGFR ou ErbB-1, e o IGF-1, conhecido como IGF-1R, estudos destacam a expressão anormal desses receptores como uma das principais causas da progressão tumoral e da metástase em várias linhagens de câncer, incluindo câncer de mama (SCHELCH et al., 2021). Quanto às vias intracelulares de sinalização, tanto o EGFR quanto o IGF-1R, ao serem fosforilados, ativam as vias de RAS/ERK1/2 e PI3K/AKT, as quais estão associadas a

processos da EMT como por exemplo: o aumento da proliferação e a invasão celular. O EGFR ativa essas vias por meio da ativação das proteínas SRC e Grb2; enquanto o IGF-1R o faz por meio da SHC e IRS como pode ser mais bem visualizado na **figura 05** (IANZA et al., 2021; XU et al., 2017).

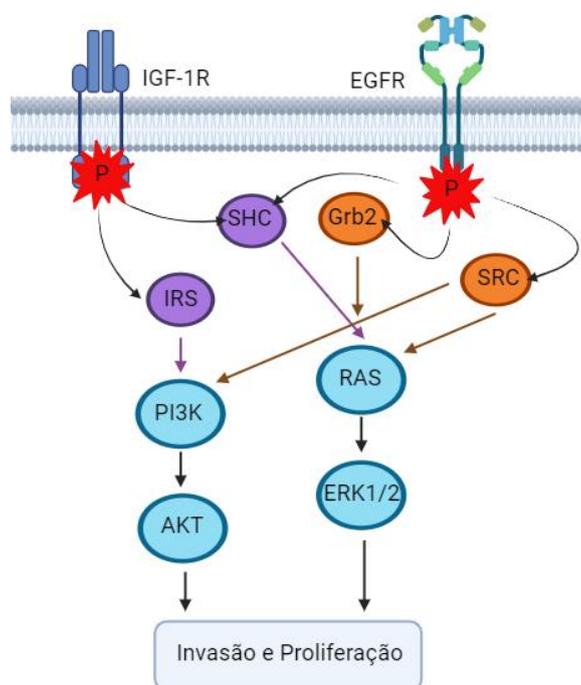


Figura 05: Congruências das vias de sinalização do IGF-1R e do EGFR envolvidas na EMT

Fonte: do próprio autor, figuras do BioRender.com

O processo de EMT também é regulado por diversos mecanismos, sejam eles genéticos ou epigenéticos. Um dos fatores genéticos mais comumente associados e que desempenha um papel chave na regulação da EMT é o fator de transcrição SNAIL. Sua superexpressão tem a capacidade de induzir o processo de EMT *in vitro* (PALMA, 2018). Esse fator é frequentemente encontrado superexpresso em vários tipos tumorais e está correlacionado com a agressividade tumoral, metástase, recidiva e mau prognóstico. Isso se deve à sua capacidade de inibir a transcrição de proteínas epiteliais importantes, como a CDH1 (CAI et al., 2019), e de ativar proteínas mesenquimais, como a VIM, entre outros fatores (CANO; NETO, 2017). Esses e outros papéis do SNAIL estão dispostos na **figura 06**.

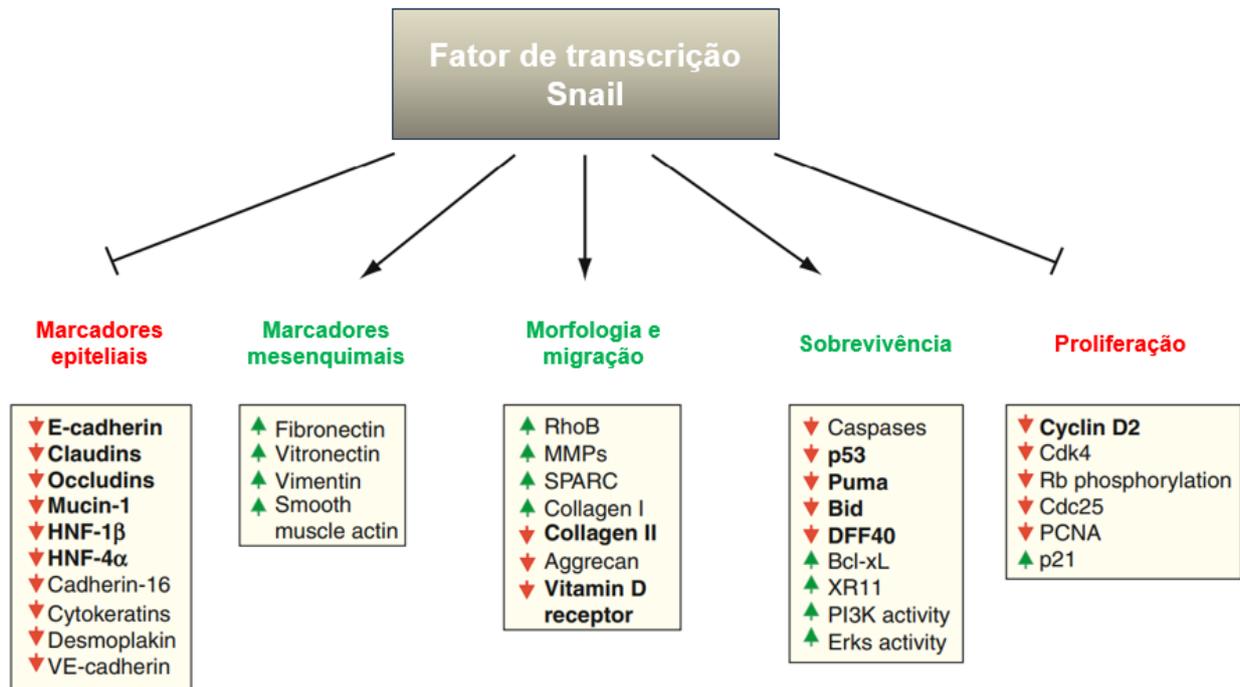


Figura 06: Papéis dos fatores de transcrição SNAIL envolvidos no processo de EMT

Fonte: traduzido (CANO; NETO, 2017).

Com relação aos mecanismos regulatórios epigenéticos envolvidos na EMT, destacam-se a metilação do DNA; a ação dos microRNAs e as modificações na cromatina e nas histonas. Todos esses desempenham papéis importantes tanto na indução quanto na reversão da EMT, alterando as expressões de genes associados ao processo (**Figura 04**) (PASTUSHENKO; BLANPAIN, 2019).

Além disso, durante o processo de EMT a MEC desempenha um papel essencial, uma vez que, a EMT, depende de diversos fatores e proteínas de superfície que estão altamente correlacionados com a MEC (EBLE; NILAND, 2019). Muitas proteínas da MEC estão associadas à indução da EMT por meio da ativação de cascatas de sinalização mediadas por receptores. Por exemplo, os glicosaminoglicanos HA demonstram associação com o processo de EMT quando desregulados em células epiteliais e *in vivo* (HELDIN et al., 2013). Além disso, o colágeno I desempenha um papel intrínseco na indução e manutenção da EMT, uma vez que interage com a integrina $\beta 1$, desestabilizando o complexo CDH1 e regulando positivamente o CDH2 (GILKES et al., 2013; KOENIG et al., 2006).

1.4 MATRIZ EXTRACELULAR

A Matriz Extracelular, ou MEC, é uma rede tridimensional, dinâmica e não celular constituída por macromoléculas extracelulares. Além de fornecer suporte estrutural e bioquímico às células circundantes, é fundamental para a homeostase e o desenvolvimento celular. Isso decorre da regulação de fatores de crescimento e citocinas, controle do potencial hidrogeniônico (pH) do microambiente e comunicação célula-célula. Ademais, é responsável pela adesão e proliferação celular (WALKER; MOJARES; DEL RÍO HERNÁNDEZ, 2018). Existem dois tipos principais de MEC que diferem em localização e composição. Uma é a matriz de tecido conjuntivo intersticial, que envolve as células e fornece suporte estrutural aos tecidos; a outra é a membrana basal, uma forma mais especializada que promove a separação do epitélio e do estroma circundante (BONNANS; CHOU; WERB, 2014).

A MEC possui diversos componentes, dentre os quais destacamos as proteínas fibrosas, como colágeno e elastina, conferindo resistência e elasticidade às células; as proteases, como as matriz metaloproteinases (MMPs), que regulam a abundância, composição e estrutura da MEC; glicoproteínas, como a fibronectina e a laminina, que interagem com os proteoglicanos e glicosaminoglicanos, conferindo viscosidade à MEC (**Figura 07**). Todos esses componentes interagem com células epiteliais, servindo como ligantes para receptores celulares e transmitindo sinais que podem regular a adesão, proliferação, migração, apoptose, sobrevivência ou diferenciação celular (BONNANS; CHOU; WERB, 2014).

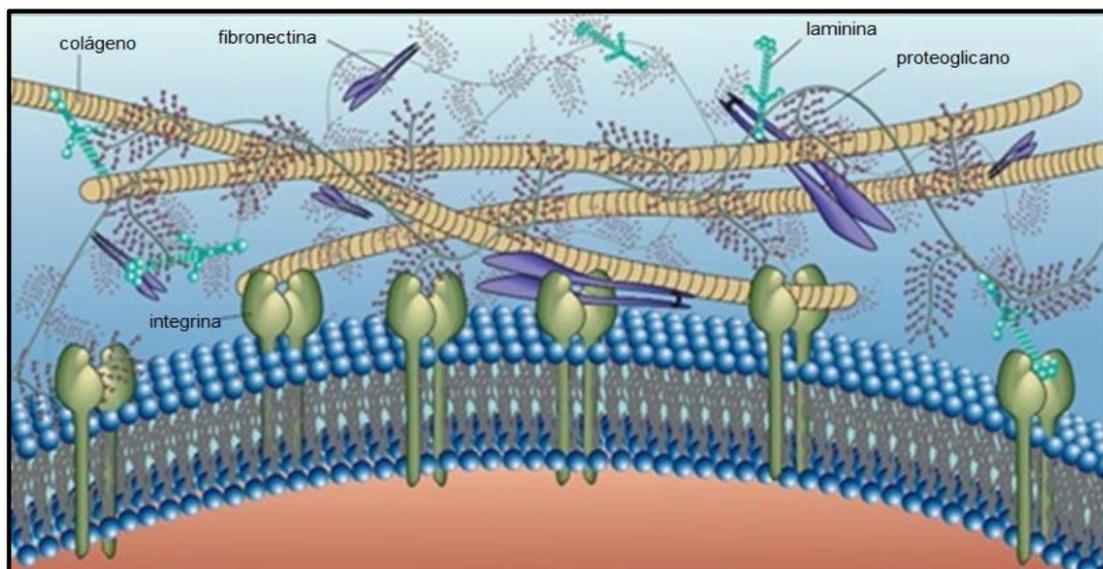


Figura 07: Estrutura principal da matriz extracelular

Fonte: (ONYEISI, 2022)

As proteínas presentes na MEC são, em sua maioria, sinalizadoras que, ao serem reconhecidas por receptores celulares, como integrinas, sindecans, CD44 e distroglicanos, induzem vias de sinalização intracelular que facilitam a montagem de diferentes componentes da própria MEC. Esses componentes formam estruturas fibrosas semelhantes a folhas, no caso da membrana basal, ou uma malha de fibras, cujas características variam de acordo com o tecido (MOUW; OU; WEAVER, 2014).

Essas proteínas ou fragmentos proteicos da MEC são liberados através de processos de clivagem da própria matriz, o que leva à regulação e remodelagem da MEC, influenciando, como mencionado, as vias das células adjacentes. Além disso, as próprias células estão constantemente envolvidas na reconstrução e remodelação da MEC por meio da síntese, degradação e modificação química (SOLES et al., 2023). Esta remodelação ocorre tanto durante condições fisiológicas quanto patológicas, e é altamente regulada. Essa regulação é mediada por enzimas, como as MMPs, A desintegrina e metaloprotease (ADAM), e as ADAMs com motivos de trombospondina (THEOCHARIS et al., 2016). De fato, a remodelação desregulada da matriz está associada a patologias e à progressão de doenças, como a fibrose e o câncer (EBLE; NILAND, 2019).

A MEC desempenha um papel fundamental ao fornecer sinais essenciais para a manutenção da polaridade celular e para regular tanto o crescimento quanto a apoptose celular. Essas características, entre muitas outras, são vitais para conter a progressão tumoral (EBLE; NILAND, 2019). No entanto, em situações patológicas de desregulação, a MEC pode favorecer a progressão tumoral. De fato, segundo Bergamaschi e colaboradores (2008), as características genéticas da MEC em células de câncer de mama podem prever o prognóstico do paciente. Por exemplo, tumores com elevada expressão de inibidores de protease estão correlacionados com um bom prognóstico. Por outro lado, a alta expressão de MMPs está associada a um mau prognóstico e a um maior risco de recorrência (BERGAMASCHI et al., 2008).

1.4.1 Matrix Metaloproteinases

As MMPs foram descobertas em 1962 durante estudos envolvendo colágeno e a metamorfose em caudas de girino (GROSS; LAPIERE, 1962). Elas constituem um grupo de proteases dependentes de zinco com diferentes papéis na remodelação e degradação dos componentes da MEC. Esta família de enzimas possui uma estrutura consensual com um domínio catalítico de metaloproteinase. A maioria das MMPs é secretada pelas células, enquanto uma minoria apresenta um domínio transmembrana, que as ancora à célula, transformando-as em enzimas de superfície celular (CUI; HU; KHALIL, 2017). Em humanos, são descritas 23 MMPs diferentes, classificadas de acordo com seus

substratos, como collagenases, gelatinases, estromelisinases e do tipo de membrana como pode ser visto na **figura 08** (NEWBY, 2007).

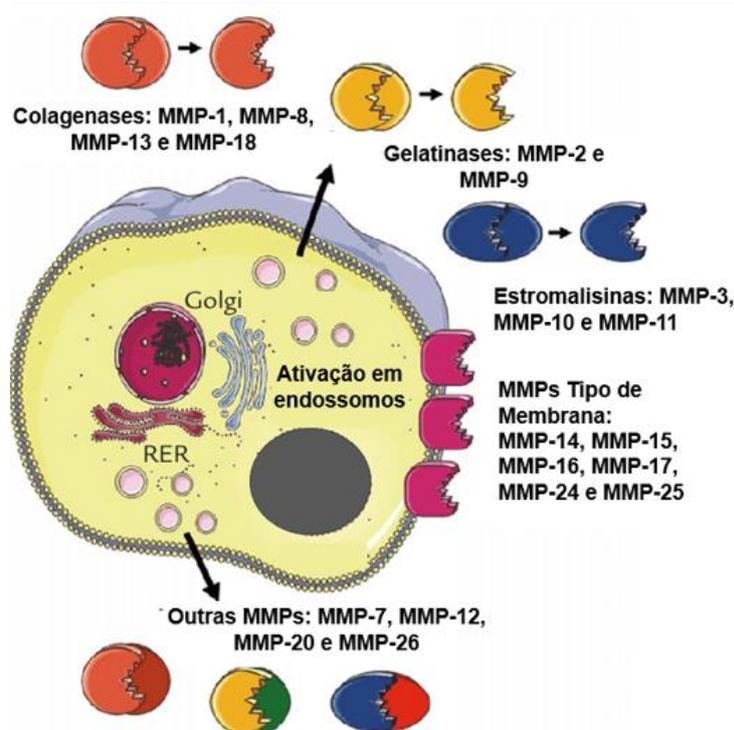


Figura 08: Classificação das MMPs humanas

Fonte: adaptado de (NEWBY, 2007).

As proteinases em geral são responsáveis pelo processo de clivagem de proteínas na superfície celular, fenômeno conhecido como "*shedding*", sendo as MMPs algumas das principais proteinases responsáveis por esse processo (REISS; SAFTIG, 2009). De fato, as MMPs degradam diversas biomoléculas na superfície celular e na região pericelular. Entre elas estão proteinases e seus ativadores e inibidores, fatores de coagulação e de crescimento celular, proteínas ligadas a esses fatores, moléculas quimiotáticas, receptores de superfície, moléculas de adesão celular e, principalmente, proteínas da MEC (BERGAMASCHI et al., 2008).

O processo de "*shedding*" ou clivagem proteolítica é um dos mecanismos-chave para regular a função de uma ampla variedade de proteínas na superfície celular. Esse processo representa uma modificação pós-traducional irreversível que regula a função de proteínas e várias sinalizações intra e extracelulares. Além disso, pode regular a disponibilidade de sinais proteicos para células vizinhas (REISS; SAFTIG, 2009). A clivagem das proteínas da superfície celular ocorre geralmente próxima à membrana plasmática, formando duas subunidades: uma extracelular, contendo o fragmento do domínio extracelular, e uma intracelular, com os domínios citoplasmático, transmembrana e um

fragmento peptídico do domínio extracelular. O primeiro fragmento é liberado para o meio extracelular, enquanto o segundo permanece ancorado na membrana plasmática. Em alguns casos, esses fragmentos podem atuar como moléculas sinalizadoras para a própria célula ou células adjacentes (REISS; SAFTIG, 2009).

Uma das famílias de MMPs em particular, as ADAMs, são proteínas classificadas como tipo de membrana e constituem o principal grupo das MMPs responsáveis pelo processo de clivagem de ectodomínios. As ADAMs estão envolvidas em diversos processos, como migração celular, cicatrização de feridas, desenvolvimento celular, controle da imunidade, proliferação celular e angiogênese (BOLIK et al., 2021). Proteínas que sofrem ação das ADAMs têm funções e atividades variadas, dentre essas proteínas podemos citar as caderinas, L-selectinas, ligante Fas, TNF α , EGFR, proteína precursora de amiloide, receptor e ligante Notch (GÓMEZ-GAVIRO et al., 2007; LIU et al., 2006; NAJY; DAY, K.; DAY, M., 2008; NAUS et al., 2006).

Como observamos, as MMPs desempenham um papel fundamental no controle celular e estão envolvidas em diversas funções celulares. Portanto, essas enzimas possuem uma regulação intrincada e complexa. Sua expressão é estimulada por várias moléculas, como citocinas, fatores de crescimento e interações célula-célula, além de serem reguladas a nível transcricional pela própria célula. Outro mecanismo de controle dessas enzimas está relacionado aos ativadores e inibidores proteicos endógenos, proporcionando várias formas de regulação. Além disso, a célula pode controlar as MMPs modulando a secreção, a localização na superfície celular e a degradação (GAFFNEY et al., 2015).

Embora sejam altamente reguladas, essas enzimas são mais frequentemente encontradas superexpressas e ativas em cânceres malignos do que em tecidos normais. Esse fenômeno é particularmente evidente em áreas onde o tumor promove uma invasão ativa do estroma, induzindo a degradação da MEC (CABRAL-PACHECO et al., 2020). Conforme discutido, a degradação da MEC por MMPs não apenas facilita o processo de invasão tumoral, mas também afeta o comportamento celular, estimulando e facilitando a progressão do câncer (NILAND; RISCANEVO; EBLE, 2022).

Correlações positivas entre a expressão de MMPs e um mau prognóstico em pacientes com diferentes tipos de câncer têm sido observadas em seres humanos (CABRAL-PACHECO et al., 2020). De fato, níveis elevados de MMPs estão associados a tumores mais invasivos e disseminados, pois essas enzimas facilitam a migração através da degradação da MEC. Além disso, um aumento na expressão de MMPs é um preditor independente de mau prognóstico e está relacionado a uma baixa taxa de sobrevida (BONNANS; CHOU; WERB, 2014).

Além de seu papel conhecido na progressão maligna, através da degradação da MEC e da remoção das barreiras físicas que facilitam a invasão e metástase do tumor, estudos têm mostrado que as MMPs também estão envolvidas nos estágios iniciais do desenvolvimento do câncer, como na fase inicial da EMT (QUINTERO-FABIÁN et al., 2019). Durante a EMT, várias proteínas, especialmente as de contato célula-célula, podem sofrer "shedding" para perder o contato e ganhar mobilidade (NILAND; RISCANEVO; EBLE, 2022). Dessa forma, as MMPs desempenham um papel importante no processo de progressão tumoral, agindo em vários estágios desse processo e permitindo que etapas dessa progressão sejam facilitadas ou até induzidas.

1.4.2 Syndecan

A família de proteínas Syndecan (SDC) foi inicialmente descrita por Saunders e colaboradores em 1989 durante estudos com células epiteliais de mama (SAUNDERS et al., 1989). Essas proteínas são parte dos proteoglicanos transmembranares expressos por várias células de vertebrados e invertebrados. Os SDCs desempenham um papel crucial na adesão e migração das células, além de atuarem como co-receptores para diversos fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e outras moléculas de sinalização (GOPAL, 2020; HASSAN et al., 2021).

Existem quatro tipos de SDCs o um, dois, três e o quatro e todos estão ancorados na membrana plasmática e possuem moléculas de heparan sulfato que possuem interações com diversas proteínas além de terem papel importante na adesão celular (**Figura 09**). O SDC1 é principalmente expresso em células epiteliais, mesenquimais, em alguns leucócitos e durante o período embrionário. Estudos com ratos knockout para SDC1 mostraram defeitos na migração de células epiteliais (COUCHMAN et al., 2015). O SDC2 é encontrado em tecidos mesenquimais, células neuronais, hepáticas e epiteliais, desempenhando uma função importante na angiogênese. Já o SDC3 é expresso em tecidos neurais e músculo-esqueléticos, e ratos knockout para SDC3 apresentaram problemas neuronais (COUCHMAN et al., 2015). Por fim, o SDC4 é mais amplamente distribuído, podendo ser detectado em quase todos os tipos celulares; o knockout dessa proteína resultou em deficiência na angiogênese e progressão tumoral (KELLER-PINTER et al., 2021).

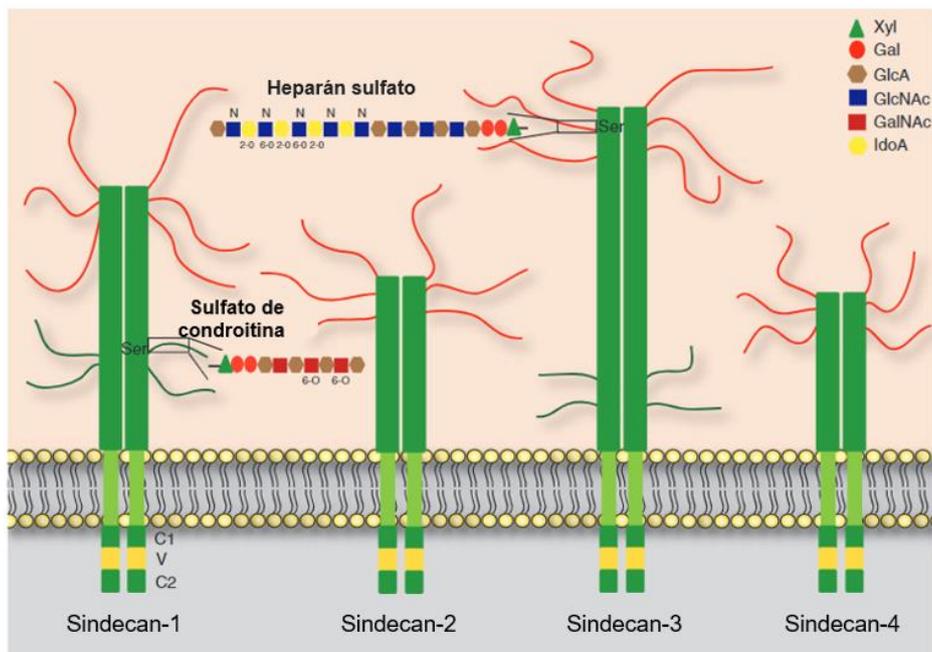


Figura 09: Os quatro tipos de SDC de humanos e seus proteoglicanos

Fonte: adaptado (MANON-JENSEN; ITOH; COUCHMAN, 2010).

Os SDCs, assim como as proteínas transmembranares em geral, são compostos por três domínios: um extracelular glicosilado, que apresenta a maior variação entre os quatro tipos de SDCs; um domínio transmembranar altamente conservado e hidrofóbico; e um domínio citoplasmático responsável pela transdução de sinais celulares. Além disso, o ectodomínio do SDC sofre o processo de clivagem por ADAMs constitutivamente, mas em condições patológicas, como no câncer, esse efeito pode ser amplificado (MANON-JENSEN; ITOH; COUCHMAN, 2010).

1.4.2.1 Sindecan-4

O SDC4 é conhecido por ser expresso abundantemente em células do fígado, rim, cérebro, pulmão, mama, coração, músculo esquelético e intestino (NCBI, 2023). Essa proteína desempenha um papel crucial na adesão celular e é importante para outras funções celulares, como organização, estrutura, proliferação, migração, sobrevivência e endocitose. (COUCHMAN et al., 2015). Ela é reconhecida por regular a organização do citoesqueleto, atuando como componente central que conecta a fibronectina, a integrina e os elementos intracelulares. Experimentos de silenciamento gênico do SDC4 demonstraram que essa rede de proteínas do citoesqueleto não chega a ser formada (CAVALHEIRO et al., 2017).

Na membrana celular, o SDC4 desempenha diversos papéis envolvidos na sua interação com a MEC, desde molécula de sinalização citoplasmática a proteína de suporte. Com relação a sinalização

citoplasmática, o SDC4 contribui para diversas vias que desencadeiam a captação de recursos para a MEC; adesão celular, endocitose e formação de exossomos (ELFENBEIN; SIMONS, 2013). Essa proteína também pode interagir diretamente com fatores de crescimento celular, incluindo o fator de crescimento dos fibroblastos 2 e o EGFR. No que diz respeito a este último receptor, o SDC4 afeta a sinalização mediada por EGF, modulando-a por meio de interações com a Integrina $\beta 4$ e, dessa forma, impactando a migração de células epiteliais (WANG et al., 2014).

