



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Formação de Invadopódios na Migração de Células Neoplásicas Malignas Expostas à Fibronectina

Maira Smaniotto Cuciolo

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Profa. Dra. Flávia Karina Delella

**BOTUCATU – SP
2018**



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Formação de Invadopódios na Migração de Células

Tumorais Expostas à Fibronectina

MAIRA SMANIOTTO CUCIELO

FLÁVIA KARINA DELELLA

DEILSON ELGUI DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Profa. Dra. Flávia Karina Delella

**BOTUCATU – SP
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM. DIVISÃO TÉCNICA
DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Cucielo, Maira Smaniotto.

Formação de invadopódios na migração de células tumorais expostas à fibronectina / Maira Smaniotto Cucielo. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Flávia Karina Delella

Coorientador: Deilson Elgui de Oliveira

Capes: 20600003

1. Fibronectinas. 2. Membrana Basal. 3. Cortactina. 4. Células - Migração. 5. Linhagem celular. 6. Próstata - Câncer.

Palavras-chave: Cortactina; Fibronectina; Invadopódio; LNCaP; Membrana Basal.

"Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida."

Sócrates

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Moacir e Joseane, pelo amor e educação durante toda minha vida, e por serem meus melhores amigos. Por todo incentivo e encorajamento, por seguirem meus sonhos comigo e por serem seres humanos maravilhosos. Ao meu irmão, Rafael, por todo amor, apoio e incentivo, por ser um exemplo.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Flávia Karina Delella, por ter me recebido de braços abertos. Por ser uma orientadora que me mostrou o mundo e ao mesmo tempo se fez presente fazendo eu me sentir amparada. Pelos ensinamentos, firmeza, ética, carinho e determinação em fazer nosso trabalho com excelência. Pelas conversas e pela paciência em me acalmar durante as crises de ansiedade. Por ter dividido comigo a paixão pela extensão universitária e pelo curso de férias. Por confiar em mim e no meu trabalho, e por muitas vezes me fazer sentir confiante. Por ter sido uma amiga que confortou, puxou orelha e riu comigo. Muito obrigada por esses anos de convivência, aprendi muito e espero aprender mais.

Ao meu co-orientador, Prof^o Dr^o Deilson Elgui de Oliveira, pelos ensinamentos científicos e por me inspirar nessa longa jornada no estudo do câncer, por sempre ser atencioso e paciente. Meu muito obrigada!

À minha colega de laboratório e amiga, Helga Caputo Nunes, por dividir seus conhecimentos científicos. Agradeço todo os conselhos, conversas, risadas e choros, por dividir seu lanchinho comigo quando precisei. Por ser um exemplo pra mim. Obrigada!

As duas iniciações científicas que me acompanharam de perto, Isabelle Mira da Silva e Mariana Medeiros, por serem prestativas (mesmo não aguentando mais fazer solução basal), por terem jeitos únicos e cada uma a sua maneira, me ensinaram pequenas coisas dia-a-dia. Muito obrigada meninas!

Ao Laboratório de Matriz Extracelular (LabMEC) e as pessoas maravilhosas que fazem parte desse grupo excepcional. Agradeço pela união, disposição, carinho e amizade em todos os momentos. Aos meus queridos amigos de pós-graduação Sérgio Alexandre Alcantara dos Santos, Ana Carolina Lima Camargo, Flávia Bessi Constantino, Ketlin Thassiani Colombelli,

Nilton José dos Santos, Caroline Nascimento Barquilha, obrigada por dividirem conhecimentos, conselhos, piadas, conversas durante o horário de café e todo o bom humor desse grupo. Aos queridos iniciações científicas: Matheus Naia Fioretto, Isabela Gasetta Ferras Paiva, Luiz Marcos Frediani Portela, Isabela Correa Barbosa, Juliana Trindade Caleffi, Amanda Grosselli Toledo, Elian Ribeiro David, Cecília Luvizutti Ferreira da Silva, Teng Fwu Shing e Arthur Pellegrine Grandisoli, por serem prestativos e amáveis, pelo interesse em aprender e ajudar. Muito obrigada!

Ao Prof^o Dr^o Sérgio Felisbino e ao Prof^o Dr^o Luiz Antonio Justulin Jr, que juntamente com a Prof^a Flávia, conduzem o grupo com empenho, estimulam a produção científica e as conversas sobre a vida acadêmica e o mundo. Obrigada por todos cafés e conversas.

Ao Bruno Martinucci, antigo colega de laboratório e amigo, levarei comigo todos os momentos de ensinamentos e conversas. Obrigada por ter sido uma pessoa agregadora, paciente e querida.

Ao Departamento de Morfologia do Instituto de Biocência, onde passei os últimos oito anos. Em especial aos servidores (Luciana, Vivian, Keyla, Ricardo, José Eduardo e Elton) e funcionários (Dominique e Maria Helena) que sempre foram solícitos e queridos.

Ao Grupo de Estudos em Carcinogênese Viral e Biologia dos Cânceres (ViriCan), pela solicitude de todos os integrantes, em especial ao colega Brunno Caetano, que dispendeu horas me acompanhando com paciência e bom humor.

Ao Prof^o Dr^o Wellerson Rodrigo Scarano, por ajudar nas análises do meu trabalho e sempre manter o clima descontraído. Muito Obrigada!

Ao Laboratório de Desreguladores Endócrinos e Carcinogênese (LabDECA), especialmente aos alunos Cristiane Pinho, Ariana Musa de Aquino e Leonardo Oliveira Mendes, pela amizade, disposição em ajudar e por todas as conversas.

Ao Laboratório de Ensaios Biológicos com Produtos Naturais, por ceder espaço para minhas análises, em especial aos alunos Larissa Lucena Périco e Vinícius Peixoto Rodrigues, pela solicitude e por tornarem as inúmeras fotodocumentações de Western Blotting mais

agradáveis e menos massantes. Muito obrigada!

Aos amigos do Laboratório do Músculo Esquelético Estriado (LabME), em especial aos amigos Bruno de Oliveira da Silva Duran, Bruno Evaristo de Almeida Fantinatti, Paula Pacielli Freire e Sarah Santiloni Cury pela disposição em ajudar, pelas conversas e risadas. Muito obrigada!

As queridas Marciana Sanabria e Marina Trevisan Guerra, minhas co-orientadoras durante minha primeira iniciação científica, por me apresentarem a vida acadêmica e me inspirarem todos os dias. Vocês foram essenciais na minha formação, obrigada por tudo!

Aos amigos de longa data, Rosana Guilhen, Elisa Frederice, Mariana Mascari e Camila Fuzinato que mesmo longe sempre se fizeram presentes me apoiando. As queridas amigas de graduação, Milene Pereira, Camila Amaro e Flávia Bessi Constantino por estarem ao meu lado em todos os momentos. Aos amigos de pouca data e muito coração, Ingrid Dantas, Karoline Rubin, Letícia de Souza Marques e Vinícius Nóbrega. Muito Obrigada!

Ao Nathan, pela paciência e determinismo em me dizer 'Vai dar tudo certo!'. Por estar ao meu lado, obrigada!

A minha família, em especial aos meus avós João, Tita e Geny, que sempre me estimularam a estudar e torceram pela minha felicidade. Aos meus tios e primos, por ficarem felizes pelas minhas conquistas e entenderem minha ausência em muitos momentos. Obrigada meus queridos!

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante todo período do mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
I. INTRODUÇÃO	01
1. MIGRAÇÃO CELULAR.....	01
2. INVADOPÓDIOS.....	04
3. A MATRIZ EXTRACELULAR E O CÂNCER.....	08
4. MODELOS DE ESTUDO <i>IN VITRO</i>	12
II. HIPÓTESE	15
III. OBJETIVOS	15
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
V. MATERIAL E MÉTODOS	16
1. LINHAGENS CELULARES NEOPLÁSICAS E CONDIÇÕES DE CULTURA.....	16
2. TESTE PARA DETECÇÃO DE MICOPLASMA NAS LINHAGENS CELULARES.....	16
3. EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS À FIBRONECTINA.....	17
4. VIABILIDADE CELULAR.....	18
5. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR POR MTT.....	18
6. ANÁLISE DA MORFOLOGIA E DA MORFOMETRIA CELULAR.....	19
7. ENSAIO DE MIGRAÇÃO EM SISTEMA DE INSERTOS <i>TRANSWELL</i>	19
8. IMUNOFLOURESCÊNCIA.....	20
9. WESTERN BLOTTING.....	21
10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	21
VI. RESULTADOS	23
1.A viabilidade celular não sofreu alteração após exposição aos componentes da MEC.....	23
2. Recobrimento da placa pelos componentes da MEC alterou a taxa de proliferação celular.....	23
3. Componentes da MEC alteram o comportamento celular.....	23
4. Comportamento móvel das células é alterado pelos componentes da MEC.....	25
5. Distribuição das proteínas chaves é alterada pelos componentes da MEC.....	25
6. Expressão diferencial das proteínas relacionadas a formação dos invadopódios.....	26
VII. DISCUSSÃO	68
VIII. CONCLUSÕES GERAIS	71
IX. REFERÊNCIAS	7

LISTA DE ABREVIATURAS

CaP: câncer de próstata
EGF: fator de crescimento epidermal
FAK: quinase de adesão focal
FN: fibronectina
MB: membrana basal
MEC: matriz extracelular
MMP: metaloproteinase de matriz
PSA: antígeno específico prostático
RNAm: RNA mensageiro
ROS: espécies reativas de oxigênio
TGF- β : fator de transformação do crescimento β
VEGF: fator de crescimento endotelial vascular
ROCK: proteína cinase associada a família Rho
Arp 2/3: complexo de proteínas associados à actina
WASP: proteína da síndrome de Wiskott-Aldrich
N-WASP: proteína da síndrome de Wiskott-Aldrich neural
MT-MMP: metaloproteinase de membrana
CDC42: Proteína controladora de ciclo celular
RHO: Pequena GTPase
SRC: proteína tirosina quinase
ERK: cinase reguladora de sinais extracelulares
RAC: subfamília da GTPase da família RHO
AR: receptor de andrógeno
ER: receptor de estrógeno
EGF: fator de crescimento epidermal

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1. Formação do processo de adesão focal.....	02
Figura 2. Formação das fibras de estresse.....	03
Figura 3. Estágios da formação dos invadopódios.....	05
Figura 4. Proteínas precursoras da formação e maturação dos invadopódios.....	07
Figura 5. Estrutura da fibronectina (FN) e seus domínios de ligação.....	10

Resultados

Figura 6. Teste molecular para detecção de Mycoplasma sp.....	17
Figura 7. Efeito da exposição aos componentes da MEC sobre a viabilidade celular.....	28
Figura 8. Efeito da exposição aos componentes da MEC na proliferação celular.....	30
Figura 9. Imunofluorescência das células LNCaP marcadas para actina-F.....	32
Figura 10. Contagem de projeções citoplasmáticas e área celular da LNCaP.....	34
Figura 11. Imunofluorescência das células PC-3 marcadas para actina-F.....	36
Figura 12. Contagem de projeções citoplasmáticas e área celular da PC-3.....	38
Figura 13. Efeito dos diferentes tipos de exposição na motilidade das células LNCaP.....	40
Figura 14. Efeito dos diferentes tipos de exposição na motilidade das células PC-3.....	42
Figura 15. Imunofluorescência das células LNCaP para a proteína Cortactina.....	44
Figura 16. Imunofluorescência das células LNCaP para a proteína MMP14.....	44
Figura 17. Imunofluorescência das células PC-3 para a proteína Cortactina.....	46
Figura 18. Imunofluorescência das células PC-3 para a proteína MMP14.....	46
Figura 19. Expressão da proteína Actina-F nas células LNCaP.....	48
Figura 20. Expressão da proteína Cortactina nas células LNCaP.....	48
Figura 21. Expressão da proteína Dinamina-2 nas células LNCaP.....	48
Figura 22. Expressão da proteína Erk 1/2 nas células LNCaP.....	50
Figura 23. Expressão da proteína p-FAK nas células LNCaP.....	50
Figura 24. Expressão da proteína Actina-F nas células PC-3.....	52
Figura 25. Expressão da proteína Cortactina nas células PC-3.....	52
Figura 26. Expressão da proteína Dinamina-2 nas células PC-3.....	52
Figura 27. Expressão da proteína Erk 1/2 nas células PC-3.....	54
Figura 28. Expressão da proteína p-FAK nas células PC-3.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Relação dos anticorpos usados para imunofluorescência.....	21
Tabela II. Relação dos anticorpos usados para western blotting.....	22
Tabela III. Resumo dos resultados analisados comparado ao grupo Controle.....	55

