



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**



**Estratégias terapêuticas para o tratamento do câncer de mama triplo
negativo: novos alvos moleculares e *design* de drogas**

Aluna: Mariana Alves Pereira Zóia

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart
Co-Orientadora: Dr^a. Lara Vecchi**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte
dos requisitos para obtenção do
Título de Doutora em Genética e
Bioquímica**

**UBERLÂNDIA - MG
2019**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



**Estratégias terapêuticas para o tratamento do câncer de mama triplo
negativo: novos alvos moleculares e *design* de drogas**

Aluna: Mariana Alves Pereira Zóia

Comissão Examinadora

Presidente	Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart
Examinadores	Prof. Dr ^a . Thaise Gonçalves de Araújo Prof. Dr ^a . Mariana Caldas Waghbi Prof. Dr ^a . Fabiana de Almeida Araújo Santos Prof. Dr ^a . Tatiana Martins Tilli

Data da Defesa: 22.07.2019

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Tese foram contempladas

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico - nº 12/2019 - PPGGB				
Data:	Vinte e dois de julho de 2019	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	19:00h
Matrícula do Discente:	11523GBI016				
Nome do Discente:	Mariana Alves Pereira Zóia				
Título do Trabalho:	Estratégias terapêuticas para o tratamento de câncer de mama triplo-negativo: novos alvos moleculares e <i>design</i> de drogas.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Biologia Molecular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Anexina A1 e esfingolipídeos no câncer de mama.				

Aos vinte e dois dias do mês de julho de dois mil e dezenove, às 14:00 horas no Anfiteatro 4K, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Prof^ª. Dr^ª. Tatiana Martins Tilli, Prof^ª. Dr^ª. Mariana Caldas Waghbi, Prof^ª. Dr^ª. Thaise Gonçalves de Araújo, Prof^ª. Dr^ª. Fabiana de Almeida Araújo Santos e Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, o Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o (a) candidato (a): APROVADO (A). Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Ricardo Goulart Filho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 22/07/2019, às 19:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Thaise Gonçalves de Araújo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 22/07/2019, às 19:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º,



§ 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana de Almeida Araújo Santos, Usuário Externo**, em 22/07/2019, às 19:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tatiana Martins Tilli, Usuário Externo**, em 22/07/2019, às 19:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Caldas Waghbi, Usuário Externo**, em 22/07/2019, às 19:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1367450** e o código CRC **10011C6C**.

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Z85 Zoia, Mariana Alves Pereira, 1991-
2019 Estratégias terapêuticas para o tratamento do câncer de mama triplo negativo: novos alvos moleculares e design de drogas [recurso eletrônico] / Mariana Alves Pereira Zoia. - 2019.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart.

Coorientador: Lara Vecchi.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2215>

Inclui bibliografia.

1. Genética. I. Goulart, Luiz Ricardo , 1962-, (Orient.). II. Vecchi, Lara, 1980-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

*Dedico carinhosamente toda esta pesquisa
à todos os pacientes acometidos por câncer*

Um diploma de doutorado ou qualquer proeza intelectual não é, por si só, suficiente para alcançar a sabedoria. É preciso guiar-se profissionalmente e pessoalmente pela reverência ao conhecimento, pela verdade, pelo compromisso de beneficiar os outros e pelo enobrecimento da alma alcançado por bondade, fortaleza, simplicidade, assistência aos que necessitam, inspiração, otimismo e felicidade. A sabedoria é tão perfeita que age como luz, fornecendo-nos uma imagem verdadeira de todas as coisas e, principalmente, de nós mesmos. A luz nunca precisará fazer barulho algum para brilhar, e, onde quer que esteja, servirá de guia para os iluminar os outros, próximos ou distantes e jamais, escolherá a quem beneficiar.

Não há e nunca haverá escuridão capaz de ofuscar a luz.

"Let there be light!"

Agradecimentos

Sou muito grata pois tenho muitos anjos ao meu redor.

Agradeço à Deus por sempre estar comigo em todos os momentos, segurando a minha mão, me guiando em todos os meus passos, me acolhendo, por se mostrar a mim em detalhes no dia-a-dia, por me mostrar o que realmente importa na vida e por me permitir viver ao lado dos anjos que me envia na forma das pessoas que amo.

À minha mãe Magali, por ser minha melhor amiga, por ser a melhor companheira do mundo, minha maior incentivadora, por ser minha base, por trocar os papéis de "mãe e filha" comigo muitas vezes, por viver todos os meus sonhos comigo, por ser meu suporte, por dar a vida pela nossa família e por ser o maior exemplo sabedoria na minha vida.

Ao meu pai Júlio, por todo o carinho comigo, por ser meu herói, por me segurar pequena e desejar que eu pudesse de alguma forma "impactar o mundo", por ter trocado "gasolina por álcool" ao abastecer o carro errado no dia do meu nascimento de tanta felicidade, por ser meu defensor em todos os momentos, por me ensinar sobre bondade, por ser um dos melhores e mais sábios corações que já conheci na vida.

Ao meu irmão Kauê, por toda a paciência comigo, por ser meu companheiro sempre para tudo e em todas as fases da vida, por ter sido meu maior incentivo me escrevendo uma carta antes de eu ir para os EUA que dizia "É preciso muita coragem para ir embora e deixar tudo para trás em busca de um sonho, e só quem vai conhece e abre as portas do mundo para si mesmo"... e como isso é verdade!

Ao meu Amor Lucas, por surgir na minha vida como um anjo enviado por Deus no momento que eu mais precisava, por andar 1700 km para o nosso primeiro encontro, por nunca soltar a minha mão, por sempre me surpreender das melhores maneiras possíveis, por todas as nossas conquistas, por todas as nossas certezas, por me ensinar a verdade sobre o amor e a felicidade e por construir comigo essa linda história que se fortalece a cada dia.

A toda a minha família, pois é onde encontro fortaleza, e principalmente à minha tia Marli, minha segunda mãe, que sempre fez tudo por mim; à minha tia Rita, por todas as conversas, por nunca medir esforços para querer o meu bem e rezar por mim; ao meu tio Denilson, por ter tanto carinho comigo e torcer por minhas vitórias; à minha tia Gledys, por sempre torcer por mim.

À minha sogra, Elizabete, por me mostrar o "lado de lá" da minha pesquisa, por ser essa guerreira que vi orgulhosamente vencer o 3º câncer de mama sempre com fé e coragem, e a toda essa família linda e unida que me acolheu tão bem e pela qual tenho tanto carinho.

Ao meu orientador e grande incentivador, Luiz, por nunca ter medido esforços para nada, por sempre ter apostado em mim, por ter me aberto diversas portas para a minha formação pessoal e profissional, por nunca me negar suporte algum, por ter me apoiado e defendido em momentos cruciais da carreira e por ser essa grande referência científica.

À minha co-orientadora, Lara, por ter me acolhido desde sempre, por nossas viagens, por ter esse espírito italiano e brasileiro ao mesmo tempo, por ter sido minha parceira, por ter gerado várias ideias que embasaram este trabalho, por ter me ensinado sempre desde o começo no laboratório, por todo o carinho e dedicação a mim.

À Thaise, um anjo que surgiu na minha vida, por ter me abraçado e me acolhido gratuitamente quando nem me conhecia direito e sem nunca pedir nada em troca, por ter me dado todo o suporte em momentos que eu mais precisei, por todas as nossas conversas as quais aprendi lições científicas e da vida, por ser meu exemplo pessoal e profissional e por ter se tornado minha grande amiga.

À Fernanda, minha grande amiga e companheira, pois no doutorado nunca existiu "Mari sem Fer e nem Fer sem Mari", por todas as conversas, desabafos, por apostar comigo, vencer comigo e também por perder comigo, por ter deixado o doutorado bem mais leve e por todas as vezes que, em meio a momentos bons ou difíceis, fomos capazes de amadurecer juntas e encontrar a real felicidade de tudo.

Ao Lucas, por ser meu grande amigo, por ser a sensibilidade em pessoa, pelas conversas, parcerias, incentivos, apoios e por se preocupar comigo (especialmente quando eu estava nos EUA)

À Jéssica, pela amizade, por todas as palavras de incentivo; à Anielle, pela amizade, por todo o carinho que sei que tem por mim e por toda a energia boa que me manda.

À Yara, por todo o carinho e consideração, por ser essa pessoa iluminada, por todas as palavras de apoio sempre, por ser meu exemplo de professora e de chefe, por ter uma sensibilidade tão difícil de se ver hoje em dia no meio profissional. Também ao grupo Bionut.

A todos os meus alunos, tanto de Patos como de Uberlândia, pois desde o momento que embarquei na aventura maravilhosa da Docência, me surpreendi com o quanto eu posso ser feliz e extremamente realizada. Isso eu devo a eles, por todo o carinho que recebi, por todas as vezes que enxergaram em mim uma luz, por todas as histórias e desabafos que ouvi e, vivendo tudo isso, por tudo o que aprendi. Principalmente à Antonielle, por ser minha primeira co-orientanda, por ser um ser humano maravilhoso, por ter se tornado minha amiga nessa caminhada, por sempre ter me estendido a mão, por tornar tudo bem mais leve, por estar comigo sempre.

Às minhas amigas Ana, Rayssa, Bianca, Danielle, Naiara, Anamary e Patrícia Lopes.

À minha mãe americana e orientadora Colleen Sweeney, por ser luz, por me acolher e se preocupar comigo, por ser uma das melhores cabeças e um dos melhores corações que conheci nessa vida; ao Kit Lam, referência mundial científica, por ter aberto as portas da UCDavis para mim e por apostar na minha pesquisa; e à minha família americana, Rita e Carlos, por terem me acolhido e cuidado de mim nos EUA.

À UCDavis, pelo financiamento de parte desta pesquisa, por ter ampliado minha visão como ser humano, cientista e docente e por ter colaborado imensamente para o meu crescimento profissional e pessoal.

À equipe do COT, por apostar na nossa pesquisa para darmos andamento ao Ensaio Clínico.

Ao laboratório de Nanobiotecnologia, pela minha formação, e especialmente ao apoio técnico fornecido pela Luciana, Natássia e Valéria. A todos os parceiros de laboratório e principalmente a Esther, Gabriela, Tafarel, Douglas, Sara e Fabiana. A todo o pessoal da UFU Patos que tanto me acolheu e especialmente ao grupo GBio.

À banca examinadora, Thaise, Mariana, Fabiana e Tatiana, por colaborarem com este trabalho.

Ao Instituto de Biotecnologia e à Pós-Graduação em Genética e Bioquímica pela oportunidade de formação e pela confiança, especialmente à Janaina e a Renata e Veridiana por todo apoio e por todo o incentivo de sempre.

À CAPES, pelo financiamento do meu Doutorado Sanduíche na UCDavis, nos EUA

Ao CNPQ, CAPES e FAPEMIG por financiarem esta pesquisa.

À UFU, minha escola.

Com carinho e amor, meu muitíssimo obrigada!

Sumário

1	Introdução	1
1.1	Câncer de mama: Conceito, epidemiologia nacional e global	5
1.2	Glândula mamária: Aspectos gerais sobre sua anatomia, histologia e citologia	8
1.3	Câncer de mama: Classificação	8
1.3.1	Classificação TNM	8
1.3.2	Classificação histológica	9
1.3.3	Classificação molecular	11
1.4	Câncer de mama triplo negativo	13
1.5	Mecanismos que caracterizam a agressividade tumoral: uma abordagem geral sobre a Transição Epitélio Mesenquimal	14
1.5.1	Mudanças na expressão gênica durante Transição Epitélio Mesenquimal: uma visão geral	15
1.6	Anexina A1 e Catepsina D como alvos moleculares para tratamento das células agressivas	19
1.6.1	Anexina A1	19
1.6.2	A importância da clivagem de Anexina A1	21
1.6.3	Catepsina D	21
1.6.3.1	Inibidores de CatD	24
1.7	<i>Design</i> de inibidores de proteases: uma visão focada em Ácido Borônico	25
2	Objetivos	27
2.1	Objetivo geral	27
2.2	Objetivos específicos	27
3	Materiais e métodos	28
3.1	Cultura de células	28
3.2	Transdução de partículas lentivirais shRNA para geração de clones de células MDA-MB-231 com Anexina A1	29
3.3	Extração de proteína e <i>Western Blot</i>	29
3.4	Ensaio de Apoptose	32
3.5	Ensaio de Autofagia	32
3.6	Ensaio de Proliferação	33
3.7	Ensaio de invasão em Matrigel	33
3.8	Ensaio de Migração (<i>Wound Healing</i>)	34
3.9	Análise de FTIR	34
3.10	Análise de Modelagem Molecular	35
3.11	Predição de sobrevivência de pacientes por análise retrospectiva	36
3.12	Atividade de Catepsina D	36
3.13	Ensaio de formação de Mamosferas	37
3.14	Síntese de PepA-BoA	37
3.15	Coloração com Vermelho de Alizarina	37
3.16	Ensaio de Viabilidade Celular	38
3.17	Imunofluorescência	39
3.18	Cultura celular em 3D	40
3.19	Análise Estatística	40
4	Resultados	42
4.1	Superexpressão de Anexina A1 está associada à expressão de Catepsina D em célula de câncer de mama triplo negativo	42
4.2	Pepstatina A inibe Catepsina D através da diade catalítica aspártica ...	44
4.3	Catepsina D cliva Anexina A1: um evento crucial na proliferação e invasão de células MDA-MB-231	47
4.4	Inibição de Catepsina D é capaz de induzir apoptose e autofagia em MDA-MB-231	49
4.5	Validação de modelos estruturais das interações Catepsina D / Anexina A1 e Catepsina D / Pepstatina A	53

4.6	Expressão de Catepsina D define a sobrevida de pacientes com câncer de mama triplo negativo	56
4.7	Perfil geral de CatD e marcadores de EMT em linhagens TNBC	58
4.8	Estratégias visando inibição efetiva de expressão e/ou atividade de CatD nas células agressivas TNBC	63
4.9	PepA-BoA é mais eficaz que PepA em reduzir a agressividade de MDA-MB-231 e MDA-MB-157	68
4.10	Inibição de CatD e seu papel na modulação de marcadores EMT em MDA-MB-231 e MDA-MB-157	74
4.11	Efeito da inibição de CatD no arranjo tridimensional de MDA-MB-231 ...	81
5	Discussão	87
6	Conclusão	106
7	Perspectivas	107
8	Referências Bibliográficas	108
9	Contribuições Científicas do Doutorado	115

Lista de Figuras

Figura 1	Epidemiologia global do câncer	2
Figura 2	Epidemiologia nacional do câncer	4
Figura 3	Representação ilustrativa de cortes axiais da mama	6
Figura 4	Composição citológica da glândula mamária	7
Figura 5	Representação esquemática de EMT	17
Figura 6	Aumento de agressividade de TNBC por meio de AnxA1 clivada	20
Figura 7	Envolvimento das Catepsinas B e D na EMT	23
Figura 8	As elevadas expressões de CatD e AnxA1 estão associadas em células MDA-MB-231	42
Figura 9	FTIR evidenciando os átomos envolvidos na inibição de CatD	45
Figura 10	Inibição de CatD inibe a proliferação, migração e invasão de MDA-MB-231	47
Figura 11	Inibição de CatD induz a apoptose em células MDA-MB-231	50
Figura 12	A inibição de CatD promove a formação de vacúolos autofágicos em células MDA-MB-231	51
Figura 13	Modelos moleculares dos complexos CatD / AnxA1 e CatD / PepA ..	53
Figura 14	Sobrevida global de pacientes com TNBC estimada através de Kaplan-Meier Plotter	56
Figura 15	Expressão e atividade de CatD em linhagensTN	58
Figura 16	Análise do perfil de marcadores epiteliais e mesenquimais e da capacidade de formação de mamosferas de células TN	60
Figura 17	Estruturas químicas das drogas utilizadas para inibição de CatD	63
Figura 18	PepA-BoA penetra eficientemente nas células MDA-MB-231 e MDA-MB-157	64
Figura 19	A atividade de CatD é eficientemente inibida em MDA-MB-231 e MDA-MB-157 de maneira dose-dependente	66
Figura 20	Inibição de CatD reduz a viabilidade de células de TNBC MDA-MB-231 e MDA-MB-157	69
Figura 21	Inibição de CatD por PepA e PepA-BoA reduz migração, invasão e proliferação de células MDA-MB-231 e MDA-MB-157	71
Figura 22	Inibição e nocaute de CatD reduz EMT em células MDA-MB-231	75
Figura 23	Inibição e nocaute de CatD reduz EMT em células MDA-MB-157	79
Figura 24	A inibição de CatD em MDA-MB-231 modifica a morfologia celular, suprime a proliferação e formação de mamosferas em cultura 3D ...	81
Figura 25	Inibição de CatD é capaz de modular a expressão de marcadores de EMT em MDA-MB-231 em cultura 3D	83
Figura 26	Representação esquemática da atividade e inibição de CatD por PepA e suas consequências em célula de TNBC	92
Figura 27	Representação esquemática de estratégias inovadoras para inibição de CatD e suas consequências funcionais e moleculares em célula de TNBC	103

Lista de Tabelas

Tabela 1	Critérios para classificação TNM	8
Tabela 2	Estágios tumorais a partir da classificação TNM	9
Tabela 3	Parâmetros que definem a classificação histológica do câncer de mama	10
Tabela 4	Pontuação que define o grau tumoral de acordo com a classificação histológica do câncer de mama	10
Tabela 5	Classificação molecular do câncer de mama com perfis de expressão gênica e tratamentos indicados	12
Tabela 6	Descrição e meios de cultivo de células TNBC	28
Tabela 7	Relação de anticorpos utilizados para a realização de <i>Western Blotting</i>	31

Lista de Abreviaturas

3D	Tridimensional
ALA	Alanina
AnxA1	Anexina A1
ASP	Aspartato
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATR	Refletância Total Atenuada
BC	Câncer de Mama
BCA	Ácido Bicinchonínico
BoA	Ácido Borônico
BSA	Albumina Sérica Bovina
CatD	Catepsina D
CD24	Cluster de Diferenciação 24
CD44	Cluster de Diferenciação 44
CFSE	Carboxi- fluoresceína succinimidil éster
DAPI	Diamino-2-fenil-indol
DMEM	Modificação de Dulbecco do Meio essencial mínimo
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
EMT	Transição Epitélio-Mesenquimal
ER	Receptor de Estrógeno
FBN1	Fibrinilona Tipo 1
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPR1	Receptor Peptídeo Formil1
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
HAS2	Hialuronan Sintase
HER2	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico tipo 2
HTLV	Vírus T-linfotrópico Humano
IGG	Imunoglobulina G
MDC	Monodansilcadaverina
MMP	Metaloproteinase
MSN	Moesina
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2yl)-2,5-Difenil Brometo de Tetrazolina
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDL1	Receptor de Morte Celular Programada 1
PEPA	Pepstatina A
PLAT	Plasminogênio Tecidual
PLAU	Ativador de plasminogênio
PR	Receptor de Progesterona
PRG1	Gene Responsivo a p53
RNA	Ácido Ribonucleico
RON	<i>Recepteur d'Origine Nantais</i>

RPMI	Meio desenvolvido no <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SD	Desvio padrão
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
shRNA	<i>Short Hairpin</i> RNA
STA	Estatina
TBS-T	Tampão Tris Salino com <i>Tween</i>
TGFB1	Fator de Transformação do Crescimento Beta
TMA	Microarranjo de Tecidos
TNBC	Câncer de Mama Triplo Negativo
TNM	Tumor Nódulo Metástase
TRP	Triptofano
VAL	Valina
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

Resumo

O câncer de mama triplo negativo (TNBC) é o tipo mais agressivo de câncer de mama e ainda não possui opções terapêuticas com comprovação clínica de eficácia. Neste contexto, a descoberta de eventos marcadores destas células pode fornecer terapias efetivas direcionadas a esse tipo de tumor. O presente trabalho demonstrou que a protease Cathepsina D (CatD) está mais expressa em linhagens TNBC mais agressivas e que, especificamente em MDA-MB-231, esta expressão está associada à superexpressão de uma proteína denominada Anexina A1 (AnxA1). Esta expressão conjunta favorece a clivagem de AnxA1 por CatD, mecanismo crítico proposto pelo presente trabalho para a atividade pró-tumorigênica da protease. Assim, ao investigar o mecanismo de inibição de CatD utilizando seu inibidor, Pepstatina A, demonstrou-se que tal inibição se dá pela ocupação do sítio ativo de CatD por PepA e, a nível atômico, o grupamento OH do inibidor é capaz de interagir com CO dos ácidos carboxílicos da díade aspártica catalítica da protease, reação que favorece a desprotonação de Asp³³ e, consequentemente, promove a inibição de CatD. Em ensaios funcionais, o tratamento de MDA-MB-231 com PepA foi capaz de induzir apoptose e autofagia e, ao mesmo tempo, reduzir a proliferação, migração e invasão destas células. Partindo para uma ampla abordagem de TNBC, demonstrou-se que a sobrevida global de pacientes com alta expressão de CatD é menor quando comparada a pacientes cujas células tumorais possuem baixa expressão da protease. Ademais, analisando variadas linhagens TNBC, notou-se que sua alta expressão está associada a maior expressão de marcadores mesenquimais e, diante disso, utilizou-se PepA e uma droga derivada desta com ácido borônico acoplado, PepA-BoA, que demonstrou ser mais eficaz e capaz de modular marcadores de EMT, realizando a transição do fenótipo epitelial para o mesenquimal, e reduzindo a agressividade destas células, ao diminuir a viabilidade celular, as capacidades de migração, invasão, proliferação e população de células-tronco. Concluindo, o presente trabalho apresenta a inibição de CatD como estratégia eficaz para tratamento de células TNBC com características similares a MDA-MB-231.

Abstract

Triple-negative breast cancers (TNBCs) are more aggressive than other breast cancer (BC) subtypes and lack effective therapeutic options. Unraveling marker events of TNBCs may provide new directions for development of strategies for targeted TNBC therapy. Herein we reported that Cathepsin D (CatD) is highly expressed in aggressive TNBC lineages and, specifically in MDA-MB-231, this expression is associated with overexpression of Annexin A1 (AnxA1). This fact favors the cleavage of AnxA1 by CatD, a critical mechanism proposed by the preent work for pro-tumorigenic protease activity. Thus, since we investigate the inhibition mechanism of CatD by its inhibitor PepA, it has been show that such inhibition is due to the occupation of the active site of CatD by PepA and, at atomic level, the OH group from PepA is capable of interactiong with CO from carboxylic acids of the CatD catalytic aspartic dyad, a reaction that favors the deprotonation of Asp33 and, consequently, promotes the inhibition of CatD. In the functional assays, treatment of MDA-MB-231 with PepA was able to induce apoptosis and autophagy and, at the same time, reduce proliferation, migration and invasion. A broad approach of TNBC, it has been shown that the overall survival of patients with high CatD high expression. Is lower when compared to patients whose tumor cells have low protease expression. In addition, analyzing several TNBC lineages, it was noted that CatD high expression. Is associated with expression of mesenchymal markers. Then, we treated cells with PepA and its drug derived with boronic acid, called PepA-BoA, which was shown to be more efficient and capable of modulating EMT markers by passing from the mesenchymal to epithelial phenotype and reducing the aggressiveness of these cells by decreasing cell viability, migration, invasion, proliferation and stem cell population. In conclusion, the presente work presentes the inhibition of CatD as an effective strategy for the treatment of TNBC cells with similar characteristics to

MDA-MB-231.

1. Introdução

1.1 Câncer de mama: Conceito, epidemiologia nacional e global

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças caracterizadas por crescimento desordenado de células que carregam em si o potencial de gerarem metástases e invadirem outros órgãos corporais, descontrolando a homeostasia do organismo[1]. Ultimamente é interessante salientar que em âmbito global houve a transição epidemiológica de doenças populacionais mais incidentes, onde doenças parasitárias e infecciosas deram lugar a doenças crônico-degenerativas, tais como cardiológicas e neoplásicas[2]. Assim, o câncer apresenta progressivo impacto epidemiológico e isso tem colocado esta doença no centro de discussões biotecnológicas, médicas, governamentais e de saúde pública.

Dentro do cenário previamente apresentado, o câncer de mama (BC) se distingue por ser um tumor maligno desenvolvido em células mamárias que possui profundo impacto a nível mundial e nacional[3]. Estimativas globais demonstram que em 2018 este tipo de tumor foi o segundo mais incidente no mundo entre homens e mulheres, correspondendo a 11.6% dos diagnósticos, perdendo somente para o câncer de pulmão (Figura 1A) [4]. Ademais, abordando em nível global a mortalidade gerada por esta doença, no mesmo ano, o BC ocupou o quinto lugar entre os tumores que mais acarretam em morte ao paciente, englobando 6.6% dos casos (Figura 1B)[4]. Analisando os dados, é interessante entender que, embora haja alta incidência, a letalidade do BC é relativamente baixa uma vez que a taxa de mortalidade é inferior a um terço da taxa de incidência, correspondendo a exatamente 30% dos casos.

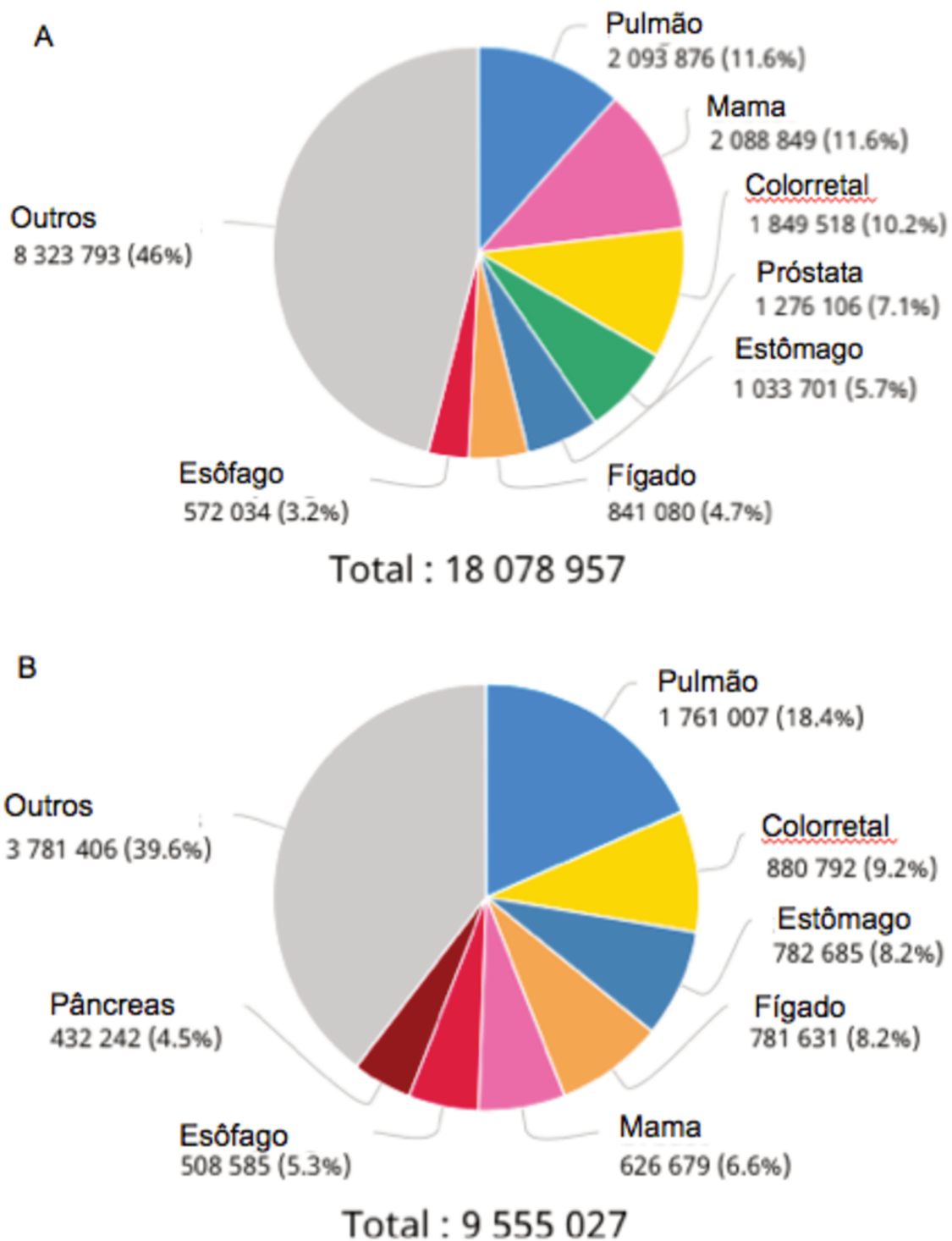


Figura 1. Epidemiologia global do câncer. A) Incidência e B) mortalidade por câncer em homens e mulheres. Adaptado. [4].

Ao comparar-se os âmbitos global e nacional, é notável a mudança do perfil de incidência e mortalidade de BC. Por um lado, a incidência ocupa o

primeiro lugar em todos tipos de câncer diagnosticados na população em ambos os sexos (perdendo somente para o câncer de pele não melanoma) (Figura 2A)[4]. Por outro lado, o número estimado de mortes classifica o BC como o terceiro responsável por óbitos dos brasileiros por esse tipo de doença (Figura 2B) [4]. Analisando conjuntamente os dados, tem-se que a letalidade a nível nacional corresponde a 21% dos casos, dado inferior à taxa global de 30%. Alguns dos fatores que sustentam esses dados possuem como base os programas governamentais e não-governamentais que priorizam o controle do câncer de mama no Brasil.

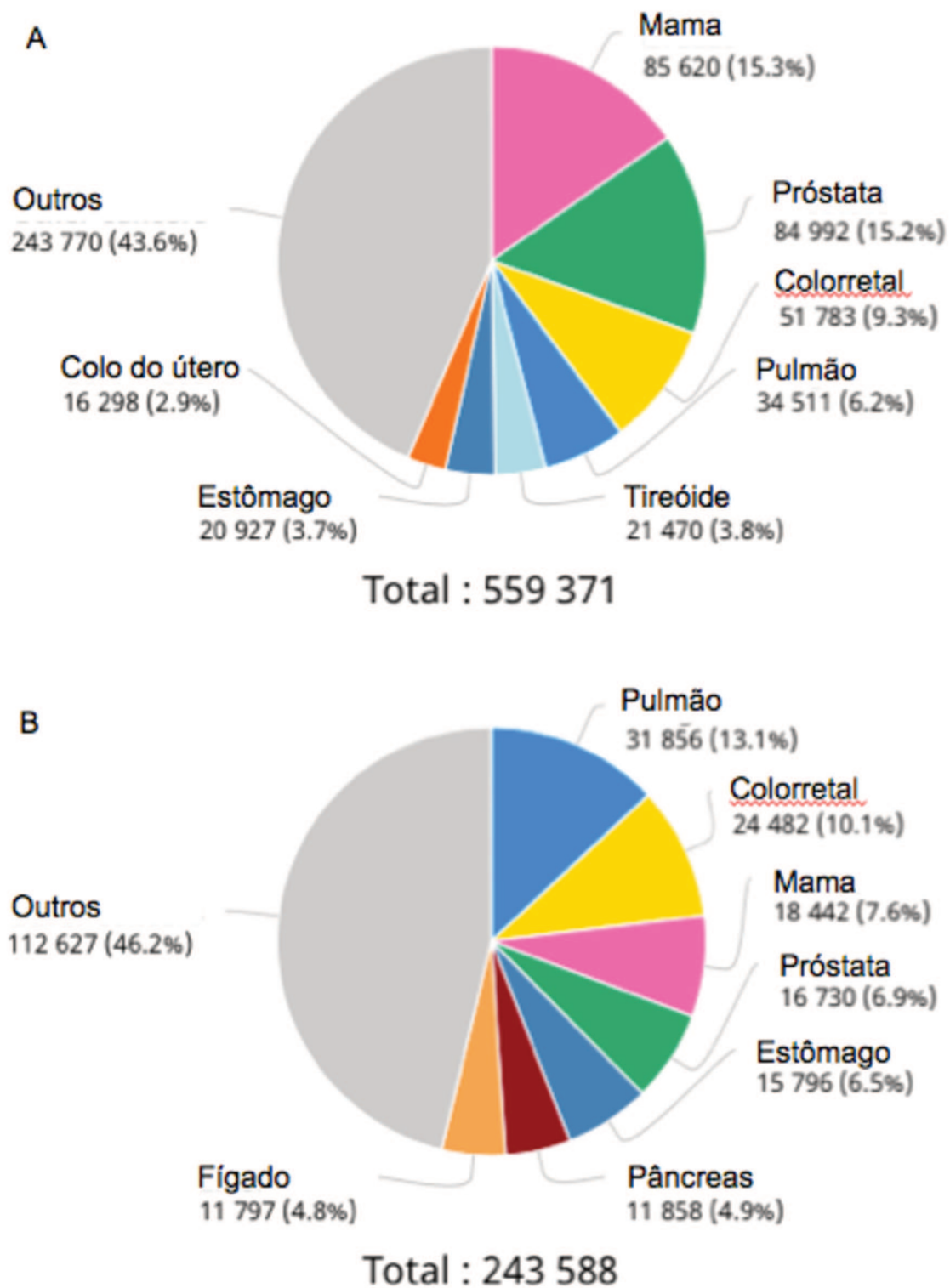


Figura 2. Epidemiologia nacional do câncer. A) Incidência e B) mortalidade por câncer em homens e mulheres. Adaptado. [4]

Em suma, torna-se clara a importância do aprofundamento no estudo biotecnológico sobre novos alvos moleculares visando o favorecimento de tratamentos inovadores para o BC a fim de que se possa colaborar com a modificação positiva do cenário previamente exposto sobre a mortalidade e letalidade desta doença.

1.2 Glândula mamária: Aspectos gerais sobre sua anatomia, histologia e citologia

A base do estudo do BC compreende primeiramente o conhecimento das estruturas anatômicas e histológicas da glândula mamária. Essa glândula, considerada parte do sistema reprodutor humano, possui função canônica de produzir e secretar leite para amamentação da progênie durante o início da vida[5].

Histologicamente, partindo de uma visão geral, pode-se afirmar que a mama é formada basicamente por três tipos de tecidos: o tecido glandular (parênquima), tecido adiposo e tecido fibroso (estroma). O tecido glandular é constituído por lobos que se subdividem em lóbulos e estes, por sua vez, são compostos pelos alvéolos. Cada lóbulo é considerado a unidade funcional da glândula mamária e possui um respectivo ducto lactífero (juntos, formam a unidade terminal ducto-lobular, demonstrada nas Figuras 4A e 4B), que possui como função conduzir o leite produzido durante o período de amamentação até um ducto maior, denominado sino lactífero, por onde é armazenado e, mediante sucção ou estímulo mecânico, é liberado no mamilo. O mamilo e aaréola são constituídos por glândulas sebáceas hipertrofiadas, denominadas

glândulas de Montgomery, que protegem a epiderme deste local por meio da formação de uma camada hidrolipídica superficial (Figura 3) [6].