Quanto à regulação, o SDC4 é principalmente regulado pelo seu ectodomínio, que sofre o processo de "*shedding*". Como mencionado, esse processo é altamente regulado por MMPs e pode estar desregulado em diversas condições patológicas, incluindo o câncer (MANON-JENSEN; ITOH; COUCHMAN, 2010). Apesar de o SDC4 ser detectado em células saudáveis de mama, foi observada uma correlação positiva entre a expressão dessa proteína e a presença de receptores de estrogênio e progesterona (BABA et al., 2006). Ademais, no contexto do câncer de mama, demonstrou-se que a inibição do IGF-1R reduz em 50% a expressão de SDC4 por meio de um mecanismo endocítico não completamente esclarecido (AFRATIS et al., 2017). Outrossim, foi demonstrado que, os proteoglicanos com heparam sulfato e os genes associados à sua síntese, também têm expressões alteradas em células de câncer de mama em comparação com células saudáveis (TEIXEIRA et al., 2020).

Além de estar correlacionada, alterações na expressão do SDC4 também contribuem para a progressão tumoral. Diversos estudos demonstraram que o SDC4 desempenha um papel importante nos "*hallmarks*" do câncer, regulando e modulando vários desses marcadores: dentre eles, podemos citar a autossuficiência em sinais proliferativos, ativando a via da ERK e induzindo a proliferação (CORTI et al., 2013); resistência à morte celular, ativando vias como MAPK e ERK (GUO et al., 2020); promoção da invasão tecidual e metástase, ao modular a atividade de LL-37 e de MMPs relacionadas à migração celular (HABES; WEBER; GOUPILLE, 2019); e indução da angiogênese, pois o SDC4 interage diretamente com proteínas responsáveis pela angiogênese (CAVALHEIRO et al., 2017).

A expressão de SDC4 pode ser modulada por diversos compostos, alguns dos quais já foram aprovados pelo "*Food and Drug Administration*" dos EUA como drogas anticâncer. Por exemplo, o uso de zoledronato regula positivamente a expressão de SDC4 e reduz a habilidade de invasão de células de câncer de mama. O trastuzumabe e panitumumabe reduzem a expressão de SDC4 em células endoteliais resistentes à "Anoiquis". O silenciamento de SDC4 por miRNAs também reduz a invasividade, capacidade proliferativa, angiogênese, motilidade e adesão à MEC em células de câncer de mama (ONYEISI et al., 2021).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Este trabalho teve como objetivo identificar e avaliar em detalhes proteínas clivadas da superfície de células de adenocarcinoma de mama induzidas ao processo de EMT por EGF através da análise proteômica do extrato total e secretoma das células

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar o processo de EMT em células de adenocarcinoma de câncer de mama (MCF-7) utilizando o EGF como indutor;
- Obter extratos e meios de cultura condicionados para a análise proteômica a partir das amostras de MCF-7 induzidas ao processo de EMT;
- Selecionar proteínas candidatas para estudo detalhado e envolvimento no processo de clivagem de superfície celular;
- Estudar mecanismos associados a proteína SDC4 selecionada a partir dos dados obtidos;
- Avaliar a viabilidade celular de MCF-7 em tratamento com o inibidor de IGF-1R por ensaio de MTT e apoptose;
- Analisar a expressão de proteínas-chave no extrato total e no secretoma de MCF-7 induzidas ao processo de EMT e tratadas com OSI-906;
- Analisar a migração celular, por ensaio de “*wound healing*” de MCF-7 induzidas ao processo de EMT e tratadas com OSI-906.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTURA CELULAR

A cultura de células foi realizada utilizando a linhagem celular MCF-7 (ATCC HTB-22TM), a qual é uma linhagem epitelial proveniente de adenocarcinoma de glândula mamária. Para o cultivo, foram utilizadas garrafas de 75 cm² (Greiner Bio-one) contendo o meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12 (DMEM-F12) (Gibco), enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell), 1% de antibiótico estreptomicina-penicilina (Gibco) e 1% de piruvato de sódio (Gibco). As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C (Panasonic), em uma atmosfera contendo 5% de CO₂.

A linhagem foi obtida a partir de alíquotas congeladas em nitrogênio líquido contendo $1,5 \times 10^6$ células por tubo. Após o descongelamento parcial, o conteúdo foi adicionado a um tubo com 10 mL de meio de cultura. Este foi homogeneizado e centrifugado em 1200 rotações por minuto (rpm) por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o pellet, contendo as células, suspenso em meio de cultura e semeado em uma garrafa de 75 cm². Esta foi deixada por 72 horas a 37°C para a fixação celular e expansão da linhagem (**Figura 10 A**). O crescimento celular foi monitorado por meio de um microscópio de fase invertida (Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss), a cada dois dias, o meio de cultura era totalmente renovado e, quando se alcançava 80% de confluência celular, realizávamos a passagem para duas novas garrafas. Todo o processo de cultura celular ocorreu dentro de uma cabine de segurança biológica classe II A1. Ademais, foram seguidos todos os protocolos recomendados para manter a esterilidade dos materiais e dos reagentes.

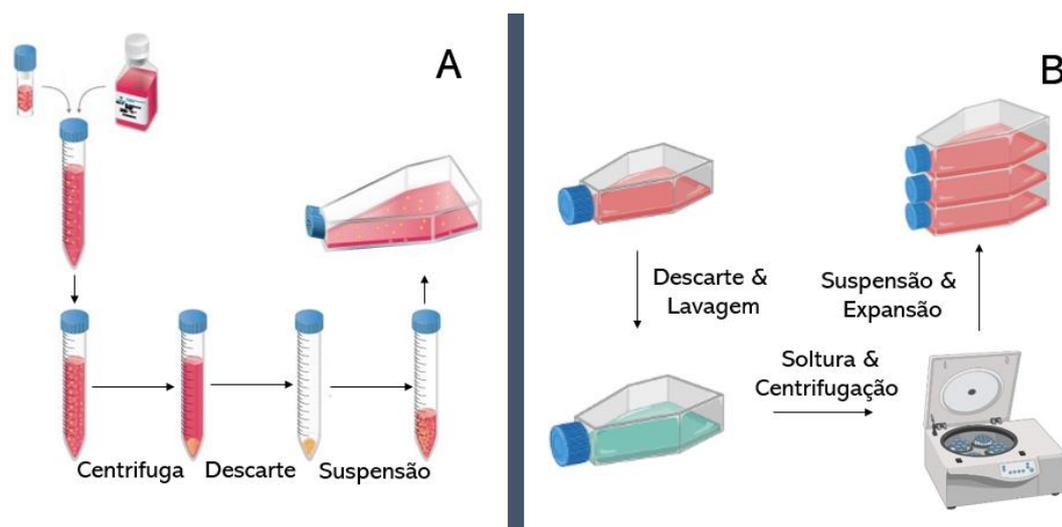


Figura 10: “Workflow” dos processos base da cultura celular

Fonte: Do próprio autor com ícones de Biorender.com

Para realizar as passagens, realizamos o processo de tripsinização celular. Inicialmente, o meio de cultura foi descartado, e a camada celular foi lavada com uma solução estéril de tampão fosfato de sódio (PBS 1X) pH 7,2. Em seguida, foram adicionados sequencialmente 5 mL de tripsina-ácido etilenodiamino tetra-acético 1% (Sigma Aldrich) à garrafa, a qual foi deixada na estufa de 37°C por 4 minutos para que as células se desprendessem. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de meio de cultura com 10% de SFB para inativação da atividade da tripsina. A solução foi coletada e transferida para um tubo Falcon de 15 mL, sendo centrifugada a 1200 rpm por 5 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e o pellet foi suspenso em meio de cultura para a expansão (**Figura 10 B**).

3.1.1 Modelo de indução da EMT com EGF

O processo de indução da EMT utilizando EGF foi conduzido de acordo com o protocolo previamente estabelecido pela aluna de doutorado Camila de Souza Palma (2018). Para a indução do processo, utilizamos o fator de crescimento EGF (rhEGF, R&D Systems, cat #236-EG) por 48 horas, com três adições na concentração de 10 ng/mL cada (PALMA, 2018).

Inicialmente, $1,0 \times 10^6$ células foram repicadas em placas de 100 mm com meio de cultura contendo 10% de SFB por 24 horas. Após esse período, o meio foi trocado para 1% de SFB e deixado por mais 24 horas. Passadas mais 24 horas, o meio de cultura foi novamente trocado para 1% de SFB com EGF na concentração de 10 ng/mL. No dia seguinte, o meio foi novamente trocado para um novo com as mesmas condições do anterior. Por fim, 12 horas após a segunda adição, foi acrescentado um novo meio com 0,5% de SFB também com EGF (**Figura 11**).

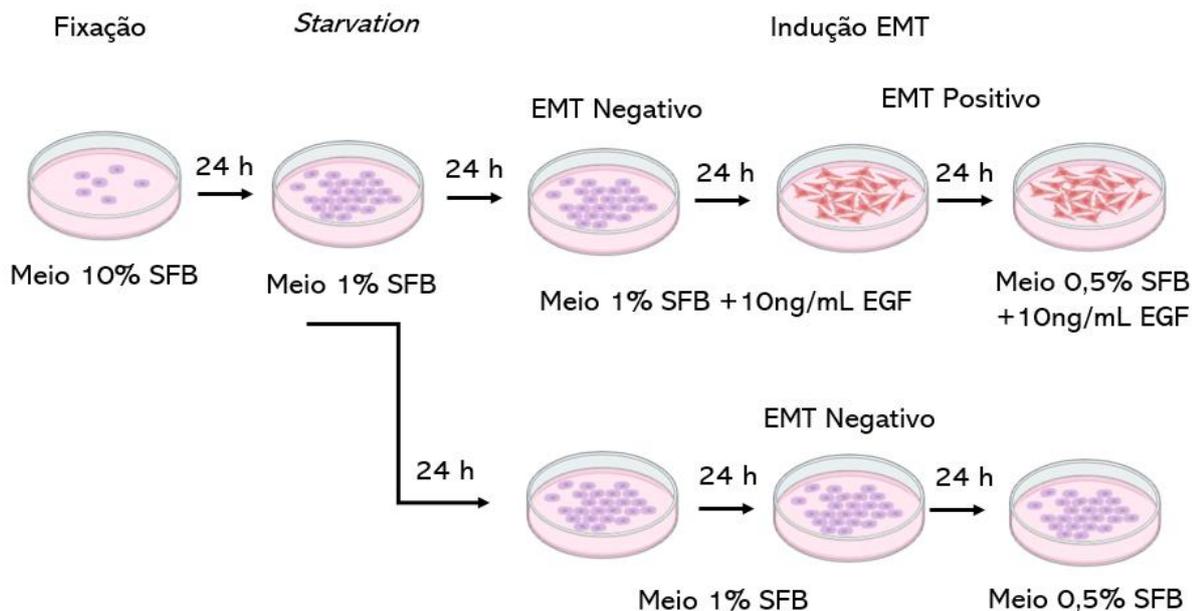


Figura 11: "Workflow" das etapas para a indução do processo de EMT

Fonte: Do próprio autor, ícones de Biorrender.com

3.2 COLETA E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SECRETOMA E DO EXTRATO CELULAR

Após a conclusão do processo de tratamento das células, iniciamos a etapa de coleta, tanto do material secretado quanto do extrato total, por meio do processo de raspagem celular. O fluxo de trabalho ("Workflow") desse processo está apresentado na **figura 12**.

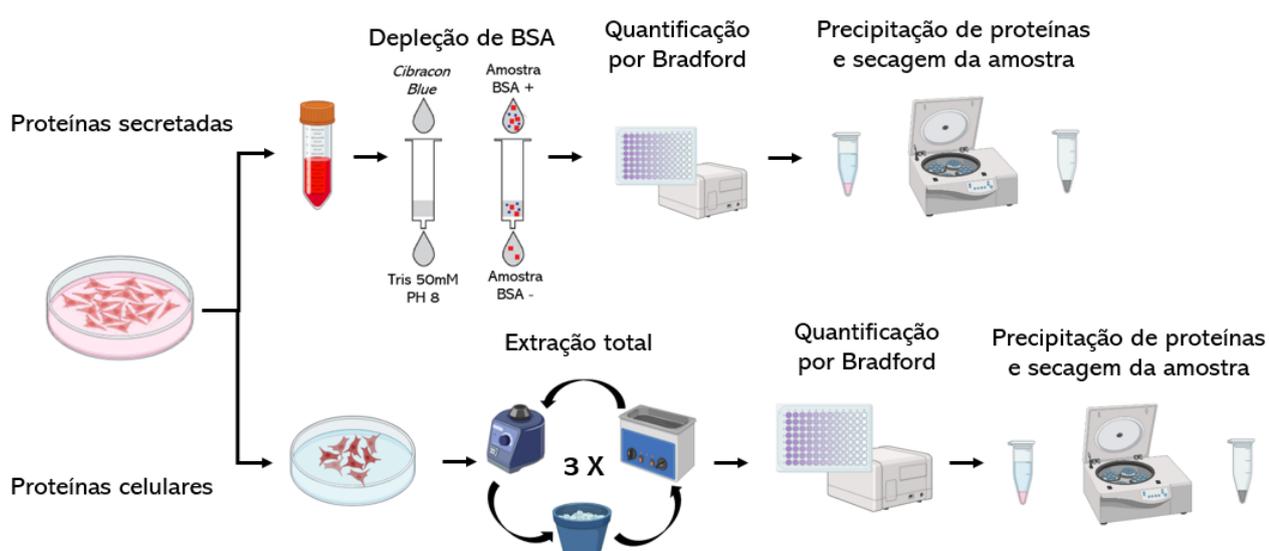


Figura 12: "Workflow" dos processos de coleta de proteínas com as amostras de MCF-7

Fonte: Do próprio autor, ícones de Biorrender.com.

3.2.1 Coleta de proteínas do Secretoma

As proteínas secretadas foram obtidas a partir do meio de cultura condicionado, transferindo 5 ml para tubos contendo 1% de inibidor de protease (Sigma Aldrich, cat #P8340) e 1% de inibidor de fosfatase ortovanadato de sódio (Sigma Aldrich, cat #S6508). Os tubos foram agitados por 10 segundos e centrifugados a 500 xg por 5 minutos a 4°C. Ao final, o sobrenadante contendo as proteínas secretadas foi armazenado em freezer a -80°C, e o pellet contendo debris celulares foi descartado.

Para reduzir a presença da albumina sérica bovina (BSA) presente no SFB, foi utilizado a técnica de depleção da BSA com a resina Cibracon Blue 3GA agarose (Sigma-Aldrich) (1 mL de resina retira 1,8 mg de BSA da amostra), conforme descrito por Di Girolamo e Righetti (2011). Essa técnica baseia-se na separação de materiais por fase sólida, na qual a BSA é captada pela resina, e o restante é eliminado, configurando um processo de cromatografia por afinidade (DI GIROLAMO; RIGHETTI, 2011). A técnica foi iniciada com 2 mL de resina em uma coluna com filtro poroso. Seu conteúdo foi lavado três vezes com solução de Tris 50 mM, pH 8,0. Após cada lavagem, a amostra foi centrifugada a 1000 xg por 20 segundos. Em seguida, o meio de cultura foi adicionado à coluna e, após 30 segundos de agitação leve, o conteúdo foi coletado e reservado sem a presença de BSA, enquanto a resina foi descartada.

Após o processo de depleção de BSA, a amostra foi concentrada e quantificada utilizando a técnica de Bradford (BRADFORD, 1976). Em seguida, a amostra foi precipitada com uma solução de precipitação (50% de acetona, 49.5% de etanol e 0,5% de ácido acético), sendo deixada no freezer a -20°C por 24 horas. O objetivo foi remover o Fenolsulfoftaleína (“*Fenol Red*”) presente no meio utilizado. Ao final, a amostra foi centrifugada a 10000 xg por 25 minutos e seca em uma SpeedVac (Concentrator plus, Eppendorf).

3.2.2 Coleta de proteínas para extrato total

Após a coleta do secretoma, as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS 1X, pH 7,2 e raspadas com um “*Cell Scraper*” para um tubo. Em seguida, centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado, e o pellet reservado. Os pellets coletados foram suspensos em tampão de extração (Ureia 8 M, Tris 0,1 M, pH 8,0, com 1% de inibidor de protease e inibidor de fosfatase), e extraídos em três ciclos de 30 segundos em vórtex, 5 minutos de ultrassom em banho (UltraSonic Cleaner 750, Unique) e 5 minutos de resfriamento em gelo. Ao final dos ciclos, as amostras foram centrifugadas a 20000 xg por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante, contendo as proteínas extraídas,

foi coletado e o pellet, contendo debris celulares, descartado. O sobrenadante foi quantificado pela técnica de Bradford (BRADFORD, 1976), precipitado utilizando a solução de precipitação e seco em Speed Vac.

3.2.3 Quantificação proteica pelo método de Bradford

O método utilizado para quantificar tanto as amostras de proteínas secretadas quanto do extrato total foi a quantificação baseada no método descrito por Bradford (1976). O processo foi realizado em uma placa de 96 poços de fundo chato com um volume total de 200 μL , sendo 20 μL de amostra (diluídas 50 e 100 vezes em água Milli-Q) e 180 μL do reagente de Bradford (BioRad, Quick Start Bradford 1x Dye Reagent). Foi realizada uma faixa de linearidade para a obtenção da equação da reta de absorvância nas concentrações de 0,25 a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, utilizando a proteína BSA (Albumina bovina fração V, Sigma-Aldrich). A reação ocorreu por 15 minutos no escuro e, em seguida, a absorvância foi medida em 595 nm por meio de um espectrômetro de placas (VersaMax Microplate Reader). Com o auxílio da faixa de linearidade e os valores de absorvância, foi possível determinar a concentração final das amostras de extrato total e das proteínas secretadas em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.3 ANÁLISE PROTEÔMICA

As amostras contendo as proteínas secretadas e do extrato total, provenientes de linhagem celular de MCF-7 induzida ou não à EMT por EGF, foram processadas para análise proteômica global em colaboração com o Professor Doutor Leonard Foster, laboratórios Michael Smith da Universidade da Colúmbia Britânica em Vancouver no Canadá.

3.3.1 Preparo, tripsinização e extração das amostras

Inicialmente, as amostras foram lavadas e precipitadas com uma solução de acetona a 100%. Após a precipitação, as amostras foram diluídas em um tampão (312,5 mM Tris, pH 6,8, 10% Dodecil sulfato de sódio (SDS), 50% glicerol, 0,1% azul de bromofenol) e acrescidas de 10 mM de cloridrato de tris(2-carboxietil) fosfina e 40 mM de cloroacetamida, conforme o protocolo proposto por Goodman e colaboradores (2018). Ao final, foram aquecidas em banho seco (Eppendorf Thermomixer R Mixer) por 5 minutos a 70 °C (GOODMAN et al., 2018).

Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) (Mini-PROTEAN TGX, BIO-RAD), utilizando o protocolo proposto por Candiano e

colaboradores (2004). A corrida foi realizada em um sistema de eletroforese vertical (PowerPac Basic Power, Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra cell, Bio-Rad) com tampão tris/glicina (tris 25 mM; glicina 192 mM e 0,1% SDS, pH 8,5) a 200V por 15 min. Terminada a corrida, o gel foi lavado com água e fixado com 40% etanol e 10% ácido acético por 20 minutos à temperatura ambiente sob agitação. Subsequentemente, o gel foi corado com 0,12% coomassie-G250, 10% (NH₄)₂SO₄, 10% ácido fosfórico e 20% metanol, e deixado à temperatura ambiente "*overnight*" sob agitação em banho seco (CANDIANO et al., 2004).

No dia seguinte, o gel foi lavado e cada uma das canaletas foi cortada e fracionada. As frações foram adicionadas a um tubo, seguido de lavagens com NH₄HCO₃/EtOH até a descoloração e desidratação completa do gel. Posteriormente, o gel foi centrifugado para remoção completa do EtOH e 0,8 µg de tripsina (NEB P8101S), foi adicionado ao gel desidratado em duas adições de 0,4 µg. A amostra foi deixada em uma estufa a 37 °C "*overnight*" e, no dia seguinte, foi adicionado 80 µL de TFA a 1% para interromper a reação enzimática.

O processo de extração foi realizado em quatro ciclos, sendo três deles com 100 µL de acetonitrila (ACN) a 40% e um a 100%. Cada ciclo consistiu em adicionar a solução na amostra e deixar em banho seco por 30 minutos a 25°C sob agitação de 800 rpm. No final de cada ciclo, o volume foi coletado e seco em SpeedVac para remoção total da porção orgânica.

3.3.2 Desalting

Terminada a extração, iniciou-se o processo de "*desalting*" utilizando a técnica de "*Stage tip*", baseada no protocolo estabelecido por Rappsilber, Mann e Ishihama (2007). Neste protocolo, foi utilizado uma ponteira de 200 µL contendo filtro e resina C18, com o objetivo de purificar a amostra e coletar apenas os peptídeos de interesse para análise em MS. O condicionamento da resina foi realizado com 50 µL de metanol, equilibrada com 100 µL de TFA a 0,2% e, a amostra, foi acidificada com TFA a 0,1% e adicionada à ponteira. O material foi lavado com 100 µL de TFA a 0,2%, e no final, foram realizados 2 ciclos de eluição com 80 µL de solução ácida (40% ACN e 0,1% TFA). O volume coletado foi denominado de eluído, o qual foi seco em SpeedVac e quantificado por NanoDrop (Thermo Fisher - A205, scopes) (RAPPSILBER; MANN; ISHIHAMA, 2007).

3.3.3 Análise por espectrometria de massas

O espectrômetro de massas (MS) utilizado para a coleta dos dados foi o TimsTOF Pro2 (Bruker Daltonics), acoplado a um NanoElute “*Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*” (UHPLC) (Bruker Daltonics), com uma coluna (10 cm x 75 µm de diâmetro interior, 1,9 µm de tamanho de partícula com emissor de 20 µm aquecido a 40°C) (Bruker PepSep Tem). Para a corrida, foi utilizado um gradiente padrão de 30 minutos, diminuindo a porcentagem do tampão A (0,1% de ácido fórmico e 0,5% de ACN) e aumentando do tampão B (0,1% de ácido fórmico e 99,4% de ACN) de 2% para 12% durante 15 minutos e, em seguida, para 33% em mais 15 minutos. A análise foi efetuada utilizando o modo de aquisição “*Data Dependent Acquisition-Parallel Accumulation Serial Fragmentation*” (DDA-PASEF) e, os dados coletados, foram analisados no software FragPipe para a identificação das proteínas observadas pelo MS. Como base de dados, foi utilizado o proteoma de *Homo sapiens* disponível no site da Uniprot. As proteínas identificadas foram filtradas pelo software Perseus por organismo e, com auxílio do Uniprot, foram selecionadas apenas proteínas transmembranas.

3.4 ENSAIOS FUNCIONAIS PARA VALIDAÇÃO DOS DADOS PROTEÔMICOS UTILIZANDO INIBIDOR DE IGF-1R

A partir dos dados proteômicos analisados, ficou determinado que conduziríamos os ensaios funcionais com a proteína SDC4, devido ao fato da sua alta detecção nos dados proteômicos e por ser uma proteína de superfície que sofre o processo de “*shedding*”. Além disso, também foi verificado que, na literatura, essa proteína está envolvida na progressão tumoral em diferentes linhagens celulares (HABES; WEBER; GOUPILLE, 2019; MANON-JENSEN; ITOH; COUCHMAN, 2010). Para mimetizar o observado nos dados, foi estabelecido um tratamento que reduzisse a expressão de SDC4, sendo assim, o composto Lincitinib (OSI-906) (MedChemExpress) foi selecionado. Este composto atua inibindo a autofosforilação e a sinalização do IGF-1R, impedindo a ativação das vias Akt e ERK1/2, o que leva a uma diminuição da expressão de SDC4, como demonstrado por *Afratis et al.* (2017) utilizando outro composto, mas com mesma atividade.

3.4.1 Análise da viabilidade celular com MTT

A análise da viabilidade celular foi conduzida utilizando o Brometo de tiazolil azul de tetrazólio (MTT) em resposta ao composto OSI-906 em diferentes concentrações, com base no IC₅₀ (Selleckchem), seguindo o protocolo adaptado proposto por Kumar, Nagarajan e Uchil (2018). As células, aproximadamente 5x10⁴ células, foram cultivadas em placas de 96 poços com 100 µL de

DMEM-F12 contendo 10% de SFB, e mantidas em estufa a 37°C por 24 horas. No dia seguinte, o meio de cultura foi trocado para 1% de SFB e deixado por mais 24 horas. No terceiro dia, o composto OSI-906 foi adicionado em diferentes concentrações (9, 18, 36, 72 e 144 nM) e avaliado por até 4, 8, 12 e 24 horas. Para fins de controle, foi realizado o branco da droga e da amostra, um controle negativo livre da droga e um controle positivo com 50 µM de tamoxifeno (MicroSouce Discovery Systems, Pharmakon 1760).

Após o período de incubação, foi adicionado 100 µL de meio 10% SBF contendo MTT na concentração de 0,5 µg/mL. A placa com as células foi mantida em estufa de 37°C por 2 horas. A reação foi interrompida pela remoção de 75 µL do meio com o MTT e a adição de 50 µL de dimetilsofoxido (DMSO) 100%. Após 10 minutos em estufa, o volume dos poços foi coletado e quantificado em um espectrofotômetro (VersaMax Microplate Reader) em 540 e 720 nm (**Figura 13**) (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018). A análise foi realizada subtraindo dos valores da absorbância de 540 nm a média da absorbância dos brancos e a de 720 nm.