RESUMO

Durante processos patológicos como o câncer, a atividade migratória de células neoplásicas aumenta, sendo um passo crítico para a disseminação dessas células a órgãos distantes. O processo migratório dessas células depende da formação de protrusões citoplasmáticas chamadas invadopódios, através da nucleação e polimerização de actina e degradação da matriz extracelular (MEC). A MEC é uma rede complexa de proteínas que fornece sustentação e moléculas sinalizadoras responsáveis pela homeostase dos tecidos. Dentre essas proteínas, a fibronectina (FN) é uma glicoproteína multiadesiva fundamental no comportamento celular normal e apresenta-se aumentada no tecido tumoral. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a influência da FN, isolada ou em associação com componentes da membrana basal, no processo migratório de células tumorais prostáticas, com ênfase no mecanismo de formação dos invadopódios. Para isso, as linhagens celulares LNCaP e PC-3 foram divididas nos seguintes grupos experimentais: Controle, FN solúvel (10µg/mL), FN *coating* (10µg/mL), FN+Geltrex e Geltrex com exposição aos componentes por 4 dias. Nas células LNCaP, foi possível observar alterações morfológicas dos grupos expostos a FN (solúvel, *coating* e em associação com Geltrex) com diminuição na área celular em comparação ao grupo controle. A proliferação celular aumentou nos grupos com recobrimento da superfície (FN *coating*, FN+Geltrex e Geltrex). Também foi possível observar a diminuição na taxa de motilidade dessas células em todos os grupos expostos. A expressão das proteínas chaves para formação dos invadopódios (Cortactina, Dinamina-2 e Actina-F) também mostraram-se diminuídas na presença dos componentes da MEC e ainda, as proteínas pFAK e ERK, mostraram-se aumentadas. Já na linhagem celular PC-3, podemos observar redução na taxa de proliferação celular nos grupos com recobrimento da superfície (FN *coating*, FN+Geltrex e Geltrex) e aumento na taxa de motilidade nos grupos com recobrimento de Geltrex (FN+Geltrex e Geltrex). A Cortactina mostrou menor expressão no grupos FN+Geltrex quando comparada ao controle, e os demais grupos não apresentaram diferenças. Para a proteína Dinamina-2, observamos aumento na expressão no grupo FN solúvel quando comparada ao controle, e diminuição nos grupos FN *coating* e FN+Geltrex. Nas células PC-3, podemos observar a inconsistência nos dados obtidos, já que essa linhagem possui características avançadas na biologia dos tumores, como independência androgênica e a fatores de crescimento. Na linhagem celular LNCaP, foi possível observar maior suscetibilidade das respostas celulares ao microambiente oferecido, sendo assim, a FN e os componentes da MB, inibiram a formação dos invadopódios e a capacidade móvel dessas linhagem. Fica claro

que a FN tem papel supressor na motilidade celular para essas células tumorais, porém o processo de formação dos invadopódios é complexo e dependente de várias vias de sinalização. Os nossos resultados são importantes, em sua maioria inéditos, pois revelam a importância e a influência da FN na inibição do comportamento migratório e formação das projeções citoplasmáticas de células tumorais e encorajam estudos adicionais sobre essa relevante temática de migração celular no câncer.

ABSTRACT

During pathological processes like cancer, the migratory activity of neoplastic cells increases, being a critical step for the dissemination of these cells to distant organs. The migratory process depends on the formation of cytoplasmic protrusions called invadopodia, through actin polymerization and extracellular matrix degradation (ECM). ECM is a complex protein network that provides support and molecules responsible for tissue homeostasis. Among these proteins, fibronectin (FN) is an essential adhesive glycoprotein in normal conditions however, is unregulated in tumor tissue. The objective of this study was to evaluate the influence of FN, alone or in association with basement membrane (BM) components, within migratory process of prostatic tumor cells, with emphasis on the mechanism of invadopodia. For this, the LNCaP and PC-3 cell lines were divided into the following experimental groups: Control, FN soluble (10 μ g / mL), FN coating (10 μ g / mL), FN + Geltrex and Geltrex. Exposure time was established into 4 days. We could observe morphological alterations of the groups exposed to FN in LNCaP cells, with a decrease in the cellular area in comparison to the control group. Cell proliferation was increased in the groups with surface coating (FN coating, FN + Geltrex and Geltrex). It was also possible to observe a decrease in the motility rate of these cells in all the exposed groups. Key proteins expression important to invadopodia formation (Cortactin, Dynamin-2 and Actin-F) was also shown to be decreased in the presence of the ECM components, and the pFAK and ERK proteins were also increased. PC-3 cell line, was observed a reduction in cell proliferation rate in the groups with surface coating (FN coating, FN + Geltrex and Geltrex). Besides, an increase in the motility rate in the Geltrex coated groups (FN + Geltrex and Geltrex). Cortactin showed lower expression in the FN + Geltrex groups when compared to control, and the other groups did not present significant differences. FN soluble group showed an increase in the expression of Dynamin-2 when compared to the control, and a decrease in FN coating and FN + Geltrex groups. We note an inconsistency in data to PC-3 cells, since this lineage has advanced characteristics in the tumor biology, as androgen and growth factors independence. It was possible to observe a higher susceptibility of the cellular responses to LNCaP microenvironment, thus, the FN and BM components inhibited invadopodia formation and mobile capacity of this lineage. It is clear that FN plays a suppressive role in cell motility for these type of tumor, but the process of invadopodia formation is complex and depends on several signaling pathways. Our results showed important data, as they reveal the importance and influence of FN in inhibiting migratory behavior and formation of cytoplasmic projections of tumor cells and encourage further studies on this relevant issue of cell migration concerning cancer.

I. INTRODUÇÃO

1. Migração Celular

A migração celular é um processo fisiológico essencial ao desenvolvimento embrionário, reparo de feridas e sistema imunológico para combate de patógenos. Diferentes tipos celulares devem migrar através da membrana basal (MB) e tecidos como parte de suas funções normais ou em resposta ao microambiente (FRIEDL; WOLF, 2010). A migração das células depende do tipo celular e do ambiente extracelular, podendo estas migrar em agrupamentos ou individualmente (*single cell*) como ocorre na transição epitelial-mesenquimal e no movimento amebóide (FRIEDL; WOLF, 2010).

Uma característica chave da migração celular é a adesão da célula à matriz extracelular (MEC) e a formação de estruturas coletivamente chamadas de invadossomos (MURPHY; COURTNEIDGE, 2011). Em células normais, essas especializações incluem as estruturas lamelipódios, filopódios e podossomos e em células neoplásicas, os invadopódios. Tais estruturas são pequenos complexos, compostos de múltiplas moléculas, formados na membrana plasmática, conectando filamentos de actina à MEC via receptores transmembrana (ADAMS, 2001; WOLF et al., 2003).

A interação entre as proteínas e os eventos sinalizadores que constituem a base da mudança morfológica e que regulam a migração celular é integrada no conceito da adesão celular (BURRIDGE; CHRZANOWSKA-WODNICKA, 1996) e polimerização e contração da actina (Figura 1) (ADAMS, 2001; LAUFFENBURGER; HORWITZ, 1996). As protrusões celulares entram em contato com elementos da MEC adjacente via moléculas de adesão, com grande influência dos receptores transmembrana da família das integrinas (HYNES, 2002), que ativam quinases de adesão focal (FAKs), responsáveis pelo início da cascata de motilidade celular (MENG et al., 2009). As integrinas acoplam a actina do citoesqueleto via proteínas adaptadoras e em seguida agrupam-se para formar um pequeno complexo focal inicial, que pode crescer e se estabilizar dentro de minutos para formar um contato focal (BURRIDGE; CHRZANOWSKA-WODNICKA, 1996; HYNES, 2002; OTEY; BURRIDGE, 1990; ZAMIR et al., 2000).

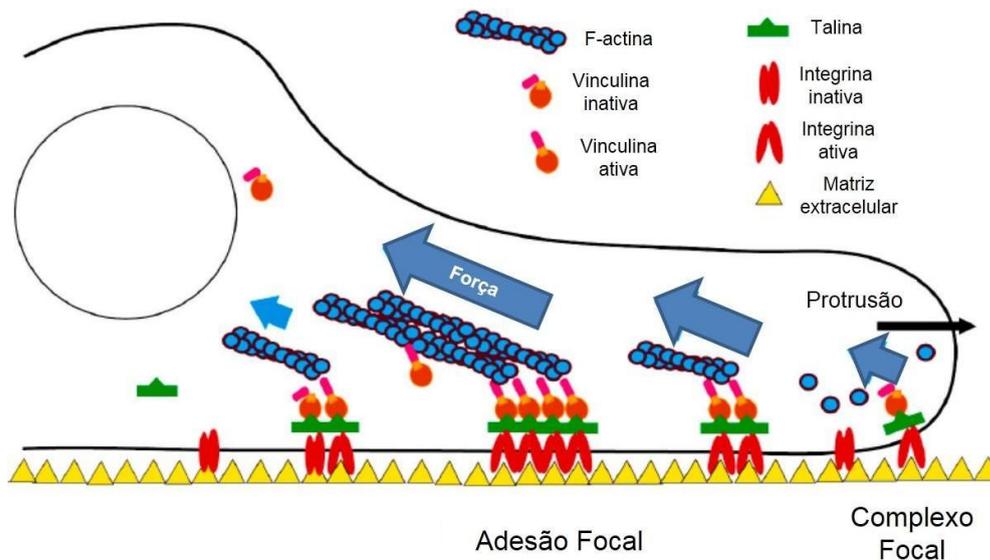


Figura 1: Esquema de formação do processo de adesão focal e proteínas envolvidas. Modificado de Humphries et al., 2007.

Nas células tumorais, estudos mostraram que FAK regula os invadopódios de uma maneira indireta, promovendo a localização espaço temporal de Src, membro da família de não receptores tirosina quinase frequentemente super expresso no câncer, além de ser um substrato para a proteína Tks5, responsável pela liberação de proteases (BURGER et al., 2014; CHAN; CORTESIO; HUTTENLOCHER, 2009). A eleição ou desarranjo dos componentes de sinalização como paxilina, FAK, p130Cas, RhoA-ROCK e calpaina, mostraram afetar a expansão dos invadopódios, polimerização de actina e degradação da MEC (BADOWSKI et al., 2007; BERDEAUX et al., 2004; BRÁBEK et al., 2004; PAN; CHEN; CHEN, 2011; TATIN et al., 2006). Durante o desenvolvimento do contato focal destinado à migração celular, filamentos de actina reúnem-se e se alongam localmente, através da ação de proteínas reticuladas como a α -actina e miosina II (CRAMER, 1999). Redes de actina ramificadas abaixo do folheto interno da membrana plasmática formam a actina cortical, enquanto as fibras de estresse são formadas por cabos alongados e abundantes de filamentos de actina (Figura 2) (BYERS; FUJIWARA, 1982).