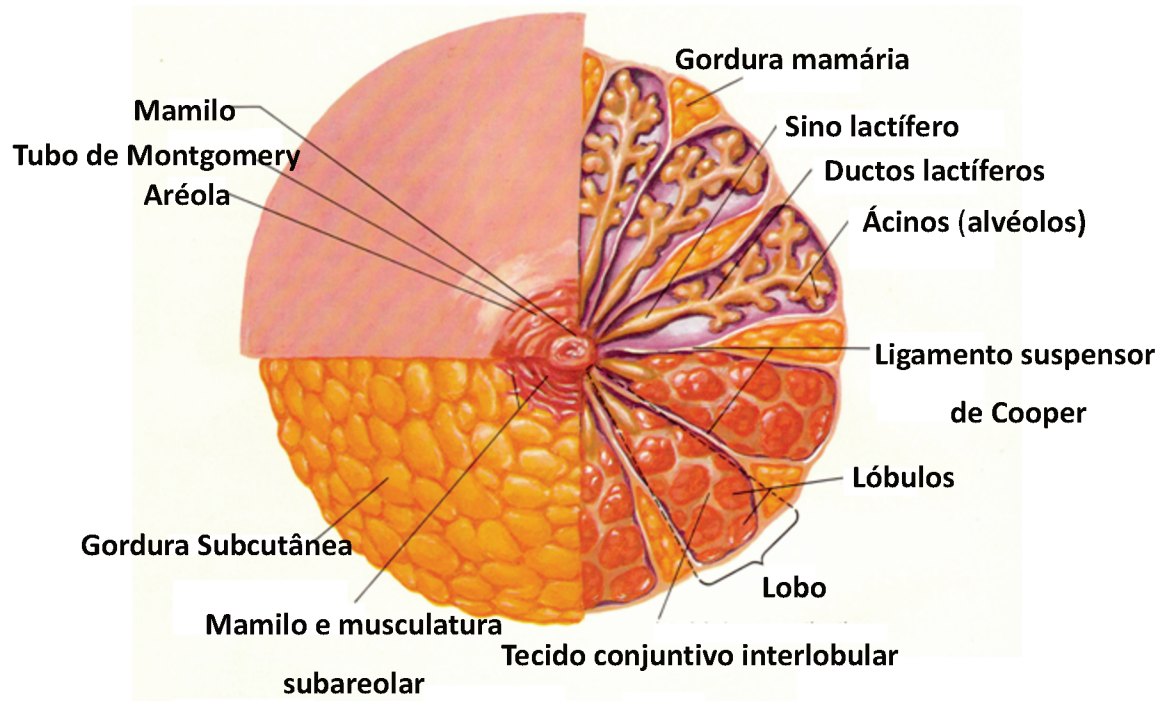


Figura 3. Representação ilustrativa de cortes axiais da mama. Na representação, tem-se as identificações de mamilo, tubo de Montgomery, aréola, gordura subcutânea e musculatura, tecido conjuntivo, lobo, lóbulos, ligamentos suspensórios de Cooper, ácinos, ductos lactíferos e sinos lactíferos. Adaptado. [6]

O tecido adiposo, composto tanto pela gordura mamária quanto pela gordura subcutânea, reveste toda a glândula mamária formando um envoltório de proteção. O tecido conjuntivo fibroso ajuda na sustentação de lobos pelos ligamentos suspensórios de Cooper que estão presentes por toda a fáscia superficial do músculo peitoral maior. Esse tecido está presente tanto dentro dos lóbulos (denominado tecido conjuntivo intralobular) quanto entre lóbulos e ductos lactíferos (tecido conjuntivo interlobular)[7].

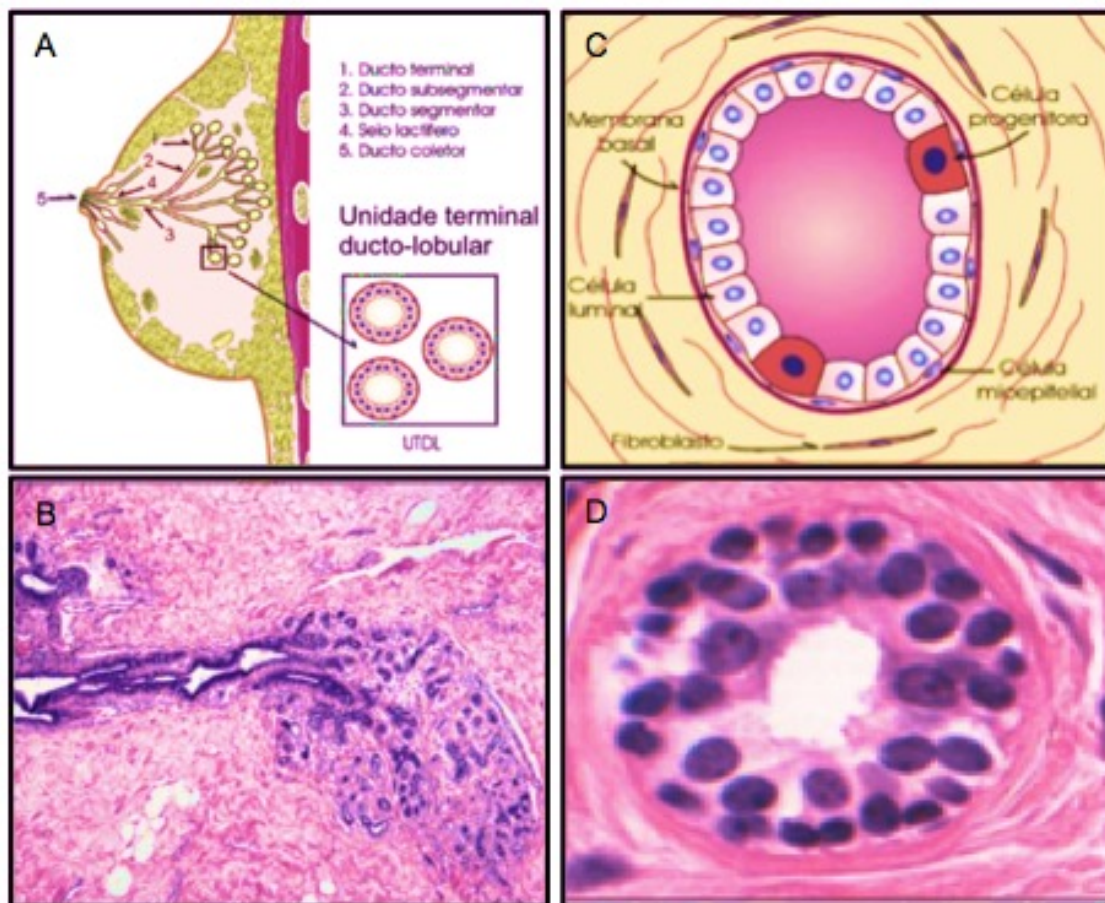


Figura 4. Composição citológica da glândula mamária. A) Identificação representativa dos ductos terminal, subsegmentar, segmentar, lactífero e coletor e B) sua imagem histológica. C) Ampliação da representação esquemática da unidade terminal ducto-lobular com identificação da membrana basal, fibroblastos, células luminiais, mioepiteliais e progenitoras e D) sua imagem histológica. Adaptado. [4]

Em âmbito citológico, as Figuras 4B e 4C ilustram a estrutura do epitélio que reveste os alvéolos mamários. Nota-se que externamente há a presença de fibroblastos, responsáveis pela síntese de componentes da matriz extracelular; a membrana basal, a qual sustenta a camada mioepitelial e durante o período de amamentação é a responsável por sofrer contrações estimuladas por impulsos succionais por meio do hormônio ocitocina. Internamente, em contato com o ducto lactífero, há a camada de células luminiais responsáveis pela produção de leite materno [4]. É importante

esclarecer que apesar de existirem perfis moleculares distintos entre as células mioepiteliais e luminais, elas são clones que surgiram a partir de uma única célula-tronco mamária ou célula progenitora [8].

1.3 Câncer de mama: Classificação

Considerando a heterogeneidade do BC, diagnósticos, prognósticos e estratégias terapêuticas são baseadas em classificações detalhadas e rigorosas. Atualmente, as principais classificações do BC vão desde a classificação por tamanho, comprometimento linfático e metástases (classificação TNM); passando por classificação histológica, patológica e por fim, chegando à mais atual classificação que é a escolhida para delineamento do presente trabalho: a classificação molecular [9][10].

1.3.1 Classificação TNM

O método TNM é baseado nas características tumorais no momento do diagnóstico que compreendem o tamanho do tumor primário (T), o grau de comprometimento de nódulos linfáticos (N) e a presença ou ausência de metástases (M). Juntos, esses três parâmetros definem estágios tumorais que variam de I a IV (Tabelas 1 e 2) e são indicadores de sobrevivência do paciente em um período de 5 anos [11].

Tabela 1. Critérios para classificação TNM

Tamanho do tumor	Comprometimento linfonodal	Metástase
T1 (≤ 2 cm)	N0 (sem comprometimento)	M0 (ausência)
T2 (2-5 cm)	N1 (1-3 linfonodos)	M1 (presença)

T3 (≥ 5 cm)

N2 (4 ou mais linfonodos)

Tabela 2. Estágios tumorais a partir da classificação TNM

Estágio I (T1N0M0)	Estágio II A (T0N1M0)	Estágio II A (T1N1M0)	Estágio II A (T2N0M0)	Estágio III B (T2N1M0)
Estágio II B (T3N0M0)	Estágio III A (T1N2M0)	Estágio III A (T1N2M0)	Estágio III A (T2N2M0)	Estágio III A (T3N1M0)
Estágio III A (T3N2M0)	Estágio III B (T4N0M0)	Estágio III B (T4N1M0)	Estágio III B (T4N2M0)	Estágio III C (T2N3M0)
Estágio III C (T1N3M0)	Estágio III C (T2N3M0)	Estágio III C (T3N3M0)	Estágio III C (T4N3M0)	Estágio IV (Metastático)

Pesquisas afirmam que em torno de 90% dos pacientes pertencentes ao estágio I sobreviverão ao menos cinco anos após o diagnóstico. Para pacientes pertencentes aos estágios II e III, a taxa de sobrevida no mesmo período de tempo é de 60 a 80% e 40 a 50%, respectivamente. Por fim, taxas inferiores a 5% de sobrevida em 10 anos acometem doentes classificados no estágio mais grave, o estágio IV [11].

1.3.2 Classificação histológica

A graduação histológica do BC é um bom fator de prognóstico para os pacientes. De acordo esse método, o grau de agressividade do tumor é calculado de acordo com a Tabela 3 a partir de atributos morfológicos das células cancerígenas como formação tubular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica. A análise de cada parâmetro confere uma nota que varia de 1 a 3 e, ao final da análise, a soma das notas distingue as células tumorais entre bem diferenciadas, moderadamente diferenciadas e pouco diferenciadas (Tabela 4) [12].

Tabela 3. Parâmetros que definem a classificação histológica do câncer de mama (em 10 campos ópticos de maior aumento)

Formação tubular	Pontuação
Maioria do tumor (>75%)	1
Grau intermediário (10 - 75%)	2
Pouca ou nenhuma (<10%)	3
Pleomorfismo nuclear	
Núcleo pequeno, regular, uniforme	1
Moderado aumento no tamanho	2
Pleomorfismo acentuado	3
Contagem mitótica	
Índice baixo (0-10 figuras analisadas em 10 CMA*)	1
Índice moderado (11-20 figuras analisadas em CMA*)	2
Índice alto (>21 figuras analisadas em CMA*)	3

Tabela 4. Pontuação que define o grau tumoral de acordo com a classificação histológica do câncer de mama

Pontuação	Grau	Perfil tumoral
3 - 5 pontos	1	Bem diferenciado
6 ou 7 pontos	2	Moderadamente diferenciado
8 ou 9 pontos	3	Pouco diferenciado

Em tese, sabe-se que tumores mais indiferenciados tendem a ser mais agressivos que tumores bem diferenciados e, portanto, quanto maior o grau, maior a agressividade tumoral. Isso ocorre uma vez que a menor diferenciação das células está associada a um maior potencial de proliferação, menor resposta a drogas e maior capacidade de geração de metástases. Neste contexto, atualmente, a erradicação de células cancerosas indiferenciadas já é considerada um passo importante para o sucesso das terapias antitumorais [13].

1.3.3 Classificação molecular

Em 2000, Charles Perou e colaboradores publicaram um artigo na revista *Nature* que continha uma análise de milhares de genes expressos em BC [14]. Isso possibilitou a análise de padrões distintos e característicos de expressão gênica e a pesquisa concluiu que esse tipo de câncer poderia ser subdividido de acordo com suas assinaturas moleculares. Diante disso, a prática clínica dividiu o câncer de mama em quatro tipos: luminal, *basal-like*, HER2 e *normal-like*. Segundo essa classificação, caso as células tumorais apresentassem expressão gênica semelhante às células epiteliais luminais da glândula mamária, o câncer era tido como luminal. Seguindo o mesmo raciocínio, se a expressão gênica fosse semelhante às células basais da mama, o câncer era classificado como *basal-like*. Células que superexpressavam o gene do Fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2) compunham o subtipo HER2 e, por fim, caso as células apresentassem poucas alterações no perfil de expressão gênica ocasionando em dificuldade de interpretação o câncer era designado como *normal-like* [14].

Em 2011 ocorreu o *12th St. Gallen International Breast Cancer Conference* onde foi proposta uma classificação molecular mais aprimorada de acordo com definições clínico-patológicas. Assim, tendo em vista que o BC compreende uma doença clinicamente heterogênea que possui perfis moleculares distintos, sua classificação passou a utilizar como pilar três principais moléculas receptoras celulares: o receptor de estrógeno (ER), o receptor de progesterona (PR) e o HER-2 para identificação de subtipos tumorais [15]. É importante notar que a expressão gênica está constantemente

sujeita a regulações traducionais e pós-traducionais e isso faz com que perfis de expressão gênica e proteica possam ser distintos. Assim, definiu-se uma classificação molecular padrão adotada até hoje pela prática clínica uma vez que os subtipos moleculares podem ser associados a tratamentos específicos [16] (Tabela 5).

Tabela 5. Classificação molecular do câncer de mama com perfis de expressão gênica e tratamentos indicados.

Subtipo	Expressão gênica	Tratamento
Luminal A	ER +	Hormonioterapia
	PR +/-	+ Cirurgia
	HER2 -	+/- Radioterapia +/- Quimioterapia
Luminal B	ER +	Hormonioterapia
	PR +/-	+ Cirurgia
	HER2 +	+/- Radioterapia +/- Quimioterapia
HER 2	ER -	Trastuzumab
	PR -	+ Cirurgia
	HER2 +	+/- Radioterapia +/- Quimioterapia
Triplo negativo	ER -	Não existe tratamento específico
	PR -	+ Cirurgia
	HER2 -	+/- Radioterapia +/- Quimioterapia

A Tabela 5 demonstra uma complexa questão: o câncer de mama triplo negativo (TNBC) ainda não possui terapia-padrão uma vez que não expressa ER, PR nem HER2. Desta forma, a pesquisa científica caminha no rumo de aprimorar cada vez mais essa classificação do BC buscando moléculas que possam atuar como marcadores moleculares para promover o direcionamento de terapias cada vez mais eficientes e com menores efeitos colaterais.

1.4 Câncer de mama triplo negativo

O TNBC é responsável por 15-20% de todos os BCs diagnosticados e é caracterizado pela ausência de expressão de três receptores: ER, PR e HER2. Este fato torna as células TNBC insensíveis às terapias hormonais ou direcionadas à inibição de HER2 e, assim, quimioterapia, cirurgia e radioterapia são atualmente as opções de tratamento estabelecidas clinicamente para pacientes com TNBC [17][18].

Pacientes acometidos por TNBC apresentam prognóstico altamente desfavorável que engloba alto risco de metástases, alto do risco de recidiva do tumor e pior sobrevida em comparação com outros subtipos de CM [19][20]. Recentemente foi aprovado no Brasil um tratamento produzido por meio de engenharia genética para CMTN baseado em imunoterapia denominado Atezolizumab (Roche®)[21][22]. A aprovação foi baseada em resultados do denominado IMpassion 130, o primeiro estudo clínico de fase III a obter benefício significativo de imunoterapia em BC metastático [23]. Esse estudo foi conduzido em 902 pacientes e apresentou caráter randomizado, multicêntrico, duplo-cego. Os resultados demonstraram que este anticorpo monoclonal provocou aumento de sobrevida livre de progressão e redução de 38% no risco de morte das pacientes com células de TNBC que expressam o Ligante de Morte Celular Programada 1 (PD-L1), uma substância produzida pelas células tumorais para inativarem a ação imunológica, principalmente por meio de linfócitos T e, assim, permitirem a progressão tumoral [23]. Em linhas gerais, o novo medicamento é um anticorpo monoclonal anti-PD-L1 que age na reativação da resposta imunológica e, por isso, possui atividade antitumoral [24].

Embora as opções terapêuticas direcionadas a TNBC estejam em avanço, é clara a necessidade de identificação de eventos moleculares que caracterizem a agressividade tumoral e que possam fornecer embasamento para o desenvolvimento de terapias inovadoras eficientes.

1.5 Mecanismos que caracterizam a agressividade tumoral: uma abordagem geral sobre a Transição Epitélio Mesenquimal

A agressividade tumoral é conhecida como a capacidade do câncer de se formar, crescer e/ou se espalhar rapidamente [25]. Essa característica agressividade é um processo rigidamente regulado que envolve a plasticidade tumoral e a ativação de diversas vias de sinalização. Uma das consequências mais importantes do processo de agressividade está relacionada à metástase, um processo biológico no qual uma célula cancerígena é capaz de se desprender da massa do tumor primário e migrar e se estabelecer em tecidos e órgãos distintos [26].

Neste cenário, o estudo de drogas antitumorais passa pelo entendimento da complexidade de fatores biológicos que determinam a progressão do tumor primário à metástase. Evidências científicas apontam que a migração de células tumorais para um lugar distinto do tumor primário pode ser realizada, em menor parte, por células-tronco circulantes e, em maior parte, por células tumorais que sofrem um processo denominado transição epitélio mesenquimal (EMT) [27].

A EMT é um evento morfogenético caracterizado pela perda de junções célula-célula, perda de polaridade apical-basal, reorganização da arquitetura do citoesqueleto com consequente mudança na morfologia celular, *downregulation*

de genes marcadores epiteliais e ativação de genes que definem o fenótipo mesenquimal, aumento de motilidade celular e, em muitos casos, capacidade de degradação de proteínas da matriz extracelular permitindo maior capacidade de invasão celular [28][29]. Ademais, a literatura evidencia que células que sofreram EMT podem adquirir maior resistência à senescência e apoptose[30][31]. Como pode-se inferir, a EMT é considerada um passo importante na progressão tumoral[32].

1.5.1 Mudanças na expressão gênica durante Transição Epitélio

Mesenquimal: uma visão geral

Como já mencionado, durante o processo de EMT as células reduzem a expressão de proteínas de caráter epitelial, incluindo as que fazem parte dos complexos de junção celular, e redirecionam a expressão gênica para a formação de um fenótipo de característica mesenquimal, após promover a reestruturação da arquitetura do citoesqueleto e a interação das células com a matriz extracelular [29].

Uma das características cruciais do processo de EMT, como demonstrado na Figura 5, é a repressão de E-caderinas, envolvidas na regulação da adesão celular, visando promover a desestabilização de junções aderentes[33][34]. Há também a repressão de genes codificadores de proteínas integrais de membrana que compõem as junções oclusivas, denominadas claudinas e ocludinas; e proteínas que constituem as placas dos desmossomos como desmoplaquinas e placoglobinas [29]. Em conjunto, esses eventos possuem o objetivo de estabilizar a dissolução das junções intercelulares. A *downregulation* de E-caderina, em contrapartida, é equilibrada

pelo aumento de N-caderina, processo conhecido na literatura como "troca de caderinas"[33]. N-caderina possui a capacidade de se ligar ao citoesqueleto e interagir com receptores tirosina-quinases, como o Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR) e *Recepteur d'Origine Nantaís* (RON)[35]. A ativação desses receptores dá início à ativação de cascatas de sinalização que visam facilitar os processos de migração e invasão celular[35].

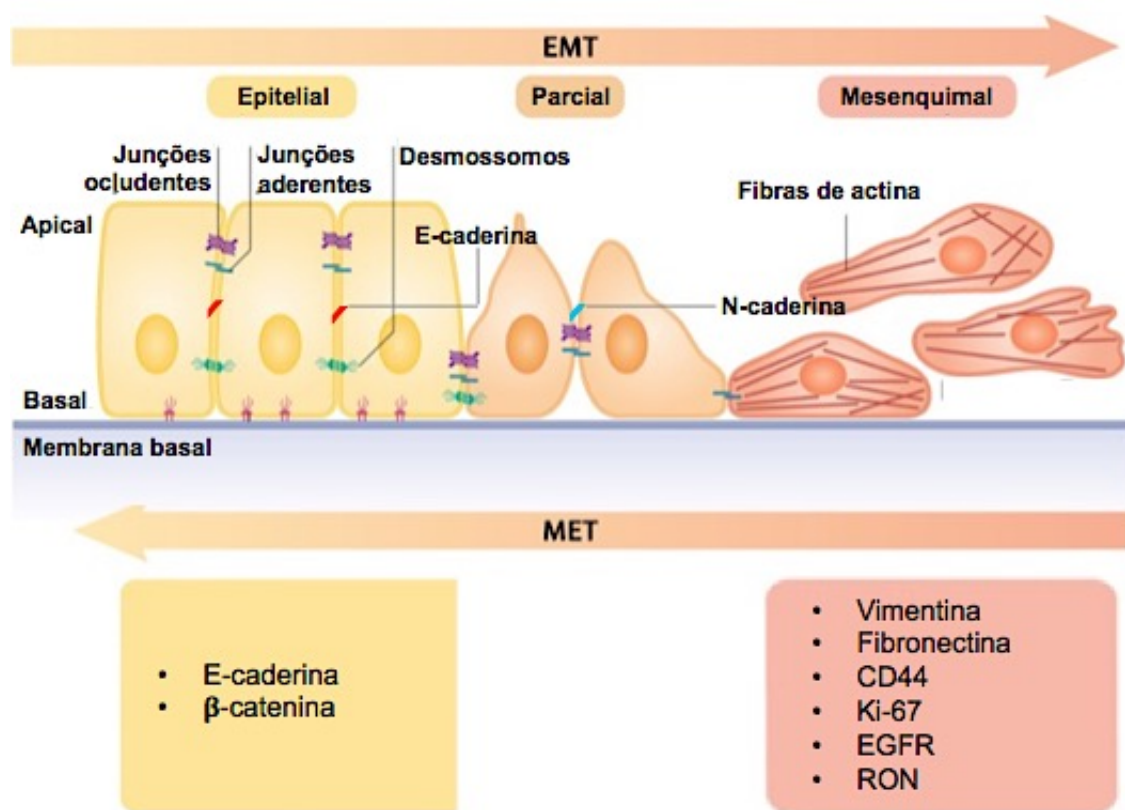


Figura 5. Representação esquemática de EMT. As células epiteliais exibem polaridade apical-basal, são mantidas unidas por junções ocludentes, aderentes e desmossomos e expressam moléculas associadas ao estado epitelial (E-caderina e Beta-catenina). A indução da EMT leva à substituição de E-caderina por N-caderina, perda de junções intercelulares, reorganização das fibras de actina, perda de polaridade apical-basal e aumento da expressão de marcadores mesenquimais (Vimentina, Fibronectina, CD44, ki67, EGFR e RON)[36].

Adicionalmente aos processos de migração e invasão celular, a proliferação das células tumorais também está correlacionada à EMT através de Ki-67, uma proteína nuclear envolvida na síntese de RNA ribossomal e necessária ao ciclo de proliferação celular[37]. No âmbito da prática clínica, esta proteína já se encontra em uso para a classificação molecular de BC, e, no âmbito científico, em diversos estudos Ki-67 está relacionada a redução da sobrevida global de pacientes e aumento de risco de mortalidade devido ao câncer, ao aumento do risco de progressão tumoral e a um prognóstico desfavorável[38][39].

Outros fatores que contribuem para EMT são as alterações na expressão de genes codificadores de proteínas do citoesqueleto e que conferem polaridade celular [29]. Em tese, a composição dos filamentos intermediários se modifica de acordo com a repressão de expressão de Citoqueratinas e ativação da expressão de Vimentina[40]. Tais modificações, concomitantemente, alteram a morfologia das células transformando-as de um formato cuboide para fusiforme. Consequentemente, este processo favorece o aumento de motilidade celular devido à interação de Vimentina com proteínas motoras, além de aumentar a capacidade das células de migrarem e invadirem órgãos e tecidos. Adicionalmente, a remodelação da matriz extracelular e a mudanças nas interações desta com as células são processos essenciais na iniciação e progressão de EMT[40]. A Fibronectina, uma proteína constituinte da matriz extracelular mamária, é capaz de promover expressão de metaloproteases capazes de degradar o colágeno desta matriz. Tal fato faz com que altos níveis de expressão de Fibronectina favoreçam um um fenótipo celular invasivo, agressivo e metastático[41][36].

A EMT também tem sido associada à formação de células-troco tumorais. De fato, o que ocorre em BC é que a indução da EMT promove a geração de células-tronco com característica $CD44^{high}/CD24^{low}$, que são capazes de atuar na formação de mamóferas[42]. Assim, a EMT promove o aumento de migração e invasão celular e isto leva à disseminação tumoral, e, adicionalmente, este cenário favorece a geração de mutações oncogênicas nas células-tronco tumorais para aumentar a expansão clonal seguida por migração, invasão e a instalação das células em órgãos distintos formando tumores secundários[42].

1.6 Anexina A1 e Catepsina D como alvos moleculares para tratamento das células agressivas

1.6.1 Anexina A1

Uma proteína que tem atraído muita atenção na comunidade científica de pesquisa oncológica é a Anexina A1 (AnxA1). Esta é uma proteína de 37 KDa de ligação a fosfolípidos de maneira dependente de Cálcio e é capaz de regular processos de inflamação, organização de membranas celulares e tráfego vesicular. No câncer, AnxA1 foi identificada por sua capacidade de indução metastática e angiogênica, além de que sua expressão se correlaciona positivamente com a progressão de vários tipos tumorais[43].

Evidências científicas postulam que a localização de AnxA1 possa direcionar sua função[44]. No citoplasma, esta proteína apresenta atividade anti-inflamatória ao inibir a fosfolipase A2; no núcleo, está envolvida em atividades transcricionais e, além disso, a localização nuclear foi associada a um pior prognóstico em câncer gástrico e de esôfago. AnxA1 também pode ser

secretada no meio extracelular, sendo capaz de ativar Receptores de Peptídeos Formilados (FPRs) e já foi demonstrado que esta localização estimula a migração e invasão de células de câncer pancreático[44].

Em BC, AnxA1 tem sido associada a pior prognóstico, baixa sobrevida global e aumento de resistência a quimioterapias[45]. Uma pesquisa publicada em 2018 pelo grupo responsável pelo presente trabalho demonstrou que AnxA1 pode ser considerada um alvo central para o TNBC[46]. Primeiramente, a análise de variadas amostras de *tissue microarrays* de BC demonstrou superexpressão de AnxA1 em TNBC e em metástases linfonodais. Observou-se também que a linhagem de TNBC MDA-MB-231 possui níveis elevados tanto de AnxA1 quanto de seu receptor, FPR1, favorecendo sua sinalização autócrina. A sinalização, provocada por AnxA1 secretada, é capaz de aumentar tanto a agressividade quanto a sobrevivência das células TNBC. Assim, o grupo demonstrou que inibindo o FPR1 e, conseqüentemente, a sinalização de AnxA1, pode-se obter *in vitro* a redução do fluxo de Cálcio, redução de sobrevivência e capacidades de invasão e migração de célula TNBC (Figura 6). *In vivo*, comprovou-se a eficácia da inibição da sinalização de AnxA1 uma vez que houve a acentuada redução do crescimento tumoral e de formação de metástases[46]. Em conjunto, estas evidências lançam indícios sobre a eficácia da inibição da sinalização de AnxA1 como estratégia para o controle de TNBC.

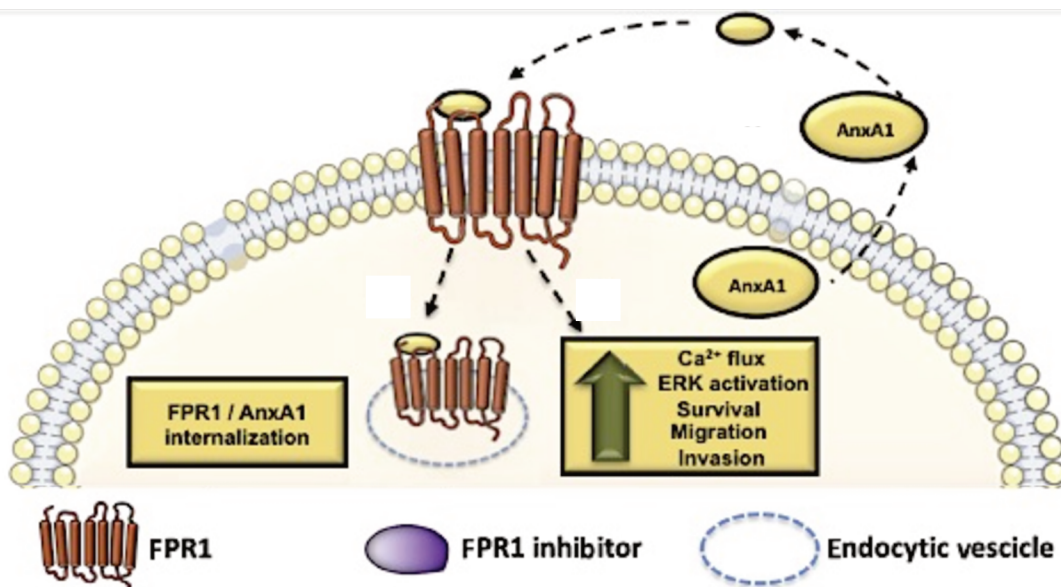


Figura 6. Aumento de agressividade de TNBC por meio de AnxA1 clivada. AnxA1 clivada é externalizada e promove a ativação autócrina de FPR1, que ocasiona o aumento de fluxo de Cálcio, ativação de ERK, maior sobrevivência e maior potencial de migração e invasão celular[46].

1.6.2 A importância da clivagem de Anexina A1

Uma vez que foi determinada a importância da sinalização extracelular de AnxA1 para a agressividade de célula TNBC, é interessante analisar o motivo que favorece a sua secreção pelas células. No mesmo trabalho citado previamente, observou-se a predominância de AnxA1 clivada no meio extracelular e, assim, foi sugerido que a clivagem desta proteína é um processo importante para sua secreção e, uma vez clivada e secretada, o peptídeo N-terminal de Anxa1 se liga a FPR1, favorecendo, assim, o aumento da agressividade tumoral[46] (Figura 6).

Adicionalmente aos fatos apresentados, a literatura demonstra que o aumento de expressão de AnxA1 clivada está correlacionado à sua atividade pró-tumoral e que tal clivagem é essencial para a agressividade tumoral[47]. Baseado nisso, o presente trabalho focou na análise da protease responsável pela clivagem de AnxA1: a Catepsina D (CatD)[48].

1.6.3 Catepsina D

CatD pertence à classe das catepsinas que compõem uma superfamília de aspartil, serina e cisteína proteases encontradas altamente expressas em vários tipos de câncer e que possuem correlação positiva com a geração de metástases[49]. De maneira geral, as catepsinas são ativadas em pH ácido e estão localizadas majoritariamente em vesículas lisossomais mas também podem se alocar em microambientes extracelulares como enzimas solúveis envolvidas na clivagem de várias proteínas tais como as proteínas de matriz extracelular e proteínas envolvidas na adesão intercelular, como E-caderinas[50].

A função canônica das catepsinas é definida pela realização de *turnover* proteico celular, ou reciclagem proteica, de proteínas entregues ao lisossomo por endocitose ou autofagocitose[49]. Existem, porém, catepsinas envolvidas em diversos tipos de processos fisiológicos tais como apresentação antigênica, renovação de colágeno, processamento de neuropeptídeos e hormônios[50]. Ademais, a elevada expressão destas proteases está correlacionada a atividades pró-tumorais uma vez que vários estudos demonstram associação positiva entre atividade proteolítica das catepsinas com os processos de transformação neoplásica, invasão tumoral e geração de metástases através de destruição de proteínas da matriz extracelular e de membranas basais[51][52].

Dentre as catepsinas, uma das mais estudadas é a CatD, uma protease lisossomal aspártica capaz de clivar vários substratos como mielina, proteínas de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina, hemoglobina,

colágeno, glucagon, enterotoxina colérica, lipotropina, hormônio da paratireoide[50]. Em câncer de mama, vários estudos evidenciaram a superexpressão desta protease e também demonstraram que ela está envolvida com ativação de vias mitogênicas, acarretando em maior proliferação tumoral[53]. Neste contexto, foi proposto também que CatD juntamente com CatB pode estar implicada na liberação de fatores de crescimento como Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), favorecendo angiogênese tumoral; e também na degradação de proteínas da matriz extracelular, favorecendo o aumento de migração, proliferação e metástase[34], como visualizado na Figura 7. Por estes e outros diversos motivos, evidências apontam que a superexpressão de CatD em tumores primários é indicativo de recidiva local ou metástase à distância[34].

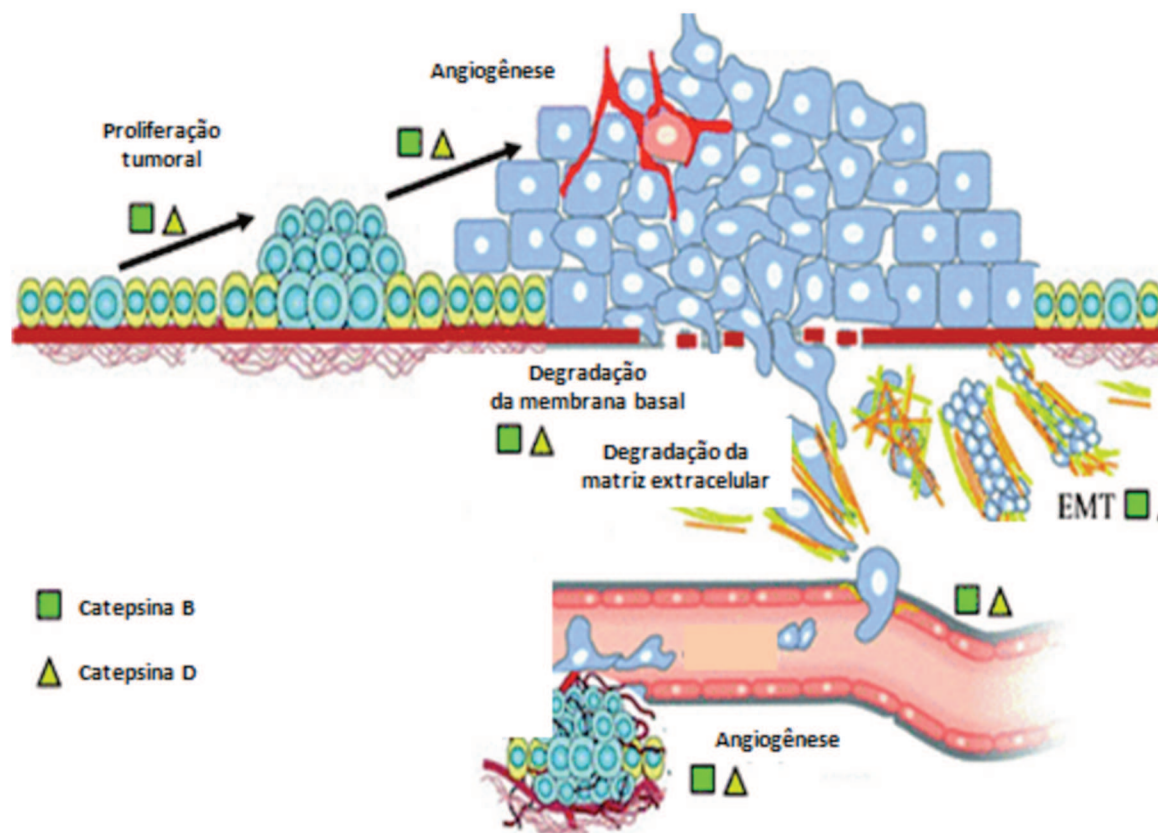


Figura 7. Envolvimento das Catepsinas B e D na EMT. As Catepsinas B e D estão envolvidas na proliferação das células tumorais, no processo de angiogênese e nos processos de degradação da membrana basal e da matriz extracelular, favorecendo a migração, invasão e agressividade tumoral[34].

No contexto de TNBC, evidências indicam a expressão de CatD e Ki-67 como fatores de prognóstico[54]. Já foi demonstrado também que CatD é superexpressa constitutivamente em linhagens celulares de BC que não expressam ER e, além disso, outros estudos já sugerem a expressão de CatD como fator prognóstico independente para a sobrevida livre de doença em pacientes com TNBC[50].

Em contexto enzimático, CatD é uma protease cujo sítio ativo é formado por uma díade catalítica composta por dois resíduos de aspartatos (Asp³³ e Asp²³¹)[55] e, dentre os diversos substratos supramencionados, têm-se que esta é capaz de clivar AnxA1 (37 KDa) especificamente em Trp¹² localizado na sua extremidade N-terminal[48]. O resultado disso é a geração da isoforma clivada de AnxA1 (contendo 35 KDa) e do fragmento N-terminal da proteína, capaz de ativar FPR1 e aumentar a agressividade tumoral[46].