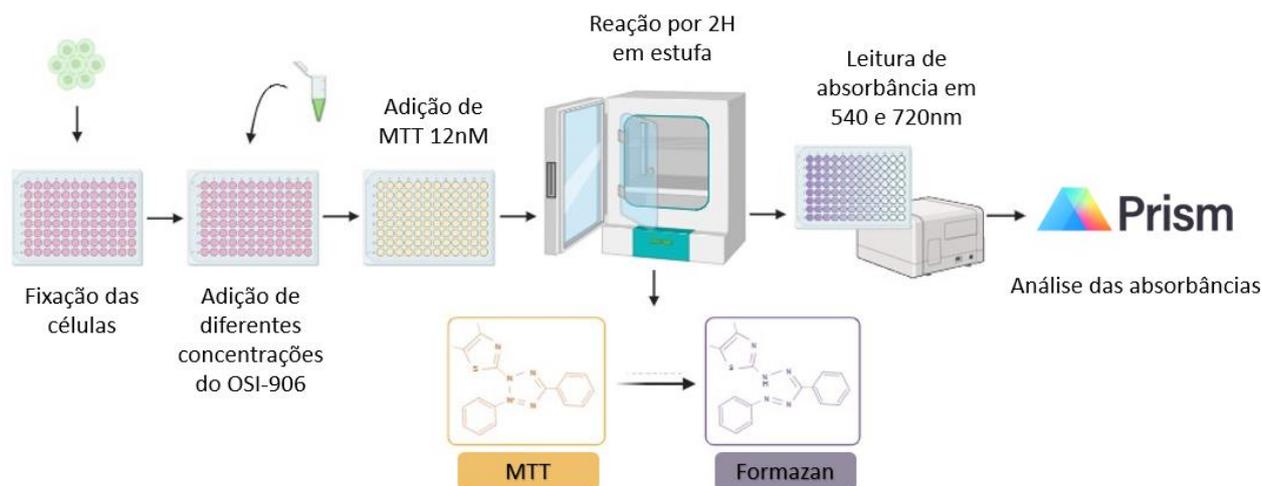


Figura 13: Sequência exemplificada do protocolo do ensaio de MTT

Do próprio autor ícones de Biorrender.com.

3.4.2 Ensaio de detecção de apoptose

O ensaio de apoptose foi conduzido em colaboração com a técnica Camila Bonaldo do Hemocentro da FMRP-USP, utilizando a marcação de células com Anexina V (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Pharmingen) seguindo o protocolo do fabricante. Para isso, 3×10^5 células foram plaqueadas em placas de 6 poços com 1,5 mL de meio de cultura contendo 10% de SFB e mantidas em estufa de 37°C por 24 horas. No dia seguinte, o meio foi trocado para 1% de SFB e

deixado na estufa por mais 24 horas. No terceiro dia, foi adicionado meio 10% SFB com 72 e 36 nM de OSI-906 por 12 e 24 horas. Para fins de controle, foram realizados um controle negativo sem a presença do composto e um positivo com 2 μ M artesunato (MicroSouce Discovery Systems, Pharmakon 1760).

Ao final do ensaio, as células foram tripsinizadas, lavadas duas vezes com PBS 1X gelado, pH 7,2. Um total de 1×10^5 células de cada poço foram retiradas e suspensas em 96 μ L do tampão de ligação 1X, pH 7,0 em tubos de citometria. A cada tubo foram acrescidos 5 μ L de Anexina V e 10 μ L de Iodeto de Propídio (IP). Os tubos foram deixados no escuro por 15 minutos em temperatura ambiente. Decorrido o período, as células foram analisadas por citometria de fluxo (**Figura 14**).

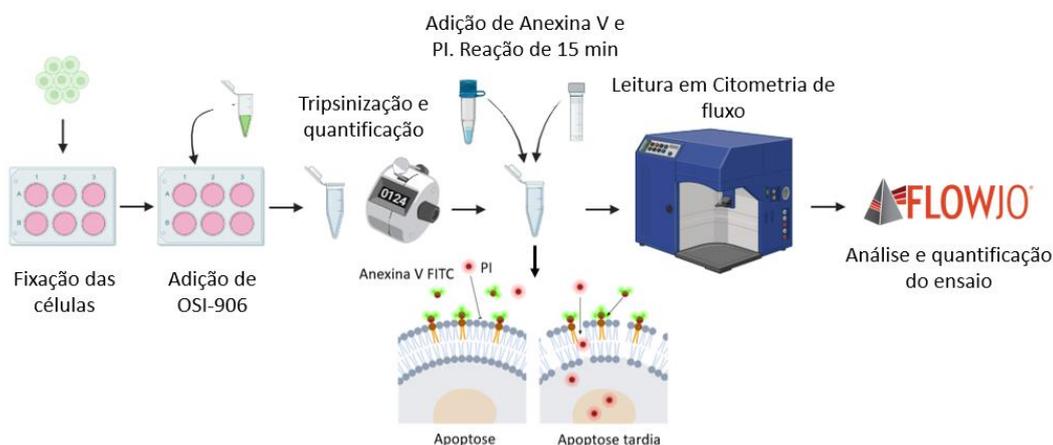


Figura 14: Esquema do ensaio de apoptose utilizando Anexina V e IP frente ao composto OSI-906

Fonte: Do próprio autor com ícones de Biorrender.com.

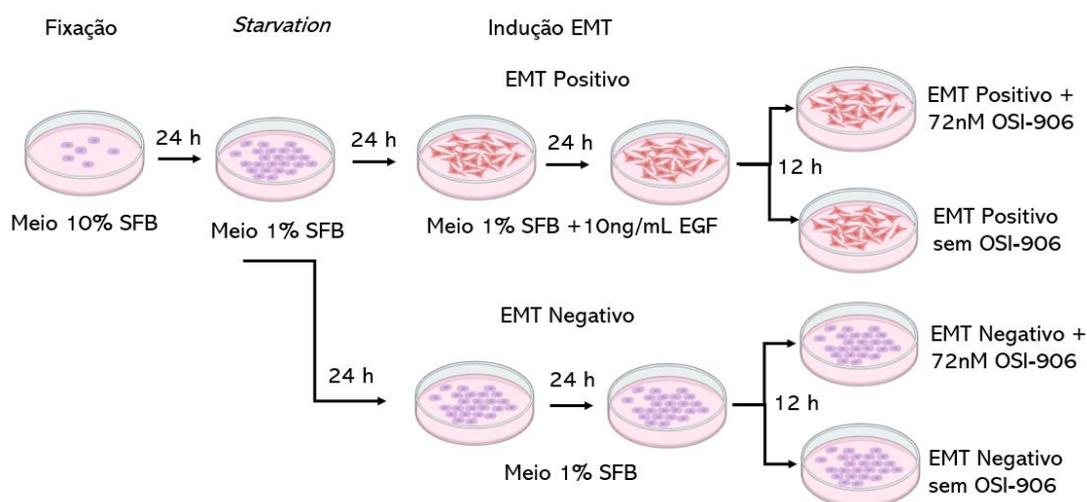
O experimento foi realizado em triplicata para análise estatística. Os dados foram coletados no citômetro de fluxo FACS Symphony A1 (BD Bioscience) e analisados com o programa FlowJo versão 10 em colaboração com o aluno de doutorado Vitor Leonardo Bassan do Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia da FCFRP-USP. As células foram classificadas em células com necrose, apoptose, apoptose tardia e viáveis, de acordo com a detecção ou não de Anexina V e de IP como demonstrado na **tabela 01**.

Tabela 01: Classificação dos eventos detectados pelo citômetro de fluxo para o ensaio de apoptose

	ANEXINA V	Iodeto de Propídio
Necrose	Negativo	Positivo
Apoptose	Positivo	Negativo
Apoptose tardia	Positivo	Positivo
Células viáveis	Negativo	Negativo

3.4.3 Modelo de indução da EMT e diminuição da expressão de SDC4

A indução do processo de EMT foi realizada utilizando EGF como descrito na seção 3.1.1. e, a diminuição da expressão de SDC4, foi realizada de forma indireta a partir da inibição da fosforilação de IGF-1R utilizando 72 nM de OSI-906 por 12 horas de tratamento. O modelo de depleção de SDC4 foi baseado no trabalho publicado por Afratis no qual é demonstrado que o SDC4, com a inibição da fosforilação de IGF-1R, sofre com aumento da sua endocitose pela célula, diminuindo assim sua expressão (AFRATIS et al., 2017). Restando 12 horas para o final da indução da EMT, o OSI-906 foi diluído em solução de DMSO 100% e em PBS 1X pH 7,2 (1:1) e, após sua adição, as placas foram homogeneizadas e deixadas em estufa a 37°C por 12 horas (**Figura 15**). Posteriormente, foi realizada a coleta das proteínas secretadas e a extração total de proteínas das células tratadas, conforme descrito na seção 3.2.

**Figura 15:** Esquema do processo de indução de EMT e redução da expressão de SDC4

Fonte: Do próprio autor com ícones de Biorrender.com

3.4.4 Ensaio de migração celular

O ensaio de migração celular foi realizado com o intuito de avaliar a atividade migratória das células induzidas ou não à EMT por EGF, e tratadas ou não com OSI-906. Para esse ensaio foi utilizado o protocolo adaptado de Liang; Park; Guan (2007), no qual um total de 2×10^5 células foram semeadas em cada poço de uma placa de 6 poços, utilizando meio de cultura com 10% de SFB. Após 24 horas, o meio foi trocado para 1% de SFB, e no dia seguinte, foram realizados dois riscos formando uma cruz nas placas utilizando uma ponteira estéril de 1000 μL . O risco horizontal é utilizado como um marcador de posição a fim de realizar os cálculos da migração celular. Em seguida, as placas foram lavadas duas vezes com PBS 1X pH 7,2 para a remoção das células desprendidas (LIANG; PARK; GUAN, 2007).

Ao final da raspagem, foi iniciado o processo de indução da EMT e de diminuição da expressão de SDC4 conforme mencionado na seção 3.4.3. Para fins de controle, células não tratadas com EGF e OSI-906 foram classificadas como controle negativo e, as tratadas apenas com EGF como EMT positivo e, apenas com OSI-906, como controle OSI-906.

As microfotografias dos riscos nas placas foram retiradas nos tempos de 0, 24, 42 e 48 horas após o início do tratamento com EGF utilizando uma câmera fotográfica e um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100) (LIANG; PARK; GUAN, 2007). O experimento foi realizado em triplicatas para análise estatística, e a área de migração celular foi analisada e quantificada utilizando o software ImageJ (Figura 16).

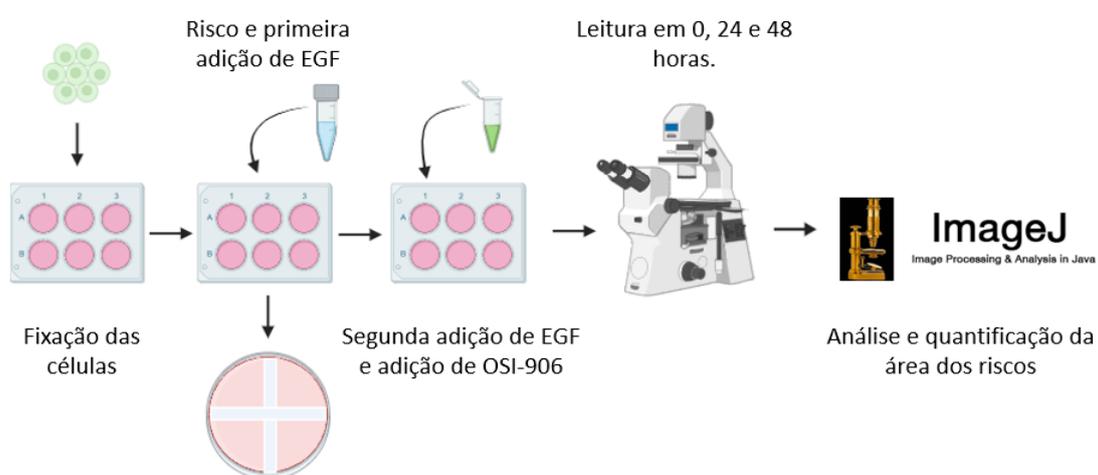


Figura 16: Esquema representativo do processo de avaliação da migração celular

Fonte: Do próprio autor com ícones de Biorrender.com

3.5 ENSAIO DE ZIMOGRRAFIA

Com o objetivo de verificar a atuação das MMPs 2 e 9 no processo de clivagem do SDC4 durante a EMT, foi realizado o ensaio de zimografia em gel nas amostras induzidas a EMT e tratadas ou não com OSI-906. Neste ensaio avaliamos a atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9, no qual as amostras são aplicadas em gel de poliacrilamida contendo gelatina, após a realização do SDS-PAGE o gel foi incubado em condições propícias para que as MMPs estejam ativas e na sequência verificamos a sua atividade conforme a degradação da gelatina presente no gel. O ensaio foi conduzido em colaboração com o Prof. Doutor José Eduardo Tanus dos Santos com o apoio da técnica Sandra de Oliveira Conde Tella do departamento de farmacologia da FMRP-USP, utilizando como base o protocolo proposto por Kleiner e Stetler-Stevenson (1994). As amostras utilizadas foram tanto de extrato total quanto do secretado, provenientes dos ensaios da seção 3.4.3.

Para a corrida dos géis, foram utilizados 20 µL de cada amostra do secretado e 30 µg de proteína do extrato total, após a quantificação pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Como controle positivo, foi utilizado o SFB diluído em Tampão Tris Salino (TBS) 1X, pH 7,5. As amostras foram diluídas em tampão não redutor 1X e 6X (0,1 M de Tris-HCl, 20% de glicerol, 4% de SDS, 0,01% de azul de bromofenol (BME)) e submetidas SDS-PAGE de 10% com 7,5 mg de gelatina (SIGMA-ALDRICH). A corrida das amostras foi realizada em tampão Tris-glicina 1X a 100 V por aproximadamente 2 horas, utilizando o sistema de eletroforese vertical (Mini-PROTEAN, Tetra Cell e PowerPac Basic Power Supply, Bio-rad) (KLEINER; STETLERSTEVENSON, 1994; LAEMMLI, 1970).

Uma vez corridas as amostras, o gel foi lavado duas vezes de 30 minutos cada, em uma solução de 2% de Triton 100-X (SIGMA-ALDRICH), a fim de remover o SDS do gel. Após as lavagens, o gel foi incubado em uma estufa a 37°C por 16 horas com tampão Tris CaCl₂ (Tris 50mM e CaCl₂ 10mM, pH 7,4). Decorrido o período, o tampão foi descartado e, uma solução do corante Comassie Blue G-250 (SIGMA-ALDRICH), foi adicionada ao gel, permanecendo por duas horas em agitação basculante. Após a coloração, o corante foi removido, e o gel lavado três vezes com solução descolorante (30% de metanol e 10% de ácido acético) até a visualização das bandas correspondentes às MMPs. O gel, após leve descoloração, foi fotografado sob luz branca a fim de evidenciar as bandas claras correspondente as MMPs dois e nove. O experimento foi realizado em triplicata, e a intensidade das bandas foi analisada pelo software ImageJ, como pode ser visualizado no esquema da **figura 17**.

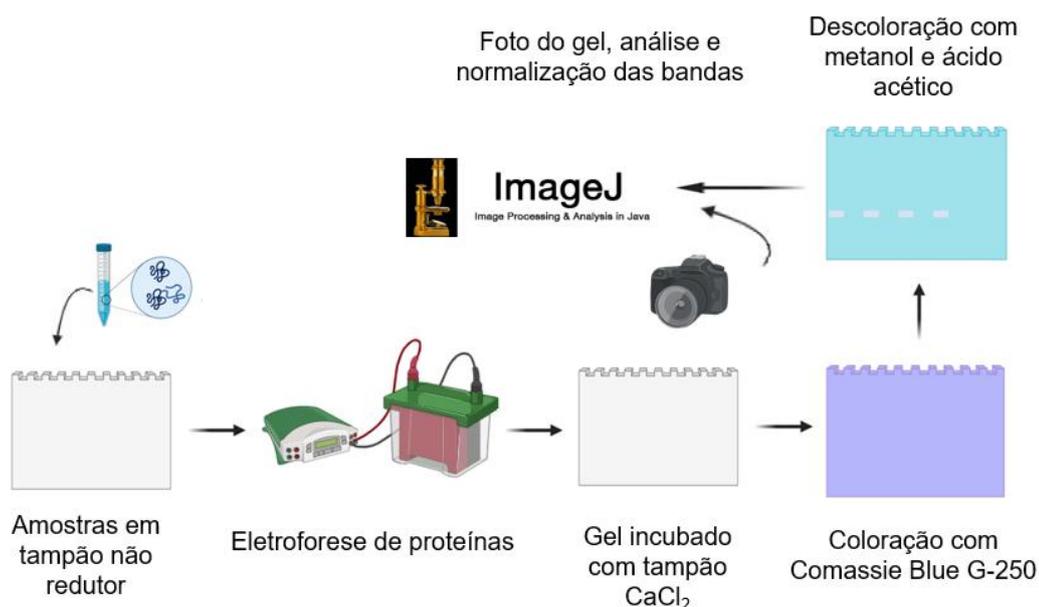


Figura 17: Esquema representativo do ensaio de Zimografia

Fonte: Do próprio autor com ícones de Biorrender.com

3.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA POR “WESTERN BLOTING”

3.6.1 Eletroforese de proteína e transferência

Para essa análise foram utilizadas as amostras provenientes da seção 3.1.1 e da seção 3.4.3 após tanto a extração total como a coleta de proteínas do secretoma. Ao todo foram utilizados 50 μg de proteína dos extratos totais e 20 μg de proteína do secretoma, as quais foram diluídas em tampão da amostra (60 mM de Tris-HCl, 10% de glicerol, 2% de SDS, 5% de BME e 0.002% de ABF). Posteriormente, foi realizada a desnaturação proteica em banho seco (Thermomixer comfort, Eppendorf) a 98°C, por 5 minutos, sob agitação, e deixadas no freezer a -20°C para resfriamento.

As amostras foram submetidas ao SDS-PAGE, o protocolo utilizado foi descrito por Laemmli, no qual a corrida das amostras é realizada em tampão tris-Glicina 1X a 90 V nos primeiros 20 minutos, e depois a 110 V por aproximadamente 1 hora e 30 minutos, utilizando o sistema de eletroforese vertical (Mini-PROTEAN, Tetra Cell e PowerPac Basic Power Supply, Bio-rad) (LAEMMLI, 1970).

As proteínas separadas por eletroforese foram transferidas pelo método semi-seco ou submarino, dependendo do peso molecular da proteína, para uma membrana de nitrocelulose. Para o método semi-seco, foi utilizado tampão semi-seco (25 mM de Tris, 192 mM de glicina, 20% de

metanol e 0.38% de SDS 10%, pH 8.0), e a transferência foi realizada no sistema de “*blotting*” (trans-Blot Turbo, Bio-Rad) por 60 minutos a 25 V. Para o método submarino, foi utilizado tampão submarino (25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 20% de metanol), e a transferência foi realizada utilizando o mesmo sistema da eletroforese vertical, contudo por uma hora em 100 V, seguido de mais uma hora em 90 V, ambos a 300 mA a 4°C. Todo o procedimento pode ser visualizado no esquema da **figura 18**.

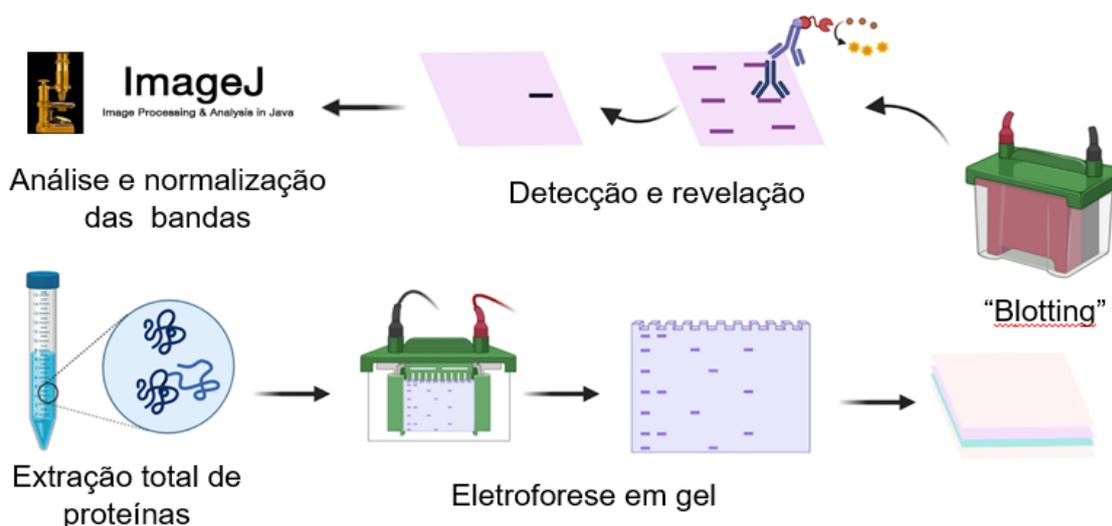


Figura 18: Esquema dos processos do ensaio de “*Western blotting*”

Fonte: Adaptado de (MEFTAHI et al., 2021).

3.6.2. Bloqueio da membrana e detecção da proteína

Após a transferência, com o intuito de bloquear os sítios não específicos, as membranas foram incubadas em TBS com Tween (TBS-T) (20 nM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl, 1% de Tween e 5% (m/v) de BSA) durante 1 hora sob agitação, conforme as instruções do fabricante do anticorpo. Decorrido o período, a solução de bloqueio foi descartada, e a membrana foi incubada “*overnight*” com o anticorpo primário a 4°C sob agitação. Após o período, retirou-se a solução com o anticorpo primário, e, após três lavagens com TBS-T de 5 minutos cada, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário por uma hora à temperatura ambiente sob agitação. Após a incubação dos anticorpos secundários, as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T por 10 minutos cada.

A detecção das proteínas marcadas foi realizada utilizando o kit de detecção (ECL Prime “*Western blotting*” Detection Reagents - GE HealthCare), conforme as instruções do fabricante. O sistema de revelação utilizado foi baseado em quimiluminescência com o fotodocumentador

(ChemiDoc, BioRad). As imagens foram analisadas, quantificadas e normalizadas pelo software ImageJ. Os anticorpos primários e secundários utilizados, os alvos, o peso molecular das proteínas, a diluição dos anticorpos e suas procedências estão especificados na tabela abaixo (**Tabela 02**).

Tabela 02: Dados dos anticorpos utilizados

Anticorpo	Alvo	Tamanho kDa	Diluição	Código
SNAIL , Rabbit	Resíduo ao redor da Asparagina 36	29	1:500	3879, Cell Signal
GAPDH , Rabbit	Região carboxila terminal	37	1:2000	2118, Cell Signal
SDC4 , Mouse	Região do Ectodomínio	24	1:200	SC12766, Santa Cruz
pIRS , Rabbit	Resíduo de serina 312 fosforilada	180	1:1000	2381, Cell Signal
IGF-1R , Rabbit	Região carboxila terminal	95	1:1000	9750, Cell Signal
CDH1 , Mouse	NS	135	1:1000	14472, Cell Signal
MMP9 , Rabbit	Resíduo ao redor de Glicina 657	90	1:1000	2270, Cell Signal
MMP2 , Mouse	NS	72	1:1000	NB200144, novusbio
β-Actin , Rabbit	Região amina terminal	45	1:1000	4970, Cell Signal
anti-Rabbit	Região FC anticorpo de coelho	NS	1:1600	7074, Cell Signal
anti-Mouse	Região FC anticorpo de rato	NS	1:1600	7076, Cell Signal

4. RESULTADOS

4.1 VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE EMT UTILIZANDO EGF COMO INDUTOR.

Neste trabalho, foi realizado a indução do processo de EMT em células MCF-7 utilizando EGF na concentração de 10 ng/mL em três adições ao longo de 48 horas. A fim de validar esse processo, foi necessário realizar uma análise morfológica das células, assim como da expressão de proteínas-chave conhecidas como sendo marcadores epiteliais e mesenquimais, como pode ser visualizado na **figura 19 e 20** respectivamente. Na **figura 19 A**, foi possível verificar que as células do grupo controle (mantiveram sua morfologia epitelial com células mais arredondadas, enquanto, no grupo tratado com EGF (**Figura 19 B**) (EMT positivo), as células apresentaram morfologia mais fusiforme, característica de células mesenquimais indicando que o processo de EMT foi bem-sucedido.

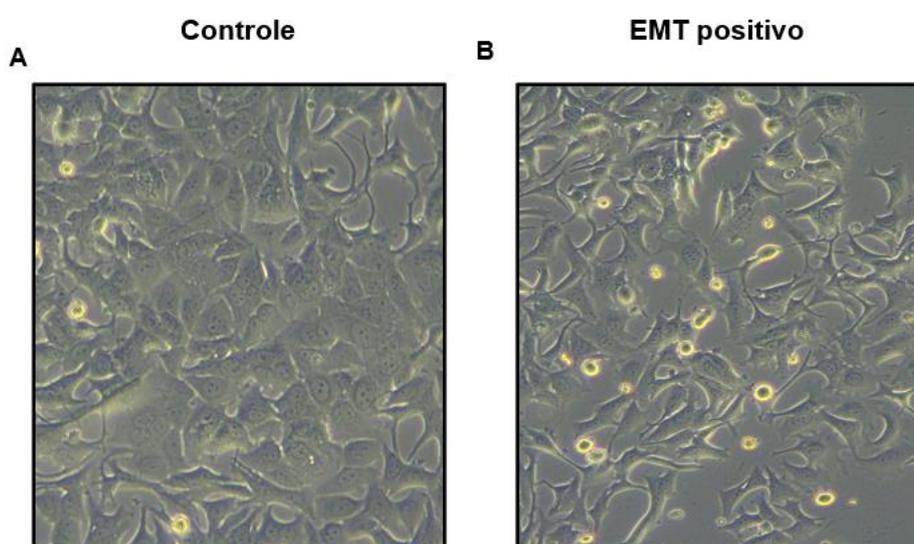


Figura 19: Análise morfológica de células de câncer de mama induzidas a EMT

A figura é composta por duas microfotografias (aumento de 100x), nas quais é possível observar a morfologia celular. **(A)** células não tratadas com EGF com características epiteliais. **(B)** células induzidas ao processo de EMT com 48 horas de exposição ao EGF com características mesenquimais.