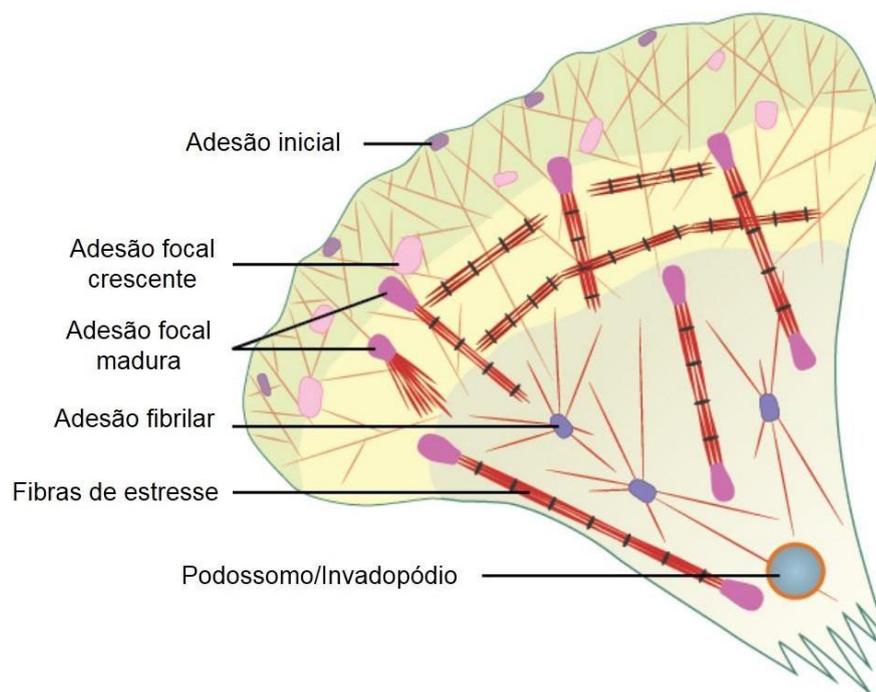


Figura 2: Detalhes da interação e do arranjo das moléculas de actina para a formação do processo de adesão focal. Usado e modificado com a permissão de MBInfo: www.mechanobio.info; Mechanobiology Institute, National University of Singapore.

Além disso, a polimerização de actina é mediada pelo complexo Arp 2/3 e membros da família WASP, que ao se ligarem a filamentos já existentes, induzem a formação de novos filamentos, que são estabilizados por proteínas como a Cortactina e a α -actinina (KELLEY et al., 2010). A desmontagem dos filamentos antigos irá gerar novos monômeros de actina necessários para formar novas protrusões nas extremidades frontais que dirigem o processo migratório, tarefa essa executada por membros da família Cofilina (WELCH; MULLINS, 2002).

A migração e invasão celular através das barreiras teciduais é importante para inúmeras condições fisiológicas e patológicas, como a transmigração de células do sistema imune e disseminação de células tumorais durante a metástase. A MEC funciona como uma barreira para a invasão celular, podendo também modular comportamento celular por interações diretas através de receptor (DOYLE et al., 2009; PROVENZANO et al., 2008; WOLF et al., 2003, 2007; WYCKOFF et al., 2006). A invasão celular em matrizes densas como a MB requer proteólise e remodelamento da MEC, a fim de criar rotas na qual as células podem migrar eficientemente (HOTARY et al., 2006; SABEH et al., 2004).

Desarranjos na sinalização de fatores de crescimento por mudanças na disponibilidade de ligantes ou mutação em moléculas de sinalização é uma característica comum na tumorigênese e progressão do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Embora alguns tipos

de adesão focal também tenham a função de ancorar a célula à MEC, os invadopódios são formados com a finalidade de invasão celular e, apesar de possuírem funções e morfologia distintas aos prolongamentos de células normais, compartilham muitas similaridades como descrito adiante (BUCCIONE; ORTH; MCNIVEN, 2004).

2. Invadopódios

Invadopódios são estruturas adesivas e invasivas que favorecem a migração de células neoplásicas através dos tecidos durante a metástase (REVACH; GEIGER, 2014). Embora os invadopódios tenham algumas similaridades moleculares com os podossomos, sabe-se que os invadopódios tem maior tempo de vida, chegando a horas (SHARMA et al., 2013), diferente dos podossomos que podem durar poucos minutos (YAMAGUCHI et al., 2005). Outra diferença é que os invadopódios projetam-se a partir do corpo celular e tem maior capacidade de degradação, comparado aos podossomos nas células não neoplásicas (MURPHY; COURTNEIDGE, 2011).

A formação dos invadopódios ocorre em três estágios: iniciação do invadopódio precursor, estabilização e maturação dos invadopódios (Figura 3) (BEATY; CONDEELIS, 2014). O primeiro passo é marcado pela formação de um prolongamento de actina, que ocorre em resposta a ativação de uma cascata de sinalização (ARTYM et al., 2011; OSER et al., 2009; YAMAGUCHI et al., 2005). A iniciação dos invadopódios envolve o recrutamento de proteínas como N-WASP, complexo Arp2/3 e cofilina em torno do complexo cortactina-actina. Esse processo envolve diversas proteínas como Tks5, Mena, SHIP2, Arg cinase, capazes de consolidar o complexo de proteínas envolvidas no processos de iniciação (EDDY et al., 2017). A proteína cortactina é frequentemente usada como marcador do prolongamento de actina e sua localização pode ocorrer simultaneamente (OSER et al., 2009) ou minutos depois (ARTYM et al., 2011) da chegada de proteases chaves como a metaloproteinase de membrana do tipo 1 (MT1- MMP ou MMP14).

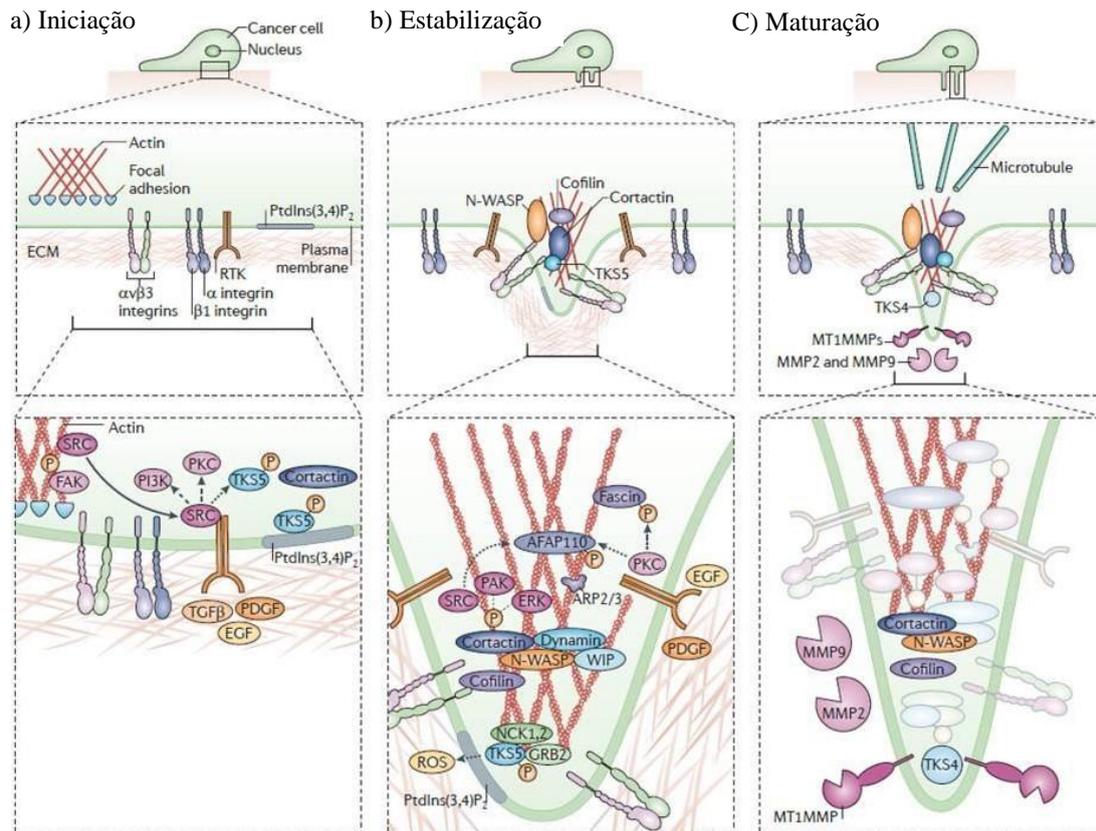


Figura 3. Estágios de formação dos invadopódios. Cada etapa de formação está representada em três níveis: i) a forma da estrutura em relação a célula; ii) representação simples das proteínas chave; e iii) visão molecular detalhada. **a)** No início da formação do invadopódio, as células estabelecem adesão focal com a matriz extracelular; **b)** A formação do invadopódio ocorre através do recrutamento e ativação da actina; **c)** Durante a maturação, o invadopódio promove a degradação da matriz extracelular através da ação de metaloproteínas de matriz. (Modificado de Murphy & Courtneidge 2011).

A fase de estabilização envolve a formação de novos filamentos de actina através de um mecanismo sinérgico entre a cofilina e Arp2/3, responsável pela polimerização da actina. Em suma, a polimerização de actina mediada pela cofilina gera filamentos-filhos que ativam vias de polimerização mediadas por N-WASP e complexo Arp 2/3 (BRAVO-CORDERO et al., 2013). Ambas proteínas, cofilina e N-WASP, mostraram-se capazes de ativar Arp2/3, um precursor de invadopódio, sugerindo que o papel central de Cdc42 na manutenção da ativação de Arp2/3 no invadopódio maduro. O Cdc42, membro da família de Rho GTPase, é essencial na polimerização de actina nos invadopódios, devido a habilidade de ativar diretamente N-WASP e então promover a nucleação de actina pelo complexo Arp 2/3 (MOREAU et al., 2003; NAKAHARA et al., 2003; ROHATGI et al., 1999; YAMAGUCHI et al., 2005). Apesar do papel central de Cdc42 na polimerização de actina nos invadopódios, fica claro o papel de

outros membros da família de Rho GTPases modulando a sinalização ou dinâmica de actina após ativação do Cdc42 (BRAVO-CORDERO et al., 2011). E por fim, a maturação do invadopódio se dá com a consolidação da polimerização da actina alongando o invadopódio e formando uma protrusão capaz de recrutar Metaloproteinases de Matriz (MMPs) e degradar a MEC (Figura 4).

Além das proteínas responsáveis pela nucleação, alongamento e ramificação dos filamentos, os invadopódios possuem estruturas em forma de anel constituídas por integrinas e proteínas relacionadas (MURPHY; COURTNEIDGE, 2011). As integrinas promovem uma ligação transmembrana entre a actina e a MEC, por intermédio de proteínas circulares como paxilina, talina e vinculina.

A formação dos invadopódios é iniciada em resposta a eventos de sinalização promotores de fenótipo migratório e invasivo, como adesão a MEC, fatores de crescimento, citocinas, proteínas da MEC, microRNAs, cálcio e espécies reativas de oxigênio (ROS) (DESTAING et al., 2011; HOSHINO; BRANCH; WEAVER, 2013; MURPHY; COURTNEIDGE, 2011). Cinasas possuem papel crítico como transdutores de sinal para regular a iniciação dos invadopódios, pois muitas dessas moléculas mostraram estar envolvidas em eventos de fosforilação.

Muitos fatores de crescimento são importantes na formação e atividade de invadopódios, como o fator de crescimento epidermal (EGF) (MADER et al., 2011; YAMAGUCHI et al., 2005), TGF- β (PIGNATELLI et al., 2012) e VEGF (LUCAS et al., 2010), capazes de aumentar o número de invadopódios. Muitas dessas vias de fatores de crescimento culminam no mesmo eixo de sinalização, especialmente cinases Src e família Rho GTPases, que controlam invadopódios (LINDER; AEPFELBACHER, 2003; MURPHY; COURTNEIDGE, 2011). Dentre os fatores que controlam a formação e função dos invadopódios, as cinases Src são a classe relacionada com mais vias de sinalização (BRANCH; HOSHINO; WEAVER, 2012). E ainda, ERK (AYALA et al., 2008; TAGUE; MURALIDHARAN; D'SOUZA-SCHOREY, 2004), outra proteína cinase, tem mostrado controlar a formação e maturação dos invadopódios (WEBB et al., 2005). Dinamina-2 é uma proteína da família de GTPases responsável pela ativação de ERK (MCNIVEN et al., 2000) e ainda, pode ser localizada em sítios de adesão focal e protrusões citoplasmáticas como lamelipódios e invadopódios. A dinamina-2 é responsável por desagregar as proteínas formadoras de adesão focal através da interação com FAK (EZRATTY; PARTRIDGE; GUNDERSEN, 2005).