1.6.3.1 Inibidores de Catepsina D

Os inibidores de CatD são drogas capazes de suprimir a atividade da protease e, muitas vezes, inibir o crescimento tumoral. Alguns estudos já evidenciaram a eficácia terapêutica de inibidores de CatD em melanoma, glioblastoma, câncer de próstata e de pulmão uma vez que houve redução de invasão nas respectivas células[55]. Adicionalmente, a literatura evidencia que inibições de CatD intracelulares e extracelulares bloqueiam a invasão celular, sugerindo que a atividade da protease seja importante nos dois locais[55].

Neste cenário, destaca-se a Pepstatina A (PepA), o inibidor mais potente de CatD já identificado até o momento[55]. Em âmbito molecular, este inibidor é um hexapeptídeo que possui peso molecular 685,89 g/mol e fórmula $C_{34}H_{63}N_5O_9$ [56]e, embora seja atualmente o mais eficaz, seu potencial não é totalmente explorado uma vez que sua penetração intracelular é considerada insatisfatória[57].

Assim, embora haja um interesse constante da indústria farmacêutica no desenvolvimento de potentes inibidores de proteases aspárticas como a CatD, devido ao fato de que esta apresenta papel fundamental em várias doenças, e principalmente no câncer, nenhum inibidor provou ser eficaz passando pela fase de testes clínicos visando se estabelecer como tratamento antitumoral[55].

1.7 *Design* de inibidores de proteases: uma visão focada em Ácido Borônico

Uma vez que nenhum inibidor foi provado eficaz na inibição de CatD, é interessante a pesquisa com foco no *design* de drogas objetivando novas formulações eficazes diante da limitação de PepA: a baixa penetração intracelular. Neste contexto, surge o interesse por um composto denominado Ácido Borônico (BoA), que teve sua visibilidade ampliada entre os pesquisadores e indústria farmacêutica desde que em 2003, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o Bortezomib, um potente medicamento lançado para tratamento de mieloma múltiplo que atua como inibidor de proteassoma. Interessantemente, grande parte de sua eficácia é atribuída à sua composição baseada em BoA[58][59].

O BoA é uma molécula útil farmacologicamente pois exibe uma variedade de atividades biológicas como a capacidade de facilitar o transporte de substâncias através de membranas lipofílicas além de ser inibidor de determinadas enzimas proteolíticas[59]. A utilidade dos compostos de BoA como agentes farmacêuticos está diretamente relacionada às suas propriedades únicas eletrônicas e físico-químicas uma vez que o Boro ocupa um lugar especial na tabela periódica estando no mesmo período que Carbono, porém com um elétron a menos, e isso faz com que estes dois elementos compartilhem muitas semelhanças estruturais, fato que favorece o que se chama de *design* biomimético[59].

Em química medicinal, o uso de BoAs como inibidores de enzimas reflete a utilidade do Boro como análogo do Carbono no processo de ligação ao sítio catalítico das proteases pois, ao mesmo tempo que se liga, não é capaz de reagir: conceito considerado a essência de inibidores enzimáticos[58]. Simplificadamente, os BoAs atuam como inibidores potentes de proteases por mimetizar o estado de transição tetraédrica da hidrólise da ligação peptídica[58][60]. Assim, diante disso, o interesse da indústria farmacêutica em substâncias inibidoras de protease contendo BoA está aumentando cada vez mais e, para isso, é necessário que pesquisas que objetivem o desenvolvimento de medicamentos antitumorais considerem essa perspectiva apresentada para o favorecer o *design* de drogas inovadoras.

Em resumo, o presente trabalho lança a inibição de CatD como estratégia terapêutica eficaz para tratamento de TNBC, elucidando seu mecanismo de inibição a nível atômico e apresentando estratégia inovadora capaz de inibir a EMT e, conseqüentemente, a agressividade das células.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliação do potencial de inibição de CatD como estratégia antitumoral para tratamento de células TNBC.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Análise da expressão de CatD e AnxA1 em linhagens BC

2.2.2. Análise e validação do mecanismo de inibição de CatD por PepA

2.2.3 Análise das consequências da inibição de CatD por PepA em linhagens BC

2.2.4 Análise de sobrevida global de pacientes TNBC com tumores contendo alta expressão de CatD

2.2.5 Análise da expressão de CatD e marcadores EMT em linhagens TNBC

2.2.6 Desenvolvimento de nova estratégia para inibição de CatD e avaliação de eficácia funcional

2.2.7 Análise em linhagens agressivas de TNBC das consequências da inibição de CatD por PepA e PepA-BoA na redução de agressividade celular e na modulação de marcadores EMT

2.2.8 Análise tridimensional das consequências da inibição de CatD por PepA e PepA-BoA na redução de agressividade celular e na modulação de marcadores EMT em MDA-MB-231

3 Materiais e Métodos

3.1 Cultura de células

Todas as linhagens utilizadas neste trabalho foram obtidas da *American Type Culture Collection* e cultivadas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Ao todo, foram utilizadas uma linhagem com expressão positiva dos receptores hormonais (ER e PR) MCF-7 e as demais utilizadas são consideradas triplo-negativas, embora a MCF-10A seja não-tumorigênica. A linhagem MCF-7 foi cultivada em meio IMDM (*Life Technologies*) enquanto que as demais foram cultivadas em meio DMEM (MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-453 e MDA-MB-157), meio RPMI (*Life Technologies*) (BT-549 e HCC-1937) e a linhagem não-tumorigênica MCF-10A foi cultivada em meio DMEM F12 (*Life Technologies*) suplementado com 5% de Soro de Cavalo, Hidrocortisona (0,5 µg/ml), Insulina (10,0µg/ml), EGF (0,02µg/ml) e Toxina Colérica (0,1µg/ml). Todos os meios foram suplementados com o antibiótico Gentamicina a 1% (v/v) e, exceto DMEM-F12, todos foram suplementados com Soro Fetal Bovino (FBS) a 10% (v/v). A descrição sucinta do local de origem, idade, etnia e meio de cultivo das linhagens triplo-negativas do presente trabalho está na Tabela 6.

Tabela 6. Descrição e meios de cultivo de células TNBC

Linhagem	Local de origem	Idade	Etnia	Meio de cultivo
MDA-MB-231	Tumor primário	51	Caucasiana	DMEM
BT-549	Tumor primário	72	Caucasiana	RPMI
MDA-MB-468	Líquido pleural	51	Negra	DMEM
HCC-1937	Tumor primário	24	Caucasiana	RPMI
MCF10-A	Mama normal	36	Caucasiana	DMEM F12
MDA-MB-453	Líquido pleural	31	Caucasiana	DMEM
MDA-MB-157	Líquido pleural	44	Negra	DMEM

Durante todo o cultivo celular, as linhagens foram monitoradas por microscopia para verificação de morfologia e por PCR para a verificação de contaminação por bactérias do gênero *Mycoplasma*.

3.2 Transdução de partículas lentivirais shRNA para geração de clones de células MDA-MB-231 com Anexina A1

A geração de clones de células MDA-MB-231 nocauteadas para AnxA1 foi feita por meio da utilização de partículas lentivirais comercialmente disponíveis (*Santa Cruz Biotechnology*) expressando shRNA controle e contra AnxA1. O experimento se deu conforme as orientações do fabricante e, resumidamente, as células foram plaqueadas em placas de 12 poços e, quando atingiram confluência de 50%, tais partículas foram transduzidas nas células através de uma incubação com 5µg/ml de Polibreno (*Santa Cruz Biotechnology*). O Polibreno é um polícatión que aumenta as ligações protéicas entre o capsídeo pseudoviral e a membrana celular. Posteriormente, as células foram infectadas por 48h utilizando as partículas lentivirais shRNA na cultura e, assim, os clones estáveis transformados (que expressavam o shRNA) foram selecionados utilizando 10µg/ml de Puomicina (*Santa Cruz Biotechnology*).

3.3 Extração de proteína e *Western Blot*

Extratos proteicos totais das células MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas por 24 h na ausência (células controle tratadas com veículo) ou presença de PepA (1µM ou 10µM) foram preparados usando o kit NE-PER de extração de proteínas de membrana, citoplasmáticas e nucleares (*Thermo Scientific*). Uma vez extraídas, a quantificação de proteína foi determinada pelo

kit BCA (*Thermo Scientific*). Após isso, 30µg do extrato proteico foram aliquotadas e adicionou-se o tampão Laemmli 6 X no volume apropriado para se obter uma concentração final de 1X. A seguir, as amostras foram aquecidas a 100°C por 5min e aplicadas em gel SDS-PAGE para eletroforese.

Para a realização da eletroforese, foram preparados géis SDS-PAGE: um gel de separação 10% para a separação das proteínas e, sobre este, um gel de empilhamento 4%. O tampão de corrida utilizado foi o Tris-Glicina contendo 0,1% de SDS e o marcador de referência de peso molecular utilizado foi o *Precision Plus Protein Kaleidoscope* (BioRad). A corrida eletroforética iniciou-se a 70V por 30min ou até que as amostras passassem pelo gel de empilhamento, e continuou a 100V por 1h e 20min. Terminada a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (*Pierce*) utilizando-se o *Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell* (Bio- Rad) e o tampão de transferência Tris-Glicina contendo 20% de metanol e 0,03% de SDS. A transferência foi realizada sob uma corrente elétrica de 15V por 50 min. A seguir, a membrana foi incubada, sob agitação, em solução de leite em pó desnatado 5% ou BSA 3% durante 1h à temperatura ambiente ou por 15h a 4°C para bloqueio de sítios inespecíficos. A seguir, a membrana foi incubada, sob agitação, por 2h a temperatura ambiente, ou por 16h a 4°C com o anticorpo primário diluído na solução de TBT-T e BSA 3%. Passado o período de incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada e incubada, sob agitação, por 1h a temperatura ambiente, com o anticorpo secundário também diluído na solução de leite em pó desnatado 5% ou BSA 3%.

Após a incubação a membrana foi novamente lavada e a detecção das proteínas foi realizada por reação quimioluminescente utilizando-se o ECL (*GE*

healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante. As imagens foram captadas através de câmara CCD *ImageQuant LAS 4000* (GE *healthcare*). As diluições de anticorpos primários e secundários utilizados nos experimentos de *Western Blot* estão descritas na Tabela 7. As análises de expressão proteica foram realizadas por densitometria utilizando a expressão da Actina ou Tubulina como controle do experimento.

Tabela 7. Relação de anticorpos utilizados para a realização de *Western Blottings*.

Nome	Tipo	Animal	Marca	Diluição
AnxA1	IgG Policlonal	Coelho	Invitrogen	1:1000
CatD	IgG Policlonal	Coelho	Invitrogen	1:1000
E-caderina	IgG Policlonal	Coelho	Sigma	1:1500
CD44	IgG Monoclonal	Camundongo	Abcam	1:700
Vimentina	IgG Monoclonal	Camundongo	Abcam	1:1000
Ki67	IgG Monoclonal	Camundongo	Invitrogen	1:1500
EGFR	IgM Policlonal	Coelho	Invitrogen	1:1000
RON	IgM Policlonal	Coelho	Invitrogen	1:1000
Fibronectina	IgG Monoclonal	Camundongo	Abcam	1:1000
Beta-Catenina	IgG Policlonal	Coelho	Invitrogen	1:1000
Actina	IgG Monoclonal	Camundongo	Sigma	1:3000
Tubulina	IgG Policlonal	Coelho	Abcam	1:3000

Os anticorpos secundários utilizados foram IgG anti-camundongo e IgG anti-coelho conjugados à enzima Peroxidase, ambos da Invitrogen e utilizados na diluição 1:3000.

3.4 Ensaio de Apoptose

Células MCF10-A, MCF-7 e MDA-MB-231 (10^6 /poço) foram cultivadas em placas de cultura de 6 poços e mantidas a 37°C, em 5% de CO₂, durante 24h. Subsequentemente, as células foram incubadas durante 24h com meio completo na ausência (células controle) ou presença de PepA (1µM ou 10µM).

Em seguida, as células foram incubadas com solução contendo AnexinaV-PE e 7-AAD (*BD Pharmingen*) durante 30min a 25°C, protegido da luz. Após a incubação, as células foram analisadas por citometria de fluxo (*BD Accuri C6*). Os gráficos foram devidamente analisados e as porcentagens de células nas fases de apoptose inicial e tardia foram determinadas utilizando o *software* FlowJo (*Treestar*).

3.5 Ensaio de autofagia

Células MCF10-A, MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas por 24h em lâminas e tratadas com PepA por 24h. Posteriormente, foram incubadas em meio completo contendo 50µM de monodansilcadaverina (MDC) (*Sigma*) a 37°C durante 1h. Subsequentemente, as células foram lavadas com PBS e fixadas durante 15min com solução de Paraformaldeído a 4%, lavadas 3 vezes com Glicerina e analisadas por microscopia de fluorescência (*Zeiss LSM510*). A intensidade de fluorescência da coloração MDC foi medida pelo *software* ImageJ. A intensidade média final de fluorescência foi calculada com base em dados provenientes da análise de 15 células.

3.6 Ensaio de proliferação

Para detectar as taxas de proliferação, dois ensaios foram realizados. No primeiro, as células MCF10-A, MCF-7 e MDA-MB-231 (10^6 /poço) foram marcadas com 1µM de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) (*Invitrogen*) por 10min a 37°C e, posteriormente, cultivadas em presença ou ausência de PepA ou PepA-BoA por 24h. Finalmente, a proliferação celular foi medida indiretamente pela intensidade de fluorescência do corante utilizando citometria

de fluxo (*Accuri C6, BD*). Os dados foram analisados pelo *software* FlowJo (*Treestar, Inc.*). No segundo, as células MDA-MB-231 e MDA-MB-157 foram cultivadas, tratadas e contadas manualmente ao microscópio (*EVOS FL; AMG*).

3.7 Ensaio de invasão em Matrigel

MCF10-A, MCF-7 e MDA-MB-231 foram examinadas pelo ensaio de invasão por um sistema em placa de 24 poços (*BD BioCoat Matrigel*) que contém uma câmara superior e outra inferior. Basicamente, a câmara superior é formada por membrana de polycarbonato de 8µm de diâmetro contendo Matrigel. As células foram tripsinizadas e adicionadas na concentração de $2,5 \times 10^5$ /poço em meio de cultura incompleto com ou sem tratamento (PepA ou PepA-BoA). O meio de cultura com 5% de FBS, utilizado como quimioatraente, foi adicionado na parte inferior da placa. O sistema de invasão foi incubado por 24h a 37°C e, subsequentemente, as células que invadiram o Matrigel foram fixadas, coradas com Azul de Tripán e contadas manualmente ao microscópio (*EVOS FL; AMG*).

3.8 Ensaio de Migração (*Wound Healing*)

Complementando o ensaio de invasão, a análise da capacidade de inibição da migração celular foi realizada por meio de ensaio *Wound Healing*. As células MCF10-A, MCF-7, MDA-MB-231 e MDA-MB-157 (2×10^5 células/poço) foram cultivadas em placas de 24 poços e mantidas a 37°C em 5% de CO₂ *overnight*. Depois de obtida a confluência, foi realizada uma lesão na camada unicelular com o auxílio de uma ponteira pressionada contra o fundo da placa de cultura, formando assim uma fenda na camada de células. A

cultura foi lavada com PBS para a retirada completa dos resíduos celulares da fenda formada. Em seguida, as monocamadas de células foram incubadas por 24h com meio na ausência (células controle) ou presença de tratamento. A confluência final foi analisada por microscópio óptico invertido (*Nikon Eclipse TS100*) e o “fechamento das fendas” foi calculado por meio do *software* ImageJ.

3.9 Análise de FTIR

Os espectros de infravermelho (IV) foram registrados à temperatura ambiente utilizando Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier (FTIR) com acessório de refletância total atenuada (ATR) na resolução de 2cm^{-1} . A correção da linha de base foi aplicada. As medições foram realizadas na faixa de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. Os espectros FTIR das células MDA-MB-231 tratadas com PepA ($1\mu\text{M}$ ou $10\mu\text{M}$) foram comparados com células MDA-MB-231 e PepA analisados separadamente. O experimento foi conduzido em triplicata permitindo que possíveis variações dentro ou entre placas fossem levadas em consideração durante a análise. Adicionalmente, as amostras passaram pelo processo de secagem previamente à análise para remover a umidade externa.

3.10 Análise de Modelagem Molecular

Estruturas tridimensionais de CatD e PepA humanas foram obtidas do *Protein Data Bank* (PDB ID: 1LYA, ILYB), enquanto os estados de resíduos de protonação foram previstos com o *PDB2PQR Server*. A estrutura tridimensional AnxA1 foi prevista usando *I-Tasser*, sua sequência de aminoácidos foi

recuperada do *UniProtKB* (P04083), enquanto uma estrutura de PDB (PDB ID: 1HM6) foi usada como modelo. O *docking* proteína-proteína (complexo CatD / AnxA1) foi realizado usando o servidor *Haddock*, enquanto o *docking* proteína-ligante (complexo CatD / PepA) foi realizado com *Autodock4* e *AutoDockTools4*. A análise do *docking* foi realizada de acordo com os protocolos da literatura. Os cálculos foram realizados de acordo com protocolos de *docking* molecular e interações entre proteínas. A identificação das interações foi realizada com Arpeggio e as imagens finais foram preparadas com o *Visual Molecular Dynamics*.

3.11 Predição de sobrevivência de pacientes por análise retrospectiva

A sobrevivência de pacientes com câncer pode ser afetada por expressões e alterações de genes específicos. A curva de Kaplan-Meier é um dos métodos analíticos promissores para prever a sobrevivência e o valor prognóstico de genes. Kaplan-Meier Plotter é um banco de dados online (<http://kmplot.com/analysis/>) que contém dados de *microarrays* e é eficiente para apresentar o papel de aproximadamente 55 mil genes na sobrevivência utilizando amostras de tecido tumoral de 10500 pacientes. Assim, o valor prognóstico do gene que codifica CatD foi analisado utilizando amostras de câncer de mama triplo negativo que continham alta e baixa expressão do mesmo. Adicionalmente, $p < 0.05$ foi considerado significativo, com intervalo de confiança de 95%.

3.12 Análise de atividade de Catepsina D

A atividade de CatD foi mensurada utilizando um kit (*Biovision*). O ensaio foi baseado na fluorescência emitida após clivagem de um substrato fluorescente por CatD. Resumidamente, as células MDA-MB-231 e MDA-MB-157 foram lisadas com o tampão de extração do kit e centrifugadas a 10000RPM. A atividade da protease foi mensurada em extratos contendo 100µg de proteína e os dados foram obtidos a partir de uma curva padrão. Os sinais fluorescentes emitidos após ação da clivagem de CatD foram detectados com o leitor de placas Spectra max M2 (*Molecular Devices*).

3.13 Ensaio de formação de mamosferas

Um total de 10^5 células foram plaqueadas em uma placa de baixa aderência de 6 poços com meio *MammoCult* (*Life Technologies*) sem antibiótico para ensaio de formação de mamosferas seguindo as recomendações do fabricante. Após 7 dias, o conteúdo celular foi aspirado, centrifugado e o sobrenadante desprezado. O *pellet* de mamosferas foi tripsinizado e novamente plaqueado para ser deixado por mais 7 dias, totalizando 14 dias. Finalmente, o conteúdo celular foi novamente aspirado, centrifugado, e o *pellet* de esferas foi delicadamente ressuspendido em 500µl de meio de cultura. Então, 50µl desta suspensão celular foi adicionada em um poço de uma placa de 96 poços para contagem do total de esferas utilizando microscópio de luz invertida. O número de esferas foi multiplicado pelo fator de diluição (x10) para se obtenção do valor total.

3.14 Síntese de PepA-BoA

A síntese foi realizada em fase sólida com protocolo próprio e estabelecido pelo laboratório do Prof. Dr. Kit Lam, *UCDavis*, EUA.

3.15 Coloração com Vermelho de Alizarina

A visualização da penetração de PepA-BoA nas células foi feita por meio do corante vermelho de Alizarina uma vez que esta possui a capacidade de se ligar a BoA. Basicamente, para a coloração, as células foram cultivadas, tratadas com PepA ou PepA-BoA por 24h e fixadas em paraformaldeído 4% por 30 min. Após isso, as células foram lavadas com água destilada, coradas por 10 min com vermelho de Alizarina (0,02g/ml) em pH=4.2 e registradas utilizando microscópio (*EVOS FL; AMG*). A intensidade de marcação foi mensurada com o *software* ImageJ.

3.16 Ensaio de viabilidade celular

A citotoxicidade das drogas foi determinada a partir do ensaio de Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). Após atingirem 80% de confluência, as células foram tripsinizadas e centrifugadas por 5min a 1.000RPM. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em meio de cultura e plaqueou-se 2×10^4 células/poço em placas de 96 poços. Posteriormente, a placa foi incubada a 37°C, 5% CO₂ por 24h para a aderência das células.

Após as células serem plaqueadas e aderidas aos poços, o meio foi substituído por diferentes concentrações das drogas (diluídas em meio) e a

placa novamente foi incubada por 24h nas mesmas condições previamente esclarecidas. Assim, foi adicionado em cada poço 10µl de MTT diluído em meio em concentração de 5mg/ml e as placas foram incubada por 4h. Em seguida, as placas foram retiradas da incubadora para adição de 50µl de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) contendo 20%/N-dimetil-formamida 50% e o conteúdo foi incubado *overnight* de maneira a propiciar a clivagem dos cristais de formazan produzidos durante a metabolização pelas células vivas. Por fim, foi realizada a leitura da absorbância no espectrofotômetro (*Multiskan GO*) a um comprimento de onda de 570nm. Os valores da viabilidade celular foram expressos em percentagem relativa à absorbância determinada nas células controle de acordo com a Fórmula F1.

$$\text{VIABILIDADE \%} = \frac{(\text{Abs tratamento} - \text{Abs branco})}{\text{Abs DMSO} - \text{Abs branco}} \times 100 \text{ (F1)}$$

3.17 Imunofluorescência

Ao atingir confluência entre 40~60% em lamínulas, as células foram lavadas com PBS 1X e fixadas com paraformaldeído (*Sigma*) 4% em PBS durante 10min a temperatura ambiente. A permeabilização foi feita com Triton-X100 0,1% (*USB Corporation*) durante 20min a 4°C. Posteriormente, foi adicionada a solução de bloqueio de 3% de BSA por 1h a temperatura ambiente. As células foram então incubadas por 1h com anticorpo primário Anti-Vimentina e 1h com secundário anti-coelho IgG conjugado com Alexa Fluor 594 (vermelho), ambos na diluição 1:100; ou 1h anticorpo primário Anti-E-

caderina e 1h secundário anti-coelho IgG conjugado com Alexa Fluor 488 (verde), ambos na diluição 1:100 em câmara úmida, protegidas da luz. É importante ressaltar que entre os anticorpos primários e secundários as células foram lavadas 3X com PBS. Após a incubação com os anticorpos secundários, as células foram lavadas novamente 3X com PBS e os núcleos celulares foram marcados com DAPI (*Invitrogen*) durante 10min, protegidos da luz. Em seguida foi feita a montagem das lâminas com PBS/Glicerol na concentração de 1:200 e as células foram visualizadas no microscópio Confocal (*Zeiss LSM 510 META /UV*).

3.18 Cultura celular em 3D

Para realização da cultura tridimensional, células MDA-MB-231 foram cultivadas em monocamada até atingirem 100% de confluência. Em seguida, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1500RPM por 3min. O sobrenadante foi aspirado e as células ressuspensas e contadas. O Matrigel com fatores de crescimento reduzidos (*BD MatrigelMatrix - BD Biosciences*) foi liquefeito em banho de gelo a 4°C. Posteriormente, a suspensão de células dissociadas foi misturada com o meio completo e soro adequados à linhagem MDA-MB-231, descritos anteriormente, com a adição de 4% de Matrigel. Alíquotas de 30µL de Matrigel foram então adicionadas a cada poço das placas de cultura de 12 poços (*BD*). Em seguida, a placa foi colocada em estufa a 37°C por 15min para solidificação do Matrigel. Posteriormente, alíquotas de 400µL da suspensão de células com 4% de Matrigel contendo 1×10^4 células foram cuidadosamente adicionadas sobre a camada de Matrigel previamente solidificada em cada poço da lâmina de cultura, caracterizando a cultura "on

top". As células foram mantidas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C, com troca de meio a cada dois dias. As imagens foram registradas no tempo de 72h, capturadas com auxílio do software *AxionVision* (Zeiss).

3.19 Análise Estatística

Todos os resultados apresentados no presente trabalho são representativos de, ao menos, três experimentos distintos, englobando replicatas experimentais e biológicas. Os dados foram relatados como o valor médio \pm desvio padrão (DP). A significância estatística da diferença entre os grupos foi determinada pelo teste *t de Student* e considerada significativa quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism 7 (*GraphPad Software Inc.*).

4. Resultados

4.1 Superexpressão de Anexina A1 está associada à expressão de Catepsina D em célula de câncer de mama triplo negativo

Estudos anteriores demonstraram a regulação positiva de AnxA1 está associada a pior prognóstico de BC, à invasão celular em pacientes com TNBC e a resistência a quimioterapias em células TNBC[46][47]. Além disso, deve-se notar que a superexpressão de CatD em tumores mamários resulta em baixa taxa de sobrevida e na ocorrência de metástases agressivas[50][61]. No presente estudo investigou-se a primeira hipótese de que a expressão de AnxA1 poderia estar correlacionada à expressão de CatD em TNBC. Para isso, foram realizados ensaios de citometria de fluxo e *Western Blotting* visando a obtenção do perfil de expressão de ambas as proteínas em três linhagens celulares: MCF-10 (linhagem celular epitelial mamária humana, não neoplásica), MCF-7 (ER+/PR-/ HER2-) e MDA -MB-231 (TNBC). Demonstrou-se que a mais agressiva das três linhagens, MDA-MB-231, apresentou maior expressão de AnxA1 e CatD em comparação com MCF-10A e MCF-7 (Figura 1A-E). Consistente com estes achados, a literatura demonstra que AnxA1 é altamente expressa em tanto em linhagem MDA-MB-231 como em amostras de pacientes com CMTN e metástases linfonodais de CM.

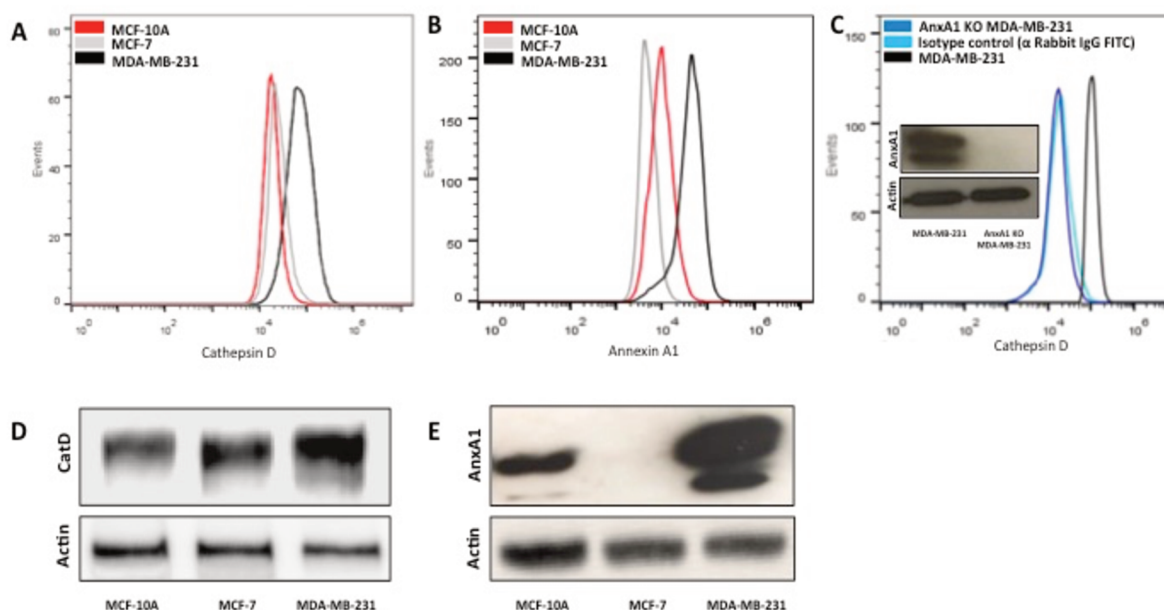


Figura 8. A elevada expressão de CatD e AnxA1 estão associadas em células MDA-MB-231.(A) Análise de expressão global de CatD em células MCF-10A (vermelho), MCF-7 (cinza) e MDA-MB-231 (preto) por meio de citometria de fluxo. (B) Análise de expressão global de AnxA1 em células MCF-10A (vermelho), MCF-7 (cinza) e MDA-MB-231 (preto) por meio de citometria de fluxo. (C) Análise por meio de citometria de fluxo da expressão de CatD em MDA-MB-231 possuindo níveis basais de AnxA1 (preto), MDA-MB-231 com AnxA1 nocauteada (azul escuro) e controle de isotipo IgG anti-Rabbit FITC (azul claro). *Western Blotting* da expressão de AnxA1 de células MDA-MB-231 com nível basal de AnxA1 e com a expressão da mesma proteína nocauteada (D) Análise por meio de *Western Blotting* da expressão de CatD de células MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231. A Actina foi utilizada como controle interno da reação. (E) Análise por meio de *Western Blotting* da expressão de AnxA1 de células MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231. A Actina foi utilizada como controle interno da reação.

Para esclarecer o efeito de AnxA1 nos níveis de CatD em células TNBC, AnxA1 foi nocauteada em células MDA-MB-231 por meio de transdução de partículas lentivirais shRNA. A Figura 1C demonstra a confirmação por meio de *Western Blotting* que na linhagem nocauteada (AnxA1KO MDA-MB-231) não houve expressão de AnxA1. Adicionalmente, esta mesma figura apresenta que a expressão de CatD na linhagem AnxA1KO MDA-MB-231 foi inferior à das células MDA-MB-231 nativas. Estes experimentos sugerem forte evidência de que AnxA1 e CatD atuam em conjunto nesta célula de TNBC. A partir de então

a questão a ser esclarecida foi o modo como a CatD poderia modular AnxA1 e, para esclarecer isso, utilizou-se o inibidor de CatD, PepA.

4.2 Pepstatina A inibe Catepsina D através da díade catalítica aspártica

PepA é um potente inibidor da atividade de CatD[55]. Com o objetivo de confirmar a eficiência da inibição de CatD por PepA e elucidar os átomos responsáveis por tal inibição, realizou-se ensaios FTIR. Essa técnica possibilitou a caracterização do complexo CatD-AnxA1 e investigação de regiões nas estruturas tanto de CatD quanto de PepA responsáveis pela inibição de CatD, baseada em vibrações de átomos dentro de moléculas. Uma vez que foi demonstrado previamente que a expressão de AnxA1 e CatD está correlacionada em TNBC, esta análise foi realizada apenas em MDA-MB-231.

Os espectros de FTIR (faixa de frequência de 800 a 4000 cm^{-1}) de MDA-MB-231, PepA e MDA-MB-231 tratada com PepA nas doses de 1 μM e 10 μM estão elucidados na Figura 9A. Nota-se que na faixa de 800 a 1200 cm^{-1} de frequência (Figura 9B), o espectro foi submetido a ampliação para melhor análise das modificações; ainda, para facilitar a compreensão, a faixa de frequência foi dividida em duas regiões importantes: 800 a 900 cm^{-1} (Figura 9C) e 900 a 1050 cm^{-1} (Figura 9D).

Em uma primeira análise (frequência de 800 a 900 cm^{-1}), o espectro referente as células MDA-MB-231 é caracterizado por um pico a 848 cm^{-1} atribuído à vibração molecular de OH do tipo flexão originada de átomos de oxigênio. Ademais, nos espectros correspondentes a célula MDA-MB-231 tratada com PepA (1 μM e 10 μM), o inibidor interage com a CatD da células de

TNBC e o pico é deslocado aparecendo em 855 cm^{-1} , valor atribuído à vibração do grupamento CO. Tomados em conjunto, estes resultados permitem inferir que os grupos carboxílicos da díade catalítica de aspartatos estão envolvidos na inibição de CatD por PepA e que tais aminoácidos na protease nativa são protonados. Além disso, confirmando estas observações, nenhum pico referente unicamente a PepA foi observado.

Em segunda análise, a faixa de frequência de 900 a 1050cm^{-1} confirma que PepA é capaz de inibir CatD através do grupo carboxílico presente na díade catalítica de aspartatos. Por um lado, os picos a 986cm^{-1} e 989cm^{-1} dos espectros de células MDA-MB-231 sem tratamento e tratadas com PepA $1\mu\text{M}$ e $10\mu\text{M}$ correspondem a vibrações de CO do tipo flexão curvatura originárias do grupo carboxílico dos resíduos de aspartato do sítio catalítico de CatD. Adicionalmente, o pico a 1012cm^{-1} do espectro de PepA foi atribuído à deformação angular do grupo OH de PepA. Portanto, através destes dados apresentados infere-se que PepA interage com CatD através do grupamento OH.

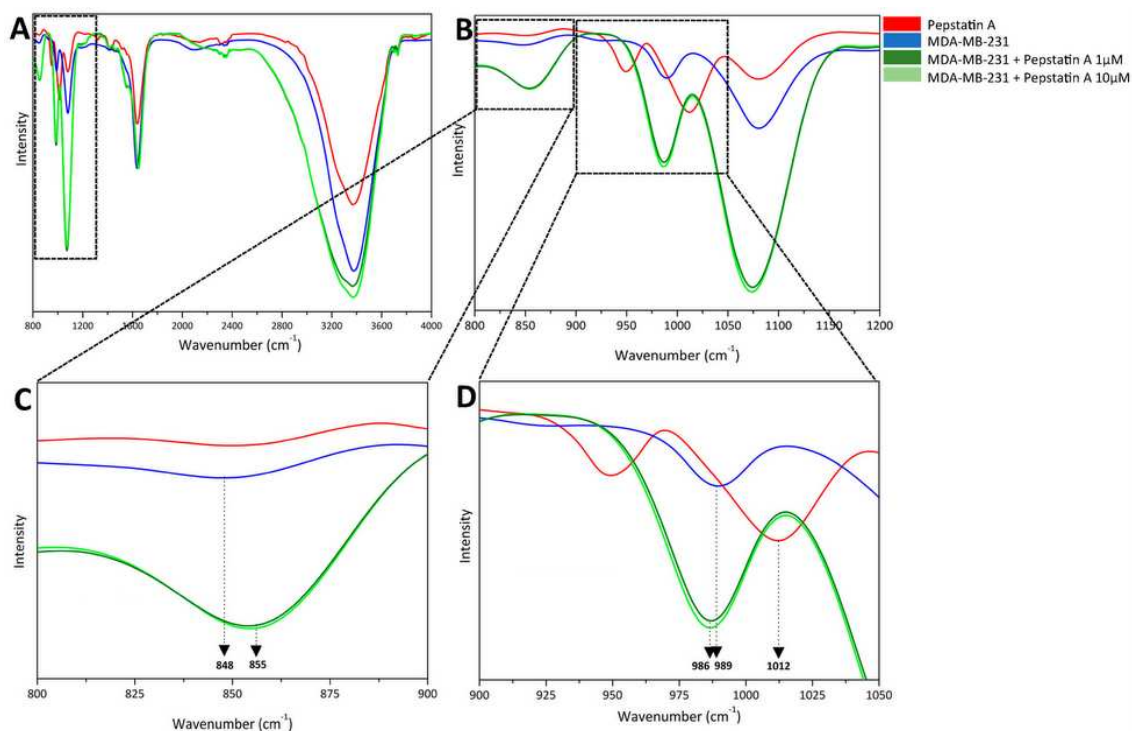


Figura 9. FTIR evidenciando os átomos envolvidos na inibição de CatD. (A) Perfil de FTIR de PepA (vermelho), MDA-MB-231 controle (azul) e tratada com PepA (1 μ M, verde claro; 10 μ M, verde escuro) na faixa de 800 a 4000 cm^{-1} . Objetivandomelhor visualização, os espectros estão ampliados nas seguintes faixas: (B) 800 a 1200 cm^{-1} , (C) 800 a 900 cm^{-1} com picos a 848 cm^{-1} e 855 cm^{-1} ; e (D) 900 a 1050 cm^{-1} com picos a 986 cm^{-1} e 989 cm^{-1} .