Também foi realizada a análise por “*Western blotting*” do extrato total dessas células, a fim de validar o processo de EMT a partir de proteínas chave do processo. Para essa técnica, foram utilizados 50 µg de proteína de cada amostra, os resultados foram analisados pelo software ImageJ, e o valor da intensidade de expressão das proteínas de interesse foi normalizado com a expressão da proteína constitutiva Gliceraldeino-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Na **figura 20 A e B**, foi possível verificar que a expressão de CDH1 diminuiu significativamente em relação ao controle, com uma média de 0,4 unidades a menos. Na **figura 20 C e D**, foi possível verificar um aumento significativo na expressão de SNAIL, com uma média de aumento de 0,4 unidades. Esse aumento do SNAIL é um importante marcador por ser um fator de transcrição que ativa a programação do processo de EMT, desencadeando uma redução na expressão de proteínas de adesão e aumentando de proteínas

relacionadas a mobilidade celular e sobrevivência. Todas importantes para a progressão tumoral o que faz do SNAIL uma proteína-chave para validação do processo de EMT (CAI et al., 2019).

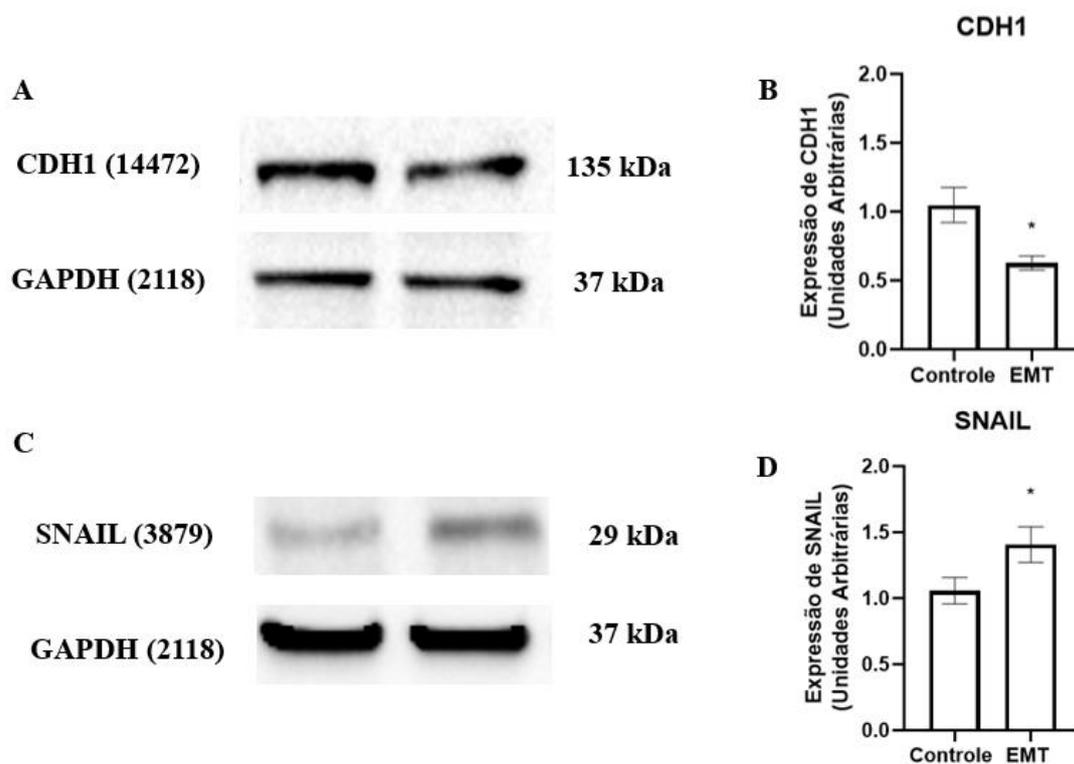


Figura 20: Avaliação do processo de EMT por expressão de proteínas-chave

A figura apresenta os resultados da análise por “*Western blotting*” das proteínas CDH1 e SNAIL, juntamente com a normalização de sua expressão por GAPDH. **(A)** Expressão de CDH1. **(B)** Expressão de CDH1 normalizada com GAPDH. **(C)** Expressão de SNAIL. **(D)** Expressão de SNAIL normalizada com GAPDH. Os gráficos B e D representam a média \pm E.P.M. *, $p < 0,05$ em comparação com o Controle, ($n = 4$ para CDH1, $n = 3$ para SNAIL).

A CDH1 é uma proteína de interação célula-célula, considerada um marcador epitelial e frequentemente subexpressa em células mesenquimais. Por outro lado, o SNAIL, que apresenta elevação em células mesenquimais, é um fator de transcrição associado à inibição de proteínas epiteliais. Sendo assim, com o aumento na expressão de SNAIL e a diminuição de CDH1, podemos confirmar que o processo de EMT está ocorrendo nas células MCF-7 tratadas com de EGF na concentração de 10 ng/mL no período de 48 horas. Em outras palavras, as células tratadas com EGF estão adquirindo características mesenquimais em comparação com as células não tratadas.

4.2 ANÁLISE PROTEÔMICA DE CÉLULAS MCF-7 INDUZIDAS AO PROCESSO DE EMT.

Confirmada a indução do processo de EMT, as amostras, tanto do extrato total quanto do secretoma, foram analisadas por MS para identificar as proteínas correlacionadas ao processo. Após a

quantificação por Nanodrop, 75 ng de proteínas que passaram pelo processo de digestão enzimática por tripsina foram injetadas no MS. Ao final das corridas, os dados indicaram um total de 4 mil diferentes proteínas (link para a tabela completa: <https://docs.google.com/spreadsheets/d/18LO3Gy6OJKPV0-HB8lpIU9mkZ7ERce4a65-brS135qI/edit?usp=sharing>). Notavelmente, a amostra de extrato total apresentou mais proteínas em comparação com a amostra das proteínas secretadas (425 e 65, respectivamente), devido à alta complexidade proteica intracelular em comparação com o conteúdo secretado

Neste estudo, a tabela anterior foi filtrada usando as informações da base de dados Uniprot para selecionar apenas as proteínas transmembranares dentre todas identificadas. Após essa filtragem, observou-se 400 proteínas identificadas no extrato total e cerca de 65 no secretoma. Com o intuito de refinamento e utilização das proteínas mais abundantes, fixamos um “*cutoff*” das 30 proteínas que tiveram maior número de peptídeos identificados, que representando a abundância dessas na amostra, o que resultou na **tabela 03** referente as proteínas do secretoma e na **tabela 04** referente as proteínas do extrato total.

Tabela 03: As 30 proteínas transmembranares mais abundantes no secretoma

ID Proteína	Descrição	N° de Peptídeos			Intensidade	
		Controle	EMT	Total	Controle	EMT
P31431	Syndecan-4	11	4	15	3.17E+06	1.28E+06
P13591	Neural cell adhesion molecule 1	10	2	12	2.90E+06	1.20E+06
P12830	Cadherin-1	9	1	10	1.65E+06	4.32E+05
P81605	Dermcidin	6	4	10	1.49E+06	1.28E+06
P05141	ADP/ATP translocase 2	3	6	9	9.94E+05	4.33E+05
Q92823	Neuronal cell adhesion molecule	9	0	9	1.89E+06	0.00E+00
P02748	Complement component C9	2	5	7	2.75E+05	8.76E+05
O00299	Chloride intracellular channel protein 1	2	4	6	3.85E+05	4.98E+05
Q14118	Dystroglycan	5	0	5	1.24E+06	0.00E+00
P18827	Syndecan-1	4	1	5	2.45E+06	9.07E+05
Q13740	CD166 antigen	5	0	5	7.64E+05	0.00E+00
P01833	Polymeric immunoglobulin receptor	3	2	5	3.07E+05	1.68E+05
P54289	Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-1	5	0	5	7.19E+05	0.00E+00
P13164	Interferon-induced transmembrane protein 1	5	0	5	1.78E+05	0.00E+00
P55285	Cadherin-6	3	1	4	4.79E+05	2.59E+05
Q15262	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa	2	2	4	4.19E+05	1.62E+05
P01857	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	2	2	4	7.52E+05	8.56E+05
Q9NQC3	Reticulon-4	0	4	4	0.00E+00	1.43E+05
P08195	4F2 cell-surface antigen heavy chain	0	4	4	0.00E+00	3.48E+05
P21796	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	3	0	3	8.57E+05	0.00E+00
O94985	Calsyntenin-1	3	0	3	8.70E+05	0.00E+00
Q9NPH3	Interleukin-1 receptor accessory protein	3	0	3	6.99E+05	0.00E+00
P54764	Ephrin type-A receptor 4	3	0	3	4.15E+05	0.00E+00
P19320	Vascular cell adhesion protein 1	3	0	3	8.03E+05	0.00E+00
P55287	Cadherin-11	3	0	3	4.47E+05	0.00E+00
Q86SQ4	Adhesion G-protein coupled receptor G6	2	0	2	4.80E+05	0.00E+00
P50895	Ephrin type-A receptor 4	1	1	2	3.21E+05	1.78E+05
Q14126	Desmoglein-2	2	0	2	4.48E+05	0.00E+00
P21926	CD9 antigen	2	0	2	4.98E+05	0.00E+00
Q02413	Desmoglein-1	1	1	2	2.09E+05	1.51E+05

Tabela 04: As 30 proteínas transmembranares mais abundantes no extrato total

ID Proteína	Descrição	N° de Peptídeos			Intensidade	
		Controle	EMT	Total	Controle	EMT
P21796	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	84	92	176	3.55E+06	4.37E+06
Q16891	MICOS complex subunit MIC60	76	80	156	2.44E+06	2.42E+06
Q9P2E9	Ribosome-binding protein 1	64	63	127	1.10E+06	1.19E+06
P05141	ADP/ATP translocase 2	60	57	117	3.84E+06	4.39E+06
Q86UP2	Kinectin	58	44	102	1.28E+06	1.12E+06
Q9NVI7	ATPase family AAA domain-containing protein 3A	31	38	69	6.81E+05	8.20E+05
P51572	B-cell receptor-associated protein 31	28	38	66	8.92E+05	1.47E+06
Q6NUK1	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1	31	33	64	7.85E+05	8.67E+05
P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	31	31	62	1.30E+06	1.31E+06
O00299	Chloride intracellular channel protein 1	31	22	53	1.71E+06	1.62E+06
P04843	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	23	24	47	7.70E+05	8.39E+05
Q02978	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	19	27	46	4.66E+05	8.82E+05
P49755	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	19	27	46	7.75E+05	1.14E+06
P13073	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	25	20	45	8.59E+05	8.59E+05
Q07065	Cytoskeleton-associated protein 4	17	25	42	4.40E+05	5.00E+05
Q14126	Desmoglein-2	20	22	42	5.36E+05	6.00E+05
Q8TBA6	Golgin subfamily A member 5	13	27	40	1.56E+05	3.38E+05
Q9NS69	Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog	16	23	39	2.87E+05	3.71E+05
O95292	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	16	23	39	6.91E+05	8.63E+05
Q9H9B4	Sideroflexin-1	21	18	39	7.02E+05	7.77E+05
P47985	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	15	19	34	6.45E+05	6.46E+05
P04844	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	11	20	31	4.88E+05	6.20E+05
Q00325	Phosphate carrier protein, mitochondrial	13	18	31	5.87E+05	7.40E+05
Q3ZCQ8	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50	14	16	30	2.14E+05	2.11E+05
P00403	Cytochrome c oxidase subunit 2	12	17	29	4.08E+05	8.39E+05
Q15836	Vesicle-associated membrane protein 3	15	12	27	2.91E+05	4.18E+05
O60313	Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial	11	16	27	3.00E+05	3.98E+05
Q07812	Apoptosis regulator BAX	10	16	26	1.56E+05	2.11E+05
Q96HS1	Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial	13	13	26	5.23E+05	6.08E+05
Q14789	Golgin subfamily B member 1	6	19	25	1.73E+05	2.07E+05

4.2.1 Avaliação da interação entre os grupos proteicos identificados a partir dos dados proteômicos.

As **figuras 21 A e B** mostram uma rede interligada das interações entre as 30 proteínas selecionadas pelo "cutoff" de cada grupo, representando proteínas do secretoma (**Figura 21 A**) e do extrato total (**Figura 21 B**). Em ambas as **figuras 21 A e B**, mas em destaque a **figura 21 B**, foi observado uma predominância de proteínas envolvidas no metabolismo celular (círculos vermelhos). Isso pode ser resultado do aumento do metabolismo celular na progressão tumoral causada pelo tratamento com EGF.

No que diz respeito às proteínas do secretoma (**Figura 21 A**), o segundo grupo mais abundante foi composto por proteínas relacionadas à adesão celular (amarelo e laranja). Isso sugere que essas proteínas desempenham um papel importante no processo de EMT, principalmente devido à mudança morfológica da célula e ao aumento da mobilidade. Dentre elas, destacam-se as cateninas como a CDH1, 11 e 6 (amarelo), que são importantes para as interações célula-célula, assim como os SDC1 e 4, com dupla função na adesão celular e na sinalização da MEC (laranja).

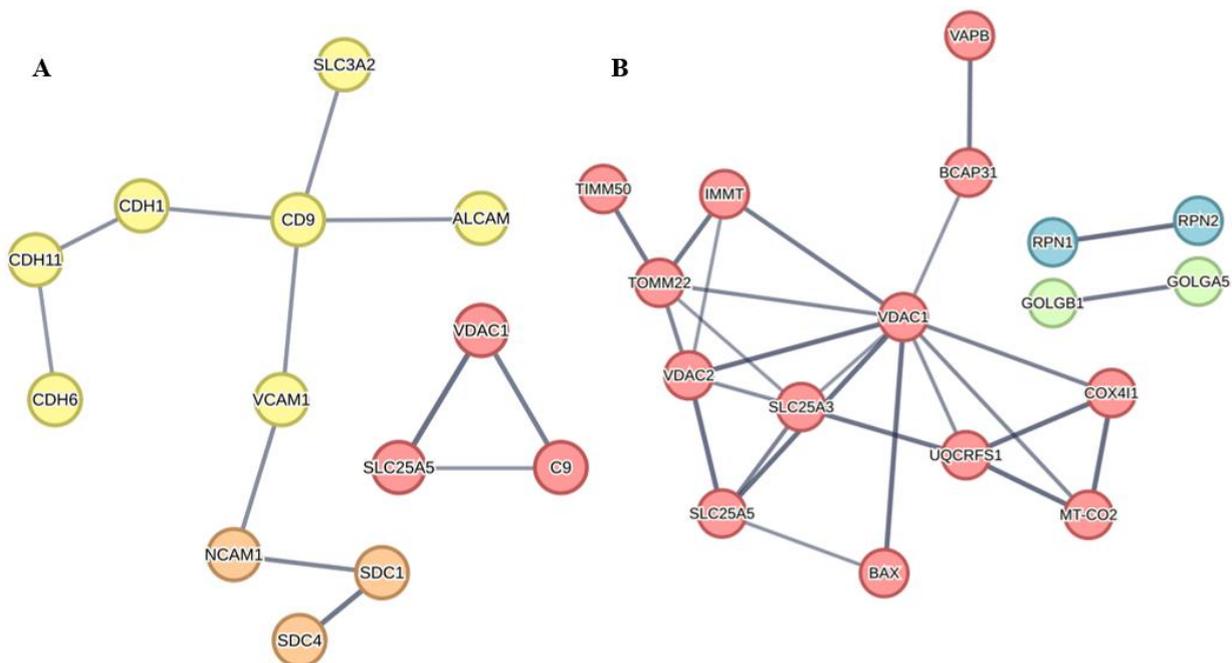


Figura 21: Análise da interação das 30 proteínas com o maior número de peptídeos identificados nas amostras.

A figura representa as interações entre as proteínas através da intensidade das linhas, sendo as linhas mais intensas associadas a uma maior interação e as menos intensas a uma menor interação. As linhas tracejadas representam as interações entre proteínas de subgrupos diferentes. O software utilizado para avaliar o conjunto de proteínas foi o STRING-DB. Os subgrupos foram agrupados por k-means, considerando uma confiança de 0,7. **(A)** Proteínas identificadas no secretoma. **(B)** Proteínas identificadas no extrato total. **(Vermelho)** Proteínas relacionadas a atividade mitocondrial **(Amarelo)** Proteínas relacionadas a adesão celular. **(Laranja)** Proteínas extracelulares com atividade de adesão celular e sinalização junto a MEC. **(Azul)** Proteínas relacionadas ao complexo de síntese de oligossacarídeos. **(Verde)** Proteínas do complexo de Golgi.

4.2.2 Análise de expressão dos grupos proteicos a partir dos dados proteômicos.

A partir da visualização das interações entre os grupos proteicos identificados, foi realizada uma análise da expressão de cada grupo em ambos os casos (Controle e Tratado) com o objetivo de verificar variações na detecção de proteínas específicas. Sendo assim, o número de peptídeos identificados para cada grupo proteico foi comparado, tanto no grupo de controle quanto no grupo tratado, para destacar sub e superexpressões de proteínas de interesse. A **figura 22 A e B** foi organizada com base nos valores das **tabelas 03 e 04**, desse modo, cada “*Heatmap*” demonstra o número de peptídeos identificados, tanto do grupo de controle quanto nas células induzidas à EMT para as 30 proteínas transmembranares mais abundantes das amostras de proteínas secretadas e do extrato total (A e B respectivamente).

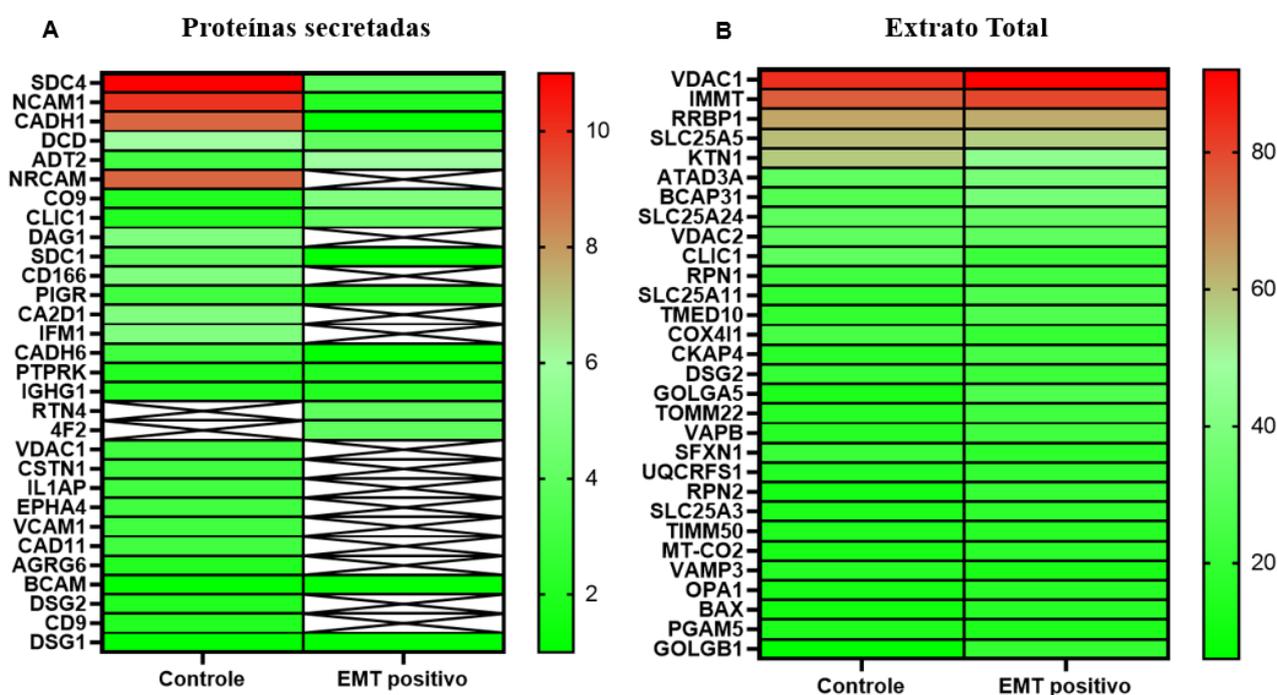


Figura 22: “*Heatmaps*” do número de peptídeos identificados de MCF-7 induzidas a EMT.

Os “*Heatmaps*” representam, através de um gradiente de cores, o número de peptídeos identificados a partir do “*cutoff*” das proteínas transmembranares mais abundantes. **(A)** Amostra de proteínas secretadas induzidas ou não a EMT. **(B)** Amostras de extrato total induzidas ou não a EMT. **(Células vermelhas)** Grupos com o maior número de peptídeos identificados. **(Células verdes)** Grupos com menor número identificado de peptídeos identificados. As células em branco com um “X” indicam grupos nos quais não foram detectados peptídeos naquela amostra. À direita de cada mapa, a legenda indica o número de peptídeos para cada tonalidade específica.

Os dados proteômicos coletados foram essenciais para corroborar com a validação do processo de EMT, principalmente nas amostras de secretoma. Na **figura 22 A**, é evidente a variação na expressão da CDH1 de 9 detecções no controle para 1 detecção no grupo tratado no secretoma. Como observado anteriormente, CDH1 está subexpressa em células EMT positivas em relação às controle.

Além disso, na **figura 22 B**, tanto VDC1 quanto IMMT encontram-se superexpressas na mesma comparação. Essas proteínas mitocondriais estão envolvidas em vias energéticas celulares, indicando que as células EMT positivas estão aumentando a maquinaria proteica relacionada a produção energética. Na **figura 22 A**, a proteína SDC4 foi a que teve a maior detecção de peptídeos, demonstrando uma maior abundância relativa principalmente na amostra controle. Além disso, ela possui uma variação significativa (superior a 100%) entre controle e tratado nas amostras de secretoma, com 11 e 4 detecções, respectivamente.

A partir destes dados, investimos em um estudo mais detalhado na proteína SCD4, uma vez que ela se encontra na superfície celular, desempenha papel crucial de adesão, além de sua importância para outras funções celulares, como organização, estrutura, proliferação, migração, sobrevivência e endocitose, além de sofrer o processo de "*shedding*" como forma de regulação (COUCHMAN *et al.*, 2015; MANON-JENSEN; ITOH; COUCHMAN, 2010). Além disso, foi observado uma alta detecção pelo MS nas amostras além de uma expressiva variação comparando o controle com as células induzidas a EMT. Outrossim, foi demonstrado por Wang *et al.* (2014) que o SDC4 pode modular a sinalização de EGFR, que neste estudo é vital para a ativação do processo de EMT devido ao uso do EGF, causando alterações na migração de células epiteliais. Ademais, diversos outros estudos também demonstraram a participação dessa proteína na progressão tumoral (HABES; WEBER; GOUPILLE, 2019; MANON-JENSEN; ITOH; COUCHMAN, 2010).

Diante disso, para estudos subsequentes, concentramos na avaliação da participação de SDC4 na mobilidade celular durante o processo de EMT induzido por EGF em células de câncer de mama. Também analisamos os ensaios a partir da redução da expressão de SDC4, a fim de mimetizarmos o evidenciado nos dados proteômicos. Para a redução da expressão de SCD4, adotamos a estratégia indireta baseada no trabalho publicado por Afratis e colaboradores em 2017, no qual a inibição da autofosforilação de IGF-1R desencadeou uma diminuição na expressão de SDC4 por meio do aumento da endocitose da proteína (AFRATIS *et al.*, 2017). Portanto, o composto OSI-906 foi escolhido, pois além de possuir alta especificidade para IGF-1R, é uma droga que se encontra em fase dois de estudos clínicos em humanos. Estes estudos propõem que o OSI-906 possa ser utilizado no tratamento contra o câncer de pulmão, pele, entre outros (NCBI, 2018 e 2019). Ademais, esse composto age inibindo a autofosforilação do IGF-1R e, por conseguinte, inibe a fosforilação da IRS-1 e de vias dependentes de sua fosforilação, como a Akt e ERK1/2 (MULVIHILL *et al.*, 2009).

4.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR FRENTE AO COMPOSTO OSI-906.

Com o objetivo de estabelecer as condições para o tratamento com o composto OSI-906 na linhagem de MCF-7, visando a redução da expressão indireta da proteína SDC4, foram conduzidos dois ensaios para avaliar a viabilidade celular frente ao composto. Um desses ensaios foi o teste de MTT, enquanto o outro foi realizado para a detecção de apoptose utilizando Anexina V.

4.3.1 Avaliação por ensaio de MTT

O ensaio de MTT é utilizado como forma de avaliação da capacidade de conversão do composto amarelo (MTT) em formazan, um composto roxo e insolúvel, resultante da atividade redutora da mitocôndria. Este processo ocorre à medida que a mitocôndria utiliza o MTT como substrato, liberando o formazan como produto enzimático.