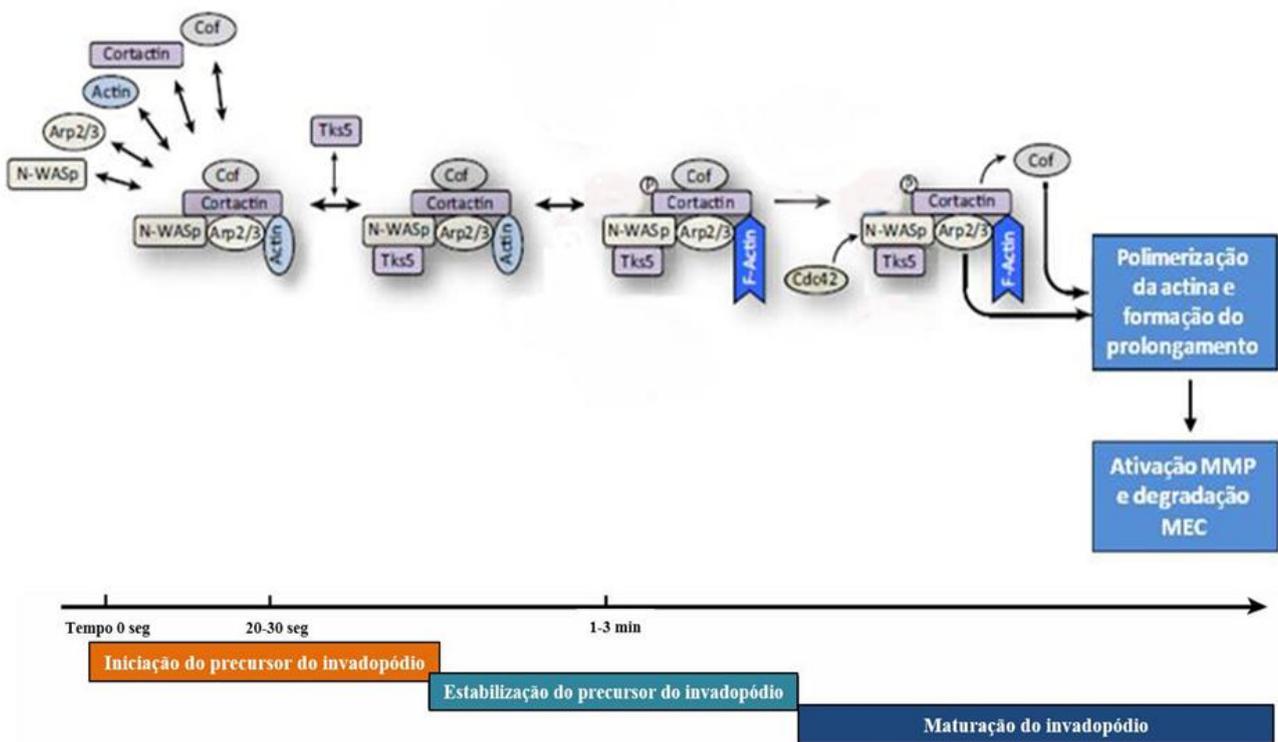


Figura 4. Proteínas precursoras da formação e maturação dos invadopódios. As proteínas cortactina, Arp 2/3, N-WASP formam um complexo de proteínas ligados à actina. Esse complexo é estabilizado com a chegada de Tks5 e inicia a nucleação e polimerização de actina. Com a formação do invadopódio, há o recrutamento de metaloproteinases de matriz responsáveis pelo remodelamento da MEC (Modificado: Eddy et al. 2017).

Invadopódios são tipicamente analisados em modelos de cultura bidimensional, facilitando a avaliação da habilidade de degradação da MEC. A formação de invadopódios e degradação da MEC ocorre em diversos tipos de células tumorais humanas (CLARK et al., 2007; MONSKY et al., 1994; SEALS et al., 2005) e trata-se de um mecanismo importante na atividade invasiva (COOPMAN et al., 1998; SCHOUMACHER et al., 2010). Em superfícies com substrato de MEC, invadopódios geralmente degradam matriz e projetam-se mais eficientemente que os podossomos (ALEXANDER et al., 2008; LINDER; WIESNER; HIMMEL, 2011; MURPHY; COURTNEIDGE, 2011). Em estudos usando técnicas tridimensionais, a atividade proteolítica tem sido localizada na base das protrusões invadopodiais (TOLDE et al., 2010; WOLF et al., 2007).

A interação dinâmica e bidirecional entre as células e a MEC pode regular migração, invasão, proliferação, morte, e também a diferenciação (HYNES, 2009; SCHULTZ et al., 2011). Diferentes propriedades físicas da MEC, como composição biomecânica, rigidez, elasticidade, densidade, ou a extensão da comunicação pode alterar o comportamento celular; em contrapartida, as células podem remodelar a MEC localmente usando proteases (HOTARY et al., 2006; TANG et al., 2013).

3. A matriz extracelular e o câncer

A MEC, um componente abundante nos tecidos, consiste em uma rede que interliga fibras proteicas, glicoproteínas e polissacarídeos incluindo colágeno, elastina, laminina e fibronectina. Nos tecidos, a MEC prove um arcabouço físico para ancoragem celular e gera força (MOTT; WERB, 2004). Além disso, regula processos como crescimento, migração, diferenciação, sobrevivência e morfogênese celular (NASCIMENTO et al., 2011; THEOCHARIS et al., 2015).

A MEC funciona como substrato e também como barreira para o avanço celular (ABERCROMBIE; DUNN; HEATH, 1977; FRIEDL; BRÖCKER, 2000; LAUFFENBURGER; HORWITZ, 1996), sendo uma estrutura dinâmica que ao interagir com as células controla seu comportamento por meio de sinais cíclicos (DALEY; PETERS; LARSEN, 2008). Dependendo do tipo celular e substrato extracelular, a formação do contato focal e a migração podem ser regulados por diferentes integrinas, como integrina $\alpha 5\beta 1$ que se liga à FN (CUKIERMAN et al., 2001); $\alpha 6\beta 1$ ou $\alpha 6\beta 4$ que se liga à laminina (RABINOVITZ; MERCURIO, 1997); e $\alpha 2\beta 1$ que se liga ao colágeno fibrilar (MAASER et al., 1999).

O envolvimento desses receptores de adesão leva ao recrutamento de proteases de superfície, como as MMPs, que degradam componentes da MEC próximos a superfície

celular (MAASER et al., 1999). A degradação da MEC por essas enzimas aumenta no desenvolvimento do câncer, levando ao remodelamento das propriedades biomecânicas, bioquímicas e físicas desse microambiente (SCHAEFER; REINHARDT, 2016). Esse remodelamento da MEC fornece um arcabouço para o avanço da protrusão celular, permitindo espaço para expansão e migração (FRIEDL et al., 1997).

A interação entre as células e o microambiente, seja a MEC ou células adjacentes, é vital para a manutenção dos processos celulares (BISSELL; HINES, 2011). Durante a tumorigênese, a interação com a MEC pode tornar-se desregulada pela alteração na expressão das integrinas e proteínas relacionadas a adesão focal, e também, devido ao rearranjo da arquitetura local e alteração na composição, estrutura e densidade da MEC (BRADBURY; FABRY; O'NEILL, 2012)(BRADBURY; FABRY; O'NEILL, 2012)(BRADBURY; FABRY; O'NEILL, 2012)(BRADBURY; FABRY; O'NEILL, 2012). *In vivo*, as células tumorais invasoras se deparam com dois grupos principais de MEC: a MB que interage diretamente com as camadas epiteliais e endoteliais, e a MEC intersticial. *In vitro*, componentes da MEC são comumente usadas como recobrimento da superfície de cultivo e, atualmente, componentes da MB sintéticos, como Matrigel ou Geltrex, tem sido usados a fim de mimetizar o microambiente *in vivo* (BRADBURY; FABRY; O'NEILL, 2012; LEE, 2007).

A MB é um polímero formado por laminina, com sítios de adesão para células epiteliais, e colágeno do tipo IV formando uma rede estabilizadora da estrutura, entre outros componentes (HALFTER et al., 2015). Dentre os componentes da MB, as lamininas são glicoproteínas formadas por três diferentes polipeptídeos, denominados α , β e γ . Tem sido mostrado que a laminina modula diferentes processos celulares como adesão, migração, crescimento e diferenciação (AUMAILLEY, 2013). Um passo crucial no desenvolvimento do tumor é a quebra proteolítica dos componentes da MB, como a laminina, através da ação de proteases específicas secretadas pelas células tumorais e também pelas células estromais adjacentes (BONNANS; CHOU; WERB, 2014). Esse processo não apenas remove as barreiras físicas da invasão celular mas também revela peptídeos bioativos (SCHENK; QUARANTA, 2003). Um crescente número de evidências tem mostrado que os peptídeos derivados da quebra de lamininas pode controlar o comportamento do tumor (CAPUANO; JAEGER, 2004; KIKKAWA et al., 2013). Dentes esses peptídeos, podemos destacar o C16, derivado do canal γ da laminina-111, peptídeo relacionado a migração celular atividade metastática e angiogênese (KURATOMI et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2011), mostrando ser um regulador na formação e atividade dos invadopódios (NASCIMENTO et al., 2011).

Dentre os componentes da MEC, a FN (Figura 5) é uma glicoproteína multifuncional encontrada no plasma e na MEC dos tecidos, expressa por muitos tipos celulares, possuindo papel chave na adesão celular e no comportamento migratório (MAGNUSSON; MOSHER, 1998). A molécula funcional de FN consiste em duas subunidades similares de 220-250 kDa ligadas por duas ligações dissulfeto na extremidade C-terminal formando um dímero. Cada monômero possui três tipos de unidades de repetições chamadas: tipo I, II, III. Dentre as suas propriedades estão: a manutenção da morfologia normal, adesão, migração, diferenciação e proliferação celular (WHITE; BARALLE; MURO, 2008).