Esses dados sugerem três eventos importantes. Primeiro, no CatD nativo, os ácidos carboxílicos da díade aspartato catalítico CatD são protonados. Segundo, os principais átomos responsáveis pela inibição de CatD são o ácido carboxílico, especialmente o CO ligado, do seu sítio ativo e a ligação OH na estrutura PepA. Em terceiro lugar, os espectros de dois grupos (MDA-MB-231 + PepA 1 μ M e MDA-MB-231 + PepA 10 μ M) mostraram as mesmas bandas, significando que o PepA é capaz de inibir eficazmente a CatD nas duas concentrações testadas.

4.3 Catepsina D cliva Anexina A1: um evento crucial na proliferação e invasão de células MDA-MB-231

Um estudo recente desenvolvido por nosso grupo de pesquisa sugere a associação entre os processos de clivagem de AnxA1 e agressividade e progressão de TNBC[46]. Embora a literatura destaque separadamente o papel de CatD e de AnxA1 clivada no câncer, este estudo é pioneiro em propor a correlação de ambos os eventos.

A análise de *Western Blotting* da expressão de AnxA1 nas três linhagens (Figura 10A) revelou uma maior expressão de AnxA1 intacta (37KDa) nas células MDA-MB-231 em comparação com as células MCF-7 e MCF10-A. Nota-se também que AnxA1 clivada (fragmento de 35,5KDa gerado por CatD) é exclusivamente expressa em células de TNBC. Ademais, as 3 linhagens foram tratadas com PepA nas concentrações de 1 e 10 μ M. Como esperado, a referida droga causou inibição do processo de clivagem de AnxA1 em MDA-MB-231. Além disso, a expressão de AnxA1 não se modificou em MCF-10A e MCF-7 após o tratamento com PepA, uma vez que é possível visualizar apenas a forma intacta de Anxa1 nestas células. De fato, o fragmento de 35,5KDa de AnxA1 gerado pela atividade de CatD exclusivamente expresso em células de TNBC. A partir disso, investigamos o efeito da inibição de CatD por PepA nos processos de proliferação, migração e invasão de MDA-MB-231.

Primeiramente avaliou-se o efeito de PepA na proliferação celular através da quantificação coloração de CFSE. Os resultados (Figura 10B) demonstram que o tratamento com PepA restringiu apenas a proliferação de MDA-MB-231, indicando que CatD e AnxA1 (35,5KDa) são importantes para este processo. Adicionalmente, a análise da influência de PepA no processo de invasão celular foi feita através de ensaio de invasão de Matrigel utilizando a linhagem de células de TNBC tratadas com a droga (1 μ M e 10 μ M) por 24h

(Figura 10C). Comparando os tratamentos às células tratadas apenas com veículo (controle), relativamente representadas por 100% de invasão, PepA na concentração de 1 μ M reduziu a porcentagem de células invasivas MDA-MB-231 para 40,75% e, quando tratadas com PepA 10 μ M, apenas 15,00% das células foram capazes de invadir o Matrigel. Adicionalmente, verificou-se a hipótese de que a inibição de CatD poderia afetar a migração celular por meio de ensaio *wound-healing*. De acordo com a Figura 10D, o tratamento com PepA não foi capaz de reduzir a capacidade de migração de MCF-10A e MCF-7 mas em MDA-MB-231 a PepA diminuiu a migração celular em comparação com o controle.

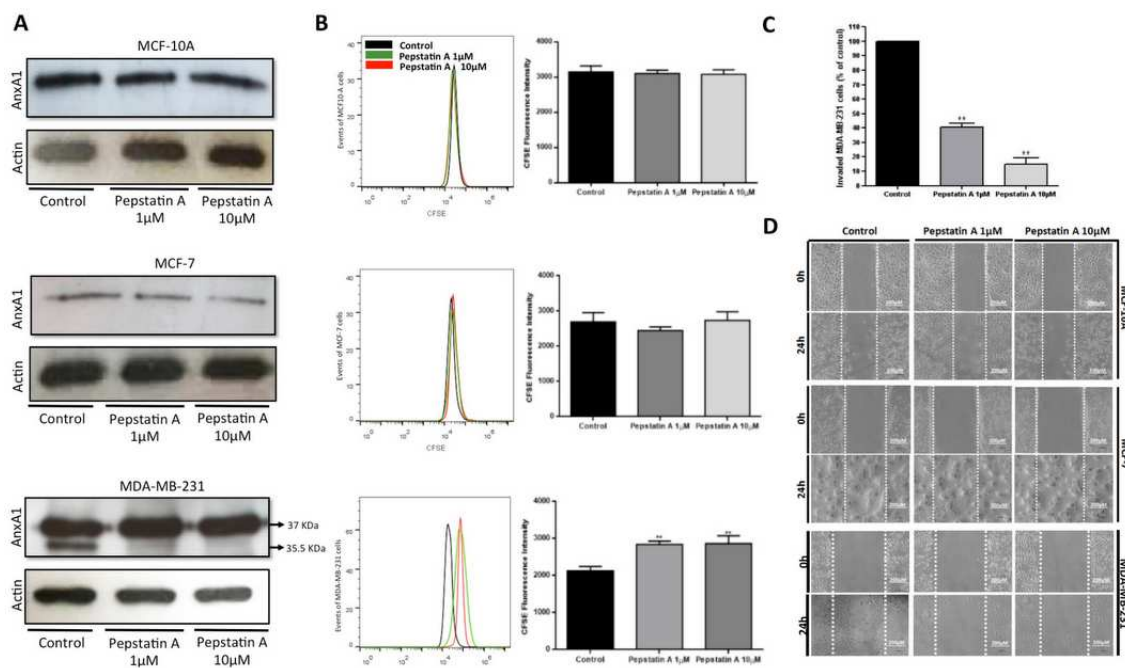


Figura 10. Inibição de CatD inibe a proliferação, migração e invasão de MDA-MB-231. (A) Análise por meio de *western blotting* da expressão de AnxA1 em células controle e tratadas por 24h com 1 e 10 μ M de PepA. AnxA1 intacta (37KDa) é detectada em todas as células e sua isoforma clivada (35,5KDa) é detectada apenas em MDA-MB-231. A Actina foi utilizada como controle interno da reação. (B) Análise de proliferação celular por meio de CFSE de MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com PepA (1 μ M, cinza e 10 μ M, vermelho) em comparação com células controle (preto). Os respectivos gráficos de barra correspondem a intensidade de

fluorescência de CFSE. A análise estatística foi baseada em triplicatas experimentais e biológicas e os dados estão expressos em barras com médias \pm DP (**, $p < 0,01$). (C) Análise de ensaio de invasão em Matrigel. O gráfico representa a porcentagem de células que invadiram em relação ao controle. A análise estatística foi baseada em triplicatas experimentais e biológicas e os dados estão expressos em barras com médias \pm DP (**, $p < 0,01$). (D) O potencial de migração foi avaliado por meio de *Wound-Healing* e as imagens demonstram células que migraram no tempo 0 h e após 24h. Barras de escala = 200 μ m.

Resumidamente, os resultados verificados na Figura 10 sustentam a hipótese de que CatD afeta a agressividade das células MDA-MB-231 através da clivagem de AnxA1. De fato, é comprovado que a sinalização autócrina de AnxA1 por seu peptídeo N-terminal sustenta capacidade invasiva em células de melanoma e BC [47][46] e, neste contexto, foi demonstrado até agora que em TNBC o bloqueio da clivagem de AnxA1 é essencial a redução das capacidades de proliferação, invasão e migração de células, e uma das explicações para este acontecimento é que tal bloqueio previne a ativação de vias de sinalização pelo peptídeo N-terminal de AnxA1.

4.4 Inibição de Catepsina D é capaz de induzir apoptose e autofagia em MDA-MB-231

Uma vez que AnxA1 clivada é expressa em MDA-MB-231 e necessária para a proliferação, migração e invasão destas células, a hipótese gerada foi de que CatD poderia prevenir a apoptose nas células de TNBC. Para essa investigação, as células MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 foram tratadas com PepA 1 μ M e 10 μ M por 24h e marcadas com AnexinaV-PE e 7-AAD. Neste contexto, sabe-se que AnexinaV liga-se à fosfatidilserina exposta externamente na membrana plasmática de células que estão no início do processo de

apoptose enquanto o 7-AAD é intercalante de DNA e se liga nas células que já estão com membranas plasmática e nuclear lisadas, acontecimentos decorrentes dos estágios finais de apoptose celular.

A investigação por citometria de fluxo (Figura 11A) demonstrou que o processo de apoptose foi induzido por PepA apenas em células de TNBC. As células controle MDA-MB-231 obtiveram 99,8% de viabilidade (Annexin V-/ 7-AAD-) (Figura 11B). No entanto, após a inibição da protease, a população de células em apoptose inicial (indicada por exposição de fosfatidilserina) aumentou significativamente ($p < 0,001$) de 0% para 43,1% (tratamento PepA 1 μ M) e para 47,5% (tratamento PepA 10 μ M). Com relação a células em processo de apoptose tardia, verificou-se que o percentual de eventos duplamente positivos para AnexinaV e 7-AAD aumentou significativamente de 0,027%, no controle, para 13,9% ($p < 0,05$) e 25,3% ($p < 0,001$) entre células MDA-MB-231 submetidas a tratamento com PepA 1 μ M e 10 μ M, respectivamente. Em contraste, a inibição de CatD não contribuiu significativamente para a indução de apoptose em células MCF-10A e MCF-7, nas quais não há clivagem de AnxA1. Estes resultados indicam que CatD e a clivagem de AnxA1 podem proteger as células MDA-MB-231 de entrarem em processo de apoptose e demonstram que a inibição da clivagem de AnxA1, induzida por CatD, promove a morte celular apoptótica em 57% (PepA 1 μ M) a 72,8% (PepA 10 μ M) de células de TNBC.

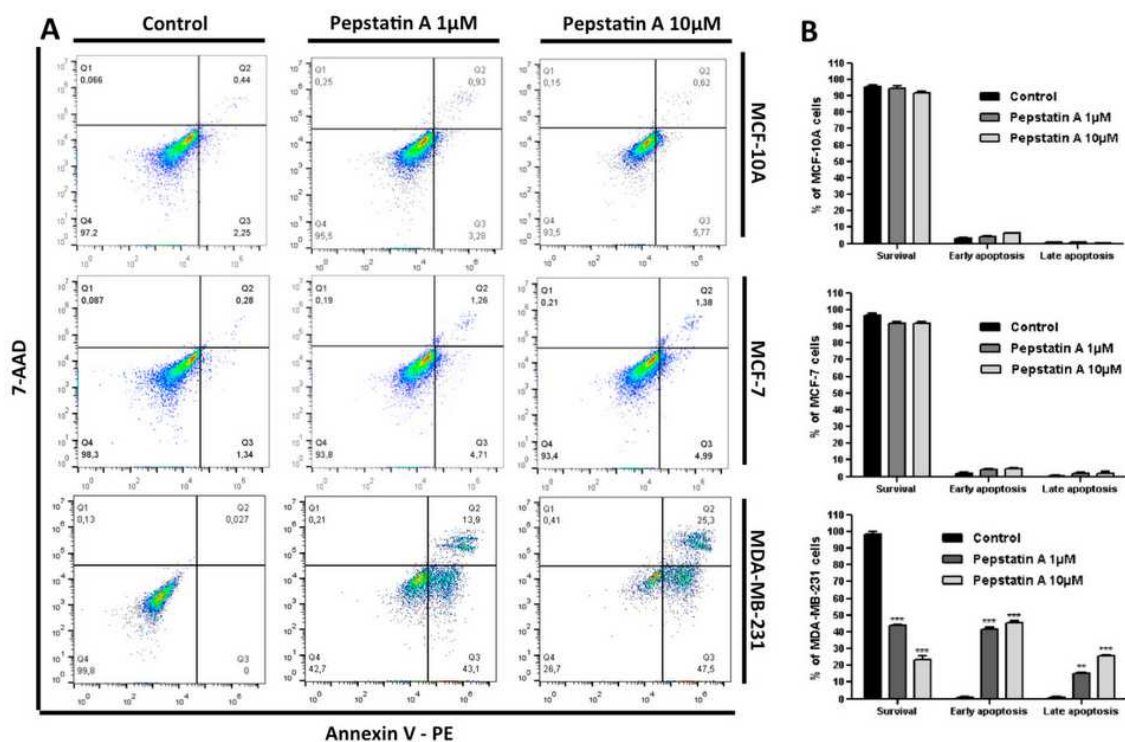


Figura 11. Inibição de CatD induz a apoptose em células MDA-MB-231. (A) A fração apoptótica de células MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 após 24h de tratamento com PepA (1 μ M e 10 μ M) comparada ao controle é mostrada, com números no quadrante inferior direito (apoptose precoce) e no quadrante superior direito (apoptose tardia). (B) Histograma representativo da taxa de apoptose precoce e tardia induzida por PepA. A análise estatística foi baseada em triplicatas técnicas e biológicas e os dados estão expressos em barras com médias \pm DP. Asteriscos indicam diferença significativa com relação ao grupo controle (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Além do processo de apoptose, a morte celular programada conhecida como autofagia é um mecanismo de apoio para contornar a resistência de células refratárias à apoptose[62][63]. Ademais, evidências substanciais demonstram que a indução autofágica é um evento crucial de atividade antitumoral induzida por drogas[64][65]. Com o objetivo de investigar se a ativação do processo de apoptose por PepA estaria associada à ativação de autofagia, avaliou-se esta última por meio de coloração com MDC. Este composto é comumente empregado para a coloração de vacúolos autofágicos maduros, uma vez que é um marcador específico de autofagolisossomos.

Em células MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 controles (tratadas com veículo), foi detectada baixa frequência de vacúolos marcados com MDC (Figura 12A). No entanto, em células de TNBC tratadas por 24h com PepA 1 μ M e 10 μ M, foram detectados vacúolos marcados com MDC com intensidade de fluorescência 35,00 e 78,40, respectivamente (Figura 10B). Por outro lado, as células MCF-10A e MCF-7 não apresentaram marcação significativa de vacúolos autofágicos após o tratamento com PepA, indicando que essas células são insensíveis à inibição de CatD em relação à autofagia.

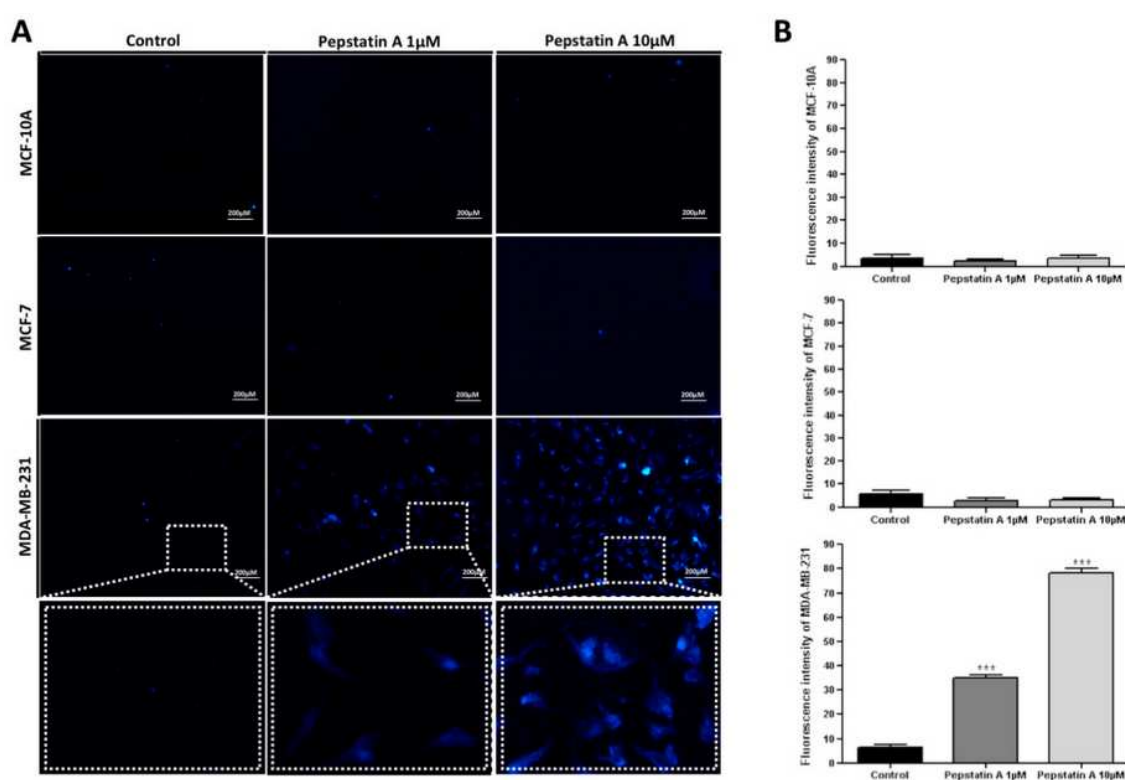


Figura 12. A inibição de CatD promove a formação de vacúolos autofágicos em células MDA-MB-231. (A) Vacúolos autofágicos (azul) em células MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 corados com MDC após tratamento por 24h com PepA (1 μ M e 10 μ M) por 24h em comparação ao grupo controle. O tracejado demonstra a visão ampliada de parte do quadrante. Barras de escala = 200 μ m. (B) Histograma representativa da intensidade de fluorescência de MDC, determinada pelo software ImageJ. Os dados são expressos como a média \pm DP de três experimentos independentes, n=15. Asteriscos (*) indicam diferença significativa do grupo controle (*, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001).

Corroborando com as análises do processo de apoptose, os dados da Figura 12 demonstram que CatD desempenha um papel protetor também contra a autofagia, uma vez que a PepA induziu significativamente este processo em células MDA-MB-231. Em conjunto, estes resultados fornecem evidências substanciais de que a inibição de CatD induz tanto processos de apoptose quanto de autofagia em células MDA-MB-231. Interessantemente, estudos recentes revelam que existe uma forma de morte não apoptótica dependente de autofagia [66][67] e, com base nisso, o presente resultado indica que alguma porcentagem de células resistentes à apoptose tratadas com PepA (43% em tratamento com PepA 1 μ M e 27,2% no tratamento com PepA 10 μ M) pode ter se inviabilizado pelo processo de autofagia.

4.5 Validação de modelos estruturais das interações Catepsina D / Anexina A1 e Catepsina D / Pepstatina A

A interação CatD/AnxA1 permite a clivagem de AnxA1 gerando um fragmento de N-terminal e outro de 35,5KDa. Quando PepA bloqueia CatD (complexo CatD/PepA), a clivagem é inibida, reduzindo a agressividade das células MDA-MB-231. Portanto, para a avaliação conformacional dos complexos estudados no presente trabalho, foram realizados estudos de *docking* molecular *in silico*.

Primeiramente, com o objetivo de analisar o complexo CatD/AnxA1, foi realizado um modelo de ancoragem proteína-proteína. O cluster de conformações resultantes apresentou 65 estruturas, sendo que a melhor delas apresentou *Haddock score* de $-161,6 \pm 6,4$, medido em unidades arbitrárias, que considera as forças intermoleculares de *van der Waals*, eletrostática e

dessolvatação. Sabe-se que CatD, quando não inibida por PepA, se liga a no Trp¹² de AnxA1 de maneira que aproxima o sítio catalítico de clivagem e, visualizando *in silico* este processo, a conformação obtida do *docking* demonstra a proximidade entre o Trp¹² de AnxA1 e a díade catalítica de aspartatos de CatD (Figura 13A). No entanto, analisando a conformação da ancoragem CatD/AnxA1, é possível especular que poderia haver modificações estruturais ainda não descritas que tornariam os domínios N-terminais de AnxA1, especialmente Trp¹², mais expostos a Asp³³ e Asp²³¹ para facilitar sua clivagem.

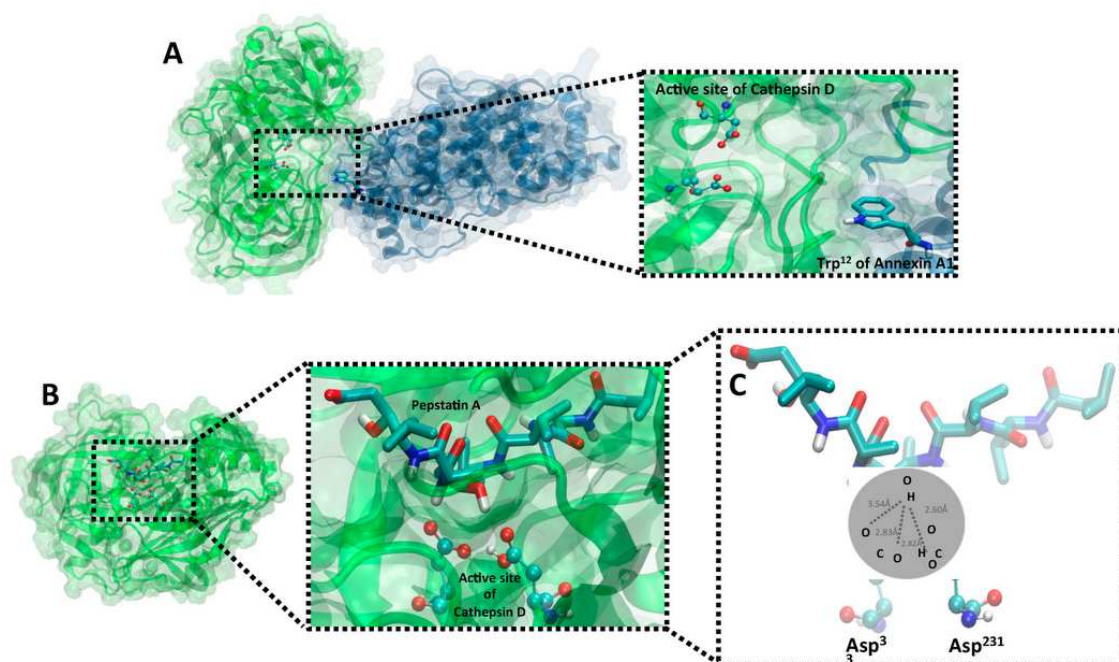


Figura 13. Modelos moleculares dos complexos CatD / AnxA1 e CatD / PepA. (A) *Docking* molecular (proteína – proteína) de AnxA1 (azul) e CatD (verde). O tracejado indica ampliação do sítio ativo de protease próximo ao Trp¹² de AnxA1. (B) *Docking* molecular (proteína – ligante) de CatD e PepA. O tracejado amplia a visão do sítio ativo de CatD bloqueado por PepA. Todas as proteínas são representadas no modelo *cartoon*, cujas espirais são alfa-hélices, as tiras representam folhas-beta e a superfície transparente indica a região da interface. (C) Imagem ampliada em um ângulo diferente para melhor demonstração das interações atômicas nas estruturas de PepA e CatD. A ligação OH de PepA interage com ácido carboxílico de Asp³³ e Asp²³¹ (localizados no sítio ativo de CatD) com distâncias aproximadas de contato de 3,54 Å, 2,83 Å, 2,832 Å e 2,60 Å. Os átomos estão representados em cores distintas (nitrogênio, azul escuro; oxigênio, vermelho; hidrogênio, branco; carbono, azul claro).

Em uma segunda abordagem, para confirmar a atividade de PepA e os principais átomos envolvidos na inibição de CatD previstos nos experimentos anteriormente mencionados foi realizado o *docking* de proteína-ligante (complexo CatD/PepA). O cluster apresentou 36 conformações de PepA e sua melhor estrutura apresentou energia de ligação de $-9.5353 \text{ kcal mol}^{-1}$ com CatD, sendo estruturalmente similar à conformação do ligante no complexo determinado por cristalografia. Como demonstrado na Figura 13B, quando CatD é inibida por PepA, o inibidor ocupa o sítio ativo da protease e, confirmando os achados do FTIR, os átomos sugeridos para participar da inibição (OH da PepA e ácido carboxílico dos resíduos de aspartato de CatD) estão fisicamente próximos. Além disso, em uma visão ampliada do complexo CatD / PepA (Figura 13C), o *docking* demonstrou que o Asp²³¹ é protonado diferentemente do Asp³³ que se encontra desprotonado. Esse resultado corrobora com o mecanismo de inibição de outras proteases aspárticas, a exemplo da protease aspártica encontrada no vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1), na qual a inibição catalítica compreende um aspartato protonado e outro desprotonado, ambos localizados no sítio ativo[68], e que possui 45% de similaridade com a protease do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)[69]. Concluindo, no sítio ativo da CatD, o Asp²³¹ se encontra protonado, comportando-se como ácido, enquanto o Asp³³ está desprotonado, comportando-se como base, permitindo assim a inibição da CatD pela ligação de OH localizada no inibidor PepA.

4.6 Expressão de Catepsina D define a sobrevida de pacientes com câncer de mama triplo negativo

Uma vez que o papel de Catepsina D e seu mecanismo de inibição por meio de PepA em MDA-MB-231 já foi evidenciado, o próximo passo do presente trabalho foi investigar a sobrevida de pacientes acometidos por TNBC que continham alta e baixa expressão gênica de Catepsina D.

Interessantemente, a análise de *Kaplan-Meier Plotter*[70][71] demonstrou claramente que a expressão elevada de Catepsina D nas 96 pacientes do estudo acometidas por CMTN reduziu significativamente ($p=0.045$) a sobrevida global mediana em 120 meses ou 10 anos, de forma que após 40 meses, a probabilidade de sobrevivência de uma paciente acometida por TNBC com alta expressão de CTSD é de 40% enquanto que de uma paciente acometida pelo mesmo tumor com baixa expressão de CTSD é 60%. Ademais, após 80 meses, a probabilidade de sobrevivência das mesmas pacientes é de aproximadamente 35% (para células tumorais com alta expressão de CTSD) versus 60% para tumores TNBC com baixa expressão de CTSD.

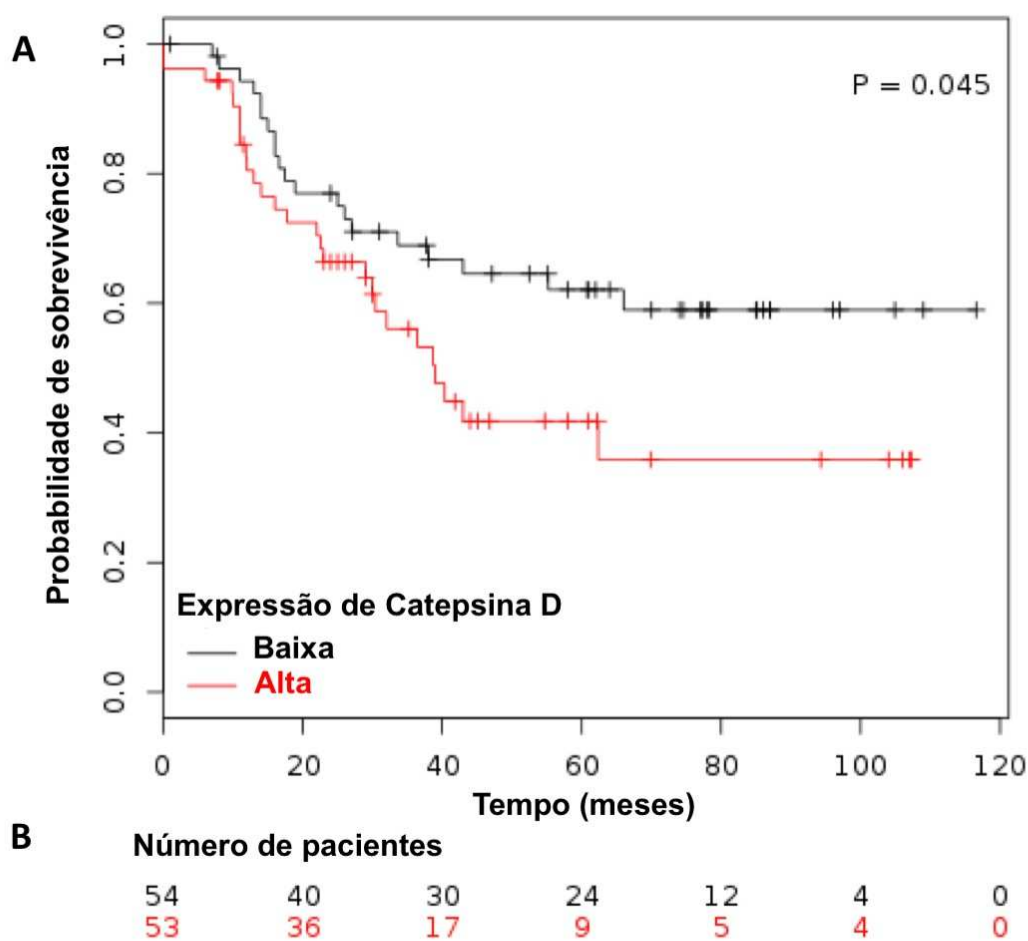


Figura 14: Sobrevida global de pacientes com TNBC estimada através de Kaplan-Meier Plotter. A) O gráfico indica a sobrevida em 10 anos de 96 pacientes acometidos por TNBC com alta (vermelho) e baixa (preto) expressão de CatD. B) Número de pacientes sobreviventes de 0 a 120 meses, análise realizada a cada 20 meses.

No ano de 2000, a Catepsina D foi apontada como fator prognóstico do câncer de mama pelo Consenso do Colégio Americano de Patologistas e hoje o presente trabalho adiciona à essa abordagem um forte indício de que esta protease pode ser considerada também como fator de prognóstico para TNBC. Além disso, ampliando a visão, pode-se constatar que a redução da atividade de CTSD nos tumores TNBC por meio de tratamentos pode aumentar de maneira satisfatória a sobrevida das pacientes.

4.7 Perfil geral de CatD e marcadores de EMT em linhagens TNBC

O passo seguinte do presente trabalho foi aumentar o número de linhagens TNBC analisando, além de MDA-MB-231, outras células TNBC como BT-549, MDA-MB-468, HCC-1937, MCF-10A (não tumorigênica), MDA-MB-453 e MDA-MB-157 e verificando seus perfis gerais de expressão proteica de CatD e de marcadores EMT. Para isso, primeiramente foi realizado western blotting visando a obtenção do perfil de expressão de CatD em todas as linhagens TNBC.

De acordo com a Figura 15A, demonstrou-se que de todas as linhagens, a MDA-MB-231 é a que possui maior expressão da protease enquanto que as linhagens MDA-MB-468, HCC-1937, MCF-10A e MDA-MB-157 possuem perfis similares de expressão. Ademais, as linhagens BT-549 e MDA-MB-435 possuem os menores níveis de expressão de CatD.

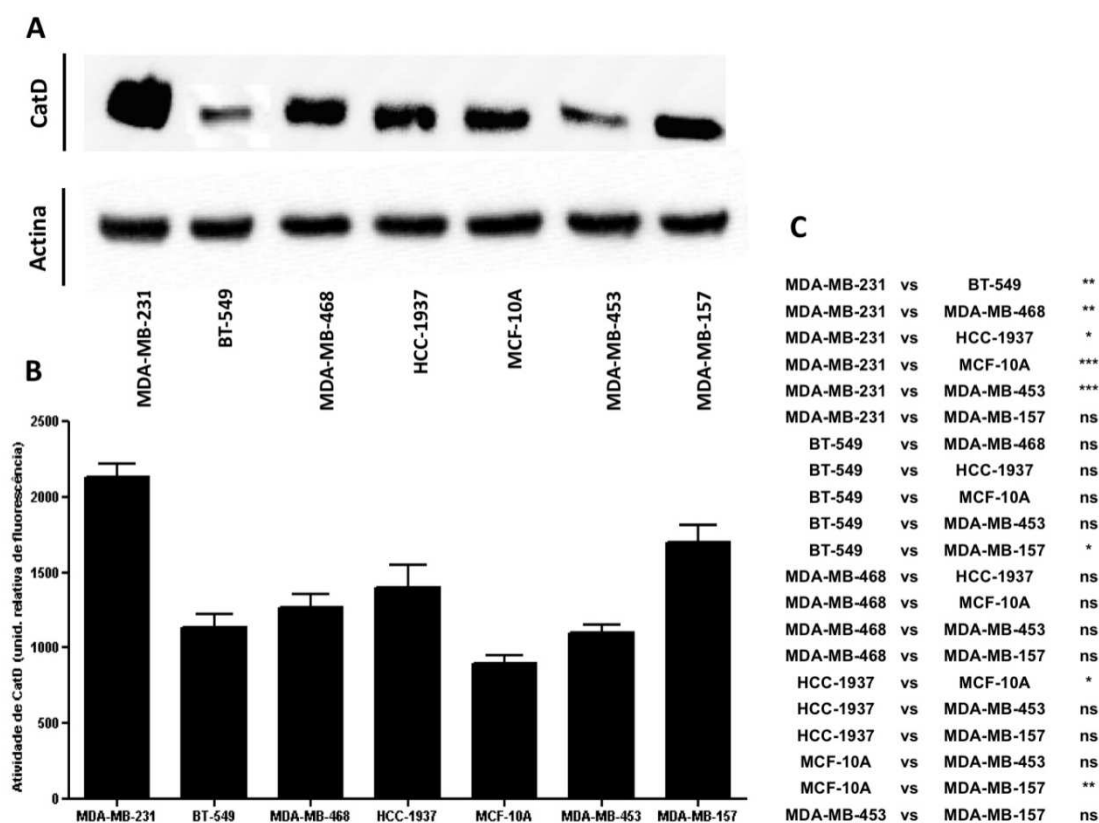


Figura 15. Expressão e atividade de CatD em linhagensTN. A) Expressão proteica de CatD acessada por meio de Western Blotting das células. Actina foi utilizada como controle da reação. Todos os dados são representativos de, no mínimo, três experimentos independentes. B) Atividade de CatD demonstrada em porcentagem de fluorescência referente às linhagens TN de BC. Os dados estão apresentados como a média \pm desvio padrão, coletados de três experimentos independentes. C) Estatística referente aos gráficos apresentados na letra (B). *, $p < 0.05$; **, $p > 0.01$; ***, $p > 0.005$.

Adicionalmente, está claro na literatura que a CatD é uma protease ativa em $pH < 6$ [49], e por isso faz-se necessário analisar, além da expressão protéica, a atividade em cada uma das linhagens TNBC uma vez que a elevada expressão em uma célula não está necessariamente correlacionada a alta atividade da protease. Assim, tem-se nas figuras 15B e 15C o resultado da análise de atividade de CatD expresso em unidades relativas de fluorescência. Os dados evidenciam a maior expressão da protease em MDA-MB-231 seguida por MDA-MB-157 e HCC-1937. Interessantemente, a linhagem não

tumorigênica MCF-10A possuiu significativamente a menor atividade de CatD, embora tenha uma expressão a níveis medianos da mesma.

A literatura demonstra que CatD está envolvida na EMT [50] e, durante este processo, as células regulam negativamente marcadores epiteliais e positivamente marcadores mesenquimais. Assim, uma vez que o perfil de expressão proteica e a atividade da protease foram verificadas, o próximo passo foi a análise do perfil de expressão de marcadores de EMT. Assim, o presente trabalho avaliou a expressão de E-caderina, biomarcador de células com fenótipo epitelial; e Vimentina e CD44, marcadores de células mesenquimais.