No nosso ensaio de MTT, as células foram expostas ao OSI-906 por 4, 8, 12 e 24 horas, em concentrações de 0 (Cont-), 9, 18, 36, 72 e 144 nM e um com 50 uM de tamoxifeno (Cont +). Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata, e os resultados estão expressos na **figura 23 A, B, C e D**. O controle negativo (Cont -) manteve-se constante, com 100% de viabilidade celular em todos os quatro experimentos. Da mesma forma, o controle positivo, apresentou uma média próxima a zero.

Em geral, em relação às concentrações e aos tempos testados, o OSI-906 não causou estresses celulares estatisticamente significativos em comparação com o controle negativo, uma vez que a média e o desvio padrão da viabilidade das amostras estavam próximos de 100%. A exceção foi na concentração de 144 nM após 24 horas de exposição, onde foi observada uma redução expressiva para 30% de viabilidade celular. Isso indica que, na concentração de 144 nM após 24 horas de exposição, o OSI-906 provoca um aumento significativo na morte celular.

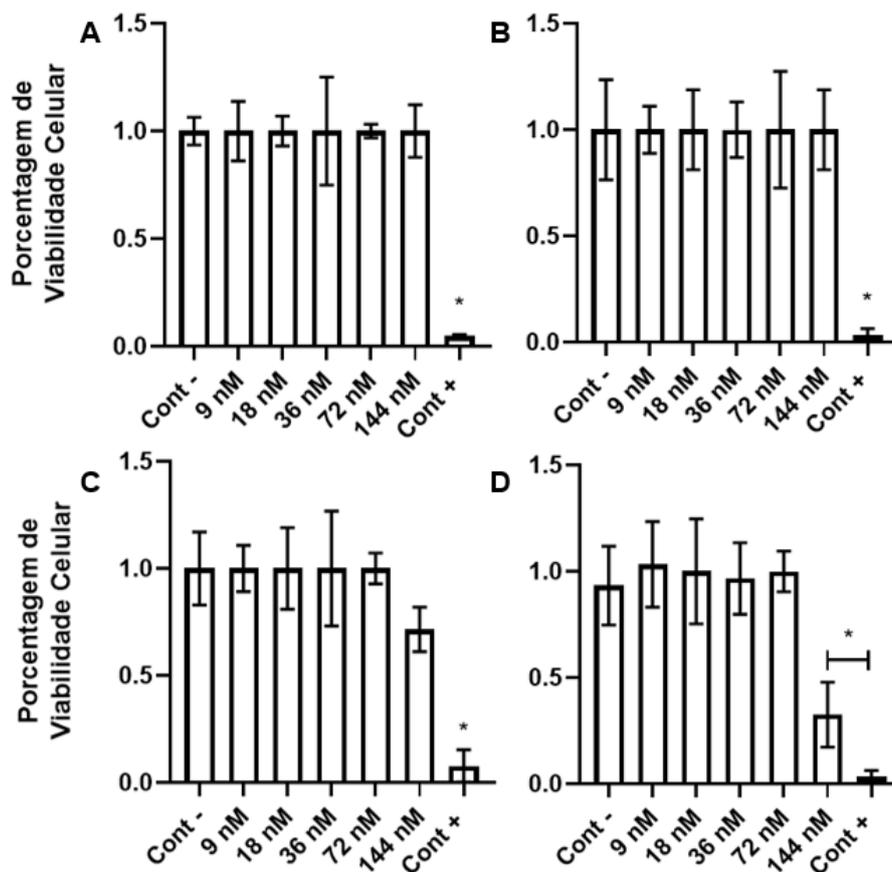


Figura 23: Análise da viabilidade celular de MCF-7 frente ao composto OSI-906

A figura apresenta quatro gráficos da viabilidade celular em porcentagem para diferentes amostras em quatro períodos distintos (A, B, C e D, correspondendo a 4, 8, 12 e 24 horas de tratamento com OSI-906). Controle negativo sem tratamento (Cont -). Controle positivo com células tratadas com 50 μ M de tamoxifeno (Cont +). (A, B, C e D) Gráficos de 4, 8, 12 e 24 horas de tratamento respectivamente. Os resultados estão representados como média \pm E.P.M. *, $p < 0,05$ em comparação com Cont -, ($n = 3$ para cada grupo experimental).

Com base na coleta desses dados, foi estabelecido que a concentração de 144 nM não seria utilizada para os demais experimentos devido à diminuição na viabilidade celular observada em 24 horas. Da mesma forma, foram descartadas as concentrações menores de 9 e 18 nM por serem inferiores ao IC_{50} estabelecido na literatura (aproximadamente 35 nM).

4.3.2 Avaliação por ensaio de apoptose com Anexina V

Com os dados preliminares de viabilidade celular obtidos pelo ensaio de MTT, foi realizado uma abordagem mais específica ao avaliar a atividade apoptótica do composto OSI-906 por meio de ensaios de apoptose utilizando Anexina V. As células foram tratadas com OSI-906 por 12 e 24 horas, nas concentrações de 36 e 72 nM, e expostas à Anexina V e ao IP 15 minutos antes de serem analisadas pela citometria de fluxo. Além disso, foi realizado um controle negativo (Cont -) sem a presença da

droga e um controle positivo (Cont +) com artesunato (2 uM). A estratégia utilizada no citômetro envolveu a seleção de "gates", conforme demonstrado na **figura 24**.

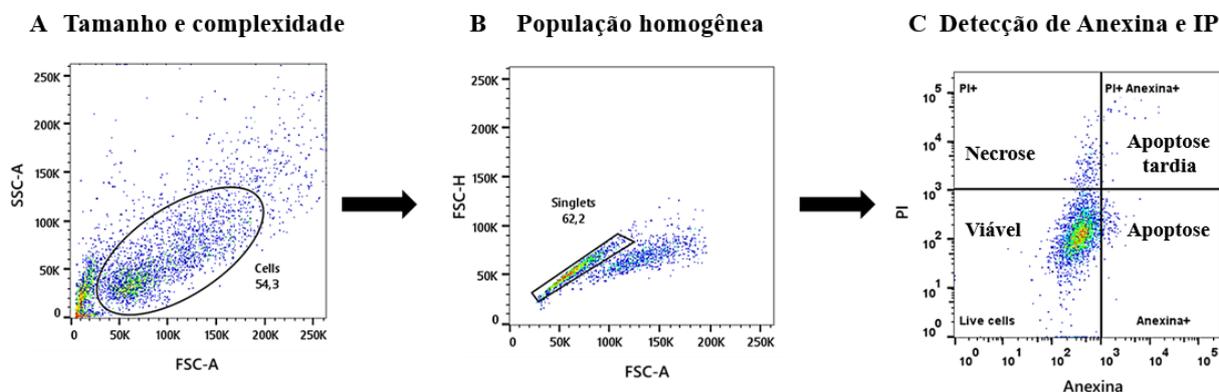


Figura 24: Estratégia de "gates" utilizada para a seleção das células a serem analisadas pelo citômetro

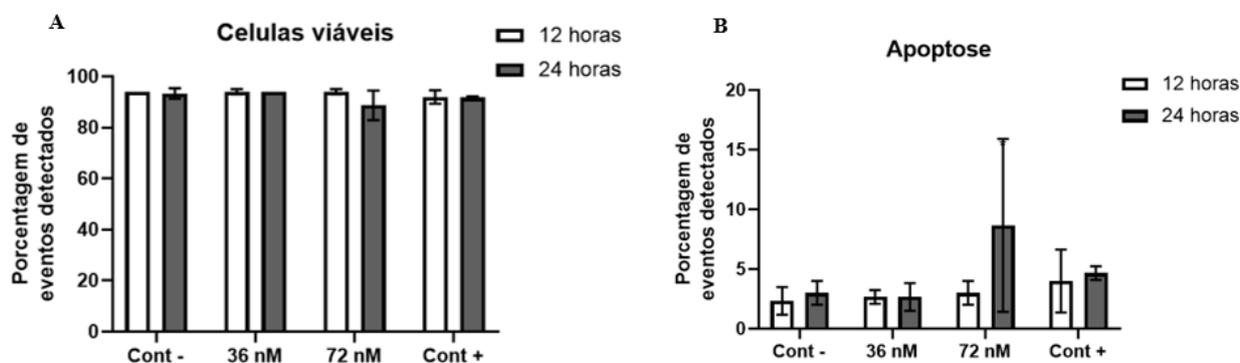
Os gráficos de dispersão mostram cada célula identificada pelo aparelho como um ponto. **(A)** Seleção das células por tamanho (FSC-A) e pela complexidade interna (SSC-A). **(B)** Seleção das células mais homogêneas por tamanho (FSC-A) e pela dispersão direta (FSC-H). **(C)** Separação das células positivas ou negativas para Anexina e IP.

Inicialmente, as células foram selecionadas por tamanho e complexidade interna, identificando aquelas que atendiam a esses padrões e excluindo debris celulares ou células fora do padrão selecionado. Após a definição desses parâmetros para a análise, as células foram novamente selecionadas pela população mais homogênea ("Singret"), excluindo as agrupadas ("Doublet"). Por último, foi realizada a distribuição com base na detecção de Anexina V e IP conforme exposto na **tabela 01**.

Após a seleção das células por tamanho, complexidade e homogeneidade, elas foram analisadas quanto à detecção de Anexina V e IP sendo classificadas em células viáveis, apoptóticas, necróticas ou em apoptose tardia. Os valores referentes a cada um dos eventos detectados estão expostos na **tabela 05** e, os eventos detectados de células viáveis e de células apoptóticas estão representados na **figura 25 A e B**, para melhor visualização.

Tabela 05: Eventos detectados para cada 100 células analisadas

Amostras	Necrose		Apoptose tardia			Células Viáveis			Apoptose			
Controle positivo 12 horas	4	2	2	1	1	2	93	94	89	2	3	7
Controle positivo 24 horas	2	2	2	1	2	2	92	92	91	5	4	5
Controle negativo 12 horas	2	4	1	1	1	2	94	94	94	3	1	3
Controle negativo 24 horas	2	2	2	1	1	3	94	95	91	3	2	4
OSI-906 36 nM 12 horas	2	2	2	2	1	1	93	94	95	3	3	2
OSI-906 36 nM 24 horas	4	1	2	1	2	3	94	94	94	2	4	2
OSI-906 72 nM 12 horas	2	2	2	1	1	1	95	94	93	2	3	4
OSI-906 72 nM 24 horas	3	1	1	1	1	2	92	82	92	5	17	4

**Figura 25:** Análise da viabilidade celular de MCF-7 frente ao composto OSI-906 pelo ensaio de detecção da apoptose por Anexina V

Os gráficos de barra mostram os valores em porcentagem dos eventos detectados na análise por citometria de fluxo. **(A)** Porcentagem de eventos nos quais não foram detectados o IP nem a Anexina V para 12 e 24 horas de experimento. **(B)** Porcentagem de eventos nos quais foram detectados a Anexina V para em 12 e 24 horas de experimento. Os resultados de representam a média \pm E.P.M. ($n = 3$ para cada grupo experimental).

Os valores de necrose (média de 2,3% em 12 horas e 2% em 24 horas) e apoptose (média de 2,3% em 12 horas e 3,0% em 24 horas) detectados no controle negativo indicam que o próprio processo de cultura, tripsinização, contagem e transporte até a análise no citômetro pode levar, por si só, à morte celular. Em relação à detecção das células viáveis, para todos os grupos, os valores em porcentagem dos eventos foram semelhantes variando de 82% a 95% em 12 e 24 horas. Isso sugere que os tratamentos com OSI-906 e o controle positivo com artesunato não afetaram significativamente a porcentagem de células viáveis, demonstrando uma baixa toxicidade desses compostos (**Figura 25 A**).

Quanto aos eventos de apoptose, houve uma variação nos eventos detectados entre o tratamento com 72 nM de OSI-906 em 24 horas (média de 8,7%) e o de 12 horas (média de 3,0%) como pode ser visualizado na **figura 25 B**. Isso indica que, para o OSI-906, na concentração de 72 nM com tratamento de 24 horas em células de câncer de mama, há, em média, um aumento na quantidade de células

apoptóticas que foram detectadas em comparação ao controle e ao tratamento de 12 horas. Esse resultado fundamentou a exclusão da possibilidade do tratamento de 24 horas utilizando o OSI-906 na concentração de 72 nM.

Em suma, com base nos dados literários sobre a atividade do OSI-906, nos resultados do ensaio de MTT (exclusão das concentrações de 9, 18 e 144 nM) e no ensaio de apoptose (exclusão do tempo de tratamento de 24 horas), ficou estabelecido que, para os experimentos subsequentes, o composto OSI-906 foi utilizado na concentração de 72 nM pelo período máximo de 12 horas.

4.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM CÉLULAS INDUZIDAS A EMT TRATADAS COM OSI-906

Após a determinação da concentração e do tempo do tratamento com o composto OSI-906 em células de câncer de mama, realizamos uma expansão celular com a indução do processo de EMT, acrescido do tratamento com OSI-906 nas últimas doze horas do tratamento com EGF. Ao final do tratamento, o meio de cultura foi coletado, e as células raspadas para a realização da extração total de proteínas que, após quantificadas, foram inseridas em gel para realizar a análise da expressão de proteínas-alvo pela técnica de “*Western blotting*”.

Os resultados da análise do processo de EMT, assim como na seção 4.1, foram obtidos com uma análise da morfologia celular por microfotografia, como pode ser visualizado na **figura 26 A, B, C e D**. Os resultados mostraram, assim como na seção 4.1, que o processo de indução da EMT foi bem-sucedido ao visualizarmos as características mesenquimais nas células tratadas com EGF em comparação com o controle negativo (**Figura 26 A e C**). Curiosamente, com o tratamento com OSI-906, as células controle também apresentaram características mesenquimais após 12 horas de tratamento (**Figura 26 B**), mas para as células com tratamento conjunto (EGF + OSI-906) não foram evidenciadas alterações morfológicas significativas em relação ao tratamento apenas com EGF (**Figura 26 C e D**).

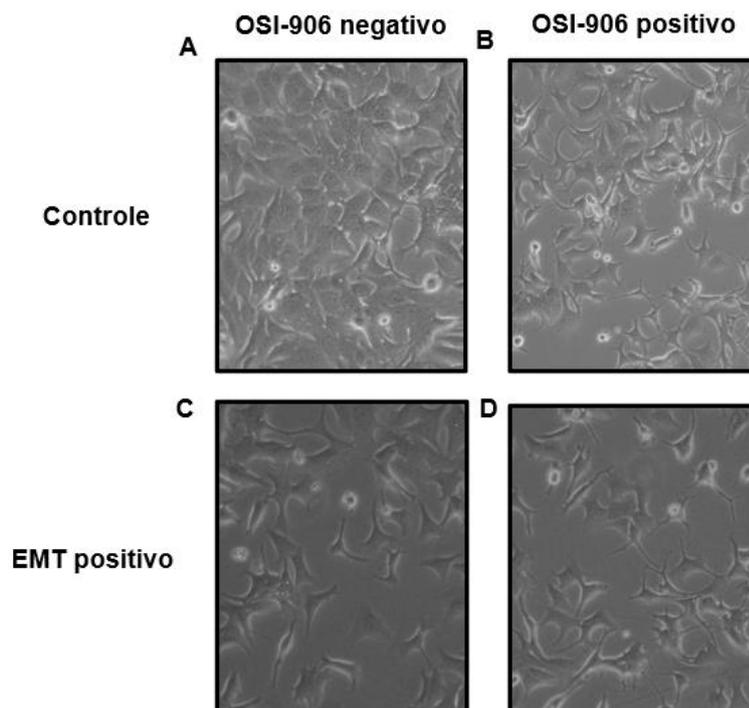


Figura 26: Análise morfológica das células de câncer de mama tratadas com OSI-906 por 12 horas

A figura é composta por quatro microfotografias dos tratamentos com EGF e OSI-906 (aumento de 100x). **(A)** Controle negativo. **(B)** Controle OSI-906. **(C)** Controle EMT. **(D)** Células tratadas com EGF (48 horas) e OSI-906 (12 horas).

Após a análise visual, foi realizado o ensaio de “*Western blotting*” para verificar a expressão de proteínas-chave para o processo de EMT, como o SNAIL e a CDH1. Não foram observadas diferenças significativas na quantificação da expressão de CDH1 nem visualmente na expressão de SNAIL entre os grupos tratados e não tratados com OSI-906, demonstrando que esse composto, apesar de causar uma alteração morfológica no controle, não afeta a expressão dessas proteínas.

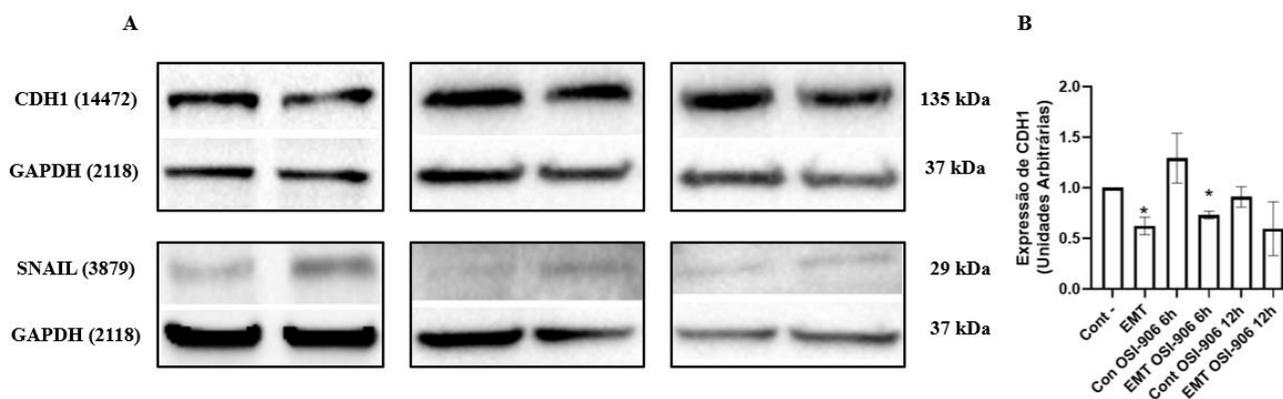


Figura 27: Avaliação da expressão das proteínas CDH1 e SNAIL por ensaio de “*Western blotting*” durante o processo de EMT e com OSI-906

A figura mostra os resultados da análise por “*Western blotting*” das proteínas CDH1, SNAIL e GAPDH, bem como a normalização de sua expressão com GAPDH. **(A)** Expressão das proteínas CDH1, SNAIL e GAPDH. **(B)** Gráfico da

expressão normalizada de CDH1. O gráfico representa a média \pm E.P.M. *, $p < 0,05$ vs Cont- (n = 2 para cada grupo experimental)

Após analisado o processo de EMT nas células tratadas com OSI-906, foi realizado a validação da ação do composto. O resultado da atividade do composto OSI-906 nas proteínas-alvo pode ser visualizado na **figura 28 A e B**. Nas amostras tratadas com OSI-906, um inibidor da auto fosforilação do IGF-1R, foi observado uma subexpressão não expressiva do receptor em 06 e 12 horas de tratamento. Ao contrário do pIRS1, que apresentou uma diferença significativa, diminuindo para 0,5 unidades para EMT e controle em 12 horas de tratamento. Esses dados validam que o tratamento com 72 nM de OSI-906 por 12 horas em MCF-7 foi eficaz, visto que as células tratadas apresentaram uma diminuição na fosforilação da proteína IRS-1 e reduzindo a expressão do IGF-1R.

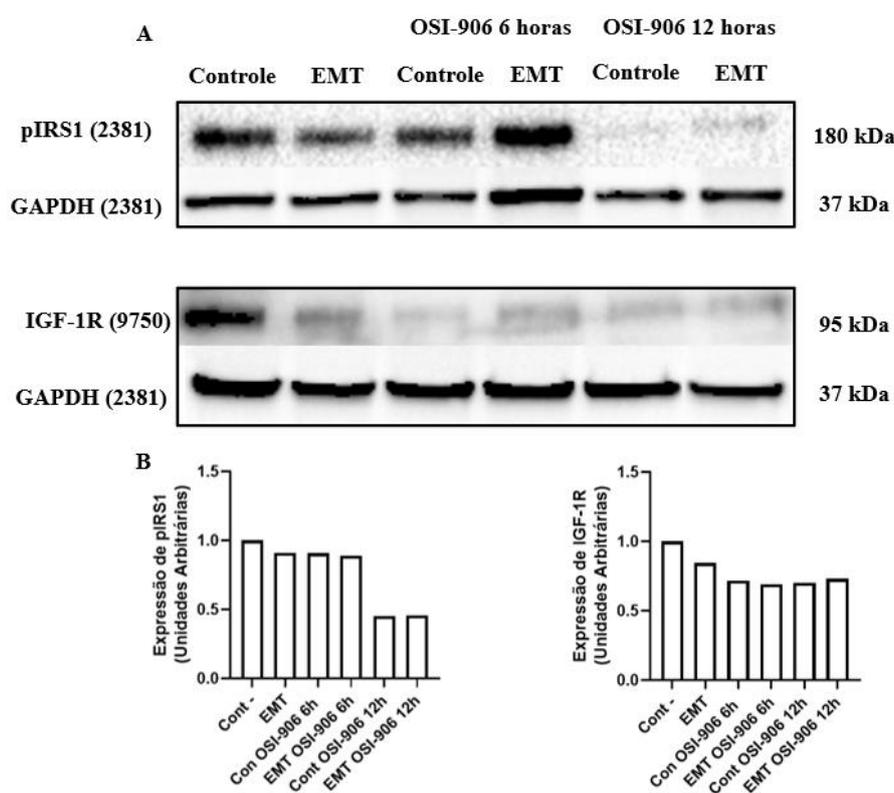


Figura 28: Avaliação da expressão das proteínas IRS1 e IGF-1R por “*Western blotting*” durante a EMT e tratadas com OSI-906

A figura mostra os resultados da análise por “*Western blotting*” das proteínas pIRS1, IGF-1R e GAPDH, bem como a normalização de sua expressão com GAPDH. **(A)** Expressão das proteínas IRS-1, IGF-1R e GAPDH. **(B)** Gráficos da expressão normalizada de pIRS1 e IGF-1R. (n = 1 para cada grupo experimental).

Com relação à expressão de SDC4, não foi possível visualizar no ensaio de “*Western blotting*” convencional, por isso decidimos realizar o ensaio por meio da técnica de “*dot blot*” (**Figura 29 A**). Para esse ensaio, utilizamos 6 μ g de proteína proveniente do extrato total. Devido ao uso desse método, não foi realizada a normalização dos resultados com uma proteína constitutiva. Nele, foi possível

verificar que, durante o processo de EMT, a expressão de SDC4 foi reduzida em média, de 4,0 unidades no controle negativo (Cont -) para 2,6 unidades no tratado com EGF (EMT). Além disso, com o tratamento com OSI-906, também foi observada uma diminuição considerável em 12 horas de tratamento (**Figura 29 B**). Para 6 horas de tratamento, foi observada uma queda de 1,2 unidades em relação aos controles e de 6,0 unidades em relação ao tratado com EGF. Para 12 horas de tratamento, a diminuição da expressão foi ainda maior e diferente do controle negativo e do EMT, sendo de 1,3 e 1,0 unidades, respectivamente (**Figura 29 B**). Isso indica que o processo de depleção indireta do SDC4 a partir da inibição da autofosforilação de IGF-1R utilizando o composto OSI-906 foi bem-sucedido, sendo mais expressivo em 12 horas, tanto para o controle como para o induzido a EMT.

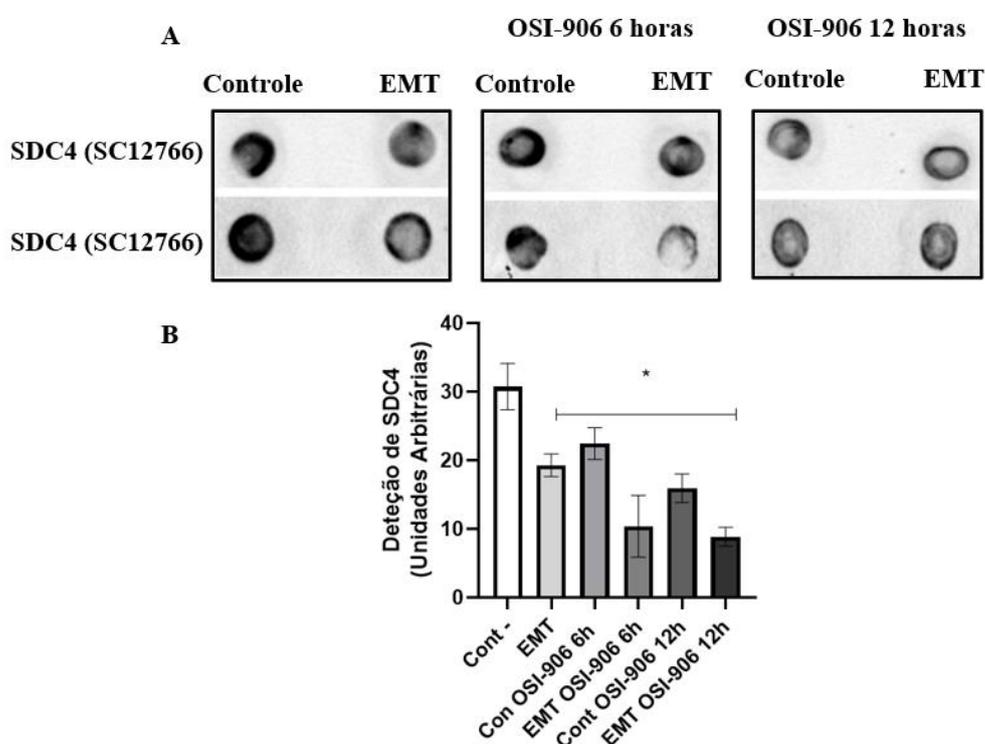


Figura 29: Análise do processo de depleção de SDC4 por “dot blot”

A figura mostra a análise por “dot blot” da expressão de SDC4 em células MCF7 induzidas ao processo de EMT com 10nM de EGF por 48 horas e tratadas com 72nM de OSI-906 por 6 e 12 horas. **(A)** Resultado do ensaio de “dot blot”. **(B)** Gráfico referente à quantificação das expressões de SDC4. Os resultados representam a média \pm E.P.M. *, $p < 0,05$ vs Cont -. #, $p < 0,05$ vs EMT, ($n = 2$ para cada grupo experimental).