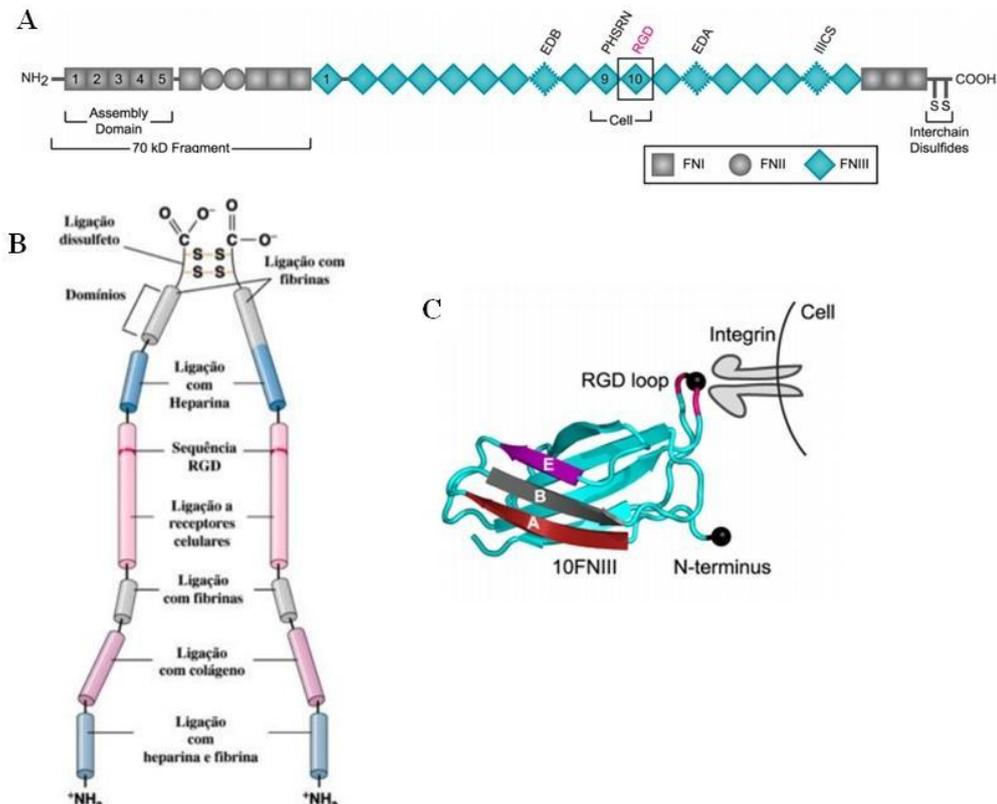


Figura 5: Estrutura da fibronectina (FN) e seus domínios de ligação. **A.** Cada braço é composto por uma combinação de repetições FI, FII e FIII com inserções ou deleções nas regiões de *splicing* alternativo; **B.** Representação simplificada do dímero de FN e os domínios de ligação à outras moléculas; **C.** Estrutura tridimensional repetição de FN tipo III com ligação à integrina. (Modificado de Becker et al., 2005; Gee et al., 2013).

Embora as moléculas de FN sejam codificadas por um único gene, as proteínas resultantes possuem diversas isoformas decorrentes de *splicing* alternativo do RNAm, gerando aproximadamente 20 variantes de FN humana. A principal região de *splicing* ocorre nas repetições do tipo III, levando a duas repetições conhecidas como EDB e EDA (PANKOV; YAMADA, 2002).

Com base na solubilidade, a FN pode ser subdividida em duas formas: FN plasmática e FN celular. A FN solúvel é um constituinte abundante no plasma (300µg/ml) e outros fluídos corporais; já a forma insolúvel é encontrada como componente da MEC. A FN plasmática é sintetizada pelos hepatócitos no fígado e mostra padrões de *splicing* relativamente simples. Já a FN celular consiste em um grupo heterogêneo de isoformas da FN resultante dos padrões de *splicing* dependente do tipo celular (PANKOV; YAMADA, 2002).

Componente ubiquitinado da MEC, a FN provê conexões com as células através das integrinas e outros receptores, além de regular a diferenciação, adesão, e migração das células. Embora a FN seja amplamente conhecida como promotora de adesão das células ao substrato, esta proteína multidomínio tem muitas características estruturais e funcionais interessantes aquém da adesão celular (SCHWARZBAUER; DESIMONE, 2011).

A FN apresenta expressão desregulada em células neoplásicas com elevado potencial metastático e por possuir papel crucial na adesão e motilidade celular, representa portanto, um elemento determinante no sucesso metastático de células neoplásicas (URTREGER et al., 2006). Contudo, ainda não existe consenso se a FN auxilia ou suprime a progressão tumoral. Alguns autores propõem que a FN possui um papel supressor, pois mesmo em baixa concentração poderia diminuir invasão e metástase por aumentar a coesão entre as células e impedir o seu desprendimento da massa tumoral (JIA et al., 2012; ZHANG et al., 2009). No entanto, outros grupos de pesquisa acreditam que a FN ao invés de suprimir o potencial metastático e invasivo pode, pelo contrário, auxiliar na proliferação e invasão celular (KNOWLES; MALIK; PILCH, 2013; PENTYALA et al., 1998).

Deep et al. (2014) analisaram a influência da silibinina, um flavonóide natural, no processo de sinalização relacionada a motilidade celular induzida pela FN. Para isso, células neoplásicas prostáticas (PC-3) foram semeadas em placas recobertas com FN (5µg/ml) e expostas ou não a silibinina em diferentes concentrações. O estudo mostrou que o flavonóide diminui a morfologia móvel e aderência das células PC-3, além de diminuir a motilidade das células nos ensaios de migração e invasão. Porém as células expostas apenas a FN mostraram citoesqueleto robusto com filamentos de actina formando projeções citoplasmáticas, e ainda, a exposição a FN ativou importantes componentes da via de sinalização responsáveis pela

motilidade celular como integrina $\alpha 5\beta 1$, FAK e seu resíduo Tyr925, Src, Cdc42, Rac, Arp2/3, Cortactina, entre outras. Dessa forma, fica evidente que a FN tem importante influência na motilidade e capacidade de invasão das células tumorais (DEEP et al., 2014).

Resultados recentes do nosso grupo de pesquisa mostraram que a exposição à FN (25 μ g/mL) diminuiu a migração das células tumorais neoplásicas LNCaP e PC-3 nas primeiras 24 horas de exposição (dados não publicados). Outros achados do nosso grupo, mostram que a exposição das células a FN (10 μ g/mL), em associação ou não ao Geltrex, modifica a expressão de genes relacionados a adesão celular, como as caderinas, e genes relacionados a proliferação, como STAT3. Tais achados, em processo de publicação, nos mostram que a FN modula o comportamento celular, diminuindo a migração. Dessa forma, esse dados suportam nossa hipótese que a FN diminui as modificações estruturais que ocorrem no processo de motilidade celular.

O complexo padrão de alterações adquiridos pelas células tumorais pode influenciar em uma variedade de funções celulares, incluindo proliferação, migração, invasão, sobrevivência e capacidade de induzir a angiogênese (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011). Além das alterações moleculares adquiridas pelas células tumorais, durante a progressão do tumor as células mantem uma complexa interação com o microambiente ao redor, o qual pode influenciar o comportamento tumoral (NIENHUIS et al., 2015).

Fica claro, portanto, que a MEC é uma estrutura dinâmica que provem sinais para as células normais. A FN é um importante componente da MEC e tem sido amplamente estudada para a identificação de propriedades que levariam a variação em suas funções (WHITE; BARALLE; MURO, 2008). Assim, é de grande importância entender também a interação da FN com células neoplásicas, seja *in vivo* como *in vitro*, para comprovar e descrever mais detalhadamente a influência dessa molécula em diversos tipos de câncer (HYNES, 1990; ZHANG et al., 2009).

4. Modelos de estudo *in vitro*

A cultura celular humana e animal são ferramentas importantes amplamente usadas na ciência. Diferentes tipos de cultura celular são modelos de estudo para doenças (dentre elas o câncer), técnicas de fertilização *in vitro*, células tronco, produção de anticorpos monoclonais e medicina regenerativa (JEDRZEJCZAK-SILICKA, 2017). Desde o estabelecimento das células HeLa, linhagens celulares tumorais imortalizadas são estudadas como modelos biológicos para investigar a biologia dos tumores (por exemplo, a iniciação, progressão, metástase, microambiente tumoral e célula tronco tumoral) e o desenvolvimento de novas terapias (JEDRZEJCZAK-SILICKA, 2017). Sabe-se que dados obtidos na pesquisa básica

usando cultura de células não são clinicamente representativos devido a heterogeneidade das células tumorais e os mecanismos relacionados a resistência às terapias (MITRA; MISHRA; LI, 2013). As linhagens celulares usadas como ferramenta de estudo podem possuir limitações, como: aberrações genéticas durante o cultivo; microambiente diferente do *in vivo*; contaminação cruzada com outros tipos celulares; mudanças na morfologia, expressão gênica e várias vias celulares; contaminação por micoplasma e outros patógenos, perda da heterogeneidade natural do tecido ou tumor (EDMONDSON et al., 2014; SOUZA et al., 2016). Pesquisas com linhagens tumorais são a oportunidade de entender a biologia dos tumores e permitir um alto nível de conhecimento para o desenvolvimento de novas drogas (MITRA; MISHRA; LI, 2013; VALYI-NAGY, 2014). Atualmente, estudos estão direcionando os tratamentos para o uso de marcadores moleculares específicos ao genoma do paciente, promovendo uma terapia personalizada contra o câncer (MITRA; MISHRA; LI, 2013).

O cultivo bi-dimensional (2D) em monocamada tem várias limitações como por exemplo a perda da arquitetura específica do tecido e interação célula-célula (SOUZA et al., 2016; TECHNOLOGIES, 2012). Novas técnicas de cultivo celular aprimoraram o microambiente das culturas, como por exemplo, os modelos de cultura tri-dimensional (3D). Esse tipo de cultura 3D de células dependentes de ancoragem usam hidrogéis sintéticos de componentes da MEC ou MB, como o Matrigel e o Geltrex (HÄRMÄ et al., 2010; HUTMACHER et al., 2010; ZAMAN, 2013), mimetizando a MEC e formando um arcabouço para as células (RODRÍGUEZ-HERNANDEZ, 2014) e ainda, permitem analisar e compreender o crescimento, migração e resistência a terapia em células tumorais. Dentre as vantagens da cultura 3D, podemos destacar: modelo *in vitro* mais fidedigno ao tecido; propriedades bioquímicas e morfológicas específicas para cada tecido; interação célula-célula e célula-MEC (essenciais para processos como diferenciação e proliferação); aumenta a acurácia da arquitetura tecidual; apresenta maior fidelidade em experimentos relacionados a biologia dos tumores e drogas (SOUZA et al., 2016).

Inúmeros estudos mostram a associação do microambiente na progressão de diversos tumores como pulmão, ovário, cólon e o câncer de próstata (CaP), através de mecanismos de migração como formação dos invadopódios e vias de sinalização relacionados a cascata da motilidade (MENG et al. 2009; DOCHEVA et al. 2010; BURGER et al. 2014; SIQUEIRA et al. 2016; BEGUM et al. 2017; NARGIS et al. 2018). Dentre os diversos tipos de tumores que acometem os homens, o CaP apresenta alta taxa de reincidência associada à migração celular, com metástases ósseas diminuindo em até 25% a sobrevivência dos pacientes acometidos por essa

malignidade (BUBENDORF et al., 2000; HELLERSTEDT; PIENTA, 2002; NØRGAARD et al., 2010; STURGE; CALEY; WAXMAN, 2011).

Durante o desenvolvimento do CaP, um fator indispensável é a sinalização mediada por andrógenos e seus receptores (RISBRIDGER et al., 2010). Os tratamentos convencionais mais aceitos são radiação e prostatectomia radical (ROSENTHAL; SANDLER, 2010), sendo estratégias terapêuticas com alta taxa de sucesso (PAYNE, 2009), porém após uma média de 12-33 meses, a doença reincide apesar dos tratamentos anti-androgênicos (HELLERSTEDT & PIENTA 2002). A insensibilidade ao tratamento anti-androgênicos está associado a progressão da doença levando a metástases múltiplas, mais frequentemente no tecido ósseo (BUBENDORF et al., 2000; NØRGAARD et al., 2010).

Duas das linhagens de células humanas de CaP mais utilizadas para estudos *in vitro* são a LNCaP e a PC3 (PEEHL, 2005). A linhagem celular LNCaP, dependente de andrógeno, é proveniente do linfonodo supraclavicular esquerdo de um homem caucasiano de 50 anos com diagnóstico de CaP metastático. As células LNCaP produzem fosfatase ácida prostática e o antígeno específico prostático (PSA), além de expressarem AR, ER, EGF e TGF α e β (Murphy, 1980). A LNCaP possui morfologia fusiforme com presença de finas projeções citoplasmáticas e núcleo volumoso em relação ao citoplasma. Geralmente expandem agrupadas umas sobre as outras (processo denominado *cluster* em inglês) formando massas disformes. Sua morfologia consiste em células fusiformes e alongadas, núcleo grande e picnótico, além de grande contato célula-célula. Já a linhagem celular PC3 é independente de andrógeno, é proveniente de metástase óssea de um homem caucasiano de 62 anos com diagnóstico de CaP metastático, além de apresentarem baixa atividade da fosfatase ácida e da di-hidrotestosterona 5- α redutase (KAIGHN et al., 1979). As células PC-3 apresentam padrão morfológico variado, sendo possível observar células com formato poligonal e fusiforme com diferentes tamanhos, além de serem multinucleadas. A morfologia da linhagem celular PC-3 permite observar melhor os detalhes do citoesqueleto e o comportamento da actina-F, pois as células apresentam grandes e variados prolongamentos citoplasmáticos como lamelipódios e filopódios. Algumas dessas células se destacam pelo seu formato aberrante e presença de múltiplos núcleos.