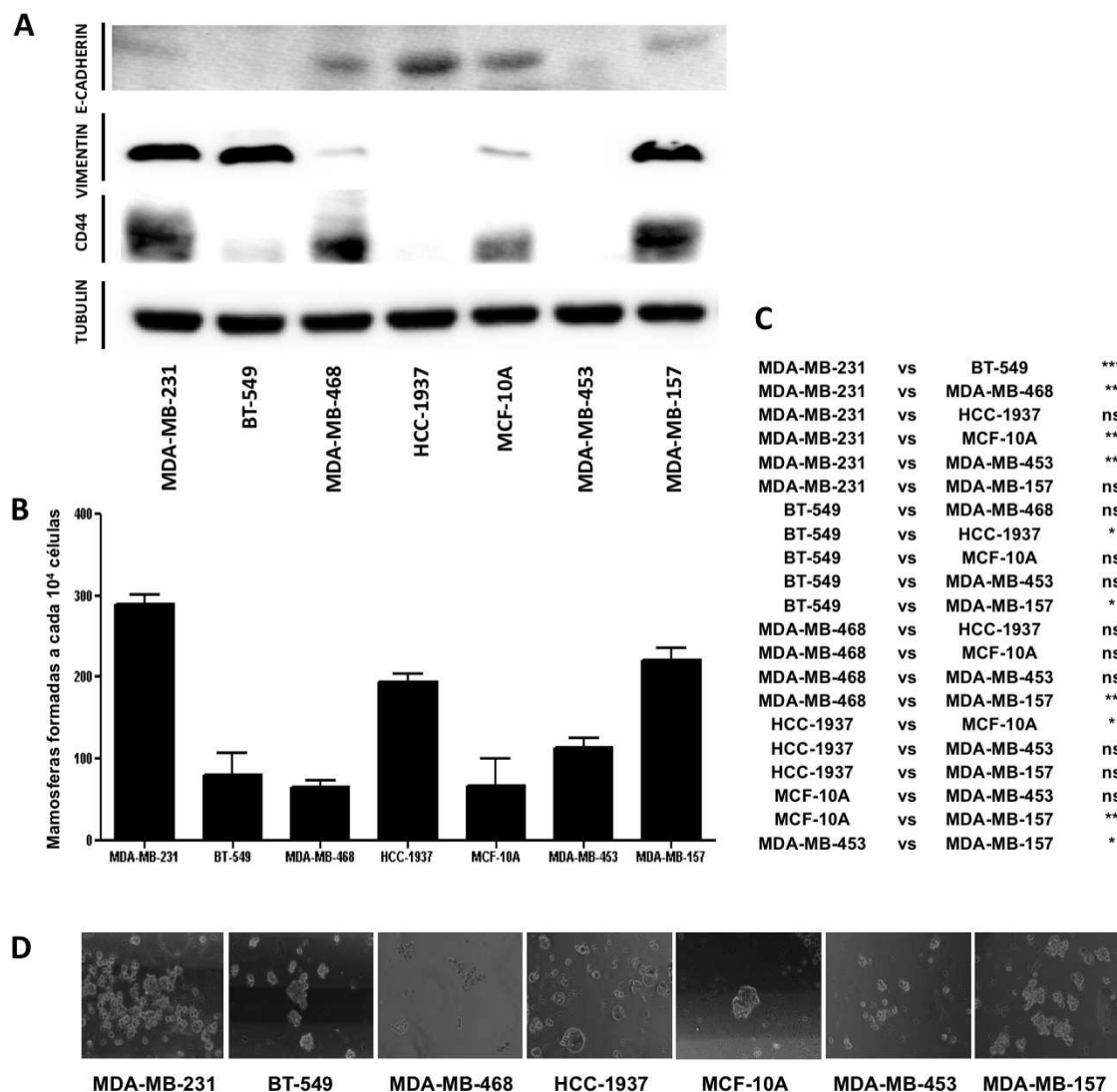


Figura 16. Análise do perfil de marcadores epiteliais e mesenquimais e da capacidade de formação de mamosferas de células TN. A) Expressão proteica de E-caderina, Vimentina e CD44 acessada por meio de Western Blotting das células. Tubulina foi utilizada como controle da reação. Todos os dados são representativos de, no mínimo, três experimentos independentes. B) Quantificação de mamosferas formadas após 14 dias a cada 10000 células analisadas. Os dados estão apresentados como a média \pm desvio padrão, coletados de três experimentos independentes. C) Estatística referente aos gráficos apresentados na letra (B). *, $p < 0.05$; **, $p > 0.01$; ***, $p > 0.005$. D) Imagens representativas das mamosferas formadas por cada uma das células analisadas. Magnificação utilizada: x20.

A figura 16A demonstra que a expressão de E-caderina foi baixa na maioria das células tendo sua maior expressão em HCC-1937 e nas células MDA-MB-468 e MCF-10A nota-se que há expressão relativamente inferior a

HCC-1937 porém maior que as outras linhagens. Ademais, pesquisas evidenciam que a expressão de marcadores mesenquimais em linhagens celulares tumorais está correlacionada à uma maior agressividade das mesmas [28] e, neste contexto, Vimentina se demonstrou mais expressa em MDA-MB-231, BT-549 e MDA-MB-157. Ademais, CD44 se demonstrou mais expresso em MDA-MB-231, MDA-MB-468 e MDA-MB-157.

O ensaio de formação de mamosferas é um método muito importante para mensurar a formação de tumores formados por células-tronco[72]. Estudos evidenciam que as células-tronco tumorais podem suportar o processo de apoptose visando formar as mamosferas por um processo caracterizado por auto-renovação ilimitada[73][74]. Neste contexto, há indícios na literatura de que o processo de EMT aumenta a população de células-tronco cancerosas [28]e então o próximo experimento do presente trabalho foi o ensaio de formação de mamosferas em todas as linhagens TN. As figuras 16B e 16C demonstram que as linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-157 possuem maior capacidade de formação de mamosferas comparadas as demais células chegando a formarem 280 e 250 mamosferas a cada população de 10000 células, respectivamente. Nota-se também que as linhagens MDA-MB-468, MCF-10A e MDA-MB-453 demonstraram menores capacidades de formação das esferas. Como visualizado na figura 16D, a morfologia das mamosferas pode ser diferente em distintas linhagens celulares uma vez que cada célula possui expressão gênica própria que determina seu fenótipo e o modo como se arranjam para formarem tais microesferas.

Em um panorama geral, as células MDA-MB-231 e MDA-MB-157 demonstraram maior expressão e atividade de Catepsina D, maior expressão

de marcadores mesenquimais Vimentina e CD44 e maior capacidade de formação de mamóferas. Essas duas linhagens possuem em comum o fato de serem consideradas do tipo TN Basal-B[75] e estudos demonstram que esta classificação engloba as células TN mais agressivas uma vez que possuem maior perfil mesenquimal quando comparadas a outras linhagens CMTN, maior capacidade de invasão e menor diferenciação celular[76][77]. Diante da análise dos dados expostos, o próximo objetivo do presente trabalho se baseou em formular distintas estratégias eficazes de inibição da protease CatD nas células mais agressivas com maior expressão da mesma (MDA-MB-231 e MDA-MB-157) e verificar as consequências da inibição da protease no perfil de expressão de marcadores EMT.

4.8 Estratégias visando inibição efetiva de expressão e/ou atividade de CatD nas células agressivas TNBC

Uma vez que foi evidenciado o papel da CatD na agressividade de células TNBC, o presente trabalho delineou novas estratégias a nível gênico e proteico para inibição desta protease. Embora PepA tenha sido utilizada para demonstrar o papel da CatD na agressividade de MDA-MB-231 e desvendar a nível atômico os elementos envolvidos nesta inibição, é estabelecido em literatura que o potencial de PepA é limitado devido a sua baixa penetração intracelular[57]. Assim, além do tratamento com PepA, inibidor padrão de CatD, no presente trabalho estabeleceu-se duas estratégias adicionais visando inibir CatD, sendo que uma se deu a nível gênico através do bloqueio da expressão de CatD por meio de shRNA e outra se deu a nível proteico com a modificação estrutural de PepA, com a adição de um componente químico denominado

Ácido Borônico, objetivando aumentar a penetração intracelular da droga. A Figura 17 traz a comparação da estrutura de PepA com a estrutura de PepA modificada com BoA.

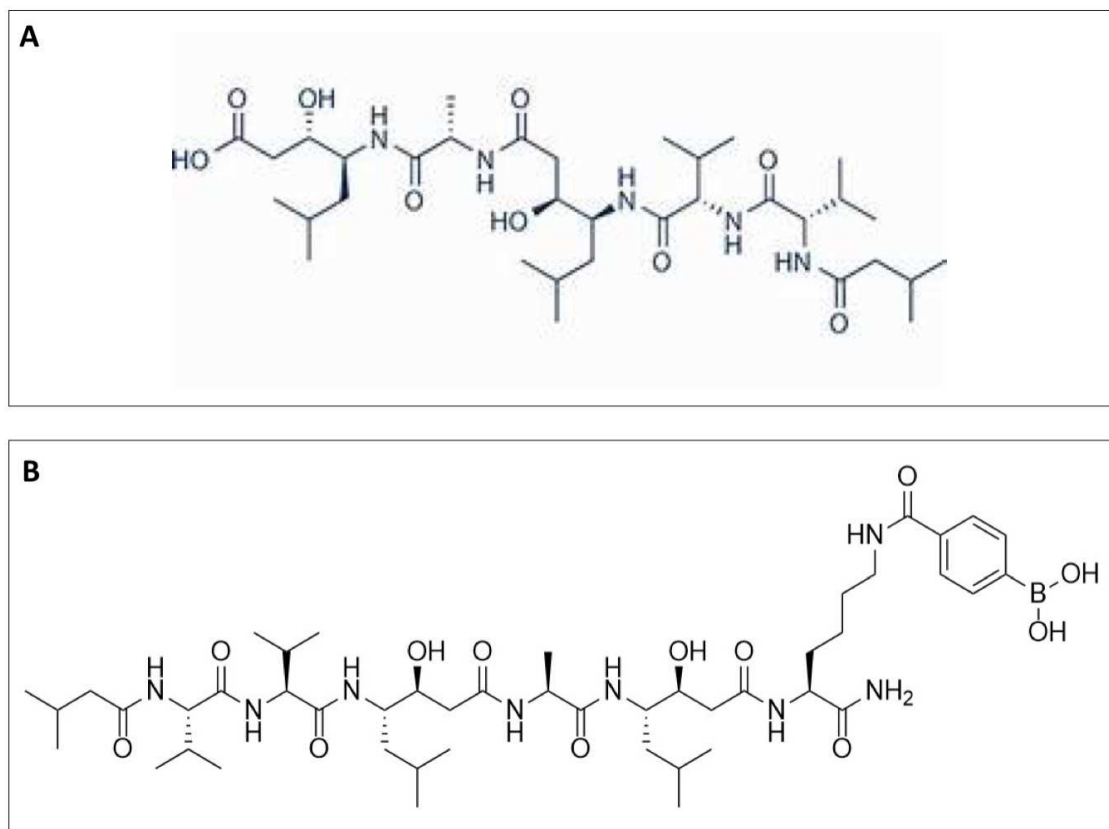


Figura 17. Estruturas químicas das drogas utilizadas para inibição de CatD. A) PepA. B) PepA-BoA

O objetivo da adição de BoA foi aproveitar de suas propriedades farmacológicas favorecendo o aumento da eficácia de PepA ao torna-la mais penetrável intracelularmente visto que este ácido possui a capacidade de facilitar o transporte de substancias através de membranas lipofílicas[78]. Adicionalmente, as propriedades eletrônicas e físico-químicas do Boro o tornam um análogo do Carbono [59] favorecendo a ligação de BoA de maneira específica ao sítio catalítico da protease CatD[58], teoricamente inibindo-a de maneira mais eficaz, quando comparada à PepA sozinha.

O passo posterior do presente trabalho baseou-se em avaliar se a droga PepA-BoA seria capaz de penetrar eficientemente nas linhagens agressivas MDA-MB-231 e MDA-MB-157 uma vez que ela foi desenhada para ser mais eficiente que PepA, cuja desvantagem é justamente a baixa capacidade de penetração intracelular. Assim, para esta verificação, utilizou-se um corante denominado Vermelho de Alizarina que é capaz de ligar-se a BoA [79] presente na droga PepA-BoA.

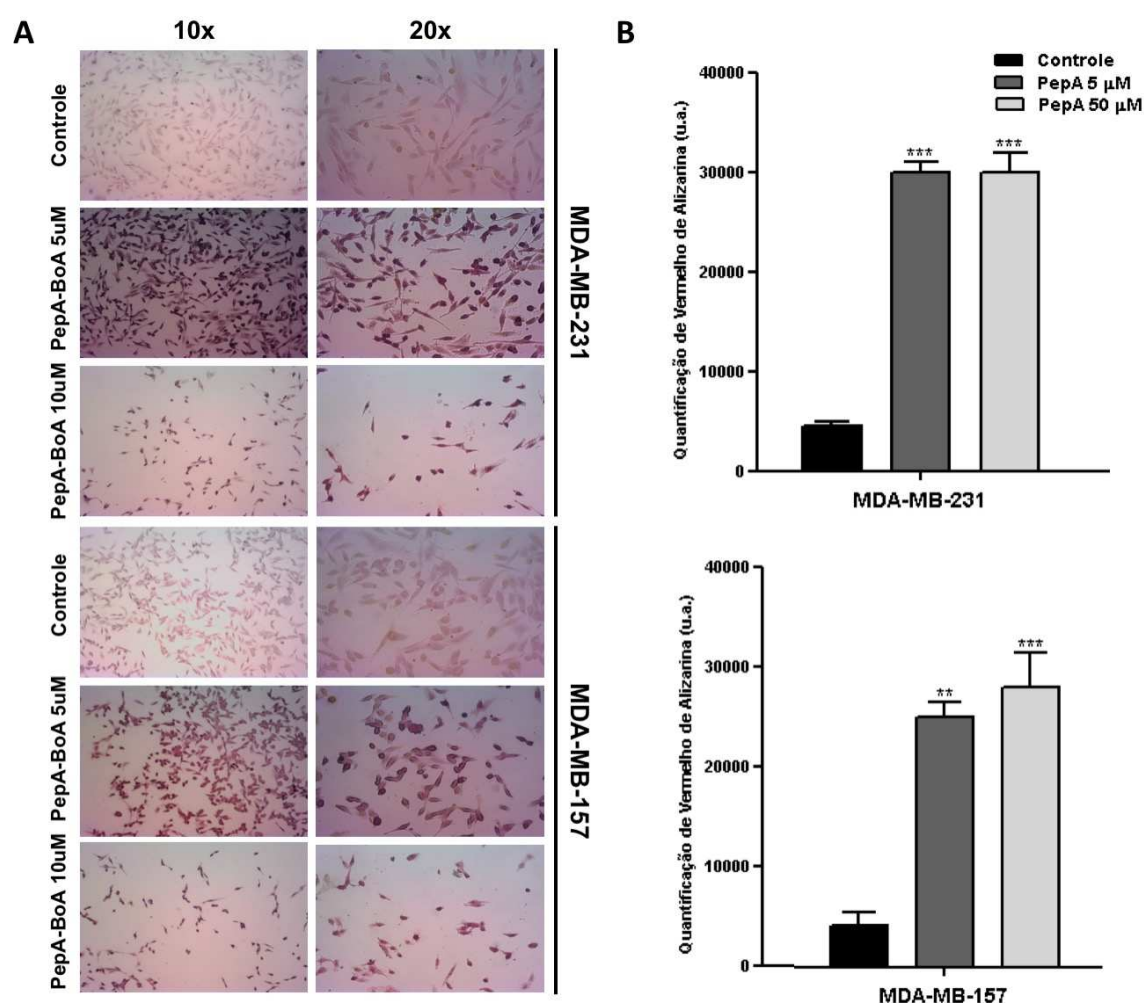


Figura 18. PepA-BoA penetra eficientemente nas células MDA-MB-231 e MDA-MB-157. A) A capacidade de penetração de PepA-BoA foi examinada por meio da marcação com Vermelho de Alizarina. B) Quantificação da intensidade de Vermelho de Alizarina em unidades arbitrárias (u.a.) determinadas por análise de 25 células no software ImageJ. Os dados estão apresentados como a média \pm desvio padrão, coletados de três experimentos independentes. A estatística foi realizada comparando

os tratamentos com os respectivos controles. *, $p < 0.05$; **, $p > 0.01$; ***, $p > 0.005$.

A figura 18A demonstra as imagens referentes aos testes em células MDA-MB-231 e MDA-MB-157 em aumentos de 10x e 20x. O controle é formado por células tratadas com PepA sem BoA enquanto que os tratamentos com a droga sintética foram nas dosagens de 5 e 50 μ M visando identificar se PepA-BoA poderia penetrar nas células em dosagens bem distintas. Como visto, PepA foi capaz de penetrar nas células nas duas doses testadas e, de acordo com a figura 18B, a quantificação de Vermelho de Alizarina em unidades arbitrárias se mostrou significativamente maior nos grupos tratados quando comparados aos respectivos controles.

Uma vez que se verificou que a droga PepA-BoA é capaz de penetrar nas células, objetivou-se demonstrar se esta penetração seria maior ou menor que a da droga PepA por meio de ensaio funcional de atividade da protease CatD. Assim, as células MDA-MB-231 e MDA-MB-157 foram submetidas a tratamentos de 24, 48 e 72h com PepA e PepA-BoA nas doses de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 μ M.

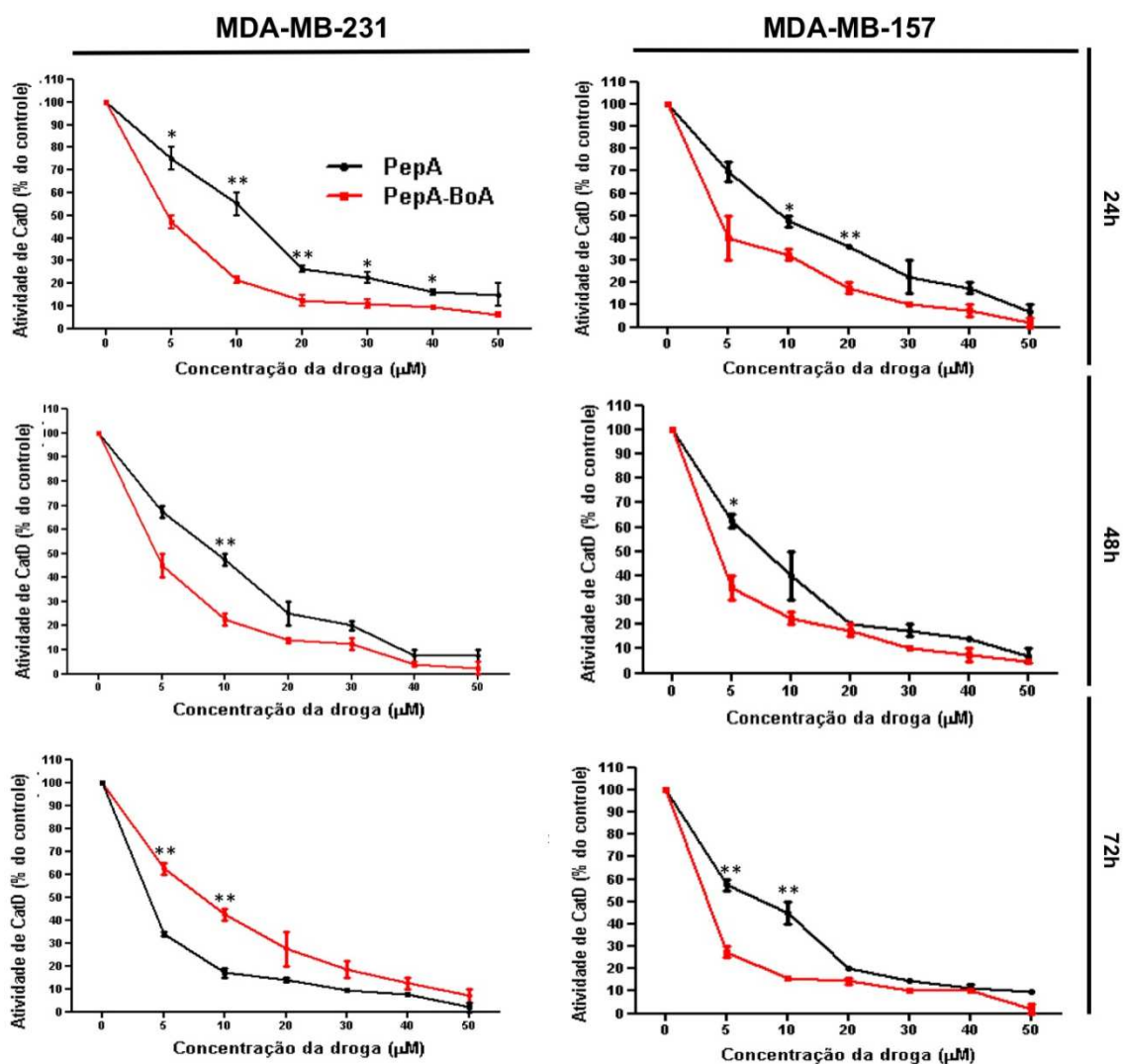


Figura 19. A atividade de CatD é eficientemente inibida em MDA-MB-231 e MDA-MB-157 de maneira dose-dependente. Foram testadas as doses 5, 10, 20, 30, 40 e 50 μM após (A) 24h, (B) 48h e (C) 72h de tratamento com PepA (preto) ou PepA-BoA (vermelho). Os dados estão apresentados como a média \pm desvio padrão, coletados de três experimentos independentes. A estatística foi realizada comparando drogas diferentes na mesma dose, tempo e célula. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.005$.

Interessantemente, como demonstrado na Figura 19, o ensaio funcional demonstrou que em absolutamente todos os casos, considerando 24, 48 e 72h e todas as doses testadas, a droga acoplada com BoA foi capaz de inibir mais eficientemente a atividade de CatD. É interessante observar que as maiores disparidades significativas de efeito entre PepA e PepA-BoA foram observadas nas doses de 5 e 10 μM e, embora na dose de 50 μM não haja disparidade tão

significativa, esta foi responsável por quase anular a atividade de CatD em todos os tempos testados. Portanto, para os ensaios posteriores a este experimento foram eleitas a serem testadas as dosagens de 5, 10 e 50 μ M visando avaliar seus efeitos na viabilidade, invasão, proliferação, formação de mamóferas e perfil de marcadores EMT nas células TNBC mais agressivas.

4.9 PepA-BoA é mais eficaz que PepA em reduzir a agressividade de MDA-MB-231 e MDA-MB-157

Uma vez que PepA-BoA se mostrou mais eficaz em inibir a atividade de CatD quando comparado a PepA, os próximos passos foram avaliar a viabilidade celular e as capacidades de migração, invasão e proliferação das células agressivas após tratamento com as referidas drogas. Todos os ensaios foram realizados após 72h pois este é o tempo ideal para a modulação do perfil de marcadores EMT nas células tumorais[80] foco do presente trabalho.

Primeiramente, o ensaio MTT foi utilizado para acessar a viabilidade das células após 72h de tratamento com PepA e PepA-BoA em MDA-MB-231, MDA-MB-157 e neste experimento a linhagem TN não tumorigênica MCF-10A também foi utilizada. Os resultados de MDA-MB-231 demonstram que a PepA só foi significativamente capaz de reduzir a viabilidade celular na maior dosagem utilizada (50 μ M) enquanto que PepA-BoA foi capaz de reduzir a viabilidade celular nas dosagens de 10 e 50 μ M para 40% e 23%, respectivamente, sendo que a dosagem de 10 μ M foi citotóxica para 60% das células e a dosagem de 50 μ M foi citotóxica para 77% das células. Com relação à MDA-MB-157, os resultados demonstram que as dosagens de 10 e 50 μ M de PepA foram suficientes para reduzir a viabilidade das células para 64% e 50%,

respectivamente enquanto que PepA-BoA foi capaz de reduzir a viabilidade de MDA-MB-157 nas mesmas doses, atingindo citotoxicidade de 40% para a dose de 10 μ M e 60% para a dose de 50 μ M. Interessantemente, os compostos não foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade das células não tumorigênicas MCF-10A fato que se torna o primeiro indício de que tais compostos podem ter efeitos colaterais reduzidos *in vivo*. Embora PepA e PepA-BoA não tenham sido citotóxicas para MCF-10A, foram citotóxicas para MDA-MB-231 e MDA-MB-157, mesmo que de maneira distinta, o que pode ser explicado pela diferença de expressão de CatD nas linhagens, ou seja, os compostos foram citotóxicos para as células que possuem maior expressão de CatD (MDA-MB-231).

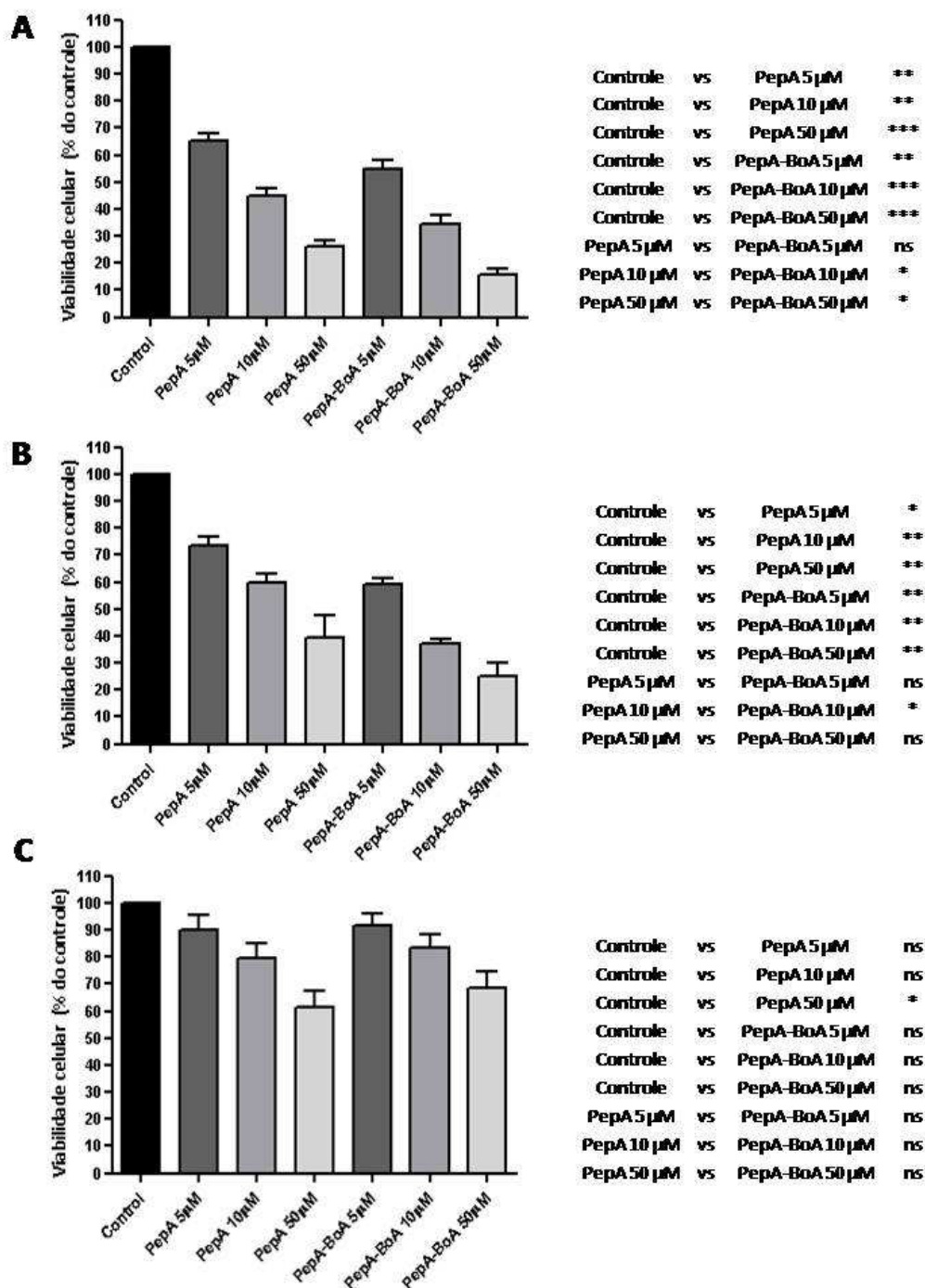


Figura 20. Inibição de CatD reduz a viabilidade de células de TNBC MDA-MB-231 e MDA-MB-157. Viabilidade de células A) MDA-MB-231, B) MDA-MB-157 e C) MCF-10A após tratamento com PepA e PepA-BoA nas concentrações de 5, 10 e 50µM. As estatísticas foram feitas com relação ao controle. Os dados estão apresentados como a média \pm desvio padrão, coletados de três experimentos independentes. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.005$.

Após o ensaio de citotoxicidade, foi realizado o ensaio de migração nas células de TNBC MDA-MB-231 e MDA-MB-157. Em MDA-MB-231, PepA e PepA-BoA foram capazes de reduzir significativamente a taxa de migração das células em todas as doses testadas comparadas com o controle da reação. PepA em dose de 5 μ M foi capaz de reduzir a migração para 50% do controle, 10 μ M reduziu para 40% do controle e 50 μ M reduziu esta taxa para 25% do controle. PepA-BoA foi capaz de reduzir a migração de MDA-MB-231 para 30% do controle na menor dose (5 μ M), 20% do controle na dose de 10 μ M e o melhor resultado obtido foi a redução de 90% da taxa de migração, alcançando um resultado de 10% do controle para a dosagem de 50 μ M. Com relação às células MDA-MB-157, as duas drogas testadas também se mostraram eficazes na redução da migração celular. PepA em 5 μ M reduziu para 50% do controle a taxa de migração enquanto que a dose de 10 μ M reduziu para 45% do controle e finalmente a dose de 50 μ M atingiu redução de 25% do controle. PepA-BoA demonstrou redução para 30% do controle na menor dose testada (5 μ M), para a dose de 10 μ M a redução foi com relação a 15% do controle e finalmente o melhor resultado foi obtido com a maior dose (50 μ M) atingindo, similarmente ao observado em MDA-MB-231 na mesma dose com a mesma droga, 90% de redução da taxa de migração, chegando a obter taxa de migração de somente 10% do controle.

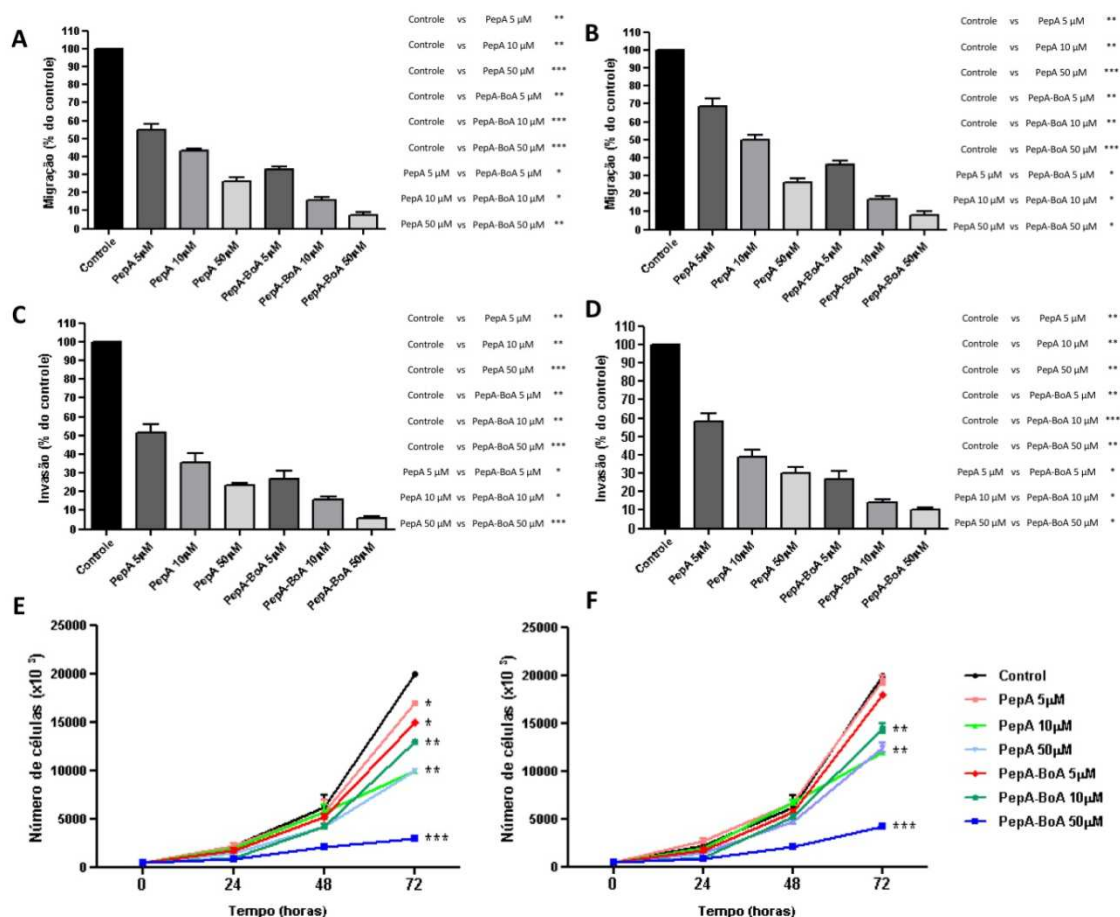


Figura 21. Inibição de CatD por PepA e PepA-BoA reduz migração, invasão e proliferação de células MDA-MB-231 e MDA-MB-157. A) Migração de células MDA-MB-231 e B) MDA-MB-157 com as respectivas estatísticas após 72h de tratamento. C) Invasão de células MDA-MB-231 e D) MDA-MB-157 com as respectivas estatísticas após 72h de tratamento. E) Proliferação de células MDA-MB-231 e F) MDA-MB-157 após 24, 48 e 72h de tratamento. As estatísticas foram feitas com relação ao controle. Os dados estão apresentados como a média \pm desvio padrão, coletados de três experimentos independentes. *, $p < 0.05$; **, $p > 0.01$; ***, $p > 0.005$.

Em trabalhos científicos que visam a pesquisa de drogas antitumorais é interessante observar taxas de migração e invasão de maneira conjunta, e então o próximo passo foi a verificação da taxa de invasão das células TNBC agressivas submetidas à inibição de CatD. De acordo com as Figuras 21C e 21D, nota-se que todos os tratamentos feitos em MDA-MB-231 reduziram a capacidade de invasão desta célula. PepA reduziu a invasão a 45% do controle na dose de 5μM, 37% na dose de 10μM e 30% na dose de 50μM. A mesma

droga acoplada à BoA teve resultados mais satisfatórios reduzindo a 25% com relação ao controle a invasão das células na menor dose (5 μ M), 12% na dose intermediária (10 μ M) e finalmente alcançando o resultado de redução de 95%, caindo para apenas 5% da taxa de invasão do controle com dose de 50 μ M. Analisando o comportamento das células MDA-MB-157, têm-se que, como na MDA-MB-231, todos os tratamentos também foram capazes de reduzir significativamente a capacidade de invasão das células. PepA reduziu a 40% do controle na dose de 5 μ M, 30% na dose de 10 μ M e 25% na maior dose de 50 μ M enquanto que PepA-BoA foi capaz de reduzir na menor dose (5 μ M) 30% do controle, em 10 μ M reduziu a taxa de invasão para 15% do controle chegando ao melhor resultado, na maior dosagem (50 μ M), a 10% do controle, atingindo redução de 90% da taxa de invasão desta célula TNBC agressiva e altamente invasiva.

O presente trabalho também acessou a taxa de proliferação das células TNBC Basal-B MDA-MB-231 e MDA-MB-157 após tratamento com as drogas PepA acoplada ou não à BoA. Os resultados obtidos nas células MDA-MB-231 demonstram que os únicos tratamentos que reduziram a taxa proliferação de maneira significativa ao controle foram PepA e PepA-BoA em doses de 10 e 50 μ M. Com relação às células MDA-MB-157, somente a dose de 50 μ M foi eficaz para redução da proliferação celular de ambas as drogas.