4.5 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR POR ENSAIO DE “WOUND HEALING”

Após a determinação do tempo máximo de tratamento com o OSI-906, foi realizado um ensaio para avaliar a taxa de migração das células induzidas à EMT e tratadas com o OSI-906. Para esse ensaio, foi utilizada a técnica de “Wound Healing”, na qual é possível visualizar a migração de células para um espaço artificialmente criado. As microfotografias do ensaio foram tiradas nos intervalos de

0, 24, 42 e 48 horas, acompanhando o tratamento de indução de EMT por EGF. Em 36 horas de experimento, foi adicionado 72 nM de OSI-906 em alguns poços junto ao tratamento com EGF para verificar as alterações na migração celular a partir da redução da expressão de SDC4 de forma indireta.

A **figura 30 A** é composta por um quadro de microfotografias representativas de cada tempo de análise dos grupos tratados com EGF e OSI-906 para o ensaio de migração celular. Nele foi possível verificar visualmente que todos os grupos tratados reduziram o espaço livre mais intensamente ao longo do tempo em relação ao grupo controle. No gráfico da **figura 30 B**, foi possível quantificar a diferença na porcentagem da migração entre os grupos em 24, 42 e 48 horas, sendo, em média, 5,3, 14,2 e 16,1%, respectivamente. Isso indica que a indução do processo de EMT levou a um aumento significativo na migração celular, muito devido a este processo estar associado à progressão tumoral que confere aumento da mobilidade da célula.

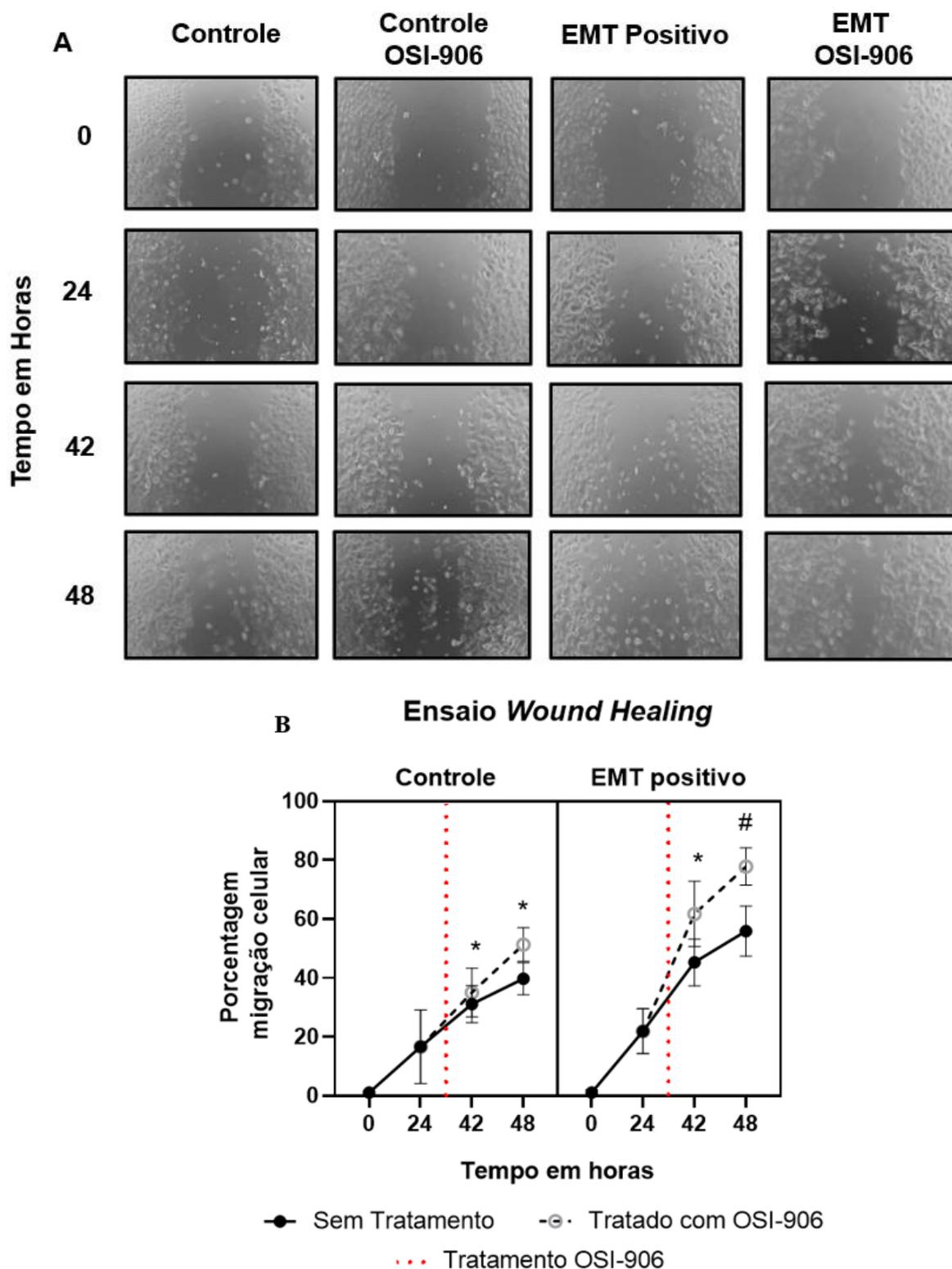


Figura 30: Análise da migração celular por ensaio de "Wound healing"

A figura apresenta microfotografias e a análise da taxa de migração celular no ensaio de "Wound healing" em células de câncer de mama induzidas ao processo de EMT com 10 nM de EGF e com redução da expressão de SDC4 utilizando 72 nM de OSI-906. **(A)** Quadro com microfotografias do ensaio ao longo das horas de indução da EMT pelos grupos analisados. **(B)** Gráfico da porcentagem da migração celular ao longo do tempo de exposição ao EGF em horas, sendo os pontos pretos sem tratamento com OSI-906 e os cinzas com tratamento; a linha vermelha tracejada indica o momento

em que o tratamento com o composto foi iniciado. Os resultados representam a média \pm E.P.M. *, $p < 0,05$ vs 0 hora de cada grupo. #, $p < 0,05$ vs EMT positivo 48 horas, ($n = 3$ para cada grupo experimental).

Com relação ao tratamento com OSI-906, foi possível visualizar na **figura 30 B** que, após o início do tratamento, a porcentagem de migração celular se elevou para ambos os grupos, sendo mais evidente no induzido a EMT. O aumento foi tal que, na análise de 48 horas, as células tratadas com OSI-906 apresentaram uma porcentagem de migração celular de 77%, a qual foi expressivamente superior ao das células em EMT no mesmo tempo (55%). Esse resultado demonstra que a inibição da auto fosforilação de IGF-1R com o objetivo de reduzir a expressão de SDC4, causou um aumento significativo na migração celular em células de câncer de mama induzidas ao processo de EMT. Nas células controle, também foi possível verificar esse padrão, contudo sem uma diferença considerável, variando apenas 3,1% em média.

4.6 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE CLIVAGEM PROTEOLÍTICA DA PROTEÍNA SDC4

Sabendo que a proteína SDC4 é integrante da MEC e sofre ação proteolítica por "shedding" através da atividade das MMPs 2 e 9 (**Figura 31 A**), decidimos avaliar o processo de clivagem proteolítica durante a EMT e com o tratamento com OSI-906 na SDC4. Para isso, realizamos, a partir dos dados proteômicos, uma análise com os peptídeos identificados; posteriormente uma análise por "dot blot" da abundância relativa da proteína SDC4 no secretoma; e ao final, uma análise da atividade gelatinolítica e de expressão das MMPs 2 e 9, através de ensaio de zimografia e "Western blotting".

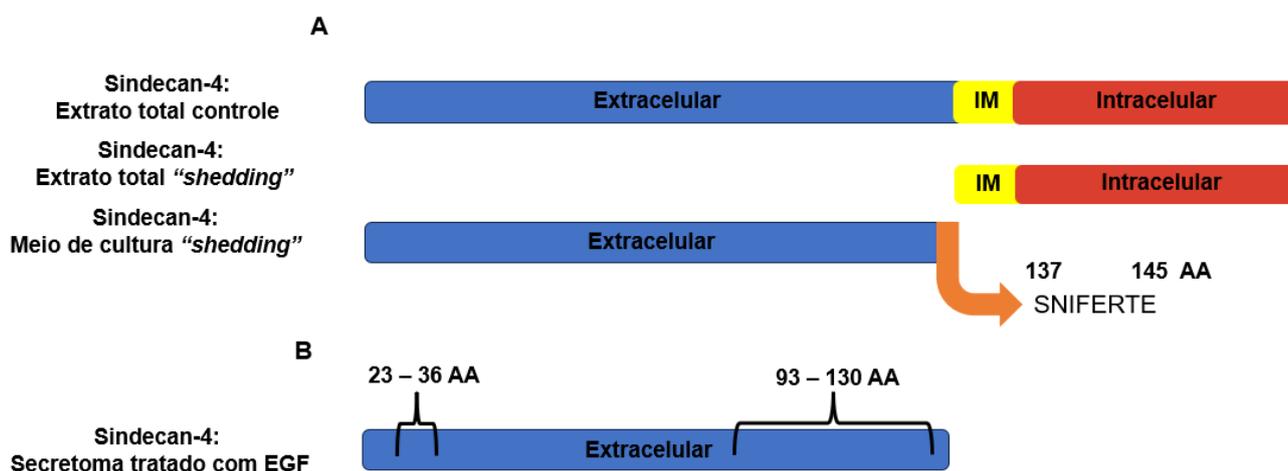


Figura 31: Análise do processo de "shedding" da proteína SDC4 a partir de dados proteômicos

A figura exemplifica o POSSÍVEL processo de "shedding" que a proteína sofre, a região proposta dessa clivagem e os resultados obtidos a partir dos dados proteômicos dos peptídeos identificados. **(A)** Exemplificação do processo de "shedding" sofrido pelo SDC4 e sua região de clivagem proposta. **(B)** Resultado da análise proteômica das proteínas secretadas com os peptídeos identificados. Fonte: Baseada em (FAÇA; HANASH, 2009)

Com os dados proteômicos, foi possível verificar que, dentre os peptídeos identificados referentes ao SDC4, todos estavam na região extracelular da proteína, mais especificamente entre os aminoácidos 23-36 (ETEVIDPQDLLEGR), 93-105 (RAGSGSQVPTEPK), 106-115 (KLEENEVIPK), 115-127 (ISPVEESEDVSNK) e entre 114-130 (RISPVEESEDVSNKVMS), como pode ser visualizado na **figura 31 B**. Ambos são posteriores à região de clivagem proposta na literatura para essa proteína, que seria entre os aminoácidos 137-145 (SNIFETER), anteriores ao domínio transmembranar.

Além disso, esses peptídeos foram encontrados majoritariamente nas amostras de secretoma tratadas com EGF e apenas um único peptídeo entre os aminoácidos da região 106-115 (ISPVEESEDVSNK) no extrato total. Sendo assim, nossos dados proteômicos também indicam que a região de clivagem do peptídeo estaria próxima ao domínio transmembrana.

4.6.1 Avaliação do processo de “*shedding*” em amostras de secretoma

Após a verificação da possibilidade do processo de “*shedding*” pela bibliografia e pelos dados proteômicos obtidos, decidimos realizar uma análise da detecção da região extracelular do SDC4 pelo método de “*dot blot*”, utilizando 6 µg de proteína proveniente do secretoma das células induzidas à EMT e tratadas com OSI-906. Na **figura 32 A e B**, foi possível visualizar através do “*dot blot*” e a quantificação deste que o processo de EMT aumenta de forma significativa a presença da proteína no secretado, com uma variação média de 3 unidades. Isso vai em contraponto com os dados da seção 4.4, que mostrava uma diminuição na expressão dessa mesma proteína durante a indução da EMT. Esses dois resultados em conjunto indicam que, durante o tratamento com EGF, está ocorrendo o aumento do processo de “*shedding*” de SDC4.

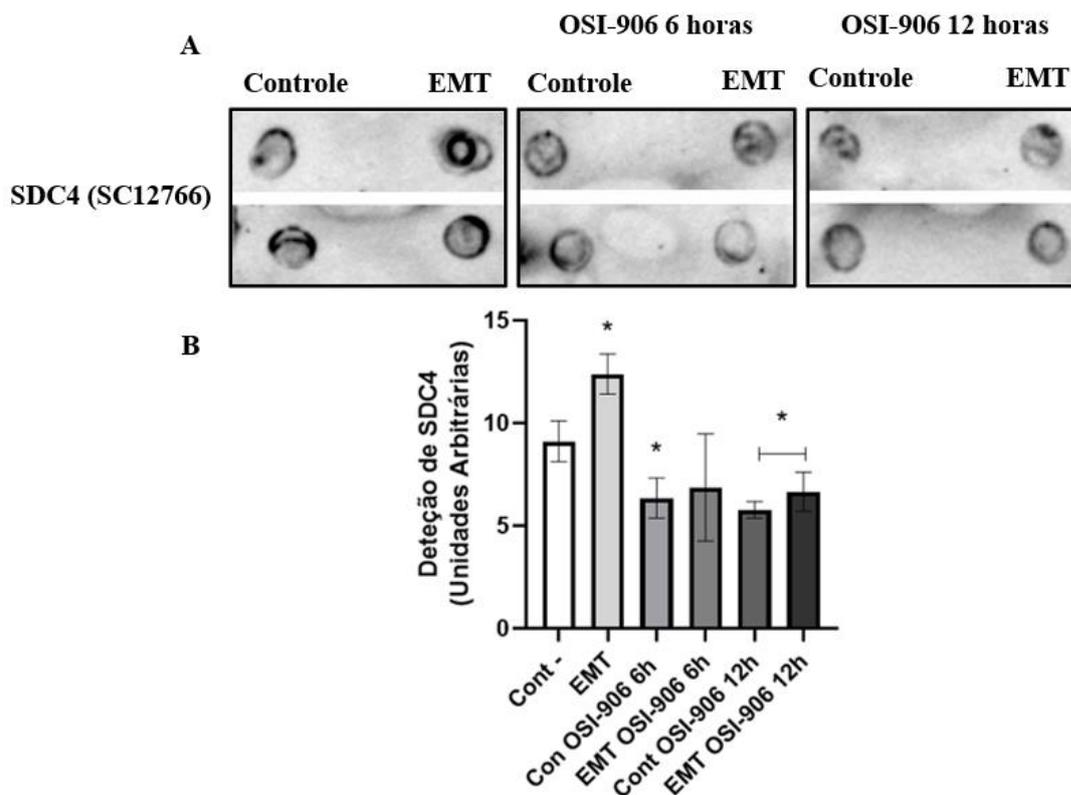


Figura 32: Análise do processo de “shedding” por “dot blot” de SDC4

A figura mostra a análise por “dot blot” da detecção da região extracelular de SDC4 em células MCF7 induzidas ao processo de EMT e tratadas com 72 nM de OSI-906 por 6 e 12 horas. **(A)** Resultado do ensaio de “dot blot”. **(B)** Gráfico referente à quantificação da detecção de SDC4 sem a normalização. Os resultados representam a média \pm E.P.M, * $p < 0,05$ vs Cont - ($n = 2$ para cada grupo experimental).

Com relação ao tratamento com OSI-906 de 6 e 12 horas, como pode ser visto na **figura 32 B**, ocorreu uma diminuição na detecção da proteína, tanto para os controles como para o tratamento com EGF. As amostras com 12 horas de tratamento com OSI-906 e o controle de 6 horas apresentaram uma diminuição significativa em relação ao controle, com suas médias de detecção caindo de 9,1 para 6,3, 5,7 e 6,7 respectivamente. Isso indica que o tratamento com OSI-906 reduziu proporcionalmente a presença da proteína no secretado, o que pode ser associado a redução concomitante de SDC4 nas amostras de extrato total avaliada na **seção 4.4**. Sendo assim, não podemos confirmar que a diminuição detectada nesse experimento está correlacionada diretamente à redução do processo de “shedding”, devido à redução na própria expressão da proteína pelo composto OSI-906, mas que os dados com o tratamento e de migração indicam uma correlação com as observações proteômicas onde SDC4 pode estar participando da progressão tumoral em células de câncer de mama.

4.6.2 Avaliação da atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9

Baseado nos dados da literatura sobre a proteína SDC4, nos dados previamente apresentados e considerando que essa proteína sofre o processo de “*shedding*”, especialmente pelas MMPs 2 e 9, foi realizado o ensaio de zimografia para avaliar a atividade dessas duas enzimas. Nosso objetivo foi verificar se, durante o processo de EMT ou com o tratamento com OSI-906, havia alguma alteração na atividade gelatinolítica das MMPs.

Para o ensaio de zimografia, foi utilizado 30 µg de extrato total e 20 µL de meio de cultura contendo as proteínas secretadas para cada uma das amostras. Para fins de controle do método e normalização dos resultados, foi incluído um controle positivo (Controle +) com SFB. O gel contendo as amostras do extrato total não revelou atividade das enzimas, conforme pode ser observado na **figura 33 A**. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que as MMPs 2 e 9, são, majoritariamente, secretadas pela célula e não estão ancoradas à membrana plasmática. Por outro lado, nas amostras do secretoma, conseguimos identificar tanto a atividade da MMP 2 (banda inferior) quanto da MMP-9 (banda superior), como ilustrado na **figura 33 B**. Esses resultados indicam que as células de câncer de mama podem estar liberando todas as unidades produzidas das MMPs 2 e 9.

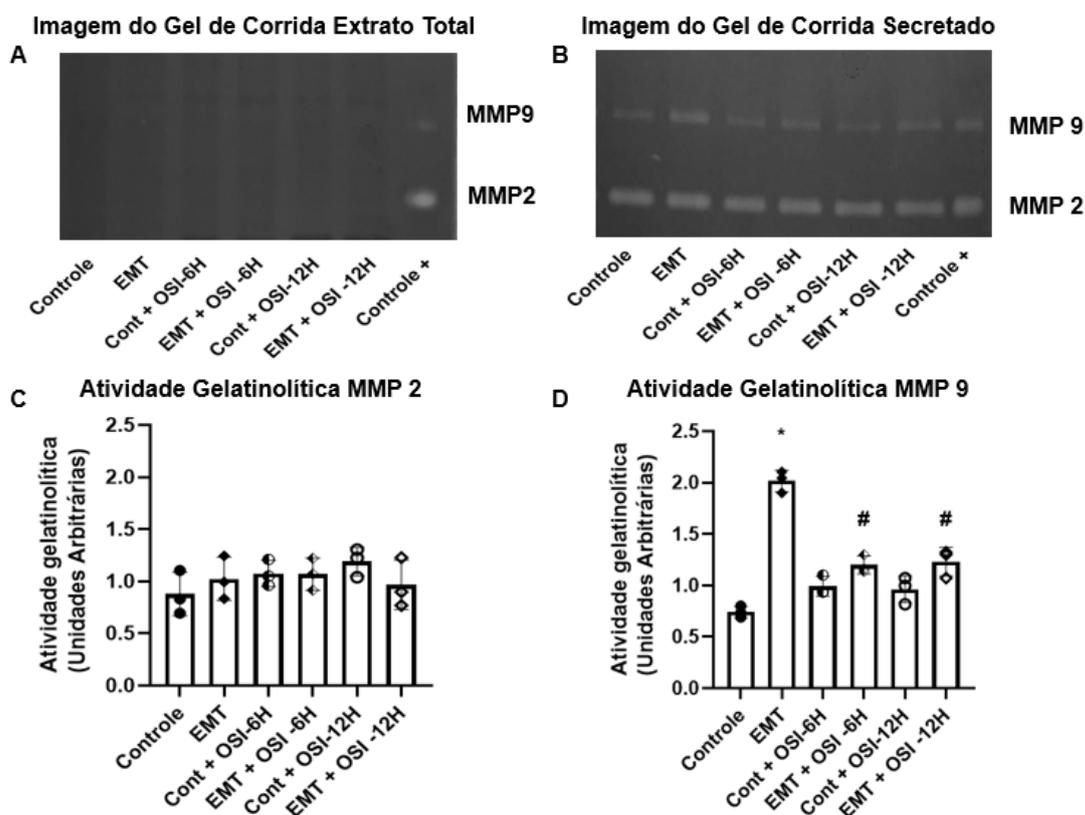


Figura 33: Zimografia para amostras do extrato total e de proteínas secretadas

A figura demonstra os resultados do ensaio de zimografia pela imagem captada do gel como pelos gráficos com os valores das bandas calculados por ImageJ. **(A)** Gel contendo 30 µg de proteína do extrato total. **(B)** Gel contendo 20 µL do secretoma. **(C)** Gráfico da atividade gelatinolítica da MMP-2 excretada, expressa em unidades arbitrárias. **(D)** Gráfico da atividade gelatinolítica da MMP-9 excretada, expressa em unidades arbitrárias. Os grupos experimentais incluem o controle negativo sem tratamento (Controle), a indução do processo de EMT (EMT), tratamento com 72 nM de OSI-906 em 6 e 12 horas, tanto induzidas quanto não induzidas à EMT (Cont + OSI/EMT +OSI), e o controle positivo com SFB. Os resultados representam a média ± E.P.M. *, $p < 0,05$ vs Controle. #, $p < 0,05$ vs Controle e EMT (n = 3 para cada grupo experimental).

Quanto à atividade da MMP 2 (**Figura 33 C**), ao comparar todas as amostras do secretoma, não foi observada diferença significativa na atividade gelatinolítica, com uma variação de até 0,3 unidades. Isso sugere que, para a quantidade de amostra utilizada, tanto a indução da EMT quanto na redução da expressão de SDC4, a atividade da MMP 2 não foi afetada de maneira significativa.

No entanto, em relação à MMP 9, foram observadas diferenças expressivas nas atividades da enzima em resposta aos diferentes tratamentos. O tratamento com EGF para a indução da EMT dobrou a atividade da MMP 9 em comparação com o controle, saindo de 0,7 para 2,0 unidades em média como pode ser visualizado na **figura 33 D**. Além disso, o tratamento com OSI-906, modulou a atividade da enzima, inibindo o aumento observado na sua atividade em média de até 1,0 unidades. Os valores analisados foram estatisticamente diferentes do controle (média de 0,3 unidades) e da EMT (média de 1,0 unidades), indicando que a atividade gelatinolítica foi reduzida pelo tratamento com OSI-906.

4.6.3 Análise da expressão das MMPs por “*Western blotting*”

Após a realização da zimografia das amostras secretadas para visualizar a atividade dessas enzimas durante o processo de EMT e tratadas com OSI-906, foi realizado a análise da expressão dessas MMPs nas mesmas amostras pelo método de “*Western blotting*”. Para essa análise, foram utilizados 30 µg de proteínas do secretoma de cada uma das amostras, e para a normalização, foi utilizado a expressão de β-actina.

Na **figura 34 A**, foi possível visualizar a expressão das MMPs 2 e 9 a partir das proteínas secretadas pela célula. Já na **figura 34 B**, foi possível verificar que a expressão de MMP 9 foi afetada pelos dois tratamentos realizados (EGF e OSI-906). O tratamento apenas com EGF fez com que a enzima tivesse expressão aumentada, variando significativamente de 1,0 para 1,8 unidades, indicando que o processo de EMT eleva a expressão da MMP 9. Com relação às amostras tratadas com OSI-906, foi possível visualizar uma diminuição na expressão nas amostras EMT positivas e na tratada com OSI-906 por 12 horas, isso indica que o composto pode estar agindo na modulação da expressão dessa enzima.