Utilizando tais linhagens celulares no estudo da motilidade das células neoplásicas e visto a dualidade de evidências sobre o papel da FN, o nosso estudo espera contribuir com novas respostas consistentes sobre a influência desse componente da MEC nos mecanismos moleculares da migração celular e na formação dos invadopódios, estruturas fundamentais para a migração e invasão tumoral.

II. HIPÓTESE

Considerando as informações acima descritas, nossa hipótese é a de que a FN possua impacto significativo, retardando o processo de migração celular e controlando negativamente proteínas responsáveis pela formação dos invadopódios em células neoplásicas malignas.

III. OBJETIVOS

Avaliar a influência da FN, isolada ou em associação com componentes da MB, no processo migratório de células neoplásicas malignas, com ênfase nos mecanismos de formação dos invadopódios.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Cultivar células neoplásicas malignas expostas à FN: i) solúvel; ii) polimerizada como cobertura em placa de cultura; ou iii) associada a uma MB sintética;
- ✓ Analisar a morfologia das células, através de marcação para Actina-F, com especial atenção à formação de prolongamentos citoplasmáticos, nos grupos expostos;
- ✓ Verificar as taxas de proliferação celular através do ensaio de MTT;
- ✓ Analisar o processo de migração das células expostas e não expostas à FN, empregando placas com sistema de insertos *transwell*;
- ✓ Localizar por imunofluorescência as proteínas Cortactina e MMP-14, envolvidas na formação dos invadopódios;
- ✓ Quantificar, por Western Blotting, as proteínas Actina-F, Cortactina, Dinamina-2, ERK 1/2, pFAK.

V. MATERIAL E MÉTODOS

1. Linhagens celulares neoplásicas e condições de cultura

O nosso trabalho utilizou as células metastáticas prostáticas LNCaP e PC-3, adquiridas junto à empresa *American Type Culture Collection* (ATCC) e constituintes do nosso banco de células neoplásicas malignas, como ferramentas biológicas para o desenvolvimento dos experimentos. A linhagem celular LNCaP (clone FGC - ATCC[®] CRL-1740TM) tem características de um adenocarcinoma prostático dependente de andrógeno, enquanto a linhagem celular PC-3 (ATCC[®] CRL-1435TM) independe de estímulos hormonais. Ambas linhagens celulares foram cultivadas em meio RPMI 1640 (GibcoTM; 11875093) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GibcoTM; 16000044) e 1% de antibiótico/antimicótico (GibcoTM; 15240062). Os meios foram trocados a cada 2 dias durante a expansão e utilização das células e foi realizado o monitoramento das culturas empregando microscópio invertido (Zeiss Axiovert[®], Alemanha). Todas as células foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ em atmosfera úmida a 37°C. O comitê de ética não se faz necessário por tratar-se de linhagens celulares estabelecidas e patenteadas pela ATCC, que mantém a responsabilidade sobre as células.

2. Teste para detecção de Micoplasma nas linhagens celulares

Um teste molecular para detecção de micoplasma foi realizado como medida preventiva antes de iniciar a exposição das diferentes linhagens celulares aos componentes da MEC. O kit utilizado foi o *VenorTMGeM Mycoplasma Detection Kit*, PCR-based (Sigma-AldrichTM) e as indicações do fabricante foram seguidas durante a sua execução. Optamos em realizar o teste durante a expansão celular prévia à montagem das placas para os experimentos com componentes da MEC. Para isso, o sobrenadante celular foi coletado e preparado para a técnica de PCR em gel de agarose. O teste molecular para detecção de micoplasma nas linhagens celulares LNCaP, PC3 e RWPE-1 (linhagem de células prostáticas normais, não utilizada nesse trabalho) teve resultado negativo para todas as amostras (Figura 6). Esses resultados garantem a qualidade das células utilizadas nesse projeto e nos demais projetos do nosso laboratório, já que a contaminação por micoplasma compromete o metabolismo da célula e a sua sobrevivência.

6. Teste para Detecção de Micoplasma

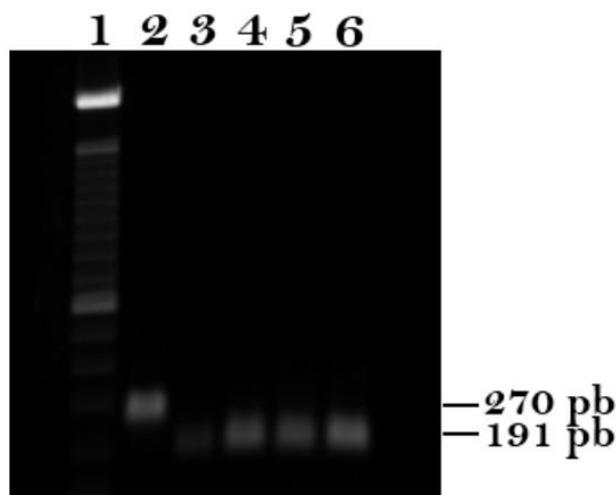


Figura 6: Resultado do teste molecular para detecção de *Mycoplasma* sp. Linha 1: padrão de peso molecular. Linha 2: Controle positivo. Linha 3: Controle Negativo. Linha 4: Amostra LNCaP. Linha 5: Amostra PC-3. Linha 6: Amostra RWPE-1.

3. Exposição das células à fibronectina

As células LNCaP e PC-3 foram divididas em cinco grupos experimentais: Controle, FN solúvel, FN *coating*, FN+ Geltrex e Geltrex. O período de exposição foi de 4 dias. Cada grupo experimental está detalhadamente descrito a seguir:

- i. Controle:** As células do grupo controle foram semeadas diretamente no plástico da placa de cultura e receberam meio padrão como descrito no tópico 1.
- ii. FN solúvel:** Para esse método a FN foi dissolvida em meio de cultura padrão na concentração de 10 µg/mL (Li et al. 2011) que, posteriormente foi adicionado às células semeadas;
- iii. FN *Coating*:** a técnica de *coating* permite o contato com a molécula da MEC em apenas uma das superfícies celulares, o que acarreta polaridade na cultura. Dessa forma a FN (Sigma-Aldrich™, St. Louis, MO) foi diluída em D-PBS (GIBCO BRL, Grand Island, NY) na concentração de 10 µg/mL (Docheva et al. 2010) e colocada no fundo dos poços da placa, revestindo-o. Após secar em temperatura ambiente por 45 min, o excesso foi aspirado e as células foram semeadas e cultivadas em meio padrão.
- iv. FN + Geltrex:** Foi utilizada uma MB sintética com fatores de crescimento reduzidos (Geltrex - GIBCO BRL, Grand Island, NY) e a técnica baseou-se nos

protocolos de Lee et al., (2007). Dessa forma, os poços da placa de cultura (Millipore Corp., Billerica, MA, USA) foram preenchidos por Geltrex ($50 \mu\text{L}/\text{cm}^2$) e incubados por 30 min a 37°C para permitir a polimerização dessa matriz. Posteriormente, as células foram semeadas na superfície da MB e ficaram incubadas com 1mL de meio padrão para aderirem a superfície. Após a adesão das células, foi adicionado mais 25% de Geltrex + $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ de FN solúvel.

v. Geltrex: Foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item **iv**. Dessa forma, os poços da placa de cultura (Millipore Corp., Billerica, MA, USA) foram preenchidos por Geltrex ($50 \mu\text{L}/\text{cm}^2$) e incubados por 30 min a 37°C para permitir a polimerização dessa matriz. Posteriormente, as células foram semeadas em superfície com componentes da MB e ficaram incubadas com 1mL de meio padrão para aderirem a superfície. Após a adesão das células, foi adicionado mais 25% de Geltrex.

4. Viabilidade Celular.

Após exposição aos componentes da MEC por quatro dias, a viabilidade celular foi avaliada e o resultado comparado à viabilidade das células LNCaP e PC-3 do grupo controle (cultivadas apenas em meio padrão). As células com viabilidade igual ou maior que 90% foram utilizadas, afim de garantir a confiabilidade dos experimentos. Para isso, as células foram tripsinizadas e as amostras tratadas com azul de tripano 0,4% (Gibco/Invitrogen™) (volume 1:1), contadas em câmara de Neubauer e visualizadas por microscopia de luz. Foram consideradas viáveis as células translúcidas e inviáveis as células coradas pelo azul de tripano.

5. Ensaio de proliferação celular por MTT

As taxas de proliferação das células expostas aos componentes da MEC foram avaliadas através do ensaio de MTT (3,4,5- dimethylthiazol-2yl-2,5 difenil tetrazolium bromide). Esse ensaio baseia-se na capacidade das desidrogenases mitocondriais clivarem o anel de tetrazolium, promovendo a formação de cristais roxos.

O ensaio de proliferação foi feito através do *MTT Cell Proliferation Assay* (Sigma-Aldrich™, M2128), seguindo as instruções do fabricante. Os experimentos utilizaram triplicatas experimentais e três experimentos independentes foram realizados. As concentrações das células foram estabelecidas de acordo com a taxa de crescimento de cada linhagem celular mostrado pela empresa *American Type Culture Collection* (ATCC), sendo: $0,5 \times 10^4$ células/poço para LNCaP e $0,1 \times 10^4$ células/poço para PC-3.

Após exposição aos diferentes componentes da MEC por 4 dias, colocamos 100µL de MTT (5mg/mL) diluído em meio sem SFB nos poços de cultura (placa de 96 poços). A incubação do MTT foi realizada por 4 horas à 37°C. O sobrenadante foi então removido e a cada poço adicionou-se 200µL DMSO antes da leitura, realizada em um aparelho de leitura ELISA em filtro de 580nm.

6. Análise da Morfologia e da Morfometria Celular

A morfologia geral e a análise do citoesqueleto das células LNCaP e PC-3, expostas ou não aos componentes da MEC, foram analisadas após a conjugação da sonda fluorescente *Alexa Fluor™ 568 Phalloidin*. Para isso, as células foram fixadas em Formalina 10% por 8 min, lavadas com PBS, permeabilizadas com triton 0,1% e bloqueadas por 40 min com BSA 3%, a temperatura ambiente. Em seguida foi feita a exposição das células à faloidina conjugada com *Alexa Fluor 568* (fluorescência vermelha, 1:200). O núcleo das células foi marcado em azul fluorescente com *DAPI* (4',6-diamidino-2-phenylindole) no momento da montagem das lâminas. As células foram analisadas e fotografadas no aumento de 63X em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica®-TCS-SPE) do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP.

Dez imagens das células marcadas com *Alexa Fluor™ 568 Phalloidin* no aumento de 63X foram utilizadas para analisar área celular e contagem de projeções citoplasmáticas das células LNCaP e PC-3. A análise da intensidade de fluorescência (*Pixel count*) vermelha da faloidina foi realizado a partir de cinco fotos, onde o contorno das células foi delimitado e analisado pelo *software Image J*. A contagem das projeções citoplasmáticas foi realizada utilizando o contador *Interactive Measurement Counting* do programa Leica® Kwin. A área celular foi mensurada multiplicando-se a largura pelo comprimento das células fotografadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica®- TCS-SPE), a partir do programa *Image J*.