Em conjunto, os dados apresentados reafirmam o papel de CatD na agressividade destas células testadas visto que, ao inibi-la de maneira eficiente, nota-se redução da agressividade de MDA-MB-231 e MDA-MB-157 é reflexo da redução nas taxas de viabilidade, migração, invasão e proliferação celular. Assim, diante de tais evidências, o próximo passo do presente trabalho

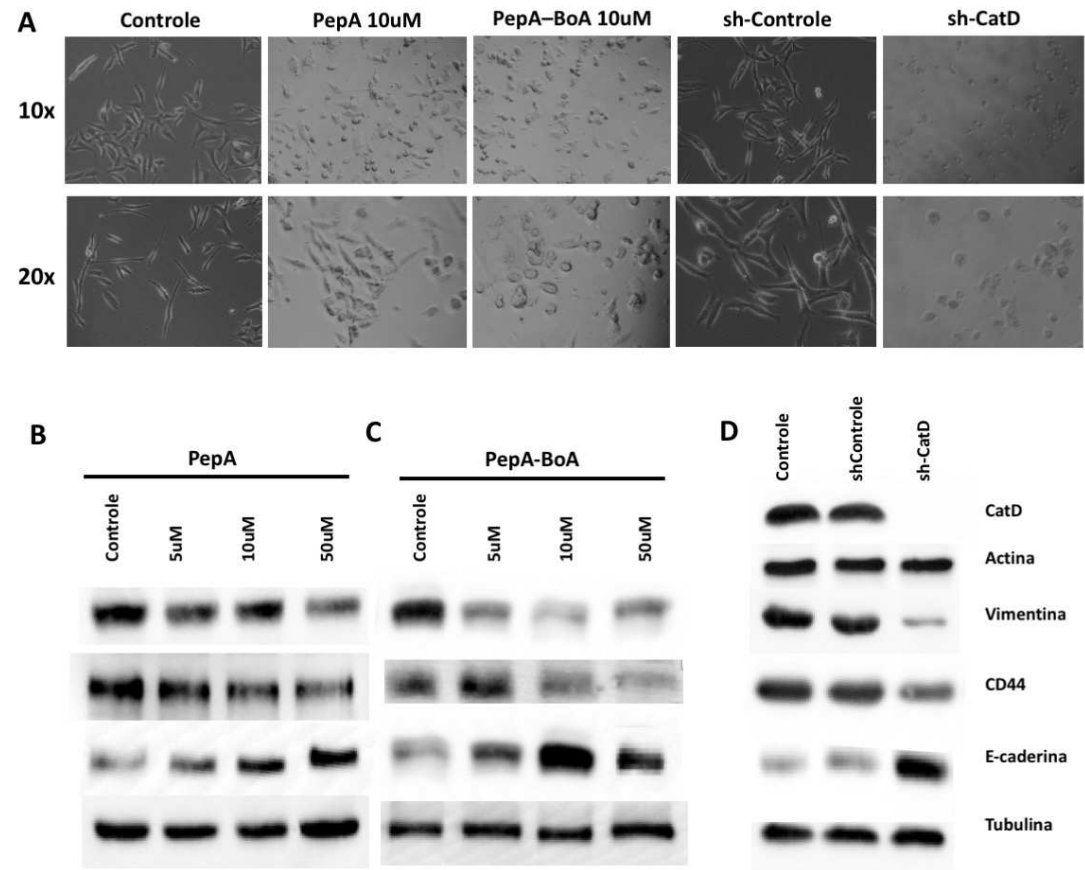
se baseou na investigação da modulação de expressão proteica destas células causada pela inibição de CatD.

4.10 Inibição de CatD e seu papel na modulação de marcadores EMT em MDA-MB-231 e MDA-MB-157

As células MDA-MB-231 e MDA-MB-157 são consideradas TN e Basal-B e possuem como uma das características principais o perfil predominantemente mesenquimal em detrimento do epitelial[77]. Neste contexto, vários estudos já descreveram o papel das Catepsinas e, particularmente, da CatD, na EMT[50][52]. Assim, diante de tais evidências, uma vez que a inibição da referida protease se demonstrou eficaz na redução da agressividade de duas linhagens mais agressivas de TNBC, analisou-se as consequências moleculares da inibição de CatD (gênica, por meio de shRNA, e proteica, por meio de PepA e PepA-BoA) em termos de expressão proteica de marcadores de EMT em MDA-MB-231 e MDA-MB-157. Adicionalmente, visualizou-se a modificação fenotípica das células nos períodos pré e pós tratamento.

Primeiramente, a análise de MDA-MB-231 considera que estas células tiveram o nocaute de CatD confirmado por meio do Western Blotting de CatD tratada com sh-CatD. A análise de Vimentina, um marcador mesenquimal *upregulado* em EMT e responsável por se ligar a proteínas motoras, aumentando a capacidade de migração e invasão celular, demonstra que os tratamentos com PepA nas doses de 5, 10 e 50µM foram capazes de reduzir a expressão da proteína. Notavelmente, porém, os tratamentos com PepA-BoA e sh-CatD foram mais eficazes na redução da expressão deste marcador embora sh-CatD tenha reduzido mais esta expressão do que qualquer dose de

PepA. Os dados obtidos no experimento de marcação de Vimentina em *Western Blotting* foram confirmados por imunofluorescência, demonstrada nas Figuras 22E e 22F, na qual a Vimentina foi marcada em vermelho e em azul estão marcados os núcleos celulares com o corante DAPI. Nestas imagens é interessante notar, além da marcação de Vimentina, que a inibição de CatD é capaz de reduzir a viabilidade celular e, no caso de PepA-BoA e sh-CatD, é capaz também de modificar a morfologia das células, tornando-as majoritariamente cuboides ao invés de fusiformes, como nos controles.



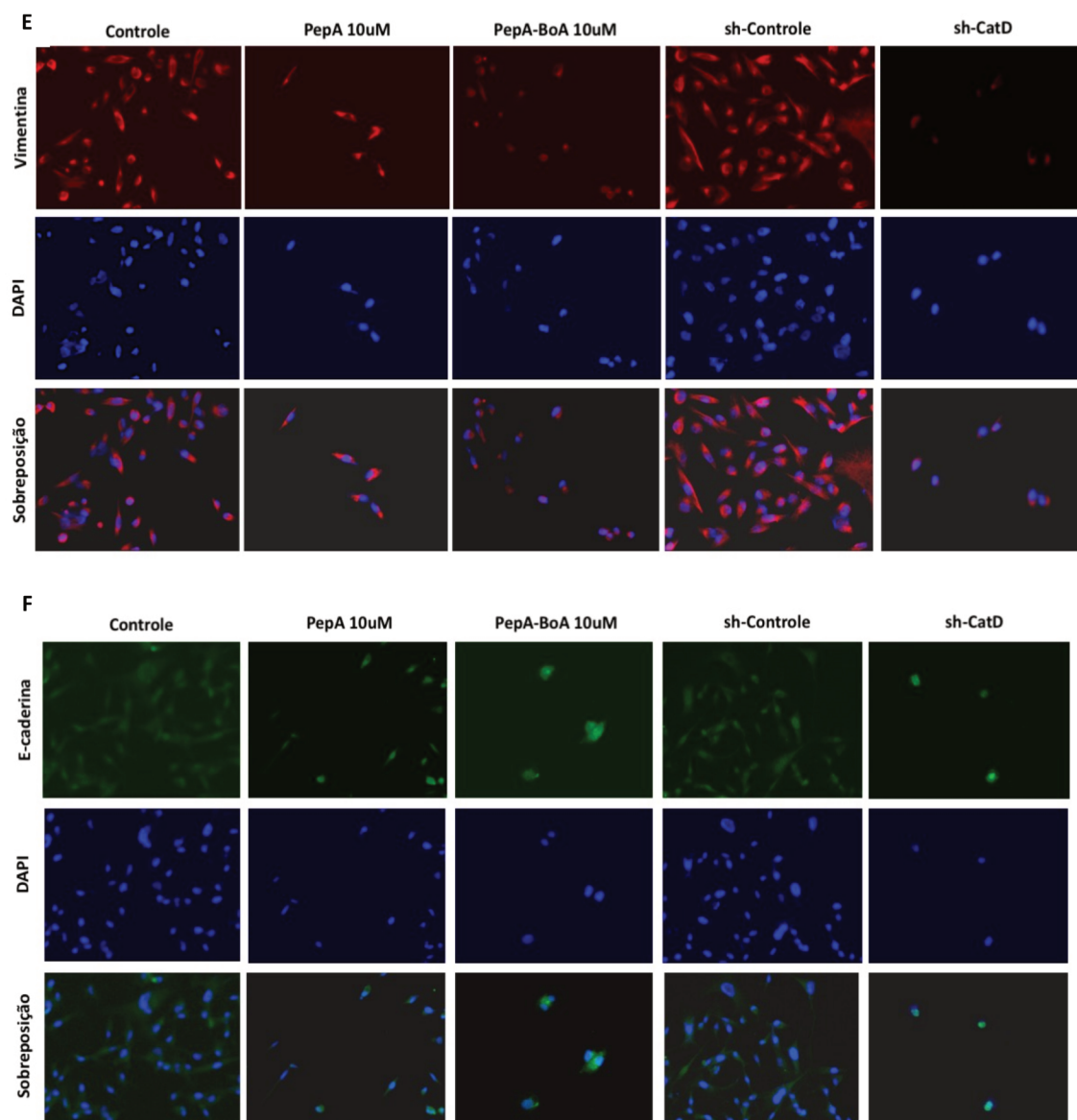


Figura 22. Inibição e nocaute de CatD reduz EMT em células MDA-MB-231. A) Imagens (ampliadas em 10 e 20 vezes) das células tratadas após 72h com PepA (10uM), PepA-BoA (10uM) e sh-CatD. Análise de Western Blotting após 72h de tratamentos com B) PepA, C) PepA-BoA e D) sh-CatD de CatD, Vimentina, CD44 e E-caderina. Actina e Tubulina foram utilizadas como controle de reação. Imunofluorescência de E) Vimentina e F) E-caderina de células tratadas com PepA, PepA-BoA e sh-CatD (x20). Todos os resultados apresentados são representativos de, no mínimo, 3 experimentos independentes.

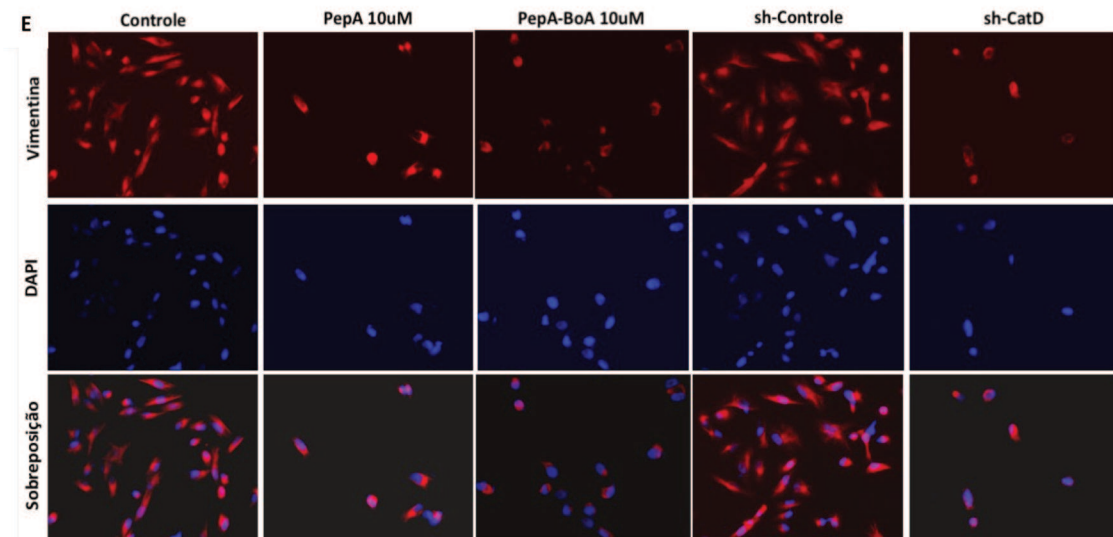
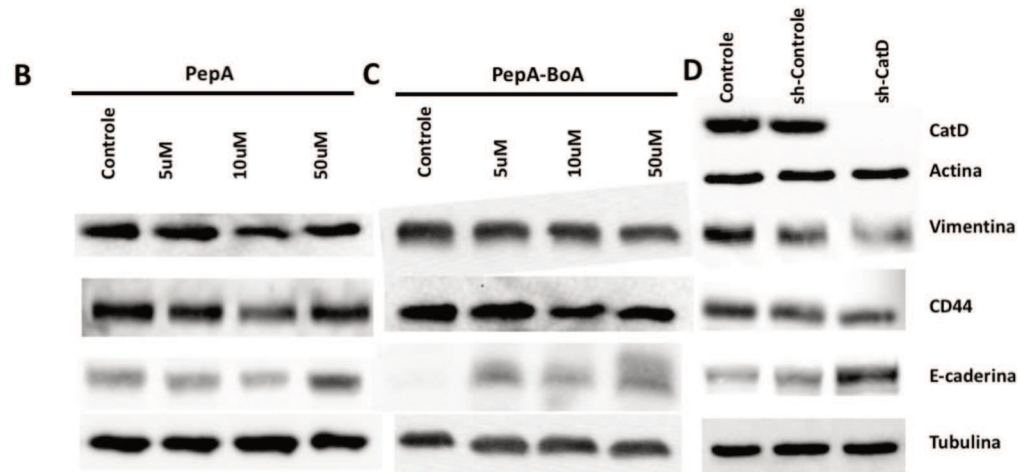
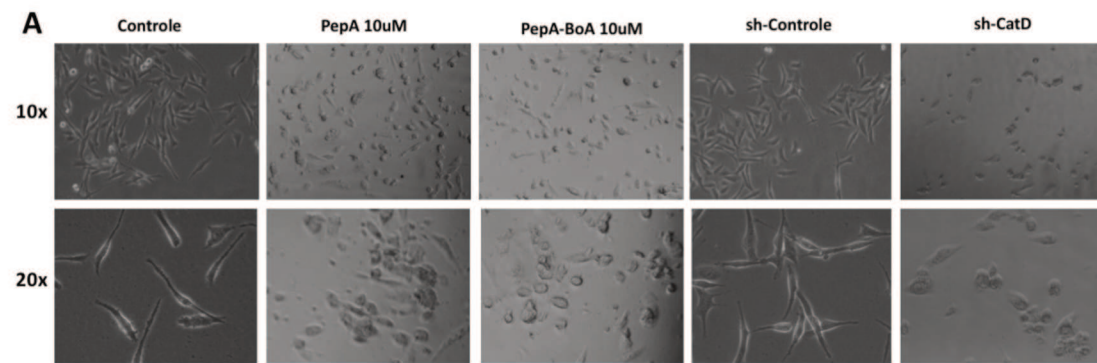
Adicionalmente à análise de Vimentina houve também a análise do marcador de células-tronco cancerosas, CD44, também considerado de caráter mesenquimal[81]. Este demonstrou mínima redução quando MDA-MB-231 foi tratada com qualquer dose testada de PepA mas a mesma droga acoplada à

BoA possuiu uma redução bem mais expressiva de CD44 nas doses de 10 e 50µM, maiores até que o a inibição gênica via tratamento com sh-CatD. Outro marcador testado foi a E-caderina, de caráter epitelial, envolvido na regulação de adesão célula-célula[82], que promove a estabilização das junções aderentes e é *downregulado* no processo de EMT[28]. A análise deste marcador demonstrou que a inibição de CatD por PepA aumentou a sua expressão, porém o tratamento com PepA-BoA e sh-CatD aumentou similarmente e expressivamente a marcação de E-caderina. Tais resultados foram confirmados pela imunofluorescência demonstrada na Figura 21F, na qual a E-caderina está marcada pela cor verde e os núcleos celulares pela cor azul (DAPI).

Em resumo, os dados demonstraram que a inibição de CatD é capaz de modular a expressão de MDA-MB-231 de forma a regular positivamente o marcador epitelial E-caderina e negativamente os marcadores mesenquimais Vimentina e CD44. Adicionalmente, é notável que o tratamento com PepA-BoA é mais eficaz, quando comparado ao tratamento com PepA, e se mostrou similar à inibição gênica de CatD por meio de shRNA fato que confirma mais uma vez a eficácia do BoA acoplado à droga na inibição da protease. Assim, ao visualizar a morfologia das células, nota-se que após tratamento com PepA-BoA e com sh-CatD, as células passam de um formato predominantemente fusiforme para cuboide, e isso é consequência da redução na capacidade de migração e invasão destas células conferida pela modulação da expressão proteica.

A análise de MDA-MB-157 revela, primeiramente, que teve o nocaute gênico bem-sucedido por meio da análise de *Western Blotting* de CatD. De

fato, a expressão de Vimentina nestas, células visualizada tanto por *Western Blotting* e confirmada por Imunofluorescência, reduziu fracamente após tratamento com PepA e PepA-BoA, sendo que após o tratamento com sh-CatD houve maior redução deste marcador de caráter mesenquimal. Adicionalmente, a expressão do segundo marcador mesenquimal analisado CD44 reduziu fracamente após tratamento com as duas drogas, e, pela análise, nota-se que houve maior redução com a dose de 10 μ M de PepA-BoA e, além disso, esta se mostrou similar ao tratamento de nocaute gênico. A E-caderina foi o único marcador de caráter epitelial testado e demonstrou aumento na sua expressão, acessado por meio de *Western Blotting* e Imunofluorescência, quando comparado ao controle, após as células terem sido submetidas ao tratamento com doses de 50 μ M de PepA e PepA-BoA. De acordo com a Figura 23B, é notório que o nocaute gênico de CatD foi mais eficaz que qualquer tratamento na regulação positiva da expressão de E-caderina. Confirmando a modulação da expressão proteica derivada do processo de inibição de CatD, é válida a observação da modificação morfológica das células MDA-MB-157, por meio da Figura 23A e da imagem demonstrada na Imunofluorescência (Figuras 23 E e 23F), visto que o tratamento com PepA-BoA e shCatD transformou as células, que antes tinham aspecto fusiforme, em células com característica cuboide.



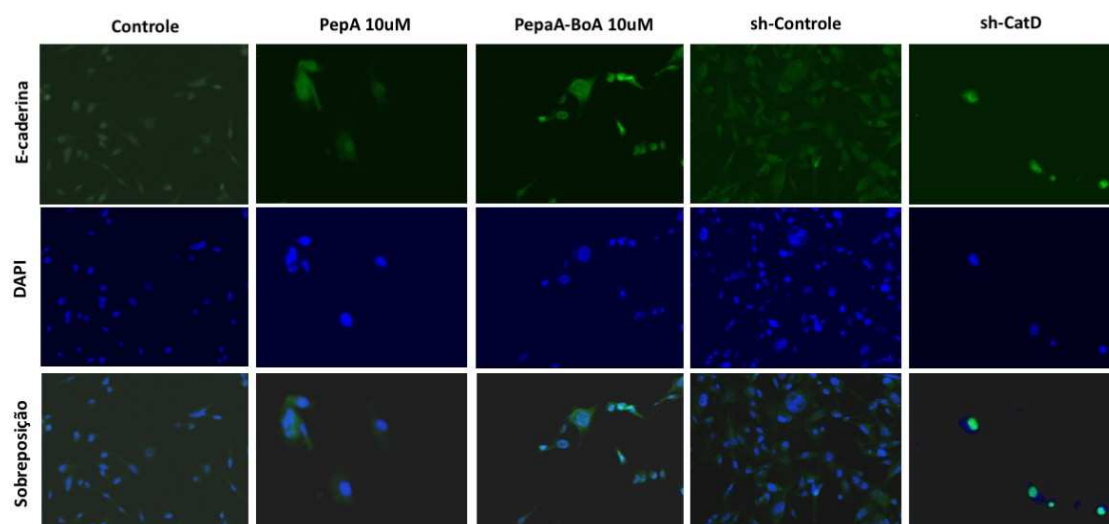


Figura 23. Inibição e nocaute de CatD reduz EMT em células MDA-MB-157. A) Imagens (ampliadas em 10 e 20 vezes) das células tratadas após 72h com PepA (10 μ M), PepA-BoA (10 μ M) e sh-CatD. Análise de Western Blotting após 72h de tratamentos com B) PepA, C) PepA-BoA e D) sh-CatD de CatD, Vimentina, CD44 e E-caderina. Actina e Tubulina foram utilizadas como controle de reação. Imunofluorescência de E) Vimentina e F) E-caderina de células tratadas com PepA, PepA-BoA e sh-CatD (x20). Todos os resultados apresentados são representativos de, no mínimo, 3 experimentos independentes.

Ao comparar a modulação de expressão proteica gerada pela inibição de CatD nas células MDA-MB-231 e MDA-MB-157, têm-se que a primeira respondeu de maneira mais satisfatória, regulando negativamente os marcadores mesenquimais testados (Vimentina e CD44) e positivamente o marcador epitelial (E-caderina). Tal fato se explica pela diferença de expressão de CatD nestas duas linhagens pois, embora ambas tenham tal protease superexpressa, é notável que a MDA-MB-231 possui maior expressão (Figura 15A) e, por isso, responde de maneira mais pronunciada à inibição efetuada pelo presente trabalho.

A partir destes resultados obtidos e analisados, o próximo passo do presente trabalho se baseou em focar na linhagem que mais respondeu à inibição de CatD para realização de ensaios adicionais visando verificar o

comportamento desta linhagem em arranjos tridimensionais frente ao tratamento com as drogas propostas.

4.11 Efeito da inibição de CatD no arranjo tridimensional de MDA-MB-231

As células MDA-MB-231 são conhecidas por formarem estruturas de caráter altamente invasivo e agressivo quando cultivadas em arranjos tridimensionais[83][84]. Assim, para determinar se a inibição de CatD seria capaz de impactar, além de estruturas bidimensionais, as estruturas tridimensionais da linhagem TNBC, as células foram cultivadas em cultura 3D com Matrigel e submetidas a tratamentos com PepA, PepA-BoA e sh-CatD. Primeiramente, de acordo com a Figura 24A, as células dos grupos controle demonstraram morfologia do tipo fusiforme, de caráter invasivo enquanto que as células tratadas cresceram predominantemente em estruturas compactas, cuboides, arredondadas e com contorno bem definido, indicando a perda de morfologia invasiva. Ademais, células tratadas com inibidores de CatD tiveram crescimento significativamente menor quando comparadas às células controle (Figura 24B).

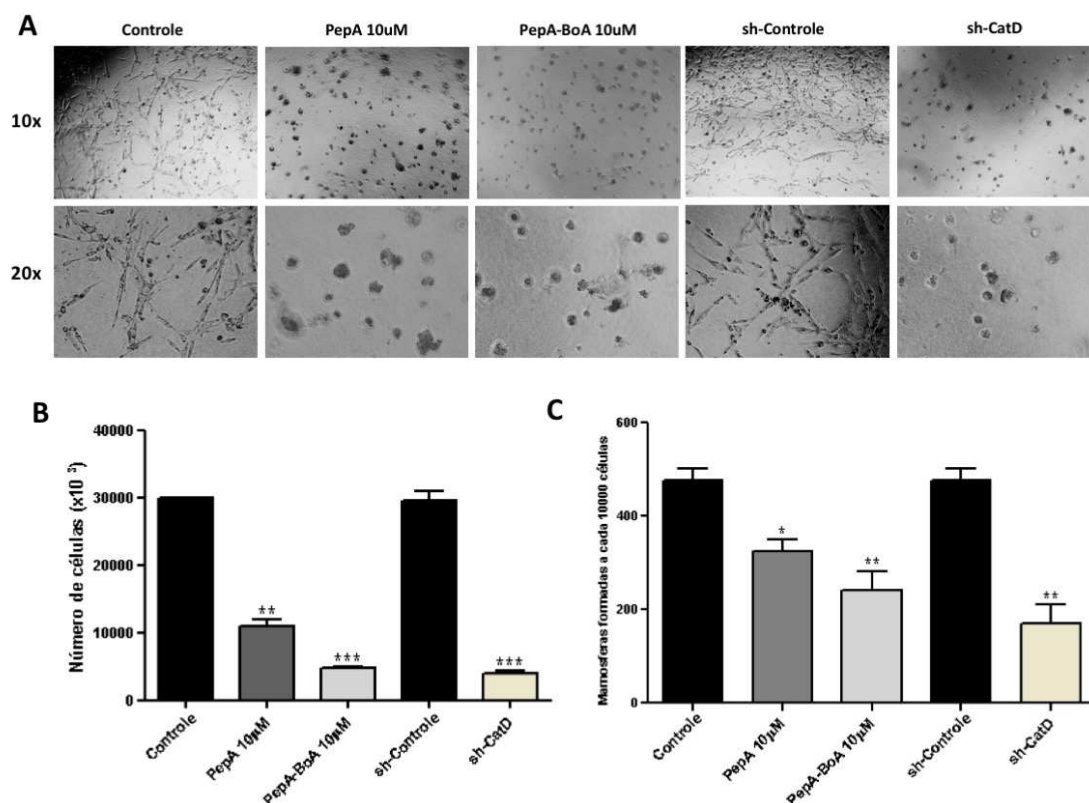


Figura 24. A inibição de CatD em MDA-MB-231 modifica a morfologia celular, suprime a proliferação e formação de mamosferas em cultura 3D. A) Imagens (ampliadas em 10 e 20 vezes) das células tratadas após 72h com PepA (10µM), PepA-BoA (10µM) e sh-CatD. B) Proliferação celular após 72h de tratamento com PepA (10µM), PepA-BoA (10µM) e sh-CatD. C) Capacidade de formação de mamosferas após 72h de tratamento com PepA (10µM), PepA-BoA (10µM) e sh-CatD. As estatísticas foram feitas com relação ao controle. Os dados estão apresentados como a média \pm desvio padrão, coletados de três experimentos independentes. *, $p < 0.05$; **, $p > 0.01$; ***, $p > 0.005$.

A capacidade de formação de mamosferas de uma cultura é capaz de gerar indícios sobre sua população de células-tronco tumorais[74] e, por isso, este ensaio foi realizado em cultura tridimensional de MDA-MB-231. De acordo com a Figura 24C, PepA não foi capaz de inibir a formação de mamosferas enquanto que a mesma droga acoplada à BoA reduziu esta formação em 75% e 78% com relação ao controle nas doses de 10µM e 50µM, respectivamente. Quando a CatD foi inibida a nível gênico, a formação de mamosferas se reduziu a 80% do controle. Assim, por não se diferenciar estatisticamente da

dose de 50µM, a dose de 10µM de PepA-BoA foi eleita para gerar o panorama ampliado de expressão proteica de marcadores de EMT. Esta análise proteica foi realizada após tratamento com PepA-BoA (sempre comparada à PepA) e shCatD.

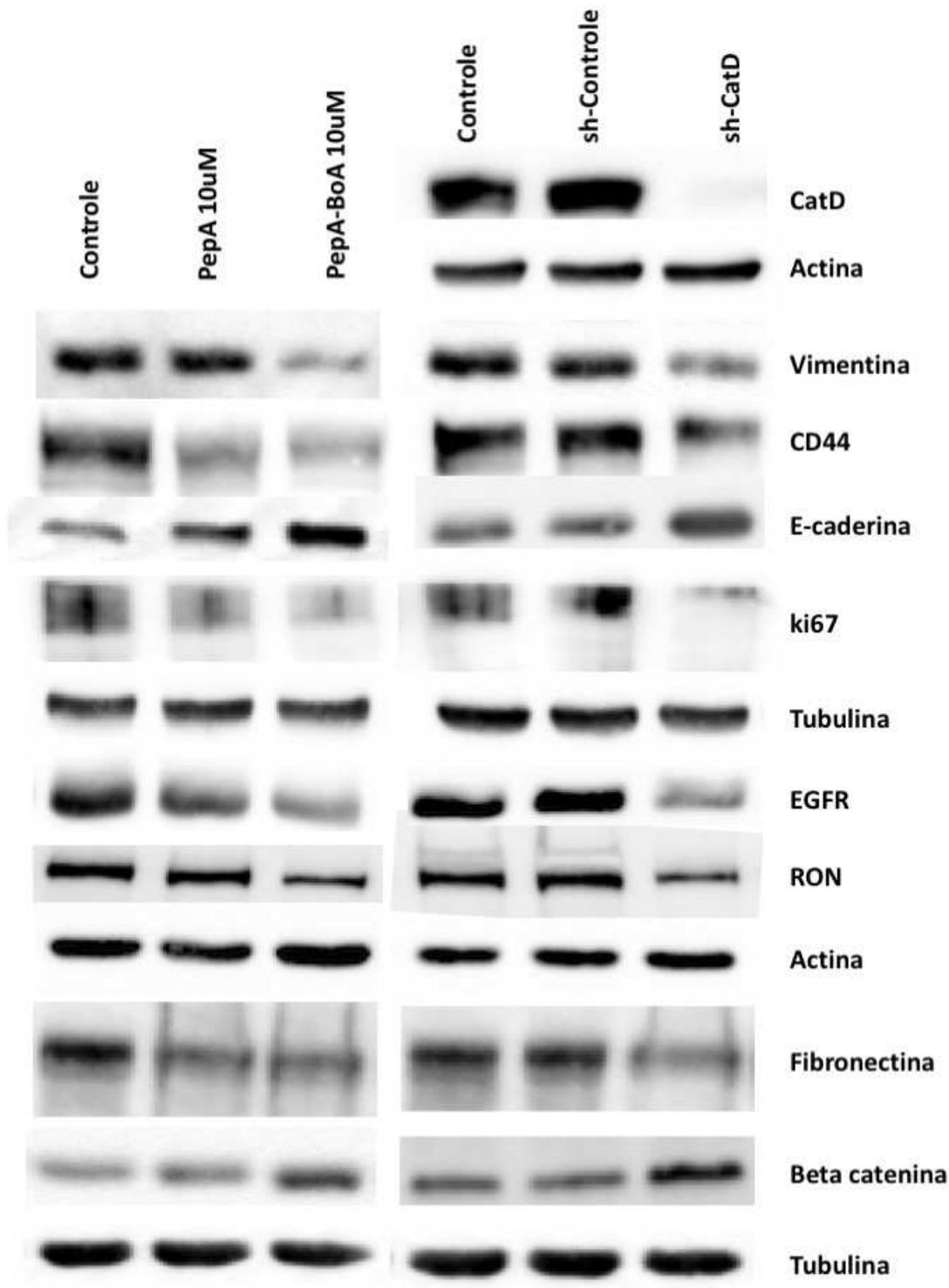


Figura 25. Inibição de CatD é capaz de modular a expressão de marcadores de EMT em MDA-MB-231 em cultura 3D. Análise feita por meio de Western Blotting de proteínas totais das células após serem tratadas com PepA (10 μ M), PepA-BoA (10 μ M) e sh-CatD e crescerem em cultura 3D. Foram analisadas as expressões de CatD, Vimentina, CD44, E-caderina, ki67, EGFR, RON, Fibronectina e Beta-catenina. Actina e Tubulina foram utilizadas como controle da reação. Todas as imagens apresentadas são representativas de, no mínimo, 3 experimentos independentes.

A expressão do marcador mesenquimal Vimentina reduziu após tratamento tanto com PepA-BoA como com shCatD. A inibição de CatD também foi capaz de reduzir a expressão de CD44, um marcador de células-tronco tumorais[73]. E-caderina, um marcador de caráter epitelial[82], teve sua expressão regulada positivamente após tratamento com PepA-BoA e shCatD. A proteína produzida durante a fase ativa da proliferação celular, ki67[39], teve a expressão reduzida em todos os tratamentos, indicando que o tratamento pode interferir na capacidade de divisão destas células. O EGFR, importante alvo para tratamento anti-tumoral em vários tipos de câncer, está relacionado ao crescimento e sobrevivência celular[85][86] e teve sua expressão reduzida efetivamente após tratamento com PepA-BoA e shCatD. Outro tipo de receptor tirosina quinase que está envolvido com o caráter mesenquimal das células[87][88], RON, foi regulado negativamente após tratamento com PepA-BoA e shCatD. Por fim, a avaliação de Fibronectina, capaz de promover a expressão de metaloproteases que degradam o colágeno da matriz extracelular mamária, favorecendo fenótipo invasivo[89], foi regulada negativamente em todos os tratamentos.

Em conjunto, os dados apresentados sugerem que a inibição de CatD por PepA-BoA (10 e 50 μ M) e por shCatD são capazes de reduzir a expansão das células-tronco tumorais dependentes do processo de EMT. Além disso, os

dois tratamentos citados (PepA-BoA e shCatD) se comportam de maneira similar demonstrando que a droga acoplada à BoA possui boa capacidade de penetração nas células, diferentemente do que é relatado para PepA, e também é eficaz na inibição de CatD. Por fim, os resultados obtidos neste arranjo tridimensional de MDA-MB-231 indicam que a inibição de CatD no microambiente tumoral pode ser uma barreira efetiva para repressão de EMT.

5. Discussão

Embora muito esforço seja direcionado à descoberta de terapias para TNBC, o sucesso em discriminar os eventos críticos que estabelecem as características peculiares desse subtipo de BC tem sido limitado [90]. Assim, é crucial investigar mecanismos moleculares críticos e específicos deste tipo de tumor, visando fornecer embasamento para desenvolvimento de terapias-alvo visto que TNBC representa o subtipo mais agressivo de câncer de mama, sendo responsável por alta incidência de metástases, altos níveis de recorrência tumoral e alta taxa de mortalidade[17][20]. Vários estudos prévios evidenciaram a atividade pró-tumoral de CatD em diversos tipos de câncer [50][52][91][53]mas nenhum demonstrou até hoje que uma das principais causas para o favorecimento da agressividade tumoral acarretada por altos níveis de expressão de CatD está ligada à capacidade desta protease clivar AnxA1. No presente estudo demonstrou-se que CatD pode ser considerado alvo terapêutico para tratamento de tumores TNBC que apresentam características similares à célula MDA-MB-231, uma vez que a inibição desta CatD repercute na remodelação de vários marcadores de EMT, tornando as células menos agressivas.

Primeiramente, demonstrou-se que CatD e AnxA1 são altamente expressas em células MDA-MB-231 comparadas com MCF-10A e MCF-7, e adicionalmente, pela primeira vez evidenciou-se que a expressão de ambas as proteínas está associada uma vez que a linhagem nocauteada para AnxA1 exibiu redução da expressão de CatD. Neste contexto, a literatura relata a superexpressão de CatD na mesma linhagem TNBC quando comparada a MCF-7 [92] e, além disso, outros estudos comprovam a alta expressão de

AnxA1 em MDA-MB-231[46] e a correlação desta proteína com a capacidade de invasão e migração de células de BC[93], o que confirma os resultados obtidos. É válido notar que, por um lado, algumas pesquisas evidenciam a importância de CatD na formação de metástases, invasão e angiogênese tumoral; por outro lado, estudos lançam AnxA1 como alvo terapêutico tendo em vista o seu papel na agressividade do câncer. Interessantemente, o presente estudo uniu partes que estavam antes separadas na literatura fornecendo fortes evidências sobre a associação de expressão e de atividade entre AnxA1 e CatD e, principalmente, sobre a função disso no estabelecimento da agressividade tumoral.

Vários estudos publicados relatam evidências que justificam o resultado encontrado no presente trabalho de que em MDA-MB-231 há superexpressão de CatD. A CatD é uma proteína que possui papel funcional na progressão do câncer atuando principalmente nos processos de mitogênese, invasão, metástase e angiogênese[61][94][95]. Estudos afirmam que CatD é capaz de degradar componentes de matriz extracelular, uma vez que no microambiente tumoral, a protease secretada se torna ativa sob condições ácidas, devido à hipóxia e produção de lactato pelas células tumorais, e, à medida que a matriz é degradada, vários fatores de crescimento são liberados, como VEGF, aumentando angiogênese e, conseqüentemente, a metástase[95][50][52]. Adicionalmente, a protease é também capaz de degradar e, conseqüentemente, inativar quimiocinas como proteínas inflamatórias de macrófago (MIP) 1- α (CCL3)[96], 1- β (CCL4)[96] e a quimiocina expressa em tecido linfóide secundário (SLC) (CCL21)[96], podendo influenciar na atenuação da resposta imune antitumoral. CatD também está envolvida no

processo de angiogênese tumoral uma vez que sua expressão estromal está associada à formação de microvascularização em carcinomas ovarianos[97] e mamários[98] e isto pode ocorrer pois a protease tem a capacidade de facilitar a liberação de Fator Básico de Crescimento de Fibroblastos (FGF) pró angiogênico dos componentes da matriz extracelular[99]. Assim, como MDA-MB-231 é linhagem que representa o subtipo mais agressivo de BC e, *in vivo*, possui alta capacidade mitogênica, de invasão, proliferação e angiogênese[76][100], isso justifica em partes sua alta expressão de CatD.

A AnxA1 é uma proteína, além de CatD, que atrai muita atenção na oncologia molecular uma vez que é capaz de induzir metástases, angiogênese e se correlaciona com a progressão de vários tipos de câncer[45]. Além disso, é descrita por se associar à piores prognósticos de BC e baixas taxas de sobrevivência[43][101]. Evidências apontam que em células MDA-MB-231, AnxA1 clivada é altamente expressa, facilmente secretada e, extracelularmente é capaz de ativar de maneira autócrina seu receptor FPR1 acarretando em aumento de fluxo de Cálcio intracelular, aumento da ativação de ERK, aumento das taxas de sobrevivência, migração e invasão celular, favorecendo a agressividade tumoral [46]. Os resultados apresentados no presente trabalho corroboram com essas evidências uma vez que apresentam alta expressão de AnxA1 clivada em MDA-MB-231, consequência da ação de CatD, quando comparada à MCF-10A e MCF-7. Ademais, tais resultados embasam e justificam a correlação encontrada entre a expressão de CatD e AnxA1. Diante disso, foi lançada a hipótese de que a inibição de CatD por PepA poderia ser eficaz para, primeiramente, inibir a clivagem e sinalização de AnxA1 e, conseqüentemente, inibir o comportamento agressivo das linhagens TNBC.