Para a MMP2, assim como no ensaio de Zimografia da seção anterior, sua expressão não apresentou variações significativas entre os tratamentos realizados, mantendo uma variação máxima de 0,3 unidades, como pode ser visto no gráfico de expressão da MMP 2 na **figura 34 B**

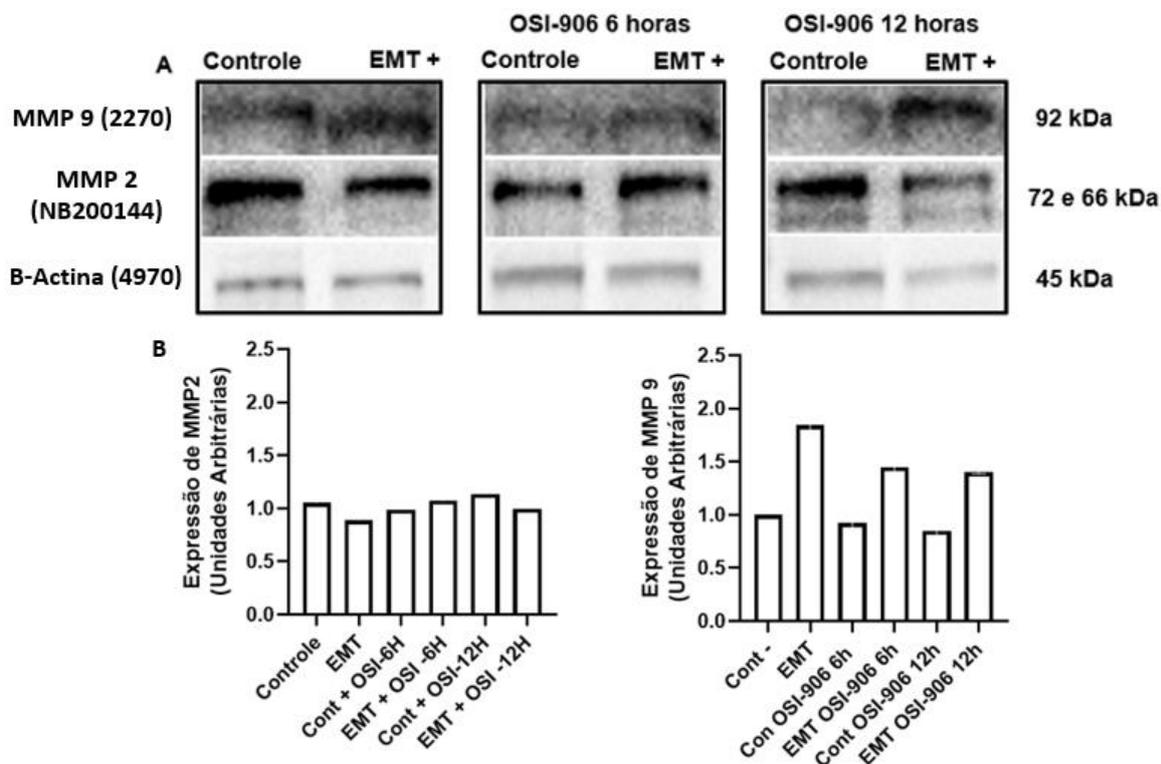


Figura 34: Avaliação da expressão das MMPs 9 e 2 por “Western blotting” durante a EMT e tratadas com OSI-906

A figura mostra os resultados na análise por “Western blotting” do secretoma das enzimas MMP 9 e 2 e a normalização da sua expressão com β -Actina. **(A)** Expressão de MMP 9 e 2. **(B)** Gráfico da expressão normalizada de MMP 2 e 9, (n = 1 para cada grupo experimental).

5. DISCUSSÃO

O câncer de mama, é um dos cinco tipos mais comuns no Brasil, ficando atrás somente do câncer de pele não melanoma. Além disso, o câncer de mama é o mais prevalente em mulheres de meia idade, somente no Brasil em 2022, foram registrados mais de 60 mil novos casos dessa neoplasia (INCA, 2022). Apesar da alta incidência, a taxa de sobrevivência das pacientes é em torno de 90%, no entanto, devido à proximidade da mama com os linfonodos axilares e mamários internos, os riscos de metástase são elevados. Quando o processo de metástase é diagnosticado, a taxa de sobrevivência das pacientes pode diminuir para até 25% dos casos de câncer de mama, sendo a metástase considerada um dos principais agravantes para esse tipo de neoplasia (SEELY; ALHASSAN, 2018).

Assim, conforme discutido, a metástase representa um dos fatores mais significativos na progressão tumoral, sendo o processo de EMT uma das etapas cruciais no início da cascata metastática (GERSTBERGER; JIANG; GANESH, 2023). A indução da EMT em células tumorais de linhagens humanas como modelo de progressão tumoral é amplamente documentada e vem sendo utilizado por nosso grupo de pesquisa a mais de uma década. A cada estudo, aprimoramos descobertas, investigamos interações entre proteínas e propomos novos mecanismos (DE SOUZA PALMA et al., 2016; LANFREDI et al., 2021; SILVESTRINI et al., 2020). Isso se deve, em grande parte, à importância desse processo na progressão tumoral de diversas neoplasias, como no câncer de mama.

Neste trabalho, foi avaliado inicialmente a indução do processo da EMT por meio da análise da mudança morfológica celular e da expressão de marcadores chave como o CDH1 e SNAIL. Os resultados revelaram uma diminuição significativa na expressão de CDH1 e um aumento, também significativo, na expressão de SNAIL em relação com as células controle. Essas observações são consistentes com dados do grupo de pesquisa referente a câncer de mama induzido ao processo de EMT com TGF- β 2, EGF e SAHA (DE SOUZA PALMA et al., 2016; LANFREDI., 2021; SILVESTRINI et al., 2020). Esses resultados também encontram respaldo em estudos realizados por outros pesquisadores que investigam a EMT e viram que, durante o processo, SNAIL está elevado e CDH1 reduzido (KIM et al., 2016; TRIVANOVIĆ et al., 2016; LIU, *et al.*, 2020). Outrossim, foi visto que a ativação por EGF estimulou a atividade de Smad 2/3, que atuam como feedback positivo para os marcadores da EMT (KIM et al., 2016). Neste mesmo estudo, constataram que a resposta celular ao tratamento, analisada através da expressão de SNAIL, VIM e fibronectina, teve início nas primeiras 4 horas, atingiu um pico em 24 horas e decaiu após 72 horas (KIM *et al.*, 2016). Esses dados indicam que, as expressões de SNAIL e CDH1 analisadas neste trabalho, captaram o pico da resposta celular ao EGF uma vez que o tratamento foi realizado com 3 adições dentro de 48 horas. Adicionalmente, estudos publicados por Takeda e colaboradores mostraram que a inibição de EGFR em MCF-7 resultou

em uma redução do processo de EMT, diminuindo a expressão de SNAIL e Twist (TAKEDA et al., 2022).

Além dos processos de EMT e metástase, os estudos relacionados à MEC são de grande importância, à medida que participação do microambiente tumoral no desenvolvimento do tumor se torna cada vez mais correlacionada (EBLE; NILAND, 2019). Como destacado, a MEC desempenha um papel fundamental na homeostase e no desenvolvimento celular, proporcionando suporte estrutural, sendo composta por diversos componentes, incluindo proteínas fibrosas, proteases e proteínas na superfície celular. Estes contribuem para a viscosidade do nicho celular, sinalização e interação entre as células (BONNANS; CHOU; WERB, 2014).

Devido à alta complexidade de proteínas envolvidas na MEC e com o objetivo de aprofundar o conhecimento nas vias relacionadas à EMT, foi realizado um estudo proteômico com células MCF-7 induzidas ao processo de EMT por meio do tratamento com EGF. Nos dados proteômicos coletados, foram identificadas cerca de 4 mil diferentes proteínas, tanto nas amostras de secretoma quanto no extrato total.

Dentre as proteínas mais abundantes detectadas no secretoma, observou-se uma predominância de proteínas relacionadas à adesão celular, como o complexo das cateninas. Além disso, foi possível verificar nessas mesmas amostras algumas moléculas com dupla função, interagindo tanto com a matriz extracelular quanto com a adesão celular, e relacionadas ao metabolismo celular. Nas amostras de extrato total EMT positivas, no entanto, observou-se uma predominância de proteínas envolvidas na maquinaria energética da célula e de síntese de glicoproteínas. As proteínas de adesão, detectadas no secretoma, foram observadas, em sua maioria, nas amostras controle. Isso se deve ao fato de que as células controle, possuindo características epiteliais, são menos agressivas do que as tratadas com EGF (características mesenquimais). Dentre essas características das células controle, podemos destacar a alta prevalência de proteínas de adesão celular, assim como observado nos dados proteômicos, como no caso da CDH1 que é mais abundante em células saldáveis (FUJITA et al., 2009). Correlacionando com as amostras de células EMT positivas, as proteínas de adesão encontram-se reduzidas devido ao tratamento com EGF, que desencadeia uma redução das proteínas epiteliais e um aumento das mesenquimais. Isso permite que a célula tenha mais mobilidade e características invasivas em relação às células controle (FUJITA et al., 2009). Com relação às proteínas relacionadas ao metabolismo celular, estas foram mais detectadas nas amostras de extrato total EMT positivas. Esse aumento em relação às amostras controle indica que a célula em EMT está com seu metabolismo elevado, muito

devido ao aumento geral da multiplicação, mobilidade e produção de componentes celulares (GOMES et al., 2022; KANG et al., 2019).

Estudos proteômicos como este se mostram interessantes para um melhor entendimento dos processos biológicos pelos quais uma célula está passando, permitindo uma compreensão mais ampla do sistema proteico. Isso favorece a descoberta de novas vias celulares de ativação, além de proporcionar um melhor desenvolvimento de terapias mais direcionadas e precisas, com alvos diretos e únicos, aumentando a sensibilidade e a especificidade dos tratamentos (NICE, 2021).

Nos dados proteômicos aqui obtidos de MCF-7 induzida a EMT por EGF, foi observado uma diminuição significativa na expressão de SDC4 em relação ao controle. SDC4 é um alvo interessante, por desempenhar um papel crucial na adesão celular e ser importante para a estrutura, proliferação, migração e sobrevivência da célula (CAVALHEIRO *et al.*, 2017). Foi previamente relatado que a expressão dessa proteína está envolvida no processo de EMT em células de câncer de pulmão tratadas com TGF- β (ICHIHASHI et al., 2016). Outros dados proteômicos do grupo reforçam esse resultado, evidenciando uma diminuição na intensidade dos picos da proteína detectados em relação às células controle (PALMA, 2018). Com base na desregulação de SDC4 e no respaldo de outros dados do grupo, decidimos aprofundar a investigação mais especificamente na participação dessa proteína durante a EMT em células de câncer de mama. Aprofundando o trabalho na busca do papel de SDC4, foi realizado a redução da sua expressão a fim de mimetizar o observado nos dados proteômicos durante a indução da EMT. Além disso, com base no publicado por Keller-Pinter em 2021, ficou decidido a realização de uma análise para verificar se, em MCF-7, a diminuição da expressão de SDC4 estaria correlacionada com o aumento da mobilidade celular durante a EMT. Isso pois, foi observado que, além de contribuir para a adesão celular, o SDC4 está envolvido no processo de migração celular em diferentes linhagens (KELLER-PINTER et al., 2021).

Para reproduzir o evidenciado, foi utilizado como base um estudo que demonstrava que a inibição do IGF-1R pelo composto AG 1024, levava a uma diminuição na expressão de SDC4 via aumento em sua endocitose (AFRATIS et al., 2017). Este trabalho demonstrou que o composto OSI-906 leva a uma redução na expressão de SDC4. Além disso, resultados clínicos promissores indicam que a droga tem atividade antitumoral diversos tipos de câncer, incluindo o de mama (BOWLES; KESSLER; JIMENO, 2011; NCBI, 2018; NCBI, 2019). O OSI-906 atua inibindo a autofosforilação do IGF-1R e, conseqüentemente, a fosforilação de IRS1 e das vias dependentes de sua fosforilação, como as vias Akt e ERK1/2 (MULVIHILL et al., 2009). Ademais, foi observado que o tratamento com 1 μ M de OSI-906 resultou em uma diminuição significativa na proliferação celular em células de

câncer de mama (KRUGER et al., 2020). Previamente aos estudos para avaliar a migração celular, foram realizados experimentos para determinar a concentração e tempo máximo que poderiam ser utilizados desse composto em MCF-7. Com base, foram utilizados os dados literários sobre o IC₅₀ do OSI-906 (35 nM), para os ensaios de MTT e de apoptose com Anexina V (MEDCHEMEXPRESS, 2023; PANCHOLI *et al.*, 2022; SELLECKCHEM, 2023). O objetivo foi de determinar a concentração e o tempo máximo nos quais foi possível reduzir ao máximo a expressão de SDC4 sem causar morte celular.

Quanto ao ensaio de MTT, as vantagens desta técnica residem na capacidade de visualizar estresses no metabolismo celular causados pela exposição ao composto, sem necessariamente resultar em morte celular (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018). No ensaio de MTT foi observado uma diminuição expressiva de 60% na viabilidade celular com 144 nM de OSI-906 em 24 horas de tratamento, sugerindo que o composto causou morte celular nessa concentração e tempo analisado. Esses dados são consistentes com estudo em diferentes linhagens de carcinoma de esôfago, no qual a viabilidade celular reduziu cerca de 30% após 48 horas de tratamento com 0,1 µM de OSI-906 (WU et al., 2017). Outra pesquisa mostrou que o tratamento desse composto na concentração de 0,4 µM por 72 horas resultou em uma redução de 50% na viabilidade celular em linhagens de carcinoma de nasofaringe (WANG et al., 2019). Esses achados na literatura, juntamente com os dados obtidos neste trabalho, indicam uma toxicidade dose e tempo dependentes do OSI-906 em MCF-7.

Posteriormente, buscando uma abordagem mais específica quando a viabilidade celular frente ao tratamento com OSI-906, avaliamos a atividade apoptótica do composto por meio de ensaios de apoptose utilizando Anexina V como marcador, e detecção por citometria de fluxo. A Anexina V possui a capacidade de se ligar especificamente à fosfatidilserina na superfície da célula que, em condições fisiológicas, está predominantemente presente na parte interna da membrana plasmática. Contudo, em condições de apoptose celular, ele é translocada para a camada externa, atuando como um sinalizador de fagocitose para as células de defesa do organismo, indicando o processo de apoptose (INVITROGEN, 2022). Nos dados coletados de apoptose, observamos que o composto OSI-906, na concentração de 72 nM em 24 horas de tratamento, resultou em um aumento nos eventos apoptóticos em comparação com as células controle e com o tratamento de 6 horas na mesma concentração. Um estudo com linhagens de carcinoma de esôfago mostrou que 1 µM de OSI-906 resultou em um aumento da apoptose em relação ao controle em 48 horas de tratamento (WU et al., 2017). Além disso, em células de câncer nasofaríngeo, o tratamento com 400 nM de OSI-906 também apresentou aumento na detecção de eventos de apoptose (WANG et al., 2019). Diante do aumento da toxicidade do composto

em MCF-7 de maneira dose e tempo dependente, ficou decidido que este seria utilizado na concentração de 72 nM por, no máximo, 12 horas de tratamento para as análises funcionais, já que não foi observada uma diminuição da viabilidade celular nem o aumento da apoptose nessa concentração e tempo.

Determinada a concentração e o tempo máximo de tratamento com OSI-906, foi realizado uma expansão celular tratada com EGF e OSI-906 a fim de obter proteínas do extrato total e do secretoma, visando validar a atividade do composto por meio da expressão de proteínas alvo, como IGF-1R, IRS1 e SDC4. Além dessas proteínas, decidimos também analisar a expressão de SNAIL e CDH1 devido à observação de alterações morfológicas (de epitelial para mesenquimal) nas células controle tratadas apenas com OSI-906. No entanto, de acordo com os dados analisados através do ensaio de "*Western blotting*", foi observado que o tratamento com OSI-906, embora tenha causado alterações morfológicas na célula, não alterou de forma significativa os marcadores de EMT. Na verdade, segundo Vaquero *et al.*, (2018), o bloqueio da fosforilação do IGF-1R por OSI-906 diminuiu a expressão de proteínas relacionadas a EMT em células de câncer de cólon retal e em xenoenxertos em ratos (VAQUERO *et al.*, 2018).

Como mencionado anteriormente, o OSI-906 inibe a autofosforilação do IGF-1R, associada à ativação, por fosforilação, de IRS1, desencadeando a ativação das vias AKT e ERK1/2. Com o objetivo de verificar a atividade do OSI-906 em MCF-7, foi realizado, por meio de "*Western blotting*", a análise da expressão de IGF-1R e de pIRS1. Ademais, foi evidenciado por Guo *et al.*, (2021) que a linhagem de MCF-7 expressa grandes quantidades de IGF-1R. Nos dados aqui apresentados, foi observado uma diminuição na expressão de IGF-1R nas células tratadas com OSI-906, assim como na expressão de pIRS1, sendo mais evidente no tratamento de 12 horas com OSI-906. Dados publicados por Zhuou *et al.*, (2015) demonstraram que, em células de câncer de pulmão, EMT positivas, a expressão de IGF-1R esta positivamente correlacionada com a expressão de pIGF-1R, em relação a células menos agressivas, indicando um aumento na sua expressão e ativação durante a progressão tumoral (ZHOU *et al.*, 2015). Corroborando com os dados aqui apresentados, estudos com diferentes linhagens celulares mostraram que o tratamento com OSI-906 também reduziu a expressão de proteínas fosforiladas como pIGFR, pIRS, pAKT e pERK sem afetar de maneira significativa a expressão de IGFR (JANKU *et al.*, 2013; KRUGER *et al.*, 2020; LEE *et al.*, 2023; VAQUERO *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2017).

Para a análise da expressão de SDC4, após tentativas não sucedidas com "*Western blotting*", optamos por realizar por meio do ensaio de "*dot blot*". Inicialmente, foi observado uma redução

significativa na expressão da proteína em células induzidas a EMT. Esse achado corrobora com o fato de que o processo de EMT eleva a agressividade da célula aumentando sua mobilidade e diminuindo sua adesão célula-célula (GUO et al., 2023; REDFERN; SPALDING; THOMPSON, 2018). Além disso, foi observado uma redução ainda mais significativa nas células tratadas com OSI-906, com diferenças significativas em 12 horas de tratamento. Essa redução também foi observada por Afratis *et al.*, (2017) ao bloquearem a ativação de IGF-1R e observarem uma redução de SDC4. Pesquisas adicionais mostraram que a inibição por siRNA de SDC4 em MCF-7 não alterou a expressão de VIM, que também é um marcador de EMT, o que corrobora com os achados aqui expostos (PHAM *et al.*, 2022). Em suma, os resultados apresentados neste trabalho corroboram com as informações da literatura e indicam que a inibição da autofosforilação do IGF-1R pelo OSI-906 resultou em uma diminuição na expressão da proteína SDC4, em ambos os grupos celulares.

Após a validação da atividade do composto e sua ação de reduzir a expressão de SDC4, prosseguiu-se para a análise da participação desta proteína no processo de migração celular durante a EMT em células de câncer de mama pelo ensaio de "*wound healing*". Essa técnica é considerada qualitativa e semi-quantitativa para avaliar a migração celular de células aderentes a partir de um risco mecânico na placa. O risco tem por objetivo criar um espaço livre de células para visualizar seu fechamento ao longo do tempo e, assim, determinar e quantificar a migração celular (LIANG; PARK; GUAN, 2007). Essa técnica também é amplamente utilizada pelo grupo para avaliação do processo de EMT, e seus resultados corroboram com os aqui obtidos ao verificar um aumento na migração celular em células tratadas com EGF (PALMA, 2018). Outrossim, corroborando com os dados do grupo, também foi validado por Trivanovic *et al.*, (2016), que MCF-7 induzida a EMT tem um aumento na taxa de migração e invasão celular em relação as células não induzidas.

Em relação as células tratadas com o OSI-906, observamos um aumento na migração celular tanto nas células controle como nas células induzidas a EMT. Com relação ao tratamento de 48 horas com EGF e de 12 horas com OSI-906, foi observado uma migração significativamente maior em comparação com aquelas tratadas apenas com EGF. Similarmente, nas células controle, foi observado um aumento não expressivo na migração celular no mesmo período. Esses achados reforçam a hipótese inicial de que, durante o processo de EMT, ocorre a diminuição da expressão de SDC4, o que leva a um aumento na migração celular, uma vez que, ao mimetizar a diminuição da expressão de SDC, um aumento da migração celular pode ser observado. Curiosamente, dados publicados por Pham *et al.* (2022) e Onyeisi *et al.*, (2021), demonstram que, células de câncer de mama tratadas com siRNA e miRNA para o silenciamento da expressão de SDC1 e 4, apresentam um aumento na migração celular

em relação as células controle para o silenciamento de SDC1, entretanto para o SDC4 o oposto foi observado. Corroborando com estes últimos, Leblanc *et al.*, (2018), demonstrou que Autotaxina e SDC4 estão envolvidos em uma colaboração recíproca para a indução da metástase em células cancerígenas humanas e em modelos de ratos ao ponto que, ao transfectarem um siRNA para inibição de SDC4, eles observaram uma diminuição na formação de metástase no câncer de mama (LEBLANC *et al.*, 2018). Outrossim, foi analisado a atividade de OSI-906 na migração de células de hepatocarcinoma e de câncer de ovário e, diferentemente dos dados desse trabalho, o tratamento com o composto reduziu a migração celular (LIU *et al.*, 2022; PIVONELLO *et al.*, 2016). No entanto, essas mesmas pesquisas abordam que as vias relacionadas ao IGF-1R podem ter uma participação importante na migração celular dessas linhagens celulares. De fato, Liu *et al.*, (2022), contribuindo para seus achados, verificou que o tratamento para ativação de IGF-1R levou a um aumento significativo na migração celular nessas mesmas linhagens. Em suma, isso pode indicar que SDC4 pode ter funções distintas a depender da linhagem celular observada. Dito isso, é importante ressaltar a relevância atual da medicina personalizada à medida que se descobre diferentes respostas para um mesmo tratamento. Portanto, através da análise personalizada, pode-se direcionar o melhor tratamento para cada paciente. Nesses casos é possível elevar as chances de sobrevivência do paciente principalmente em relação as neoplasias, as quais podem ter diversas variações bioquímicas, genéticas e fisiológicas dentro de um mesmo tipo de tumor (HOEBEN; JOOSTEN; VAN DEN BEUKEN-VAN EVERDINGEN, 2021).

Como descrito na literatura, além da diminuição de expressão, SDC4 sofre o processo de "*shedding*" através da ação proteolítica das MMPs 2 e 9 (MANON-JENSEN; ITOH; COUCHMAN, 2010; ONYEISI, 2022). Este se trata de um mecanismo pós-traducional irreversível que pode regular a função de proteínas da superfície celular e de diversas sinalizações intracelulares (REISS; SAFTIG, 2009). Sendo assim, foi dada continuidade neste trabalho com a hipótese de que, durante o processo de EMT, a diminuição da detecção de SDC4, evidenciada pelo dado proteômico e pelo ensaio de "*dot blot*", poderia estar ocorrendo adicionalmente devido ao aumento do processo de "*shedding*" da proteína pela atividade das MMPs.

Para o ensaio de "*dot blot*", foram utilizadas meio de cultura condicionado com as proteínas do secretoma que indicaram que, durante o processo de EMT, ocorre um aumento na detecção da região extracelular da proteína em relação ao controle. Esse dado, combinado com a detecção de SDC4 no extrato total, indica que pode estar ocorrendo um aumento no processo de "*shedding*". Ademais, frente ao tratamento com OSI-906, foi possível visualizar, tanto no secretoma como no extrato total, uma diminuição na detecção desta proteína, corroborando a afirmativa anterior de que o composto está

reduzindo a expressão de SDC4 de forma indireta via inibição da autofosforilação de IGF-1R. Após essa visualização, ficou decidido que, para validar o aumento desse processo seria necessário analisar a expressão e a atividade das MMPs envolvidas. Sendo assim, foi realizado um ensaio de Zimografia em gel de gelatina a fim de analisar a atividade das MMPs 2 e 9 e de sua expressão por "*Western blotting*".

Com a zimografia foi possível observar que não houve atividade gelatinolítica detectada nas amostras de extrato total, mas foi observado intensa atividade nas amostras de secretoma. Isso pode indicar que essa linhagem de MCF-7 estaria com uma alta taxa de secreção das enzimas ou que, na forma intracelular, elas encontram-se bloqueadas. Nas amostras de secretoma, foi observado que a expressão da MMP 2 não sofreu variações significativas para ambos os tratamentos, mas curiosamente a MMP 9 sofreu aumento da atividade nas amostras tratadas com EGF e que, o tratamento com OSI-906, reduziu essa diferença causada pela indução da EMT. Em um trabalho publicado por Huanna *et al.*, (2015), foi observado que, em células de câncer de mama tratadas com enzimas responsáveis pela o-glicosilação, a MMP 2 estava aumentada e envolvida na progressão tumoral ao favorecer a migração e invasão celular (HUANNA *et al.*, 2015). Além disso, foi observado que IGF-1R regula a expressão de MMP 9, à medida que a quando o receptor é inibido, ocorre uma redução na expressão dessa enzima (SECCARECCIA; BRODT, 2012). Isso indica que, a redução da expressão e da atividade de MMP 9 visualizada aqui neste trabalho, durante o tratamento com OSI-906, pode ser devido a atividade de bloqueio da fosforilação do IGF-1R. Ademais, também foi visto que na inibição da expressão de SDC4 por miRNA em células endoteliais, a atividade e expressão dessas MMPs varia com a inibição da proteína, indicando que a expressão de SDC4 pode estar correlacionada com a de algumas MMPs (ONYEISI, 2022).

Além disso, o aumento da atividade de MMP 9 durante a EMT pode ser explicado pelo aumento da agressividade celular neste processo, de fato, como compilado por Huang em 2018, a agressividade de células de câncer de mama e a expressão da MMP 9 estão positivamente correlacionadas (HUANG, 2018). Em complementaridade, foi observado que a inibição da expressão de MMP 9 reduz a habilidade invasiva e migratória, além de reprimir a progressão da EMT em células de câncer de mama (IZDEBSKA *et al.*, 2021; NAZIR *et al.*, 2019). Além desses fatores anteriormente citados, o aumento na atividade de MMP 9 também pode ser explicado pelo fato de que essa MMP está envolvida em processos inflamatórios, e o processo de EMT, assim como a progressão tumoral, ativam, entre vários "*hallmarks*", a inflamação promovida pelo tumor, o que pode estar desencadeando o aumento da sua atividade e expressão dessa enzima (GONG *et al.*, 2008; MARRELLI *et al.*, 2022). Ademais, durante

a EMT, a célula adquire características mesenquimais e habilidades motoras, e, analisando para tumores, a atividade das MMPs é aumentada para favorecer a destruição da MEC e facilitar o processo de migração celular (CABRAL-PACHECO et al., 2020). Ainda, estudos publicados por Onyeisi (2022) com células endoteliais tratadas com miRNA par inibir a expressão de SDC4, mostram que a atividade e expressão dessas MMPs variam com a inibição dessa proteína.