7. Ensaio de Migração em Sistema de Inseto Transwell

Para a avaliação do potencial migratório das células foram utilizados insertos Thin Cert™ com membranas contendo poros de 8µm (Greiner Bio-One) em placa de 24 poços. Os experimentos utilizaram duplicatas experimentais. Na parte superior do inserto as células das linhagens tumorais foram semeadas na quantidade de 1×10^5 células/poço para LNCaP e 2×10^4 células/poço para PC-3. Receberam meio padrão RPMI sem SFB, adicionado ou não dos

componentes da MEC: FN solúvel, coating ou agregada ao Geltrex. Já na parte inferior, foi adicionado apenas meio RPMI contendo 10% de SFB. Insetos contendo apenas meio de cultura padrão ou Geltrex também foram montados.

Posteriormente as placas com os insetos foram incubadas durante 24 horas para as células LNCaP e 18 horas para PC-3, de acordo com o tempo de duplicação de cada linhagem celular mostrado pela empresa *American Type Culture Collection* (ATCC). Após incubação as células foram fixadas com metanol por 10 min, e aquelas que não migrarem, ou seja, que permaneceram na parte superior do inserto, foram retiradas por raspagem. As células que migraram através dos poros da membrana foram coradas com solução de azul de toluidina a 0,1% durante 10 segundos e fotografadas com a objetiva de 5x em microscópio invertido (Zeiss Axiovert[®], Alemanha).

8. Imunofluorescência

As lamínulas de vidro contendo as células LNCaP e PC-3 dos grupos experimentais foram lavadas com PBS (3x) e fixadas com metanol P.A. por 8 min. Após fixadas, as células foram lavadas novamente com PBS, permeabilizadas com triton 0,1% e bloqueadas *por 40 min* com BSA 3%, a temperatura ambiente.

Em seguida, os anticorpos primários citados na Tabela I, diluídos em BSA 1%, foram aplicados e incubados durante 2 horas em temperatura ambiente. Após, as células foram lavadas com PBS e incubadas com os anticorpos secundários apropriados, também diluídos em BSA 1% (Tabela I) durante 1 hora em temperatura ambiente. O excesso de anticorpo secundário foi retirado com PBS e as lamínulas contendo as células foram montadas sob lâminas em meio de montagem para fluorescência VECTA SHIELD[®], *mounting medium for fluorescence with DAPI – Vector Laboratories*, para posterior observação ao Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica[®]-TCS-SPE) do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP.

Tabela I: Relação dos anticorpos primários e secundários usados para a técnica de imunofluorescência.

Anticorpo Primário	Fabricante	Código Catálogo	Diluição
Cortactina	Abcam	ab81208	1:1000
MMP-14	Santa Cruz	sc12367	1:200
Anticorpo Secundário	Fabricante	Código Catálogo	
Anti Rabbit	Santa Cruz	sc2012	1:200
Anti Goat	Santa Cruz	sc2024	1:200

9. Western Blotting

A expressão das proteínas Actina-F, Cortactina, Dinamina-2, ERK 1/2, pFAK e GAPDH foi analisada e quantificada por meio de Western Blotting. Foi feita triplicata experimental para cada grupo experimental e ainda, foram feitos três experimentos independentes, sendo três replicatas biológicas.

Após serem lavadas com PBS, as células receberam tampão de lise RIPA (Pierce, IL, EUA), adicionado de coquetel inibidor de protease/fosfatase (Sigma CO, Saint Louis, MO, USA). Após 24 horas de incubação a -20°C com o tampão de lise, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 12000 rpm a 4°C por 10 min. Em seguida, foi feita a coleta do sobrenadante e a quantificação das proteínas resultantes usando espectrofotômetro NanoVue[®] (GE Healthcare). Aliquotas do extrato celular (30 μg) foram diluídas em tampão de amostras, aquecidas e separadas em SDS-PAGE a 10% em sistema de eletroforese *Mini Protean III* (BioRad, Califórnia, USA). As proteínas separadas no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose 0,2 μm (BioRad, Califórnia, USA) e, posteriormente bloqueadas com leite desnatado 3% diluído em TBS-Tween e incubadas com os diferentes anticorpos primários descritos na Tabela II durante aproximadamente 16 horas. Depois de lavadas em TBS-Tween, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (Tabela II) por 2 horas e reveladas pelo sistema de detecção *ECL[®] Selected Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Após a captura da imagem em transiluminador *G-Box* foi feita a quantificação densitométrica das bandas utilizando o programa *Image J*.

Tabela II: Relação dos anticorpos primários e secundários usados para a técnica de western blotting.

<i>Anticorpo Primário</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Código Catálogo</i>	<i>Diluição</i>
Cortactina	Abcam	ab81208	1:15000
Dinamina	Abcam	ab3457	1:5000
Actina-F	Santa Cruz	sc1615	1:800
ERK 1/2	Santa Cruz	sc514302	1:1000
pFAK	Santa Cruz	sc81493	1:1000
GAPDH	Santa Cruz	sc47724	1:5000
<i>Anticorpo Secundário</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Código Catálogo</i>	<i>Diluição</i>
Anti Rabbit	Santa Cruz	sc2030	1:5000 - 1:10000
Anti Mouse	Abcam	ab6789	1:5000 - 1:10000
Anti Goat	Santa Cruz	sc2378	1:2000

10. Análises Estatísticas

Foi realizado o teste de homocedasticidade e normalidade (Shapiro-Wallis test) para averiguar como os dados se comportam em relação a sua distribuição, classificando-os como paramétricos ou não-paramétricos. Posteriormente, utilizamos o teste estatístico para análise de variância – ANOVA, com “a posteriori” de Tuckey- Kramer. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

VI. RESULTADOS

1. Viabilidade

A viabilidade das células LNCaP e PC-3 não foi afetada por nenhuma das exposições. Os valores foram obtidos através da contagem relativa de células vivas e mortas utilizando o corante azul de tripan (Figuras 7A e B). Destaca-se que a média geral (contendo o resultado de todos os grupos experimentais/célula) da viabilidade celular para as células LNCaP e PC-3 foi, respectivamente, 83,53% (SEM = 3,39) e 94,25% (SEM = 1,54).

2. Proliferação Celular

Células da linhagem LNCaP (Figura 8A) apresentaram aumento na taxa de proliferação celular nos grupos com recobrimento da superfície: FN *coating*, FN+Geltrex e Geltrex em comparação com o grupo controle. O grupo FN solúvel não apresentou diferença em relação ao grupo controle. Para as células PC-3 (Figura 8B), o ensaio de proliferação mostrou diminuição nos grupos com recobrimento FN *coating*, FN+Geltrex e Geltrex em relação ao controle. O grupo FN solúvel não apresentou alterações em comparação com o grupo controle.

3. Morfologia e Morfometria Celular

Para investigar as mudanças morfológicas das linhagens LNCaP e PC-3, utilizamos marcação com faloidina-rodamina, que define a actina-F presente no citoplasma, e observamos através microscopia confocal de fluorescência.

Células LNCaP

A LNCaP possui morfologia fusiforme com presença de finas projeções citoplasmáticas e núcleo volumoso em relação ao citoplasma (Figura 9A). Na presença de FN solúvel, as células LNCaP apresentaram grandes prolongamentos com acúmulo de actina na região citoplasmática cortical, principalmente na extremidade dos prolongamentos (Figura 9B). Ainda no grupo FN solúvel, algumas células adjacentes mostraram comunicação através de projeções mais finas e alongadas. Quando expostas a FN *coating*, as células apresentaram-se isoladas, com prolongamentos mais curtos (e predomínio de actina na região cortical do citoplasma) ou agregadas e mantendo os prolongamentos citoplasmáticos visíveis (Figura 9C).

Na presença de componentes da MB, em associação ou não à FN, as células LNCaP mostraram-se mais agregadas, com morfologia menos fusiforme e mais arredondadas, com curtos prolongamentos citoplasmáticos (Figuras 9D e 9E). Nesses grupos é possível observar

que a actina-F concentrou-se logo abaixo da membrana citoplasmática, contornando as células.

Quanto à marcação para actina-F, o grupo FN solúvel apresentou maior intensidade e o grupo FN *coating* teve menor intensidade, em relação ao grupo controle (Figura 9F). Os demais grupos FN+Geltrex e Geltrex não apresentaram diferenças na intensidade de marcação para actina-F.

O número de projeções citoplasmáticas não foi diferente entre os grupos experimentais e o grupo controle (Figura 10A), apesar dos grupos FN *coating*, FN+Geltrex e Geltrex apresentarem projeções mais curtas, como citado acima.

Agrupadas e analisadas pelas suas dimensões na forma de área celular, as células LNCaP revelaram variação de 100 a 2000 μm^2 (Figura 10B). O grupo controle e o grupo FN *coating* tiveram predomínio de tamanho celular entre 500 e 1000 μm^2 . Já os demais grupos (FN solúvel, FN+Geltrex e Geltrex) apresentaram predomínio de células menores, com tamanho variando entre 100 e 500 μm^2 .

Células PC-3

As células PC-3 apresentam padrão morfológico variado, sendo possível observar células com formato poligonal e fusiforme com diferentes tamanhos, além de serem multinucleadas (Figura 11A). A morfologia da linhagem celular PC-3 permite observar melhor os detalhes do citoesqueleto e o comportamento da actina-F, pois as células apresentam grandes e variados prolongamentos citoplasmáticos como lamelipódios e filopódios. Nesses prolongamentos, a actina se organiza na região cortical do citoplasma e na forma de fibras de estresse (Figura 11A, detalhe).

Quando expostas à FN solúvel, foi possível observar maior número de projeções citoplasmáticas do tipo lamelipódios nas células PC-3 (Figura 11B). Nos lamelipódios (Figura 11B, detalhe), a actina-F se organiza na região cortical suportando a formação dessas estruturas e as fibras de estresse mantem a organização citoplasmática e exercem força de tração para a célula. Na exposição à FN *coating*, as células apresentaram morfologia arredondada e disposição em aglomerados (Figura 11C). As células apresentaram regiões com longos prolongamentos contendo actina cortical e filopódios (Figura 11C, detalhe).

Células PC-3 expostas a FN+Geltrex mostraram-se mais arredondadas, com excessiva concentração de actina cortical e numerosos prolongamentos do tipo filopódios (Figura 11D). Quando expostas apenas ao Geltrex, essas células apresentaram-se volumosas e aglomeradas, compostas por grande quantidade de actina cortical e poucos prolongamentos citoplasmáticos e filopódios (Figura 11E).

A intensidade de marcação para actina-F foi menor no grupo FN *coating* em

comparação com o grupo controle e se manteve semelhante nos demais grupos FN solúvel, FN+Geltrex e Geltrex (Figura 11F).

A contagem das projeções citoplasmáticas (Figura 12A) revelou aumento dessas estruturas no grupos FN solúvel e FN+Geltrex, como previamente avaliado na análise da morfologia celular desses grupos. Já o grupo Geltrex apresentou uma diminuição no número de projeções citoplasmáticas em relação ao grupo controle. Não houve diferença no número de projeções das células do grupo FN *coating*, em relação ao grupo controle.

A avaliação da área celular comprovou a grande variação do padrão morfológico para a linhagem PC-3, com variação entre 1000 a 20000 μm^2 (Figura 12B). Todos os grupos avaliados (experimentais e controle) tiveram um predomínio de células com tamanho de 1000-5000 μm^2 .

4. Motilidade Celular

O potencial de motilidade das células LNCaP dos diferentes grupos experimentais foi acessado através de ensaios de migração celular utilizando insertos com membrana porosa de 8 μm . Após 24 horas de incubação, células LNCaP de todos os grupos experimentais migraram significativamente menos que as células do grupo controle (Figura 13).

Já as células PC-3, foram incubadas por 18 horas e apresentaram aumento na taxa de migração nos grupos expostos a FN+Geltrex e Geltrex. O grupo FN solúvel e FN *coating* não apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao grupo controle (Figura 14).