Interessantemente, o tratamento de MDA-MB-231 com PepA teve grande efeito na morte celular, visto que aumentou significativamente não só a taxa de apoptose como também o processo de autofagia nestas células. Corroborando com os resultados obtidos, estudos afirmam que a mesma droga teve efeito na indução de apoptose em células de neuroblastoma[102] e câncer colorretal[103]. De fato, a literatura demonstra que em muitos casos, uma mesma proteína é capaz de controlar ambos os processos de apoptose e autofagia[104][105][106]e esta ativação conjunta por uma droga antitumoral é importante visto que estudos sugerem que populações de células tumorais refratárias ao processo de apoptose induzido por tratamentos quimioterápicos podem morrer com a ativação do processo de autofagia[107][62][108]. Este é um dos motivos que pode explicar evidências encontradas na literatura que demonstram que a elevada expressão de CatD em tumores pode proteger as células cancerígenas do tratamento com agentes quimioterápicos[109][50]. Diante disso, nota-se, portanto, que o tratamento com a inibição da protease por meio de PepA poderia tornar as células mais sensíveis à quimioterapia. Adicionalmente, os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com as estratégias modernas antitumorais uma vez que as drogas estão sendo desenhadas de modo a induzir morte celular majoritariamente por autofagia e apoptose em detrimento do processo de necrose, visando evitar efeitos colaterais inflamatórios[110][111].

Além de induzir a morte celular, o tratamento com PepA é eficaz na redução da agressividade de MDA-MB-231 uma vez que acarretou na redução das taxas de proliferação, invasão e migração dessas células de TNBC mas não de MCF-7 e MCF-10A visto que tais células não superexpressam CatD e,

por isso, não há AnxA1 clivada. Além disso, a estudos afirmam que não há expressão de FPR1 em MCF-7 enquanto em MCF-10A este mesmo receptor está expresso mas não há AnxA1 clivada para ativa-lo[46]. Isso ocorre supostamente devido à baixa expressão de CatD em MCF-10A, verificada no presente trabalho, ou ao pH em que estas células sobrevivem que é menos ácido que de MDA-MB-231 devido às condições de hipóxia e produção de lactato por estas células tumorais. Ademais, é interessante salientar que na literatura há estudos com fortes indícios da atividade antitumoral de PepA uma vez que ela foi capaz de reduzir *in vivo* a formação de metástases de melanomas e sarcomas[112].

Uma vez que a inibição de CatD evidenciou, por meio de ensaios funcionais com PepA, seu papel na redução de agressividade de MDA-MB-231, o presente trabalho foi pioneiro na elucidação a nível atômico do mecanismo catalítico de CatD e sua interação com PepA. Primeiramente, a análise *in silico* demonstrou que PepA é capaz de ocupar o sítio ativo de CatD, o qual contém a díade catalítica formada por Asp³³ e Asp²³¹, dificultando a proximidade desta com Trp¹² de AnxA1 e, portanto, gerando a inibição. Em segundo análise, a junção dos dados provindos de FTIR e *docking* molecular revelaram que os dois resíduos de Asp do sítio ativo da protease encontram-se protonados em CatD ativa e, quando PepA, por meio de sua ligação OH, interage com os Ácidos Carboxílicos da díade catalítica, especificamente na ligação CO, ocorre que Asp²³¹ permanece protonado enquanto Asp³³ se desprotona, resultando na inibição de CatD. Interessantemente, este mecanismo se demonstrou similar ao da protease aspártica encontrada no vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) e, adicionalmente, o

sítio ativo da protease desta doença compartilha 45% de similaridade com o sítio ativo da protease do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)[69]. O mecanismo de inibição de CatD, uma protease aspártica, demonstrado no presente estudo, é uma importante contribuição científica visto que as proteases aspárticas tem sido alvo de enorme interesse da comunidade científica por possuírem papéis significativos em doenças como hipertensão (através de renina), Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (AIDS) (através da protease de HIV) e Candidíase (através de proteases secretadas durante a infecção)[113][114][115]. Assim, no geral, os resultados obtidos sobre a ação dos inibidores de proteases aspárticas fornecem subsídio para o *design* de drogas que possam favorecer outras doenças além de TNBC.

Em conjunto, o mecanismo elucidado fornece a base atômica e molecular que justifica as evidências da ação antitumoral de PepA. Na literatura não há muita informação sobre o mecanismo de inibição de CatD por PepA mas um estudo afirma que o grupamento hidroxila do aminoácido Sta, parte da integrante estrutural de PepA, está diretamente envolvido na ação deste inibidor uma vez que Sta é estruturalmente análogo ao substrato CatD e a seu estado de transição formado durante a clivagem e, por isso, apresenta atividade inibitória[55]. Assim, tem-se fortes indícios de que os aminoácidos Asp e Sta são os maiores responsáveis pela inibição de CatD por meio de PepA.

Assim, resumindo a primeira parte dos resultados obtidos, pode-se elucidar a nível molecular o que ocorre em MDA-MB-231 focando na atividade CatD (ver diagrama esquemático na Figura 7), a saber: (A) em células sem tratamento, CatD age por meio de sua díade catalítica clivando AnxA1

exatamente em Trp¹², dando origem ao fragmento N-terminal desta proteína e à sua isoforma de 35,5 KDa, aumentando a agressividade celular; e (B) quando as mesmas células tumorais são expostas à inibição de CatD por meio de tratamento com PepA, a clivagem de AnxA1 é inibida por meio da interação dos Ácidos Carboxílicos dos Asp da díade catalítica de CatD com o OH de PepA, não há geração de fragmento N-terminal e há um aumento da taxa de morte celular por meio de apoptose e autofagia além de redução das capacidades de migração, invasão e proliferação celular, resultando na redução da agressividade de células MDA-MB-231.

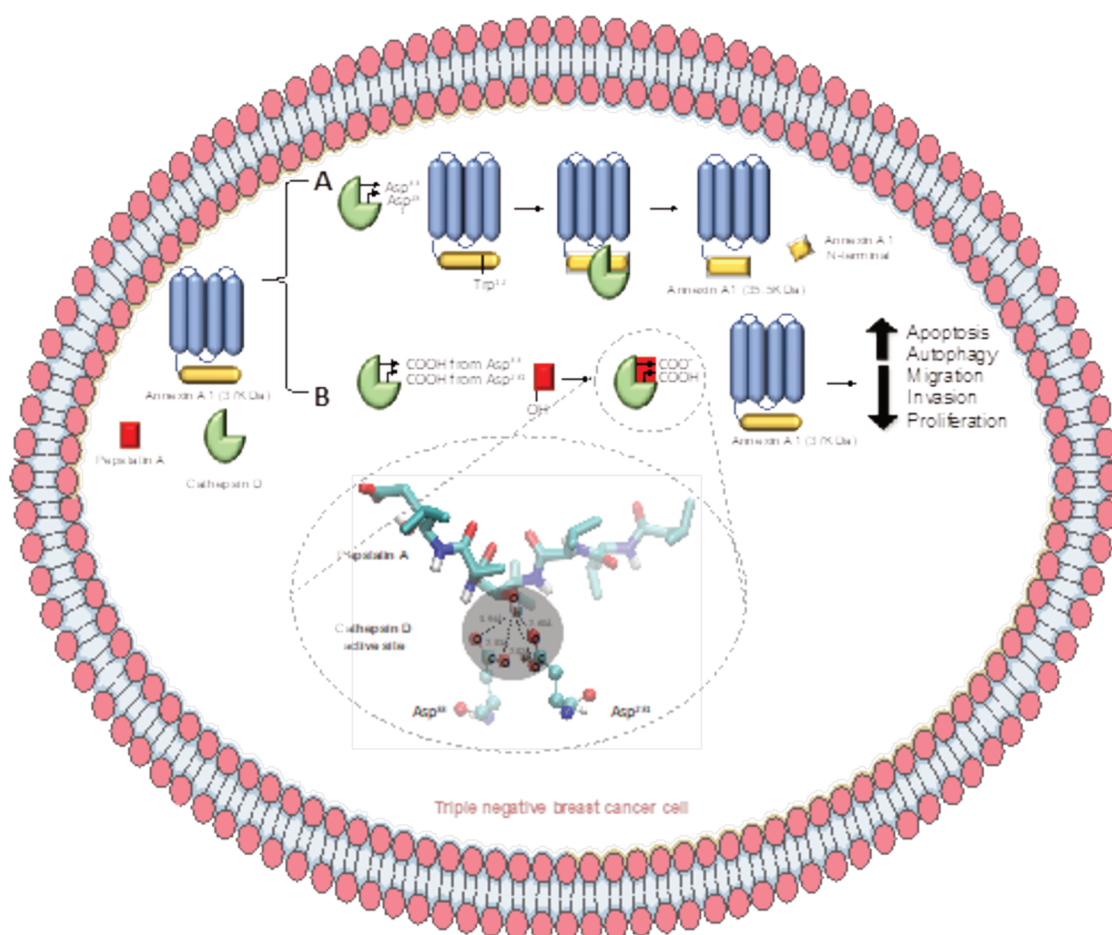


Figura 26. Representação esquemática da atividade e inibição de CatD por PepA e suas consequências em célula de TNBC. A) Por um lado, CatD (cujo sítio ativo possui Asp³³ e Asp²³¹) cliva AnxA1 no Trp¹² gerando um fragmento N-terminal e uma isoforma de 35,5 KDa. B) Por outro lado, quando é inibida por PepA, o OH de PepA

interage com os ácidos carboxílicos de Asp³³ e Asp²³¹ do sítio ativo de CatD, bloqueando a atividade da protease. Assim, AnxA1 permanece intacta (37KDa) e isso acarreta em redução da agressividade de MDA-MB-231, o que inclui aumento de autofagia e apoptose e redução das capacidades de migração, invasão e proliferação. CatD está representada genericamente por uma figura verde, PepA está representada genericamente por um quadrado vermelho, AnxA1 está representada genericamente por uma figura azul e seu domínio N-terminal está apresentado em amarelo.

Diante do sucesso da inibição de CatD na redução de agressividade de MDA-MB-231, em detrimento de MCF-7 e MCF-10A, decidiu-se ampliar a investigação desta proteína em TNBC de modo a entender melhor sua capacidade prognóstica em pacientes, sua expressão em variadas linhagens TNBC e, por fim, a função de CatD nesse tipo de tumor. Assim, demonstrou-se que pacientes com TNBC cujas células possuem alta expressão de CatD possuem menor taxa de sobrevida em 10 anos quando comparado a pacientes com o mesmo tipo de tumor cujas células apresentem reduzida expressão da protease. É interessante notar que esses dados vão de encontro a uma análise multivariada de 2810 pacientes que concluiu que a alta expressão de CatD em tumores primários está associada a um pior prognóstico do câncer de mama, com menor sobrevida global e menor sobrevida livre de recidiva, quando comparada a tumores primários com baixa expressão da protease[116]. É interessante notar que, no geral, os índices reforçam a aceitação da hipótese de que a inibição de CatD pode servir para tratamento de tumores com características similares a MDA-MB-231 (com alta expressão de CatD) e, além disso, que este tratamento poderia contribuir também para o aumento da probabilidade de sobrevida das pacientes.

Ao ampliar a gama de linhagens TNBC testadas, os resultados demonstraram que a expressão e atividade de CatD é variável nestas células

e, interessante, as que possuem maior expressão desta protease, MDA-MB-231 e MDA-MB-157, há também a maior expressão de marcadores Vimentina e CD44, menor expressão do marcador epitelial E-caderina e maior capacidade de formação de mamóferas. Estudos demonstram que CatD pode inativar as proteínas responsáveis pela adesão celular clivando E-caderina, principal componente das junções aderentes, anulando a capacidade de adesão intercelular e contribuindo para a invasão das células tumorais[52][91]. Adicionalmente, têm-se a expressão de E-caderina permanece alta em cânceres bem diferenciados e menos invasivos, enquanto que é reduzida em cânceres indiferenciados e esta redução, conseqüentemente, está associada a prognósticos desfavoráveis e aumento dos estágios tumorais T e N[117][82][118]. Em conjunto, a baixa expressão de E-caderina e alta de CatD são considerados fatores que predizem o surgimento de metástases linfonodais em câncer de laringe[119].

Ampliando o conhecimento sobre o modo de ação de CatD, evidências apontam que esta protease pode agir de maneira não proteolítica a nível nuclear atuando juntamente com TRPS1, um repressor transcricional mediado por GATA, que se encontra superexpresso em BC e aumenta a ocorrência de metástases[120] ao induzir EMT. Esta via transcricional na qual CatD atua como co-fator de TRPS1 melhora da função repressora de TRSP1 que é necessária para a aumentar a proliferação celular e a transformação fenotípica mesenquimal de células de câncer de mama, sendo capaz de aumentar os níveis de Vimentina[121], justificando, assim, a elevada expressão deste marcador mesenquimal observada no presente trabalho nas células com maior expressão de CatD MDA-MB-213 e MDA-MB-157.

Vários estudos evidenciam a ligação entre o processo de EMT e de formação de células-tronco tumorais e uma das moléculas envolvidas nestes dois processos é o CD44[122]. Esta proteína está intimamente correlacionada ao desenvolvimento de vários tumores sólidos, contribuindo assim nos processos de invasão, metástase, recorrência tumoral e quimiorresistência. Interessantemente, uma vez que sabe-se que a alta formação de mamosferas observada nas linhagens TNBC advém da capacidade de células tronco tumorais[74], pode-se inferir que a alta expressão de CD44 está refletindo na maior capacidade de formação de mamosferas pelas linhagens. Neste sentido, o bloqueio de CD44 tem se mostrado capaz de atenuar o fenótipo maligno, retardar a progressão tumoral e reverter a resistência a quimioterapia[81]. Assim, os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que há alta expressão de CD44 e alta capacidade de formação de mamosferas em células que apresentam alta expressão e atividade de CatD e, corroborando com tais dados, há evidência na literatura de correlação positiva significativa entre CD44 e CatD em câncer de mama[123]. Assim, embora existam muitos estudos na literatura que correlacionem CatD com o processo metastático e com alguns marcadores de EMT específicos, o presente trabalho é pioneiro ao dar o enfoque em EMT ao demonstrar a análise da expressão de CatD, E-caderina, CD44 e Vimentina.

As evidências apresentadas demonstraram, dentre todas as linhagens testadas, o perfil similar de MDA-MB-231 e MDA-MB-157 em termos de expressão/atividade de CatD, E-caderina, CD44 e Vimentina. Interessantemente, estas células similares são ambas do tipo basal B, caracterizadas por perfil mesenquimal caracterizado pela superexpressão de

genes associados à agressividade tumoral como Moesina (MSN), Ativador de Plasminogênio Tecidual (PLAT), Fator de Transformação do Crescimento Beta (TGFB1), Metaloproteinases 2 e 14 (MMP2 e MMP14), Catepsina C (CTSC), Ativador do Plasminogênio (PLAU), Fibrilina 1 (FBN1), Hialuronan Sintase (HAS2) e Gene Responsivo a p53 (PRG1) [124]; porém, além de similaridades estas células possuem diferenças como a expressão de EGFR (MDA-MB-231 +, MDA-MB-157 -) e a mutação de p53 (MDA-MB-231 possui; MDA-MB-157 não possui)[125]. Assim, devido a todas as semelhanças e diferenças e principalmente baseado na superexpressão e alta atividade de CatD, o presente trabalho focou nestas linhagens para desenvolver e aplicar a estratégia eficaz de inibição de expressão/atividade de CatD baseada na utilização de PepA-BoA.

PepA é o inibidor padrão de CatD [55] e já demonstrou neste trabalho ser capaz de reduzir a agressividade de MDA-MB-231, entretanto, é estabelecido na literatura que a principal desvantagem da utilização desta droga é seu baixo potencial de penetração intracelular[57] e este é um dos principais motivos pelo qual PepA ainda não tenha conseguido demonstrar eficácia suficiente para ser testada em ensaios clínicos. Neste contexto, em 2003, o BoA ganhou enorme visibilidade nas indústrias farmacêuticas e na comunidade científica após a aprovação pela FDA do Bortezomibe, um medicamento de primeira classe utilizado para o tratamento de mieloma múltiplo recidivo e de linfoma que contém uma molécula do referido ácido[126][58][127]. Interessantemente, este ácido possui a capacidade de se ligar a fosfolipídios de membrana, aumentando assim a capacidade de penetração intracelular[128][129][130]. Além disso, BoA tem demonstrado em

vários estudos possuir atividades antibacterianas, antivirais e antitumorais[131] as quais englobam a inibição da polimerização de tubulinas, de proteassomas, de enzimas e proteínas [132].

A habilidade de BoA de agir como análogos de estados de transição de substratos e de formar ligações covalentes com sítios ativos de enzimas o enquadra na categoria de inibidores enzimáticos[58]. O modo primário de ação destes inibidores está no fato de formarem um complexo estável a partir da doação de um par de elétrons de um aminoácido disposto no sítio ativo da enzima[58][133]. Contextualizando, a abordagem do BoA na potencialização do efeito de drogas já foi utilizada por pesquisadores ao promoverem o *design* de drogas antitumorais que possuem como foco a inibição do Antígeno Específico da Próstata (PSA)[134], inibição de Histona Desacetilase (HDAC)[135], inibição de Anidrase Carbônica (CA)[136], inibição de Esteróide Sulfatase (STS)[137], inibição do Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR) [138] e a inibição de Fatores Induzidos por Hipóxia (HIF)[139]. Assim, a literatura evidencia que PepA e BoA já exibiram propriedades antitumorais e apresentaram potencial para serem utilizadas como tratamento para TNBC de maneira independente e, assim, o presente trabalho combinou estes dois compostos para síntese de um novo composto inibidor da protease CatD denominado PepA-BoA.

PepA-BoA se demonstrou capaz de penetrar nas células MDA-MB-231 e MDA-MB-157 e os ensaios funcionais de atividade de CatD demonstraram que PepA-BoA quando comparada à PepA é mais eficiente em reduzir a atividade da protease e também ao reduzir a agressividade das células uma vez que houve redução de viabilidade celular, migração, invasão, proliferação, redução

de expressão de marcadores mesenquimais e aumento de marcadores epiteliais e modificação morfológica celular ao tornar células majoritariamente fusiformes em cuboides. Estes dados apresentados por este trabalho reforçam as evidências de vários estudos que afirmam que, de fato, BoA aumenta a eficiência de drogas [134] [135] [136] [117] [118] [119] como PepA no presente estudo e, assim, possui enorme potencial farmacêutico a ser considerado para o *design* de drogas inovadoras. Similarmente ao observado no ensaio de proliferação do presente trabalho, pesquisadores obtiveram maior inibição do crescimento de células prostáticas quando acoplaram BoA em uma droga inibidora de PSA [114]. Outro estudo demonstrou que inibidores de HDAC reduziram mais o crescimento celular de células de câncer de estômago quando estes estavam acoplados à BoA [115]. Pesquisadores também compararam drogas inibidoras de EGFR com e sem BoA e notaram que as drogas mais potentes continham BoA em sua molécula pois eram mais capazes de inibir a fosforilação de EGF mediada pela tirosina quinase de EGFR e, conseqüentemente, isso provocou a inibição do crescimento celular via aumento da porcentagem de células na fase G1 do ciclo celular e aumento de apoptose [118]. Adicionalmente, uma série de BoA's foram sintetizados para inibir os Fatores Indutores de Hipóxia (HIF) e tiveram excelente resultado, suprimindo a atividade destes e, conseqüentemente, reduzindo a angiogênese tumoral [119].

Embora muitos estudos tenham sido realizados objetivando avaliar o efeito antitumoral de inibidores acoplados à BoA, estes se limitam a avaliar o efeito destas drogas no crescimento e morte de células tumorais. Interessantemente, o presente estudo é o primeiro a avaliar o efeito de uma

droga, PepA, que contém BoA em sua composição, na modulação da expressão de marcadores epiteliais e mesenquimais em células tumorais. Tanto em MDA-MB-231 quanto em MDA-MB-157, duas linhagens de TNBC altamente agressivas de caráter mesenquimal e que possuem os maiores índices de atividade de CatD, houve a regulação positiva de E-caderina contraposta à regulação negativa de Vimentina e CD44. Os efeitos de PepA-BoA são similares aos efeitos da inibição gênica de CatD (por meio de sh-CatD), fato que demonstra a eficácia desta droga na inibição da protease. Adicionalmente, a modulação em MDA-MB-231 se demonstrou mais acentuada que em MDA-MB-157 devido à diferença de expressão e atividade de CatD nestas duas linhagens. Uma vez que os efeitos da inibição de CatD foram mais acentuados em MDA-MB-231, o presente trabalho focou nesta célula para avaliar as consequências funcionais e a modulação de marcadores EMT.

Os sistemas de cultivo celular *in vitro* englobam a cultura bidimensional, em monocamada, e tridimensional. Estas últimas possuem maior complexidade e são utilizadas para mimetizar condições *in vivo* uma vez que nestas condições as células modulam o metabolismo em resposta à estímulos de um microambiente 3D altamente complexo [140][141]. Estudos com culturas celulares 3D demonstram que o uso do cultivo 3D em detrimento à cultura de células bidimensional influencia significativamente em comportamentos fundamentais tais como as capacidades de proliferação, diferenciação de células-tronco, respostas metabólicas e sobrevivência celular[142]. Diante do exposto, a partir do cultivo 3D de MDA-MB-231, observou-se no presente trabalho a modificação morfológica das células agressivas, dispostas em arranjo fusiforme, caracterizado por baixa adesão intercelular, para o formato

de caráter cuboide, cujas células crescem de maneira agrupada. O cultivo 3D reduziu também de maneira significativa a proliferação e a capacidade de formação de mamóferas de células MDA-MB-231 após tratamento com PepA, PepA-BoA e sh-CatD. Interessantemente, a inibição de proliferação e se demonstrou mais acentuada no cultivo em 3D quando comparado à cultura 2D.

Além de acarretar em consequências funcionais como morfologia, proliferação e formação de mamóferas, a inibição de CatD em cultura 3D ocasionou em consequências moleculares que englobaram a remodelação do perfil de marcadores de EMT. De maneira geral, houve a regulação negativa de marcadores mesenquimais e positiva de marcadores epiteliais. Com relação a marcadores mesenquimais, o tratamento com PepA-BoA e sh-CatD foi capaz de reduzir mais acentuadamente a expressão de Vimentina, quando comparado ao mesmo tratamento em cultura bidimensional. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que, uma vez que CatD pode atuar como co-fator de TRSP1 aumentando a expressão de Vimentina, a inibição da protease tem como consequência indireta a redução de expressão deste marcador mesenquimal [101]. A inibição de CatD acarretou também na redução de CD44, marcador de células-tronco, sendo que PepA-BoA foi mais eficaz que o bloqueio gênico de CatD com sh-CatD. Diante das funções previamente elucidadas de CD44, tem-se que a redução de sua expressão acarreta em menor percentual de células-tronco tumorais dentre as células TNBC, e consequentemente, isso está relacionado à menor capacidade de quimiorresistência, formação de metástase, recorrência tumoral, tornando as células menos agressivas[73]. Adicionalmente, houve a redução de expressão de ki67, marcador de proliferação celular, e este resultado está de acordo com

estudos em câncer de esôfago e de cavidade oral que verificaram correlação positiva entre a expressão de CatD e ki-67 [144].

O EGFR é um receptor encontrado superexpresso em vários tipos de câncer e está envolvido com o crescimento de tumores sólidos, como mama e pulmão, fato que justifica o uso clínico de inibidores de EGFR (Erlotinib, Afatinib, Gefitinib, Osimertinib e Dacomitinib) e anticorpos monoclonais (Cetuximab) como terapia antitumoral[145]. Interessantemente, o presente estudo demonstrou a redução acentuada de expressão de EGFR após tratamento de MDA-MB-231 com PepA-BoA e sh-CatD sugerindo que estas estratégias de inibição de CatD poderiam agir, indiretamente, como inibidores da expressão de EGFR. Os resultados obtidos estão de acordo com pesquisas que sugerem EGFR e CatD como fatores prognósticos para câncer cervical [146], BC primários[147] e TNBC[148]. Neste contexto, outro receptor do tipo tirosina quinase avaliado no presente estudo que reduziu a expressão é o RON, que possui envolvimento em EMT como evidenciado por diversos estudos[29][149][150]. Por fim, o último marcador mesenquimal avaliado foi a Fibronectina, que possui papel claro na EMT uma vez que, durante a referida transição, a adesão celular se modifica de célula-célula para célula-matriz extracelular[151]. A exposição de células mamárias à Fibronectina é capaz de aumentar a agressividade a partir do aumento de expressão de marcadores mesenquimais como N-caderina, Vimentina, Snail, metaloprotease de matriz-2 (MMP2)[41]. Diante disso, a redução da expressão de Fibronectina como consequência da inibição de CatD está de acordo com os demais resultados obtidos no presente trabalho, tais como a redução da expressão de Vimentina,

e demonstra o sucesso das estratégias de inibição da protease na reversão da EMT.

Em contrapartida à regulação negativa de marcadores mesenquimais, a inibição de CatD foi capaz de regular positivamente os marcadores epiteliais E-caderina e Beta-catenina. Neste contexto, estudos afirmam que o complexo E-caderina/Beta-catenina desempenha um papel crucial na manutenção da integridade epitelial e a expressão baixa deste complexo está associada a uma variedade de tipos de câncer resultante do processo de EMT[152][153]. Assim, o presente trabalho demonstrou o aumento da expressão tanto de E-caderina (em cultura 2D e 3D) como de Beta-catenina e a consequência molecular mais característica da inibição da referida protease nesta abordagem é o aumento da capacidade das células MDA-MB-231 de crescerem de maneira agrupada, aderindo-se umas às outras. Uma vez que o contato intercelular é um determinante crítico para EMT, a retomada da capacidade de adesão célula-célula está diretamente associada à redução de EMT e formação de metástases. Em resumo, os resultados estão representados esquematicamente na Figura 28.

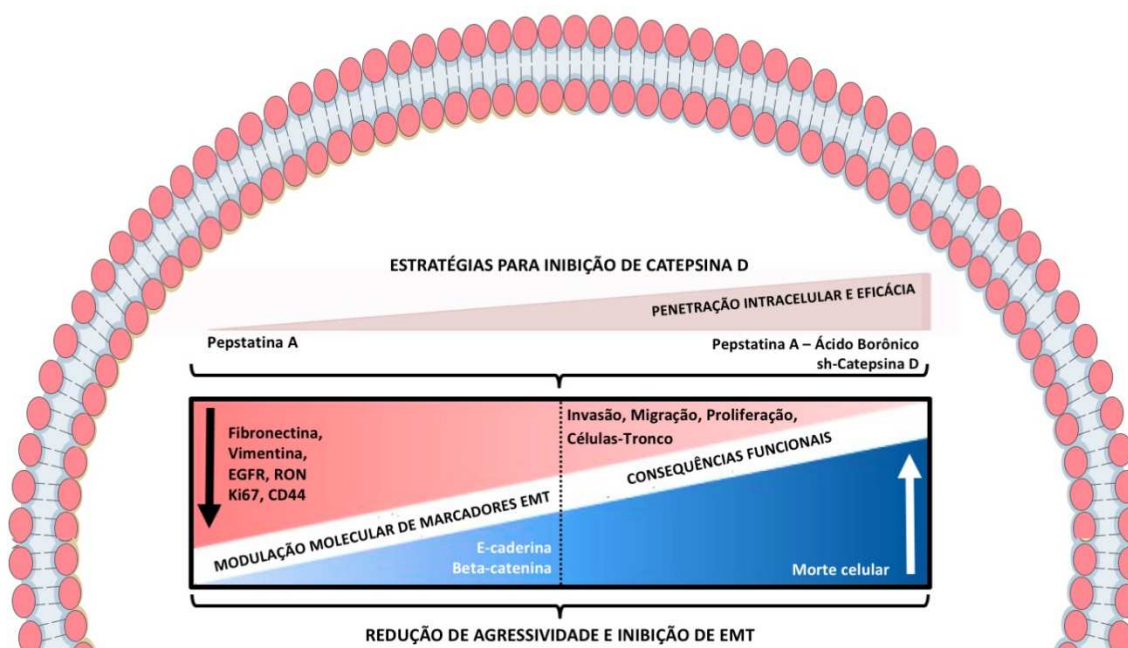


Figura 27. Representação esquemática de estratégias inovadoras para inibição de CatD e suas consequências funcionais e moleculares em célula de TNBC. PepA, PepA-BoA e sh-CatD foram as estratégias utilizadas, sendo que as duas últimas possuem maior capacidade de penetração intracelular e, portanto, maior eficácia. Intracelularmente, os tratamentos modularam a expressão de marcadores de EMT, reduzindo expressão de Vimentina, Fibrinectina, EGFR, CD55, RON e ki67 (marcadores mesenquimais) e aumentando a expressão de E-caderina e Beta-catenina (marcadores epiteliais). As consequências funcionais da inibição de CatD se basearam em redução de invasão, migração, proliferação e formação de células-tronco e aumento da taxa de morte celular das células de TNBC. Diante disso, as consequências das estratégias de inibição de CatD utilizadas se basearam em redução de agressividade e inibição de EMT.

O foco do presente trabalho foi o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para tratamento de TNBC mas é válido mencionar dois aspectos adicionais. Primeiramente, a CatD, alvo de inibição desta pesquisa, se encontra superexpressa em várias doenças como Alzheimer[154][155], Parkinson[156][157] e aterosclerose[158][159]. Em segundo lugar, embora a EMT seja tratada pelo presente trabalho com a abordagem oncológica, é válido notar que esta transição está relacionada também a eventos associados a gestação como implantação, embriogênese e desenvolvimento de órgãos[160]; e a eventos associados a cicatrização de feridas, regeneração tecidual e

fibrose de órgãos[28][160]. Portanto, as contribuições científicas apresentadas pelo presente trabalho sobre o mecanismo e as estratégias de inibição de CatD, juntamente com seus efeitos em agressividade tumoral e EMT, possuem aplicações tanto em doenças dependentes desta protease como em processos fisiológicos dependentes do princípio molecular que rege a EMT.

6. Conclusão

O presente trabalho avaliou a expressão diferencial de CatD entre diversas linhagens de BC e, especificamente em MDA-MB-231, foi demonstrado que a elevada expressão desta protease está associada à expressão de AnxA1, sendo que sua clivagem é proposta como um dos eventos críticos no estabelecimento da agressividade destas células. Ademais, elucidou-se a nível atômico o mecanismo de inibição da CatD e desenvolveu-se nova estratégia para a inibição de CatD, a qual se baseou na construção de uma molécula contendo o PepA acoplado à BoA, dando origem à PepA-BoA. Esta droga inovadora demonstrou possuir mais eficácia que o principal inibidor de CatD, PepA, sendo capaz de modular marcadores EMT em cultura bidimensional e tridimensional, promovendo a transição das células de um fenótipo de característica mesenquimal para predominantemente epitelial; e reduzindo acentuadamente a agressividade de células TNBC. Concluindo, este trabalho apresenta a inibição de CatD como estratégia inovadora para o tratamento de TNBC que possuam características semelhantes à linhagem MDA-MB-231.