Como perspectivas deste trabalho, é observável que são necessários mais estudos com SDC4 para elucidar os mecanismos pelos quais essa proteína pode participar no aumento da migração celular em MCF-7. Levando em consideração que SDC4 sofre o processo de “*shedding*”, e que a região extracelular dessa proteína pode se ligar a outros receptores, esse mecanismo pode estar indiretamente favorecendo o processo de migração celular. Portanto, investigações adicionais sobre as interações secundárias dessa região extracelular com receptores específicos podem oferecer “*insights*” valiosos para o entendimento das vias relacionadas ao SDC4. Outrossim, estudos com a inibição direta de SDC4 utilizando siRNAs ou peptídeos sintéticos são necessários para diferenciar e validar os efeitos observados neste trabalho entre diminuição da expressão indireta via bloqueio da fosforilação de IGF-1R do bloqueio direto de SDC4 a fim de determinar os efeitos causados pelo uso do OSI-906 na célula. Isso pois, a inibição mútua dessas proteínas pode estar levando a resultados sobrepostos, e a compreensão específica dos efeitos de SDC4 é crucial para uma abordagem terapêutica mais precisa. Ademais, com relação a atividade proteolítica, se mostra importante a condução de futuros estudos na linha do bloqueio da atividade da MMP 9 para verificar as interações diretas entre o “*shedding*” de SDC4, bem como de outras proteínas, no processo de EMT mediado por MMP 9. Considerando tudo isso, é possível, compreender de forma mais clara como essas moléculas interagem durante a migração celular e poder oferecer novos “*insights*” para intervenções terapêuticas. Além disso, considerando a importância demonstrada de SDC4 no processo de migração celular em MCF-7, a criação de terapias inibitórias específicas para esta proteína, para tipos celulares e ou tumores específicos seja por meio de anticorpos ou peptídeos sintéticos, pode representar uma promissora abordagem para o desenvolvimento de terapias supressoras de metástase nos estágios iniciais da progressão tumoral em câncer de mama. Essas terapias podem ter implicações clínicas significativas no tratamento de cânceres com potencial metastático podendo elevar a taxa de sobrevida dos pacientes.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, foram realizados experimentos que levaram a identificação do envolvimento da proteína SDC4 na EMT. Também foram realizados experimentos que mostraram a participação de SDC4 na migração celular durante o processo de indução da EMT em células de câncer de mama. Para chegar aos resultados, foi utilizado como base os dados proteômicos coletados de MCF-7 induzida ao processo de EMT, utilizando o EGF como indutor, no qual foi visualizado uma diminuição significativa na identificação de peptídeos de SDC4. Subsequentemente o composto OSI-906 foi utilizado a fim de reduzir a expressão de SDC4 de forma indireta, a fim de mimetizar o que foi visualizado nos dados proteômicos. O uso desse composto com esse objetivo mostrou-se eficaz, uma vez que foi verificado uma diminuição na expressão de pIRS1 e de SDC4. Ademais, verificou-se que o tratamento com OSI-906 não afetava, de forma significativa o processo de EMT, assim como não causava diminuição da viabilidade celular ou aumento da apoptose na concentração e tempo utilizado. O ensaio de “*Wound healing*” evidenciou que, tanto o tratamento com EGF como com OSI-906, causou um aumento na migração celular, indicando que a diminuição da expressão e SDC4 pode estar envolvido na progressão tumoral e metástase. Além disso, nossas análises do processo de “*shedding*” de SDC4 indicaram que a indução da EMT leva a um aumento dessa clivagem proteolítica, da mesma forma que ocorre um aumento da expressão e da atividade de MMP 9, a qual está associada ao processo de clivagem de SDC4. Foi visto também que o tratamento com OSI-906 levou a uma diminuição tanto para a detecção da proteína no secretoma como para a atividade e expressão de MMP 9. Contudo, mais estudos são necessários com um bloqueador direto de SDC4, assim como ensaios de inibição da MMP 9, a fim de validar nossos achados e descartar as possíveis interferências causadas pela inibição de IGF-1R. Esses resultados podem apresentar avanços no entendimento da participação da proteína no processo de migração celular durante a progressão tumoral em células de câncer de mama induzidas à EMT, auxiliar no desenvolvimento de terapias eficazes contra a propagação da metástase no câncer de mama e, assim sendo, elevar as chances de sobrevivência dos pacientes diagnosticados com câncer em estágios avançados.

REFERÊNCIAS

- AFRATIS, N. A. *et al.* IGF-IR cooperates with ER α to inhibit breast cancer cell aggressiveness by regulating the expression and localisation of ECM molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 40138, 2017.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. cancer-facts-and-figures-2021.pdf **Cancer Facts and Figures**. [s.l: s.n.], 2021.
- BABA, F. *et al.* Syndecan-1 and syndecan-4 are overexpressed in an estrogen receptor-negative, highly proliferative breast carcinoma subtype. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 98, n. 1, 2006.
- BERGAMASCHI, A. *et al.* Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. **Journal of Pathology**, v. 214, n. 3, 2008.
- BOWLES, D.W., KESSLER, E.R., JIMENO, A., **Lincitinib. Drugs of the future**. v. 36, n. 12, 2011
- BOLIK, J. *et al.* Inhibition of ADAM17 impairs endothelial cell necroptosis and blocks metastasis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 219, n. 1, 2021.
- BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, [s.n.], 2014.
- BRABLETZ, S. *et al.* Dynamic EMT: a multi-tool for tumor progression. **The EMBO Journal**, v. 40, n. 18, 2021.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, 1976.
- CABRAL-PACHECO, G. A. *et al.* The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 24, 2020.
- CAI, F. *et al.* Expression of snail and e-cadherin in drug-resistant MCF-7/ADM breast cancer cell strains. **Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan**, v. 29, n. 3, 2019.
- CANDIANO, G. *et al.* Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, 2004.
- CANO, A., NETO, M.A. Snail Transcription Factors. **Encyclopedia of Cancer**. Springer, Berlin, Heidelberg, [s.v.], [s.n.], 2017.
- CAVALHEIRO, R. P. *et al.* Coupling of vinculin to F-actin demands Syndecan-4 proteoglycan. **Matrix Biology**, v. 63, [s.n.], 2017.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **What Are the Risk Factors for Breast Cancer?**. 2023. Disponível em: www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/risk_factors.htm. Acesso em: 20 dez. 2023.
- CHAFFER, C. L. *et al.* EMT, cell plasticity and metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 35, n. 4, 2016.
- CORSO, G. *et al.* E-cadherin deregulation in breast cancer. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 11, 2020.

CORTI, F. *et al.* The syndecan-4/protein kinase C α pathway mediates prostaglandin E2-induced extracellular regulated kinase (ERK) activation in endothelial cells and angiogenesis in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 18, 2013.

COUCHMAN, J. R. *et al.* Syndecans: From peripheral coreceptors to mainstream regulators of cell behaviour. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 96, n. 1, 2015.

CUI, N.; HU, M.; KHALIL, R. A. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. Em: **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 147, [s.n.], 2017.

DAS, V. *et al.* The basics of epithelial–mesenchymal transition (EMT): A study from a structure, dynamics, and functional perspective. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 9, 2019.

PALMA, C. S. **Avaliação de alterações proteômicas em diferentes modelos de indução da transição epitelial-mesenquimal (EMT) em células de adenocarcinoma de mama.** 2018. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

DE IESO, M. L.; YOOL, A. J. Mechanisms of aquaporin-facilitated cancer invasion and metastasis. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. 135, 2018.

PALMA, C. S. *et al.* Proteomic analysis of epithelial to mesenchymal transition (EMT) reveals cross-talk between SNAIL and HDAC1 proteins in breast cancer cells. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 15, n. 3, 2016.

DI GIROLAMO, F.; RIGHETTI, P. G. Plasma proteomics for biomarker discovery: A study in blue. **Electrophoresis**, v. 32, n. 24, 2011.

EBLE, J. A.; NILAND, S. The extracellular matrix in tumor progression and metastasis. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 36, n. 15, 2019.

ELFENBEIN, A.; SIMONS, M. Syndecan-4 signaling at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. 17, 2013.

FAÇA, V. M.; HANASH, S. M. In-depth proteomics to define the cell surface and secretome of ovarian cancer cells and processes of protein shedding. **Cancer Research**, v. 69, n. 3, 2009.

FIGUEIRA, R. S. C. **Expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) e de seus iniciadores (TIMPs e RECK) em modelo de progressão tumoral de câncer de mama e sua correlação com dados clínico-patológicos.** 2006. Dissertação (mestrado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

FERLAY, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, 2015.

GAFFNEY, J. *et al.* Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. **Matrix Biology**, v. 44-46, [s.n.], 2015.

GERSTBERGER, S.; JIANG, Q.; GANESH, K. Metastasis. **Cell**, v. 186, n. 8, 2023.

GILKES, D. M. *et al.* Collagen prolyl hydroxylases are essential for breast cancer metastasis. **Cancer Research**, v. 73, n. 11, 2013.

- GÓMEZ-GAVIRO, M. *et al.* Expression and Regulation of the Metalloproteinase ADAM-8 during Human Neutrophil Pathophysiological Activation and Its Catalytic Activity on L-Selectin Shedding. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 12, 2007.
- GONG, Y. *et al.* Inflammatory macrophage migration requires MMP-9 activation by plasminogen in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 9, 2008.
- GOODALL, G. J.; WICKRAMASINGHE, V. O. RNA in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 21, n. 1, 2021.
- GOODMAN, J. K. *et al.* Updates of the In-Gel Digestion Method for Protein Analysis by Mass Spectrometry. **Proteomics**, v. 18, n. 23, 2018.
- GOPAL, S. Syndecans in Inflammation at a Glance. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 227, 2020.
- GROSS, J.; LAPIERE, C. M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 48, n. 6, 1962.
- GUO, Y. *et al.* ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 19, n. 3, 2020.
- GUO, Z. *et al.* Molecular profile of metastasis, cell plasticity and EMT in pancreatic cancer: a pre-clinical connection to aggressiveness and drug resistance. **Cancer and Metastasis Reviews**, [s.v.], [s.n.], 2023.
- HABES, C.; WEBER, G.; GOUPILLE, C. Sulfated glycoaminoglycans and proteoglycan syndecan-4 are involved in membrane fixation of LL-37 and its pro-migratory effect in breast cancer cells. **Biomolecules**, v. 9, n. 9, 2019.
- HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, 2022.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, 2011.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, 2000.
- HASSAN, N. *et al.* Cell-surface heparan sulfate proteoglycans as multifunctional integrators of signaling in cancer. **Cellular Signalling**, v. 77, [s.n.], 2021.
- HELDIN, P. *et al.* Deregulation of hyaluronan synthesis, degradation and binding promotes breast cancer. **Journal of Biochemistry**, v. 154, n. 5, 2013.
- HOEBEN, A.; JOOSTEN, E. A. J.; VAN DEN BEUKEN-VAN EVERDINGEN, M. H. J. Personalized medicine: Recent progress in cancer therapy. **Cancers**, v. 13, n. 2, 2021.
- HUANG, H. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: Recent advances. **Sensors**, v. 18, n. 10, 2018.
- HUANG, T. *et al.* GALNT14 mediates tumor invasion and migration in breast cancer cell MCF-7. **Molecular Carcinogenesis**, v. 54, n. 10, 2015.
- IANZA, A. *et al.* Role of the IGF-1 Axis in Overcoming Resistance in Breast Cancer. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 22, n. 9, 2021.

ICHIHASHI, Y. T. *et al.* Up-regulation of Syndecan-4 contributes to TGF- β 1-induced epithelial to mesenchymal transition in lung adenocarcinoma A549 cells. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 5, [s.n.], 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **INCA ESTIMA 704 MIL CASOS DE CÂNCER POR ANO NO BRASIL ATÉ 2025**. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>. Acesso em: 05 fev. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **DADOS E NÚMEROS SOBRE CÂNCER DE MAMA**. Relatório Anual 2022. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/dados_e_numeros_site_cancer_mama_setembro2022.pdf. Acesso em: 28 set. 2023.

INVITROGEN. **Annexin V Conjugates for Apoptosis Detection**, 2022. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A23202?SID=srch-hj-A23202>. Acesso em: 11 dez. 2023.

IZDEBSKA, M. *et al.* Downregulation of mmp-9 enhances the anti-migratory effect of cyclophosphamide in mda-mb-231 and mcf-7 breast cancer cell lines. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, 2021.

JANKU, F. *et al.* A kinase-independent biological activity for insulin growth factor-1 receptor (IGF-1R): Implications for inhibition of the IGF-1R signal. **Oncotarget**, v. 4, n. 3, 2013.

KELLER-PINTER, A. *et al.* Cancers Syndecan-4 in Tumor Cell Motility. v. 13, n. 13, 2021.

KIM, J. *et al.* EGF induces epithelial-mesenchymal transition through phospho-Smad2/3-Snail signaling pathway in breast cancer cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 51, 2016.

KLEINER, D. E.; STETLERSTEVENSON, W. G. Quantitative zymography: Detection of picogram quantities of gelatinases. **Analytical Biochemistry**, v. 218, n. 2, 1994.

KOENIG, A. *et al.* Collagen type I induces disruption of E-cadherin-mediated cell-cell contacts and promotes proliferation of pancreatic carcinoma cells. **Cancer Research**, v. 66, n. 9, 2006.

KRUGER, D. T. *et al.* IGF-1R pathway activation as putative biomarker for linsitinib therapy to revert tamoxifen resistance in ER-positive breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 146, n. 8, 2020.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of cell viability by the MTT assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, 2018.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, 1970.

LANFREDI, G. P. *et al.* Analysis of ovarian cancer cell secretome during epithelial to mesenchymal transition reveals a protein signature associated with advanced stages of ovarian tumors. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1869, n. 6, 2021.

LEBLANC, R. *et al.* Autotaxin- β interaction with the cell surface via syndecan-4 impacts on cancer cell proliferation and metastasis. **Oncotarget**, v. 9, n. 69, 2018.

- LEE, H. J. *et al.* Correction: Development of a 4-aminopyrazolo[3,4-d]pyrimidine-based dual IGF1R/Src inhibitor as a novel anticancer agent with minimal toxicity. **Molecular Cancer**, v. 1, n. 50, 2023.
- LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, 2007.
- LIU, L. *et al.* OSI-906 restores the sensitivity of ovarian clear cell carcinoma to cisplatin by targeting the IGF1R/AKT pathway. **Medical Oncology**, v. 39, n. 2, 2022.
- LIU, P. C. C. *et al.* Identification of ADAM10 as a major source of HER2 ectodomain sheddase activity in HER2 overexpressing breast cancer cells. **Cancer Biology and Therapy**, v. 5, n. 6, 2006.
- MANON-JENSEN, T.; ITOH, Y.; COUCHMAN, J. R. Proteoglycans in health and disease: The multiple roles of syndecan shedding. **FEBS Journal**, v. 227, n. 19, 2010.
- MARCONI, G. D. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition (Emt): The type-2 emt in wound healing, tissue regeneration and organ fibrosis. **Cells**, v. 10, n. 7, 2021.
- MARRELLI, D. *et al.* Immunohistochemical Markers of the Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) Are Related to Extensive Lymph Nodal Spread, Peritoneal Dissemination, and Poor Prognosis in the Microsatellite-Stable Diffuse Histotype of Gastric Cancer. **Cancers**, v. 14, n. 24, 2022.
- MEDCHEMEXPRESS. MedChemExpress, 2023. **Lincitinib**. Disponível em: <https://www.medchemexpress.com/Linsitinib.html>. Acesso em: 20 dez. 2023
- MEFTAHI, G. H. *et al.* Applications of western blot technique: From bench to bedside. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 49, n. 4, 2021.
- MOUSTAKAS, A.; HELDIN, C. H. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. **Cancer Science**, v. 10, n. 98, 2007.
- MOUW, J. K.; OU, G.; WEAVER, V. M. Extracellular matrix assembly: A multiscale deconstruction. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, 2014.
- MULVIHILL, M. J. *et al.* Discovery of OSI-906: A selective and orally efficacious dual inhibitor of the IGF-1 receptor and insulin receptor. **Future Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 6, 2009.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. SDC4 syndecan 4 [*Homo sapiens* (Human)]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6385#gene-expression>. Acesso em: 19 dez. 2023.
- NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NCBI). **A Trial of ASP7487 (OSI-906) in Combination With Bortezomib for the Treatment of Relapsed Multiple Myeloma**. Clinicaltrials.gov, 2018. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01672736>. Acesso em: 04 jan. 2024
- NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NCBI). **Study of Erlotinib (Tarceva®) in Combination With OSI-906 in Patients With Advanced Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) With Activating Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Gene**. Clinicaltrials.gov, 2019. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01221077>. Acesso em: 04 jan. 2024

NAJY, A. J.; DAY, K. C.; DAY, M. L. The ectodomain shedding of E-cadherin by ADAM15 supports ErbB receptor activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 26, 2008.

NAUS, S. *et al.* Identification of candidate substrates for ectodomain shedding by the metalloprotease-disintegrin ADAM8. **Biological Chemistry**, v. 387, n. 3, 2006.

NAZIR, S. U. *et al.* Breast cancer invasion and progression by MMP-9 through Ets-1 transcription factor. **Gene**, v. 711, [s.n.], 2019.

NEWBY, A. C. Role of metalloproteinases in plaque rupture. **International Journal of Gerontology**, v. 1, n. 3, 2007.

NGUYEN, D. X.; BOS, P. D.; MASSAGUÉ, J. Metastasis: From dissemination to organ-specific colonization. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 9, 2009.

NICE, E. C. The Separation Sciences, the Front End to Proteomics: An Historical Perspective. **Biomedical Chromatography**, v. 35, n. 1, 2021.

NILAND, S.; RISCANEVO, A. X.; EBLE, J. A. Matrix metalloproteinases shape the tumor microenvironment in cancer progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n.1, 2022.

ONYEISI, J. O. S. *et al.* microRNA-140-3p modulates invasiveness, motility, and extracellular matrix adhesion of breast cancer cells by targeting syndecan-4. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 122, n. 10, 2021.

Onyeisi, J. O. S. Papel do Syndecan-4 no remodelamento da matriz extracelular em células endoteliais resistentes ao Anoikis. Tese (doutorado em Ciências) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Cancer**. 2022 Disponível em: www.who.int/activities/promoting-cancer-early-diagnosis. Acesso em: 27 dez. 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Promoting cancer early diagnosis**. Disponível em: www.who.int/activities/promoting-cancer-early-diagnosis. Acesso em: 20 dez. 2023.

PANCHOLI, S. *et al.* Elacestrant demonstrates strong anti-estrogenic activity in PDX models of estrogen-receptor positive endocrine-resistant and fulvestrant-resistant breast cancer. **npj Breast Cancer**, v. 8, n. 1, 2022.

PASTUSHENKO, I.; BLANPAIN, C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. **Trends in Cell Biology**, v. 29, n. 3, 2019.

PEI, D. *et al.* Mesenchymal–epithelial transition in development and reprogramming. **Nature Cell Biology**, v. 1, n. 21, 2019.

PHAM, S. H. *et al.* Syndecan-1 and -4 influence Wnt signaling and cell migration in human breast cancers. **Biochimie**, v. 198, [s.n.], 2022.

PIVONELLO, C. *et al.* The dual targeting of insulin and insulin-like growth factor 1 receptor enhances the mTOR inhibitor-mediated antitumor efficacy in hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 9, 2016.

- QUINTERO-FABIÁN, S. *et al.* Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 21, n. 24, 2019.
- RAPPSILBER, J.; MANN, M.; ISHIHAMA, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. **Nature Protocols**, v. 2, n. 8, 2007.
- REDFERN, A. D.; SPALDING, L. J.; THOMPSON, E. W. The Kraken Wakes: induced EMT as a driver of tumour aggression and poor outcome. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 35, n. 4, 2018.
- REISS, K.; SAFTIG, P. The “A Disintegrin And Metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: Physiological and cellular functions. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 20, n. 2, 2009.
- RIBATTI, D.; TAMMA, R.; ANNESE, T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. **Translational Oncology**, v. 13, n. 6, 2020.
- SALATI, M.; SPALLANZANI, A. New Horizons for Personalised Treatment in Gastroesophageal Cancer. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 2, 2022.
- SAUNDERS, S. *et al.* Molecular cloning of syndecan, an integrated membrane proteoglycan. **Journal of Cell Biology**, v. 108, n. 4, 1989.
- SCHELCH, K. *et al.* EGF Induces Migration Independent of EMT or Invasion in A549 Lung Adenocarcinoma Cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, [s.n.], 2021.
- SECCARECCIA, E.; BRODT, P. The role of the insulin-like growth factor-I receptor in malignancy: An update. **Growth Hormone and IGF Research**, v. 22, n. 6, 2012.
- SEELY, J. M.; ALHASSAN, T. Screening for breast cancer in 2018—what should we be doing today? **Current Oncology**, [s.v.], n. 25, 2018.
- SELLECKCHEM. Selleckchem.com,2023. **Linsitinib** (OSI-906). Disponível em: <https://www.selleckchem.com/products/OSI-906.html>. Acesso em: 20 dez.2023
- SENGA, S. S.; GROSE, R. P. Hallmarks of cancer - The new testament: Expanding the hallmarks of cancer. **Open Biology**, v. 11, n. 1, 2021.
- SETHI, N.; KANG, Y. Unravelling the complexity of metastasis-molecular understanding and targeted therapies. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 11, 2011.
- SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer Statistics, 2021. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 1, 2021.
- SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer statistics, 2023. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 73, n. 1, 2023.
- SILVESTRINI, V. C. *et al.* Proteomics analysis reveals the role of ubiquitin specific protease (USP47) in Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) induced by TGFβ2 in breast cells. **Journal of Proteomics**, v. 219, [s.n.], 2020.
- ŚLIŻEWSKA, K.; MARKOWIAK-KOPEĆ, P.; ŚLIŻEWSKA, W. The role of probiotics in cancer prevention. **Cancers**, v. 1, n. 13, 2021.

SOLES, A. *et al.* Extracellular Matrix Regulation in Physiology and in Brain Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 8, n. 24, 2023.

STERNER, R. C.; STERNER, R. M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. **Blood Cancer Journal**, v. 4, n. 11, 2021.

STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. A. The cancer genome. **Nature**, v. 7239, n. 458, 2009.

SUHAIL, Y. *et al.* Systems Biology of Cancer Metastasis. **Cell Systems**, v. 2, n. 9, 2019.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, 2021.

TAKEDA, T. *et al.* EGFR inhibition reverses epithelial-mesenchymal transition, and decreases tamoxifen resistance via Snail and Twist downregulation in breast cancer cells. **Oncology Reports**, v. 47, n. 6, 2022.

TALMADGE, J. E.; FIDLER, I. J. AACR centennial series: The biology of cancer metastasis: Historical perspective. **Cancer Research**, v. 14, n. 70, 2010.

TEIXEIRA, F. C. O. B. *et al.* The Heparan Sulfate Sulfotransferases HS2ST1 and HS3ST2 Are Novel Regulators of Breast Cancer Stem-Cell Properties. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, [s.n.], 2020.

THEOCHARIS, A. D. *et al.* Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, [s.n.], 2016.

TRIVANOVIĆ, D. *et al.* Inflammatory cytokines prime adipose tissue mesenchymal stem cells to enhance malignancy of MCF-7 breast cancer cells via transforming growth factor- β 1. **IUBMB Life**, v. 68, n. 3, 2016.

VAQUERO, J. *et al.* The IgF2/IR/IGF1R pathway in tumor cells and myofibroblasts mediates resistance to EGFR inhibition in cholangiocarcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 17, 2018.

VENNING, F. A.; WULLKOPF, L.; ERLER, J. T. Targeting ECM disrupts cancer progression. **Frontiers in Oncology**, v. 5, n. 224, 2015.

WALKER, C.; MOJARES, E.; DEL RÍO HERNÁNDEZ, A. Role of extracellular matrix in development and cancer progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 19, 2018.

WANG, H. *et al.* Cytoplasmic domain interactions of syndecan-1 and syndecan-4 with α 6 β 4 integrin mediate human epidermal growth factor receptor (HER1 and HER2)-dependent motility and survival. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 44, 2014.

WANG, Z. *et al.* IGF-1R Inhibition Suppresses Cell Proliferation and Increases Radiosensitivity in Nasopharyngeal Carcinoma Cells. **Mediators of Inflammation**, v. 2019, [s.n.], 2019.

WU, J. *et al.* Overcoming Linsitinib intrinsic resistance through inhibition of nuclear factor- κ B signaling in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Medicine**, v. 6, n. 6, 2017.

XU, H. *et al.* Epidermal growth factor receptor in glioblastoma. **Oncology Letters**, v. 14, n. 1, 2017.

YANG, J. *et al.* Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 21, 2020.

YANG, S. T. *et al.* Conformation-dependent antibiotic activity of tritrpticin, a cathelicidin-derived antimicrobial peptide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 296, n. 5, 2002.

ZAHAVI, D.; WEINER, L. Monoclonal antibodies in cancer therapy. **Antibodies**, [s.v.], [s.n.], 2020.

ZHANG, Y.; WEINBERG, R. A. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. **Frontiers of Medicine**, v. 4, n.12, 2018.

ZHENG, H.; KANG, Y. Multilayer control of the EMT master regulators. **Oncogene**, v. 14, n. 33, 2014.

ZHOU, J. *et al.* Implication of epithelial-mesenchymal transition in IGF1R-induced resistance to EGFR-TKIs in advanced non-small cell lung cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 42, 2015.

ZOU, J.; WANG, E. Cancer Biomarker Discovery for Precision Medicine: New Progress. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 42, 2018.