7. Perspectivas Futuras

7.1 Avaliação histológica da modulação de marcadores EMT de tumores tratados com PepA e PepA-BoA

7.2 Avaliação *in vivo* de tumor primário TNBC e metástases tratados com PepA e PepA-BoA

7.3 Avaliação da associação entre CatD e AnxA1 em variadas linhagens TNBC

7.4 Avaliação histológica da associação entre CatD e AnxA1 em tumores e metástases derivadas de TNBC

7.5 Inibição *in vitro* e *in vivo* conjunta de CatD e AnxA1 como tratamento para TNBC

8. Referências Bibliográficas

- [1] C. Facts, "Cancer Facts & Figures", *Am. Cancer Soc. Inc.*, 2014.
- [2] A. R. Omran, "The epidemiologic transition. A theory of the Epidemiology of population change. 1971.", *Bull. World Health Organ.*, 2001.
- [3] A. C. Society, "Breast Cancer What is breast cancer?", *Am. Cancer Soc. Cancer Facts Fig. Atlanta, Ga Am. Cancer Soc.*, 2016.
- [4] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, e A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.", *CA. Cancer J. Clin.*, 2018. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- [5] B. Davis e S. Fenton, "Mammary Gland", in *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00061-3>
- [6] P. Ondrejka, "Atlas of Anatomy", *Magy. Sebészeti*, 2012. <https://doi.org/10.1556/MaSeb.65.2012.4.12>
- [7] &NA; &NA;, "Anatomy of the Human Body", *South. Med. J.*, 1925. <https://doi.org/10.1097/00007611-192506000-00042>
- [8] X. Zhao, G. K. Malhotra, H. Band, e V. Band, "Derivation of myoepithelial progenitor cells from bipotent mammary stem/progenitor cells", *PLoS One*, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035338>
- [9] G. Viale, "The current state of breast cancer classification", *Ann. Oncol.*, 2012. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds326>
- [10] E. Provenzano, G. A. Ulaner, e S. F. Chin, "Molecular Classification of Breast Cancer", *PET Clinics*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.004>
- [11] S. F. Worrall, "TNM Classification of Malignant Tumours.", *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 2002.
- [12] C. I. Li, D. J. Uribe, e J. R. Daling, "Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer", *Br. J. Cancer*, 2005.
- [13] S. Sell, "Stem cell origin of cancer and differentiation therapy", *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2004.04.007>
- [14] C. M. Perou, T. Sørile, M. B. Eisen, M. Van De Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Ress, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, Ø. Fluge, A. Pergammenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lønning, A. L. Børresen-Dale, P. O. Brown, e D. Botstein, "Molecular portraits of human breast tumours", *Nature*, 2000. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- [15] M. Untch, B. Gerber, N. Harbeck, C. Jackisch, N. Marschner, V. Möbus, G. Von Minckwitz, S. Loibl, M. W. Beckmann, J. U. Blohmer, S. D. Costa, T. Decker, I. Diel, T. Dimpfl, W. Eiermann, T. Fehm, K. Friese, F. Jänicke, W. Janni, W. Jonat, M. Kiechle, U. Köhler, H. J. Lück, N. Maass, K. Possinger, A. Rody, A. Scharl, A. Schneeweiss, C. Thomssen, D. Wallwiener, e A. Welt, "13th St. Gallen international breast cancer conference 2013: Primary therapy of early breast cancer evidence, controversies, consensus - Opinion of a German team of experts (Zurich 2013)", *Breast Care*, 2013. <https://doi.org/10.1159/000351692>
- [16] N. Harbeck, C. Thomssen, e M. Gnant, "St. Gallen 2013: Brief preliminary summary of the consensus discussion", *Breast Care*. 2013. <https://doi.org/10.1159/000351193>
- [17] M. L. Telli, "Triple-negative breast cancer", in *Molecular Pathology of Breast Cancer*, 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41761-5_6
- [18] K. J. Chavez, S. V. Garimella, e S. Lipkowitz, "Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer", *Breast Dis.*, 2010. <https://doi.org/10.3233/BD-2010-0307>
- [19] T. C. De Ruijter, J. Veeck, J. P. J. De Hoon, M. Van Engeland, e V. C. Tjan-Heijnen, "Characteristics of triple-negative breast cancer", *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00432-010-0957-x>
- [20] R. Dent, M. Trudeau, K. I. Pritchard, W. M. Hanna, H. K. Kahn, C. A. Sawka, L. A. Lickley, E. Rawlinson, P. Sun, e S. A. Narod, "Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence", *Clin. Cancer Res.*, 2007. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>
- [21] T. Powles, I. Durán, M. S. van der Heijden, Y. Loriot, N. J. Vogelzang, U. De Giorgi, S. Oudard, M. M. Retz, D. Castellano, A. Bamas, A. Fléchon, G. Gravis, S. Hussain, T. Takano, N. Leng, E. E. Kadel, R. Banchereau, P. S. Hegde, S. Mariathasan, N. Cui, X. Shen, C. L. Derleth, M. C. Green, e A. Ravaud, "Atezolizumab versus chemotherapy in patients with platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma (IMvigor211): a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial", *Lancet*, 2018. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33297-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33297-X)
- [22] F. Hoffmann-La Roche Ltd, "Roche provides update on phase III study of TECENTRIQ (atezolizumab) in people with previously treated advanced bladder cancer", *Media Release*, 2017.
- [23] J. Lorenz, "Atezolizumab and Nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer", *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 2019.
- [24] F. C. Santini e C. M. Rudin, "Atezolizumab for the treatment of non-small cell lung cancer", *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*, 2017. <https://doi.org/10.1080/17512433.2017.1356717>
- [25] C. C. Earle, B. A. Neville, M. B. Landrum, J. Z. Ayanian, S. D. Block, e J. C. Weeks, "Trends in the aggressiveness of cancer care near the end of life", *J. Clin. Oncol.*, 2004. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.08.136>
- [26] J. Yokota, "Tumor progression and metastasis", *Carcinogenesis*. 2000. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.497>
- [27] P. Friedl e K. Wolf, "Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms", *Nature Reviews Cancer*. 2003. <https://doi.org/10.1038/nrc1075>
- [28] R. Kalluri e R. A. Weinberg, "The basics of epithelial-mesenchymal transition", *Journal of Clinical Investigation*. 2009. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
- [29] S. Lamouille, J. Xu, e R. Derynck, "Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>
- [30] E. J. D. Robson, W. T. Khaled, K. Abell, e C. J. Watson, "Epithelial-to-mesenchymal transition confers resistance to apoptosis in three murine mammary epithelial cell lines", *Differentiation*, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2006.00075.x>
- [31] D. L. Franco, J. Mainez, S. Vega, P. Sancho, M. M. Murillo, C. A. de Frutos, G. del Castillo, C. Lopez-Blau, I. Fabregat, e M. A. Nieto, "Snail1 suppresses TGF- β -induced apoptosis and is sufficient to trigger EMT in

- hepatocytes", *J. Cell Sci.*, 2010. <https://doi.org/10.1242/jcs.068692>
- [32] G. M. Wahl e B. T. Spike, "Cell state plasticity, stem cells, EMT, and the generation of intra-tumoral heterogeneity", *npj Breast Cancer*. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41523-017-0012-z>
- [33] M. Maeda, "Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition", *J. Cell Sci.*, 2005. <https://doi.org/10.1242/jcs.01634>
- [34] A. Ratna e S. K. Das, "Role of cathepsins, in particular cathepsins B and D in breast cancer: Mechanisms and clinical implications", in *Pathophysiological Aspects of Proteases*, 2017. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6141-7_8
- [35] S. Thomson, F. Petti, I. Sujka-Kwok, P. Mercado, J. Bean, M. Monaghan, S. L. Seymour, G. M. Argast, D. M. Epstein, e J. D. Haley, "A systems view of epithelial-mesenchymal transition signaling states", *Clin. Exp. Metastasis*, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10585-010-9367-3>
- [36] A. Dongre e R. A. Weinberg, "New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>
- [37] V. Daniele, P. Simeone, J. Frank, T. Marco, G. Anna, C. Loredana, T. Andrea, B. Claudia, F. Isabelle, A. Gaballo, A. Saverio, S. Michel, e M. Michele, "Translating epithelial mesenchymal transition markers into the clinic: Novel insights from proteomics", *EuPA Open Proteomics*, 2016.
- [38] L. T. Li, G. Jiang, Q. Chen, e J. N. Zheng, "Predic Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review)", *Molecular Medicine Reports*. 2015.
- [39] R. Yerushalmi, R. Woods, P. M. Ravdin, M. M. Hayes, e K. A. Gelmon, "Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential", *The Lancet Oncology*. 2010. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70262-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70262-1)
- [40] C.-Y. Liu, H.-H. Lin, M.-J. Tang, e Y.-K. Wang, "Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation", *Oncotarget*, 2015. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3862>
- [41] J. Park e J. E. Schwarzbauer, "Mammary epithelial cell interactions with fibronectin stimulate epithelial-mesenchymal transition", *Oncogene*, 2014. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.118>
- [42] S. A. Mani, W. Guo, M.-J. Liao, E. N. Eaton, A. Ayyanan, A. Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C. C. Zhang, M. Shipitsin, L. L. Campbell, K. Polyak, C. Briskin, J. Yang, e R. A. Weinberg, "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells.", *Cell*, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>
- [43] M. H. Sheikh e E. Solito, "Annexin A1: Uncovering the many talents of an old protein", *International Journal of Molecular Sciences*. 2018.
- [44] Z. Boudhraa, B. Bouchon, C. Viallard, M. D'Incan, e F. Degoul, "Annexin A1 localization and its relevance to cancer", *Clin. Sci.*, 2016. <https://doi.org/10.1042/CS20150415>
- [45] A. Bhardwaj, N. Ganesan, K. Tachibana, K. Rajapakshe, C. T. Albarracin, P. H. Gunaratne, C. Coarfa, e I. Bedrosian, "Annexin A1 preferentially predicts poor prognosis of basal-like breast cancer patients by activating mTOR-S6 signaling", *PLoS One*, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127678>
- [46] L. Vecchi, M. Alves Pereira Zóia, T. Goss Santos, A. de Oliveira Beserra, C. M. Colaço Ramos, B. França Matias Colombo, Y. C. Paiva Maia, V. Piana de Andrade, S. Teixeira Soares Mota, T. Gonçalves de Araújo, F. Van Petten de Vasconcelos Azevedo, F. A. Soares, S. M. Oliani, e L. R. Goulart, "Inhibition of the AnxA1/FPR1 autocrine axis reduces MDA-MB-231 breast cancer cell growth and aggressiveness in vitro and in vivo", *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.06.010>
- [47] Z. Boudhraa, C. Merle, D. Mazzocut, J. M. Chezal, C. Chambon, E. Miot-Noirault, M. Theisen, B. Bouchon, e F. Degoul, "Characterization of pro-invasive mechanisms and N-terminal cleavage of ANXA1 in melanoma", *Arch. Dermatol. Res.*, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00403-014-1517-z>
- [48] M. Sakaguchi, H. Murata, H. Sonogawa, Y. Sakaguchi, J. I. Futami, M. Kitazoe, H. Yamada, e N. H. Huh, "Truncation of annexin A1 is a regulatory lever for linking epidermal growth factor signaling with cytosolic phospholipase A2 in normal and malignant squamous epithelial cells", *J. Biol. Chem.*, 2007. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707538200>
- [49] G. E. Conner, "Cathepsin D", in *Handbook of Proteolytic Enzymes: Second Edition*, 2004. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-079611-3.50016-1>
- [50] P. Benes, V. Vetvicka, e M. Fusek, "Cathepsin D-Many functions of one aspartic protease", *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2008.02.008>
- [51] V. Gocheva, W. Zeng, D. Ke, D. Klimstra, T. Reinheckel, C. Peters, D. Hanahan, e J. A. Joyce, "Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis", *Genes Dev.*, 2006. <https://doi.org/10.1101/gad.1407406>
- [52] G.-J. Tan, Z.-K. Peng, J.-P. Lu, e F.-Q. Tang, "Cathepsins mediate tumor metastasis", *World J. Biol. Chem.*, 2017.
- [53] A. M. Kabel, "Tumor markers of breast cancer: New perspectives", *J. Oncol. Sci.*, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jons.2017.01.001>
- [54] L. Huang, Z. Liu, S. Chen, Y. Liu, e Z. Shao, "A prognostic model for triple-negative breast cancer patients based on node status, Cathepsin-D and Ki-67 index", *PLoS One*, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083081>
- [55] M. Gacko, A. Minarowska, A. Karwowska, e Ł. Minarowski, "Cathepsin D inhibitors", *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2007.
- [56] J. Marciniśzyn, J. A. Hartsuck, e J. Tang, "Mode of inhibition of acid proteases by pepstatin", *J. Biol. Chem.*, 1976.
- [57] M. Maynadier, L. L. Vezenkov, M. Amblard, V. Martin, C. Gandreuil, O. Vaillant, M. Gary-Bobo, I. Basile, J. F. Hernandez, M. Garcia, e J. Martinez, "Dipeptide mimic oligomer transporter mediates intracellular delivery of Cathepsin D inhibitors: A potential target for cancer therapy", *J. Control. Release*, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.07.017>
- [58] R. Smoum, A. Rubinstein, V. M. Dembitsky, e M. Srebnik, "Boron Containing Compounds as Protease Inhibitors", *Chem. Rev.*, 2012. <https://doi.org/10.1021/cr608202m>
- [59] W. Yang, X. Gao, e B. Wang, "Boronic acid compounds as potential pharmaceutical agents", *Medicinal*

- Research Reviews. 2003. <https://doi.org/10.1002/chin.200330264>
- [60] J. Adams e M. Kauffman, "Development of the proteasome inhibitor Velcade™ (Bortezomib)", *Cancer Investigation*. 2004. <https://doi.org/10.1081/CNV-120030218>
- [61] E. Liaudet-Coopman, M. Beaujouin, D. Derocq, M. Garcia, M. Glondou-Lassis, V. Laurent-Matha, C. Prébois, H. Rochefort, e F. Vignon, "Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis", *Cancer Letters*. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.06.007>
- [62] M. C. Maiuri, E. Zalckvar, A. Kimchi, e G. Kroemer, "Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007. <https://doi.org/10.1038/nrm2239>
- [63] A. Eisenberg-Lerner, S. Bialik, H. U. Simon, e A. Kimchi, "Life and death partners: Apoptosis, autophagy and the cross-talk between them", *Cell Death and Differentiation*. 2009. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.33>
- [64] Z. J. Yang, C. E. Chee, S. Huang, e F. A. Sinicrope, "The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications", *Mol. Cancer Ther.*, 2011. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0047>
- [65] D. C. Rubinsztein, J. E. Gestwicki, L. O. Murphy, e D. J. Klionsky, "Potential therapeutic applications of autophagy", *Nature Reviews Drug Discovery*. 2007. <https://doi.org/10.1038/nrd2272>
- [66] S. W. G. Tait, G. Ichim, e D. R. Green, "Die another way – non-apoptotic mechanisms of cell death", *J. Cell Sci.*, 2014. <https://doi.org/10.1242/jcs.093575>
- [67] H. Okada e T. W. Mak, "Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells", *Nature Reviews Cancer*. 2004. <https://doi.org/10.1038/nrc1412>
- [68] S. Ma, K. A. Vogt, N. Petrillo, e A. J. Ruhoff, "Characterizing the protonation states of the catalytic residues in apo and substrate-bound human T-cell leukemia virus type 1 protease", *Comput. Biol. Chem.*, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2015.04.002>
- [69] M. Geller, M. Miller, S. M. Swanson, e J. Maizel, "Analysis of the structure of HIV-1 protease complexed with a hexapeptide inhibitor. Part II: Molecular dynamic studies of the active site region", *Proteins Struct. Funct. Genet.*, 1997. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(199702\)27:2<195::AID-PROT5>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(199702)27:2<195::AID-PROT5>3.0.CO;2-F)
- [70] J. M. Bland e D. G. Altman, "Survival probabilities (the Kaplan-Meier method).", *BMJ*, 1998. <https://doi.org/10.1136/bmj.317.7172.1572>
- [71] P. Sedgwick, "How to read a Kaplan-Meier survival plot", *BMJ*, 2014. <https://doi.org/10.1136/bmj.g5608>
- [72] F. L. Shaw, H. Harrison, K. Spence, M. P. Ablett, B. M. Simões, G. Farnie, e R. B. Clarke, "A detailed mammosphere assay protocol for the quantification of breast stem cell activity", *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10911-012-9255-3>
- [73] P. Ji, Y. Zhang, S. J. Wang, H. L. Ge, G. P. Zhao, Y. C. Xu, e Y. Wang, "CD44 hi CD24 lo mammosphere-forming cells from primary breast cancer display resistance to multiple chemotherapeutic drugs", *Oncol. Rep.*, 2016. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4739>
- [74] Y. Lombardo, A. de Giorgio, C. R. Coombes, J. Stebbing, e L. Castellano, "Mammosphere Formation Assay from Human Breast Cancer Tissues and Cell Lines", *J. Vis. Exp.*, 2015. <https://doi.org/10.3791/52671>
- [75] C. R. Tate, L. V. Rhodes, H. C. Segar, J. L. Driver, F. N. Pounder, M. E. Burow, e B. M. Collins-Burow, "Targeting triple-negative breast cancer cells with the histone deacetylase inhibitor panobinostat", *Breast Cancer Res.*, 2012. <https://doi.org/10.1186/bcr3192>
- [76] K. Subik, J.-F. Lee, L. Baxter, T. Strzepek, D. Costello, P. Crowley, L. Xing, M.-C. Hung, T. Bonfiglio, D. G. Hicks, e P. Tang, "The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines.", *Breast Cancer (Auckl)*, 2010. <https://doi.org/10.1177/117822341000400004>
- [77] A. Rody, T. Karn, C. Liedtke, L. Pusztai, E. Ruckhaeberle, L. Hanker, R. Gaetje, C. Solbach, A. Ahr, D. Metzler, M. Schmidt, V. Müller, U. Holtrich, e M. Kaufmann, "A clinically relevant gene signature in triple negative and basal-like breast cancer", *Breast Cancer Res.*, 2011. <https://doi.org/10.1186/bcr3035>
- [78] R. Zhang, X. Qin, F. Kong, P. Chen, e G. Pan, "Improving cellular uptake of therapeutic entities through interaction with components of cell membrane", *Drug Delivery*. 2019. <https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1582730>
- [79] G. Springsteen e B. Wang, "Alizarin Red S. as a general optical reporter for studying the binding of boronic acids with carbohydrates", *Chem. Commun.*, 2001. <https://doi.org/10.1039/b104895n>
- [80] S. Duhamel, M. A. Goyette, M. P. Thibault, D. Filion, L. Gaboury, e J. F. Côté, "The E3 Ubiquitin Ligase HectD1 Suppresses EMT and Metastasis by Targeting the +TIP ACF7 for Degradation", *Cell Rep.*, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.096>
- [81] H. Xu, Y. Tian, X. Yuan, H. Wu, Q. Liu, R. G. Pestell, e K. Wu, "The role of CD44 in epithelial–mesenchymal transition and cancer development", *OncoTargets and Therapy*. 2015.
- [82] F. Van Roy e G. Berx, "The cell-cell adhesion molecule E-cadherin", *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8281-1>
- [83] P. A. Kenny, G. Y. Lee, C. A. Myers, R. M. Neve, J. R. Semeiks, P. T. Spellman, K. Lorenz, E. H. Lee, M. H. Barcellos-Hoff, O. W. Petersen, J. W. Gray, e M. J. Bissell, "The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression", *Mol. Oncol.*, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.02.004>
- [84] C. P. Huang, J. Lu, H. Seon, A. P. Lee, L. A. Flanagan, H. Y. Kim, A. J. Putnam, e N. L. Jeon, "Engineering microscale cellular niches for three-dimensional multicellular co-cultures", *Lab Chip*, 2009. <https://doi.org/10.1039/b818401a>
- [85] N. Normanno, A. De Luca, C. Bianco, L. Strizzi, M. Mancino, M. R. Maiello, A. Carotenuto, G. De Feo, F. Caponigro, e D. S. Salomon, "Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer", *Gene*. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.10.018>
- [86] M. Scaltriti e J. Baselga, "The epidermal growth factor receptor pathway: A model for targeted therapy", *Clinical Cancer Research*. 2006. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1554>
- [87] E. R. Camp, W. Liu, F. Fan, A. Yang, R. Somcio, e L. M. Ellis, "RON, a tyrosine kinase receptor involved in tumor progression and metastasis", *Annals of Surgical Oncology*. 2005. <https://doi.org/10.1245/ASO.2005.08.013>
- [88] D. V. T. Catenacci, G. Cervantes, S. Yala, E. A. Nelson, E. El-Hashani, R. Kanteti, M. El Dinali, R. Hasina, J.

- Brägelmann, T. Seiwert, M. Sanicola, L. Henderson, T. A. Grushko, O. Olopade, T. Karrison, Y. J. Bang, W. H. Kim, M. Tretiakova, E. Vokes, D. A. Frank, H. L. Kindler, H. Huet, e R. Salgia, "RON (MST1R) is a novel prognostic marker and therapeutic target for gastroesophageal adenocarcinoma", *Cancer Biol. Ther.*, 2011. <https://doi.org/10.4161/cbt.12.1.15747>
- [89] B. Fernandez-Garcia, N. Eiró, L. Marín, S. González-Reyes, L. O. González, M. L. Lamelas, e F. J. Vizoso, "Expression and prognostic significance of fibronectin and matrix metalloproteases in breast cancer metastasis", *Histopathology*, 2014. <https://doi.org/10.1111/his.12300>
- [90] S. K. Pal, B. H. Childs, e M. Pegram, "Triple negative breast cancer: Unmet medical needs", *Breast Cancer Research and Treatment*. 2011. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1293-1>
- [91] G. Berchem, M. Glondou, M. Gleizes, J. P. Brouillet, F. Vignon, M. Garcia, e E. Liaudet-Coopman, "Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps in vivo: Proliferation, angiogenesis and apoptosis", *Oncogene*, 2002. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205745>
- [92] Z. Khalkhali-Ellis e M. J. C. Hendrix, "Elucidating the function of secreted maspin: Inhibiting cathepsin D-mediated matrix degradation", *Cancer Res.*, 2007. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4767>
- [93] M. Okano, K. Kumamoto, M. Saito, H. Onozawa, K. Saito, N. Abe, T. Ohtake, e S. Takenoshita, "Upregulated Annexin A1 promotes cellular invasion in triple-negative breast cancer", *Oncol. Rep.*, 2015. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3720>
- [94] S. S. Ohri, A. Vashishta, M. Proctor, M. Fusek, e V. Vetvicka, "The propeptide of cathepsin D increases proliferation, invasion and metastasis of breast cancer cells", *Int. J. Oncol.*, 2008. <https://doi.org/10.3892/ijo.32.2.491>
- [95] M. Garcia, N. Platet, E. Liaudet, V. Laurent, D. Derocq, J. P. Brouillet, e H. Rochefort, "Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis", *Stem Cells*. 1996. <https://doi.org/10.1002/stem.140642>
- [96] M. Wolf, I. Clark-Lewis, C. Buri, H. Langen, M. Lis, e L. Mazzucchelli, "Cathepsin D specifically cleaves the chemokines macrophage inflammatory protein-1 α , macrophage inflammatory protein-1 β , and SLC that are expressed in human breast cancer", *Am. J. Pathol.*, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63914-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63914-4)
- [97] A. Lösch, M. Schindl, P. Kohlberger, J. Lahodny, G. Breitenecker, R. Horvat, e P. Birner, "Cathepsin D in ovarian cancer: Prognostic value and correlation with p53 expression and microvessel density", *Gynecol. Oncol.*, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2003.11.016>
- [98] M. C. González-Vela, M. F. Garijo, F. Fernández, L. Buelta, e J. F. Val-Bernal, "Cathepsin D in host stromal cells is associated with more highly vascular and aggressive invasive breast carcinoma", *Histopathology*, 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.1999.00548.x>
- [99] P. Briozzo, J. Badet, F. Capony, I. Pieri, P. Montcourrier, D. Barritault, e H. Rochefort, "MCF7 mammary cancer cells respond to bFGF and internalize it following its release from extracellular matrix: A permissive role of cathepsin D", *Exp. Cell Res.*, 1991. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(91\)90362-X](https://doi.org/10.1016/0014-4827(91)90362-X)
- [100] R. Cailleau, R. Young, M. Olivé, e W. J. Reeves, "Breast tumor cell lines from pleural effusions", *J. Natl. Cancer Inst.*, 1974. <https://doi.org/10.1093/jnci/53.3.661>
- [101] A. Liu, W. Huang, G. Zeng, X. Ma, X. Zhou, Y. Wang, C. Ouyang, e A. Cheng, "Expression of the Annexin A1 gene is associated with suppression of growth, invasion and metastasis of nasopharyngeal carcinoma", *Mol. Med. Rep.*, 2014. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2656>
- [102] R. Castino, D. Pace, M. Démoz, M. Gargiulo, C. Ariatta, E. Raiteri, e C. Isidoro, "Lysosomal proteases as potential targets for the induction of apoptotic cell death in human neuroblastomas", *Int. J. Cancer*, 2002. <https://doi.org/10.1002/ijc.10139>
- [103] C. S. F. Oliveira, H. Pereira, S. Alves, L. Castro, F. Baltazar, S. R. Chaves, A. Preto, e M. Côte-Real, "Cathepsin D protects colorectal cancer cells from acetate-induced apoptosis through autophagy-independent degradation of damaged mitochondria", *Cell Death Dis.*, 2015. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.157>
- [104] W. Gao, J. H. Kang, Y. Liao, M. Li, e X. M. Yin, "Autophagy and cell death", in *Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research*, 2009. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-381-7_30
- [105] S. Mukhopadhyay, P. K. Panda, N. Sinha, D. N. Das, e S. K. Bhutia, "Autophagy and apoptosis: Where do they meet?", *Apoptosis*, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10495-014-0967-2>
- [106] M. C. Maiuri, A. Criollo, e G. Kroemer, "Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome", *EMBO Journal*. 2010. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.377>
- [107] J. M. A. Delou, D. Biasoli, e H. L. Borges, "The complex link between apoptosis and autophagy: A promising new role for RB", *An. Acad. Bras. Cienc.*, 2016. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620160127>
- [108] A. L. Edinger e C. B. Thompson, "Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy", *Current Opinion in Cell Biology*. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.09.011>
- [109] L. B. Bazzett, C. S. Watkins, C. Gercel-Taylor, e D. D. Taylor, "Modulation of proliferation and chemosensitivity by procathepsin D and its peptides in ovarian cancer", *Gynecol. Oncol.*, 1999. <https://doi.org/10.1006/gyne.1999.5426>
- [110] K. Degenhardt, R. Mathew, B. Beaudoin, K. Bray, D. Anderson, G. Chen, C. Mukherjee, Y. Shi, C. Gélinas, Y. Fan, D. A. Nelson, S. Jin, e E. White, "Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis", *Cancer Cell*, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.06.001>
- [111] C. W. Yun e S. H. Lee, "The Roles of Autophagy in Cancer", *International journal of molecular sciences*. 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19113466>
- [112] F. M. Tumminello, G. Leto, N. Gebbia, L. Rausa, e R. J. Bernacki, "Evaluation of antitumor and antimetastatic activity of pepstatin A in some experimental tumor models.", *J. Chemother.*, 1989.
- [113] M. Monod, S. Capoccia, B. Léchenne, C. Zaugg, M. Holdom, e O. Jousson, "Secreted proteases from pathogenic fungi", *Int. J. Med. Microbiol.*, 2002. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00223>
- [114] J. Eder, U. Hommel, F. Cumin, B. Martoglio, e B. Gerhartz, "Aspartic Proteases in Drug Discovery", *Curr. Pharm. Des.*, 2006. <https://doi.org/10.2174/138161207779313560>
- [115] A. M. Silva, R. E. Cachau, H. L. Sham, e J. W. Erickson, "Inhibition and catalytic mechanism of HIV-1 aspartic protease", *J. Mol. Biol.*, 1996. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0026>
- [116] J. A. Foekens, M. P. Look, J. Bolt-De Vries, M. E. Meijer-Van Gelder, W. L. J. Van Putten, e J. G. M. Klijn,

- "Cathepsin-D in primary breast cancer: Prognostic evaluation involving 2810 patients", *Br. J. Cancer*, 1999. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6990048>
- [117] O. Schmalhofer, S. Brabletz, e T. Brabletz, "E-cadherin, β -catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer", *Cancer and Metastasis Reviews*. 2009. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9179-y>
- [118] A. Gheldof e G. Berx, "Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition", in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00014-5>
- [119] M. Paksoy, U. Hardal, e C. Caglar, "Expression of Cathepsin D and E-Cadherin in primary laryngeal cancers correlation with neck lymph node involvement", *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00432-011-1007-z>
- [120] J. Hu, P. Su, M. Jiao, X. Bai, M. Qi, H. Liu, Z. Wu, J. Sun, G. Zhou, e B. Han, "TRPS1 Suppresses Breast Cancer Epithelial-mesenchymal Transition Program as a Negative Regulator of SUZ12", *Transl. Oncol.*, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.01.009>
- [121] A.-S. Bach, D. Derocq, V. Laurent-Matha, P. Montcourrier, S. Sebti, B. Orsetti, C. Theillet, C. Gongora, S. Pattingre, E. Ibing, P. Roger, L. K. Linares, T. Reinheckel, G. Meurice, F. J. Kaiser, C. Gespach, e E. Liaudet-Coopman, "Nuclear cathepsin D enhances TRPS1 transcriptional repressor function to regulate cell cycle progression and transformation in human breast cancer cells", *Oncotarget*, 2015. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4394>
- [122] C. D. May, N. Sphyris, K. W. Evans, S. J. Werden, W. Guo, e S. A. Mani, "Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: A dangerously dynamic duo in breast cancer progression", *Breast Cancer Research*. 2011. <https://doi.org/10.1186/bcr2789>
- [123] P. A. Regidor, R. Callies, M. Regidor, U. Günthert, M. Zöller, e A. E. Schindler, "Expression of the CD44 variant isoforms 6 and 4/5 in breast cancer: Correlation with established prognostic parameters", *Arch. Gynecol. Obstet.*, vol. 258, n° 3, p. 125–135, 1996. <https://doi.org/10.1007/s004040050113>
- [124] X. Dai, H. Cheng, Z. Bai, e J. Li, "Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping", *Journal of Cancer*. 2017. <https://doi.org/10.7150/jca.18457>
- [125] S. E. Smith, P. Mellor, A. K. Ward, S. Kendall, M. McDonald, F. S. Vizeacoumar, F. J. Vizeacoumar, S. Napper, e D. H. Anderson, "Molecular characterization of breast cancer cell lines through multiple omic approaches", *Breast Cancer Res.*, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0855-0>
- [126] M. Groll, C. R. Berkers, H. L. Ploegh, e H. Ova, "Crystal structure of the boronic acid-based proteasome inhibitor bortezomib in complex with the yeast 20S proteasome", *Structure*, 2006. <https://doi.org/10.2210/pdb2f16/pdb>
- [127] C. R. Berkers, M. Verdoes, E. Lichtman, E. Fiebig, B. M. Kessler, K. C. Anderson, H. L. Ploegh, H. Ova, e P. J. Galaray, "Activity probe for in vivo profiling of the specificity of proteasome inhibitor bortezomib", *Nat. Methods*, 2005. <https://doi.org/10.1038/nmeth759>
- [128] X. Wang, X. Zhen, J. Wang, J. Zhang, W. Wu, e X. Jiang, "Doxorubicin delivery to 3D multicellular spheroids and tumors based on boronic acid-rich chitosan nanoparticles", *Biomaterials*, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.03.008>
- [129] J. Y. Jeong, E. H. Hong, S. Y. Lee, J. Y. Lee, J. H. Song, S. H. Ko, J. S. Shim, S. Choe, D. D. Kim, H. J. Ko, e H. J. Cho, "Boronic acid-tethered amphiphilic hyaluronic acid derivative-based nanoassemblies for tumor targeting and penetration", *Acta Biomater.*, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.02.030>
- [130] S. Assouline, J. Chang, R. Rifkin, A. M. Hui, D. Berg, N. Gupta, Y. Xi, A. Di Bacco, e P. Martin, "MLN9708, a novel, investigational proteasome inhibitor, in patients with relapsed/refractory lymphoma: Results of a phase 1 dose-escalation study", *Blood*, 2011. <https://doi.org/10.1182/blood.V118.21.2672.2672>
- [131] J. Kim, "Anticancer Activity of Some Boronic Acid Arylidene Heterocycles", 2015.
- [132] P. C. Trippier e C. McGuigan, "Boronic acids in medicinal chemistry: Anticancer, antibacterial and antiviral applications", *MedChemComm*. 2010. <https://doi.org/10.1039/c0md000119h>
- [133] H. Defrancesco, J. Dudley, e A. Coca, "Boron Chemistry: An Overview", in *ACS Symposium Series*, 2016. <https://doi.org/10.1021/bk-2016-1236.ch001>
- [134] A. M. LeBeau, P. Singh, J. T. Isaacs, e S. R. Denmeade, "Potent and Selective Peptidyl Boronic Acid Inhibitors of the Serine Protease Prostate-Specific Antigen", *Chem. Biol.*, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.05.020>
- [135] N. Suzuki, T. Suzuki, Y. Ota, T. Nakano, M. Kurihara, H. Okuda, T. Yamori, H. Tsumoto, H. Nakagawa, e N. Miyata, "Design, synthesis, and biological activity of boronic acid-based histone deacetylase inhibitors", *J. Med. Chem.*, 2009. <https://doi.org/10.1021/jm900125m>
- [136] D. Vullo, J. Voipio, A. Innocenti, C. Rivera, H. Ranki, A. Scozzafava, K. Kaila, e C. T. Supuran, "Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the human cytosolic isozyme VII with aromatic and heterocyclic sulfonamides", *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.12.052>
- [137] V. Ahmed, Y. Liu, C. Silvestro, e S. D. Taylor, "Boronic acids as inhibitors of steroid sulfatase", *Bioorganic Med. Chem.*, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.08.033>
- [138] H. S. Ban, T. Usui, W. Nabeyama, H. Morita, K. Fukuzawa, e H. Nakamura, "Discovery of boron-conjugated 4-anilinoquinazoline as a prolonged inhibitor of EGFR tyrosine kinase", *Org. Biomol. Chem.*, 2009. <https://doi.org/10.1039/b909504g>
- [139] K. Shimizu, M. Maruyama, Y. Yasui, H. Minegishi, H. S. Ban, e H. Nakamura, "Boron-containing phenoxyacetanilide derivatives as hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α inhibitors", *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.12.037>
- [140] R. Edmondson, J. J. Broglie, A. F. Adcock, e L. Yang, "Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors", *Assay Drug Dev. Technol.*, 2014. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>
- [141] A. Nyga, U. Cheema, e M. Loizidou, "3D tumour models: Novel in vitro approaches to cancer studies", *Journal of Cell Communication and Signaling*. 2011. <https://doi.org/10.1007/s12079-011-0132-4>
- [142] C. P. Soares, V. Midlej, M. E. W. de Oliveira, M. Benchimol, M. L. Costa, e C. Mermelstein, "2D and 3D-organized cardiac cells shows differences in cellular morphology, adhesion junctions, presence of myofibrils

- and protein expression", *PLoS One*, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038147>
- [144] M. Ikeguchi, T. Sakatani, T. Ueta, K. Fukuda, S. Oka, K. Hisamitsu, K. Yamaguchi, S. Tsujitani, e N. Kaibara, "Correlation between cathepsin D expression and p53 protein nuclear accumulation in oesophageal squamous cell carcinoma", *J. Clin. Pathol.*, 2002. <https://doi.org/10.1136/jcp.55.2.121>
- [145] V. Hirsh, "Turning EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer into a chronic disease: Optimal sequential therapy with EGFR tyrosine kinase inhibitors", *Ther. Adv. Med. Oncol.*, 2018. <https://doi.org/10.1177/1758834017753338>
- [146] G. B. Kristensen, R. Holm, V. M. Abeler, e C. G. Tropé, "Evaluation of the prognostic significance of cathepsin D, epidermal growth factor receptor, and c-erbB-2 in early cervical squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study", *Cancer*, 1996. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19960801\)78:3<433::AID-CNCR9>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19960801)78:3<433::AID-CNCR9>3.0.CO;2-K)
- [147] N. P. M. Sacks, K. Smith, A. P. Norman, M. Greenall, S. LeJeune, e A. L. Harris, "Cathepsin D levels in primary breast cancers: Relationship with epidermal growth factor receptor, oestrogen receptor and axillary nodal status", *Eur. J. Cancer*, 1993. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(93\)90401-Z](https://doi.org/10.1016/0959-8049(93)90401-Z)
- [148] K. S. Tonkin, J. W. McKay, L. W. Stitt, S. Tokmakejian, e D. S. Haines, "Tumour epidermal growth factor receptor, erbB-2 and cathepsin D in node-negative invasive breast cancer: their impact on the selection of patients for systemic adjuvant therapy", *Cancer Prev Control*, 1999.
- [149] P. T. Yu, M. Babicky, D. Jaquish, R. French, K. Marayuma, E. Mose, S. Niessen, H. Hoover, D. Shields, D. Cheresch, B. F. Cravatt, e A. M. Lowy, "The RON-receptor regulates pancreatic cancer cell migration through phosphorylation-dependent breakdown of the hemidesmosome", *Int. J. Cancer*, 2012.
- [150] E. R. Camp, A. Yang, M. J. Gray, F. Fan, S. R. Hamilton, D. B. Evans, A. T. Hooper, D. S. Pereira, D. J. Hicklin, e L. M. Ellis, "Tyrosine kinase receptor RON in human pancreatic cancer: Expression, function, and validation as a target", *Cancer*. 2007. <https://doi.org/10.1002/cncr.22490>
- [151] Q. K. Chen, K. Lee, D. C. Radisky, e C. M. Nelson, "Extracellular matrix proteins regulate epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells", *Differentiation*, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2013.03.003>
- [152] S. Roura, S. Miravet, J. Piedra, A. García De Herreros, e M. Duñachl, "Regulation of E-cadherin/catenin association by tyrosine phosphorylation", *J. Biol. Chem.*, 1999. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.51.36734>
- [153] M. Conacci-Sorrell, I. Simcha, T. Ben-Yedidia, J. Blechman, P. Savagner, e A. Ben-Ze'Ev, "Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: The roles of β -catenin signaling, Slug, and MAPK", *J. Cell Biol.*, 2003. <https://doi.org/10.1083/jcb.200308162>
- [154] E. J. Goetzl, A. Boxer, J. B. Schwartz, E. L. Abner, R. C. Petersen, B. L. Miller, e D. Kapogiannis, "Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease", *Neurology*, 2015. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001702>
- [155] M. de A. C. Smith, "Doença de Alzheimer", *Rev. Bras. Psiquiatr.*, 2005.
- [156] V. Cullen, M. Lindfors, J. Ng, A. Paetau, E. Swinton, P. Kolodziej, H. Boston, P. Saftig, J. Woulfe, M. B. Feany, L. Myllykangas, M. G. Schlossmacher, e J. Tyynelä, "Cathepsin D expression level affects alpha-synuclein processing, aggregation, and toxicity in vivo", *Mol. Brain*, 2009. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-2-5>
- [157] Y. Chu, H. Dodiya, P. Aebischer, C. W. Olanow, e J. H. Kordower, "Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: Relationship to alpha-synuclein inclusions", *Neurobiol. Dis.*, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.05.023>
- [158] E. Kaschina, H. Scholz, U. M. Steckelings, M. Sommerfeld, U. R. Kemnitz, M. Artuc, S. Schmidt, e T. Unger, "Transition from atherosclerosis to aortic aneurysm in humans coincides with an increased expression of RAS components", *Atherosclerosis*, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.01.003>
- [159] Z. Khalkhali-Ellis e M. J. C. Hendrix, "Two faces of Cathepsin D: Physiological guardian angel and pathological demon", *European Journal of Physical and Health Education*. 2014. <https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000206>
- [160] D. Kim, T. Xing, Z. Yang, R. Dudek, Q. Lu, e Y.-H. Chen, "Epithelial Mesenchymal Transition in Embryonic Development, Tissue Repair and Cancer: A Comprehensive Overview", *J. Clin. Med.*, 2017. <https://doi.org/10.3390/jcm7010001>

9. Contribuições científicas do Doutorado

9.1 Artigo Científico publicado na revista *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*

Título: *Inhibition of the AnxA1/FPR1 autocrine axis reduces MDA-MB-231 breast cancer cell growth and aggressiveness in vitro and in vivo.*

9.2 Patente Depositada no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual

Título: Peptídeos inibidores de Anexina A1 como estratégia terapêutica para câncer de mama.

9.3 Artigo Científico publicado na revista *International Journal of Molecular Sciences*

Título: *Inhibition of Triple-Negative Breast Cancer Cell Aggressiveness by Cathepsin D Blockage: Role of Annexin A1*

9.4 Capítulo do Livro *State of the Art in Nano-bioimaging*

Título: *Biocompatible Magic Sized Quantum Dots: Luminescent Markers and Probes*

9.5 Projeto de *Clinical Trial* em parceria com o Grupo Oncoclínicas®