5. Imunolocalização das Proteínas Cortactina e MMP-14

Para investigar a localização de proteínas chaves no processo de formação de invadopódios, realizamos imunofluorescência das proteínas cortactina e MMP-14.

Células LNCaP

Na imunomarcção para Cortactina (Figura 15), o grupo controle apresentou marcação citoplasmática difusa e menos intensa. Já os grupos FN solúvel e FN *coating* apresentaram marcação com maior intensidade na região cortical dos prolongamentos citoplasmáticos. Os grupos FN+Geltrex e Geltrex tiveram marcação mais intensa, quando comparadas ao grupo controle.

A proteína MMP14 distribuiu-se delicadamente por toda a área de membrana plasmática das células (Figura 16). Para essa proteína, os grupos FN solúvel e FN+Geltrex apresentaram marcação mais intensa que o grupo controle. Os grupos FN *coating* e Geltrex tiveram intensidade de marcação semelhante à do grupo controle.

Células PC-3

Nas células PC-3, a imunomarcação para Cortactina (Figura 17) teve a mesma intensidade em todos os grupos experimentais, sendo que nos grupos FN solúvel, FN *coating* e FN+Geltrex houve predomínio de marcação na região cortical do citoplasma, destacando o contorno celular na região em que acontece a montagem dos filamentos de actina.

As células marcadas para MMP-14 (Figura 18) tiveram imunomarcação mais intensa apenas no grupo exposto ao Geltrex, quando comparado ao grupo controle. Os demais grupos tiveram marcação semelhante à do grupo controle.

6. Expressão de proteínas chaves na motilidade celular

A expressão das proteínas Actina-F, Cortactina, Dinamina-2, ERK 1/2 e p-FAK foi investigada nos diferentes grupos experimentais.

Células LNCaP

As proteínas Actina-F (Figura 19) e Dinamina-2 (Figura 21) tiveram a expressão diminuída em todos os grupos expostos a FN e aos componentes da MB, em relação ao grupo Controle. Já a expressão da proteína Cortactina (Figura 20) diminuiu nos grupos FN *coating* e Geltrex.

A quantificação da proteína ERK 1/2 (Figura 22) apresentou aumento nos grupos FN solúvel, FN+Geltrex e Geltrex e não houve diferença no grupo FN *coating*, quando comparado ao grupo controle. A proteína pFAK (Figura 23) mostrou-se aumentada nos grupos FN *coating* e FN+Geltrex, enquanto os grupos FN solúvel e Geltrex não apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao grupo controle.

Células PC-3

A quantificação da proteína Actina-F (Figura 24) mostrou-se aumentada apenas nos grupos FN solúvel e FN *coating*. A expressão da proteína Cortactina (Figura 25) diminuiu no grupo FN+Geltrex em comparação ao grupo controle. A expressão dessa proteína não variou nos demais grupos experimentais. Já a proteína Dinamina-2 (Figura 26) aumentou no grupo FN solúvel e diminuiu nos grupos FN *coating* e FN+Geltrex. O grupo Geltrex não apresentou diferença quando comparada ao grupo controle.

A quantificação da proteína ERK 1/2 (Figura 27) mostrou-se diminuída no grupo Geltrex e não apresentou diferença nos demais grupos expostos. A proteína pFAK (Figura 28) teve a sua expressão aumentada nos grupos expostos FN solúvel e FN+Geltrex e não variou nos grupos FN *coating* e Geltrex.

Figura 7. Efeito da exposição da FN solúvel, *coating* ou associada ao Geltrex (e dos seus controles) sobre a viabilidade das células LNCaP (**A**) e PC-3 (**B**). Não houve diferença entre os grupos experimentais. Os resultados são expressos como média \pm SEM.

Viabilidade Celular

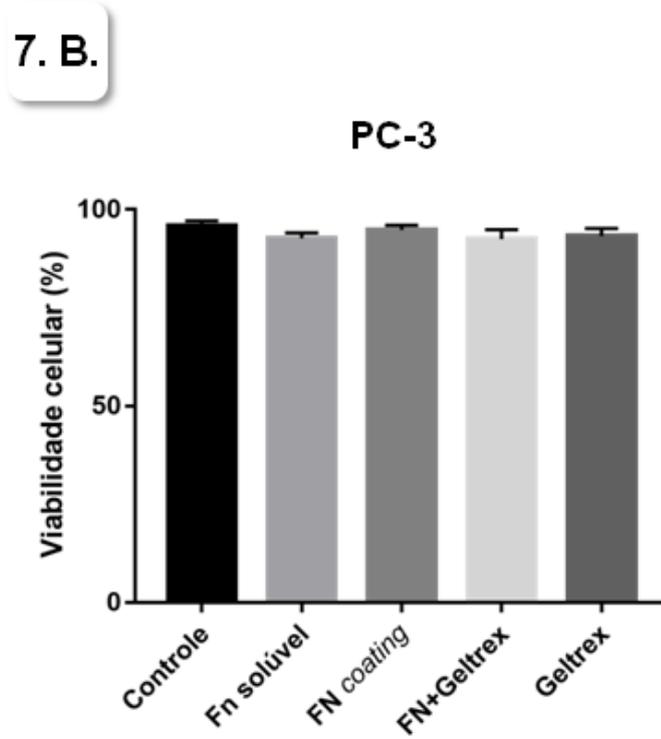
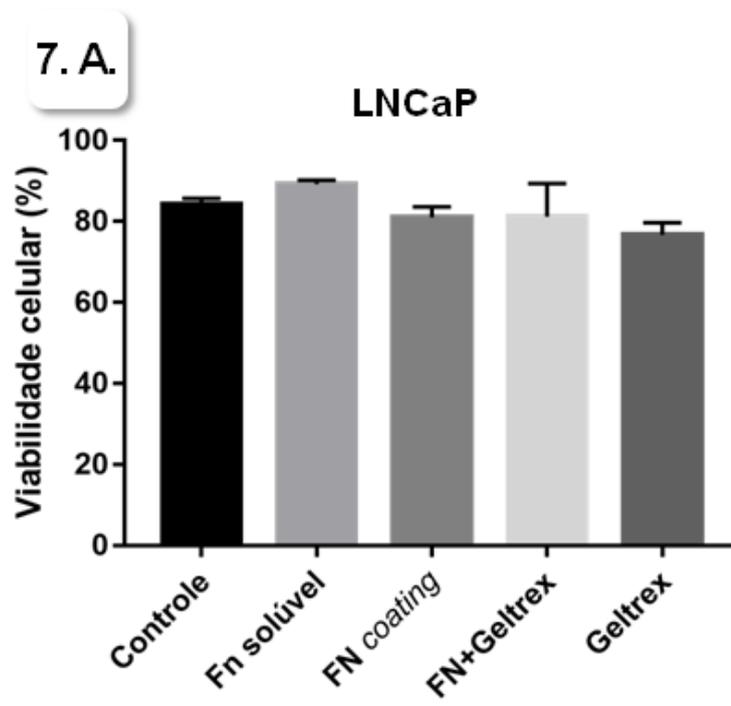


Figura 8. Efeito de 4 dias de exposição da FN solúvel, *coating* ou associada ao Geltrex (e dos seus controles) sobre a proliferação das células LNCaP (**A**) e PC-3 (**B**). A FN *coating*, associada ao Geltrex e apenas o Geltrex foram capazes de aumentar a taxa de proliferação nas células LNCaP. Nas células PC-3, o efeito foi oposto e as mesmas exposições diminuíram a proliferação dessas células. Os resultados são expressos como média \pm SEM.

Ensaio de Proliferação Celular

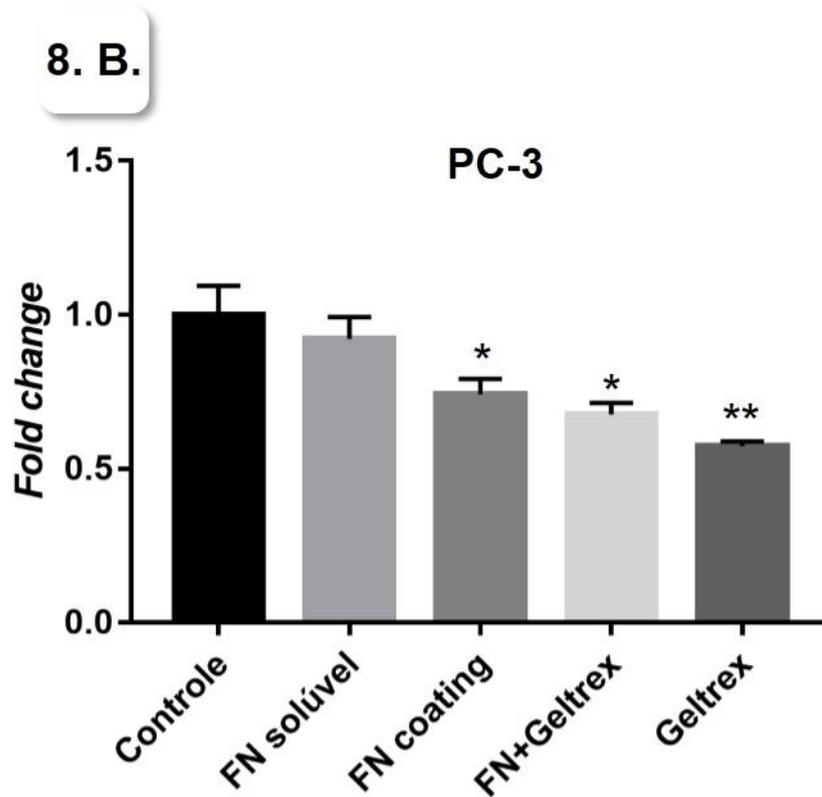
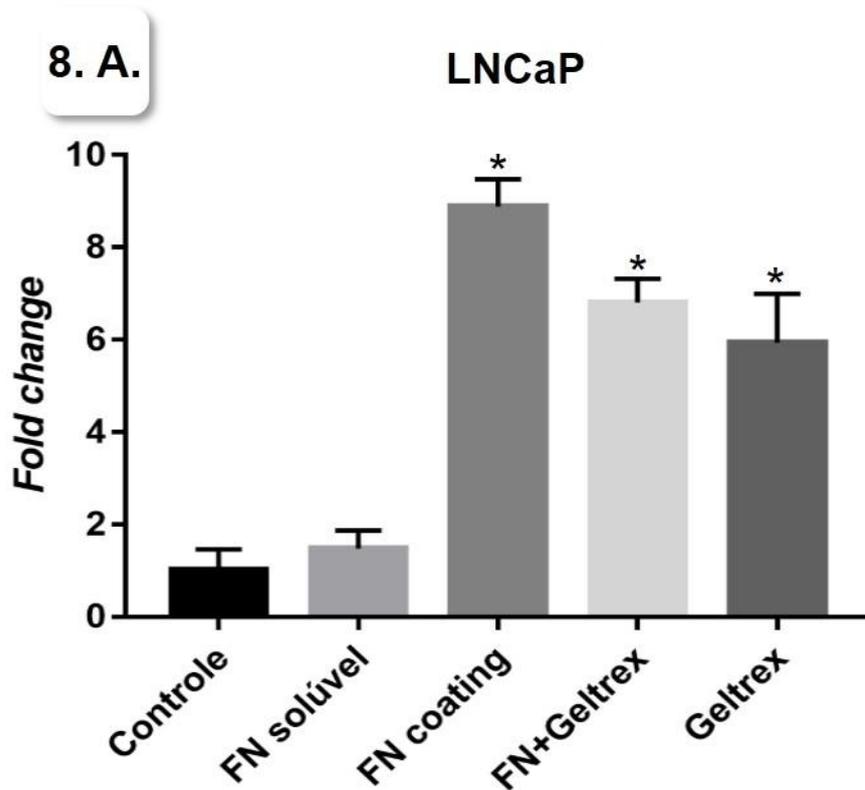
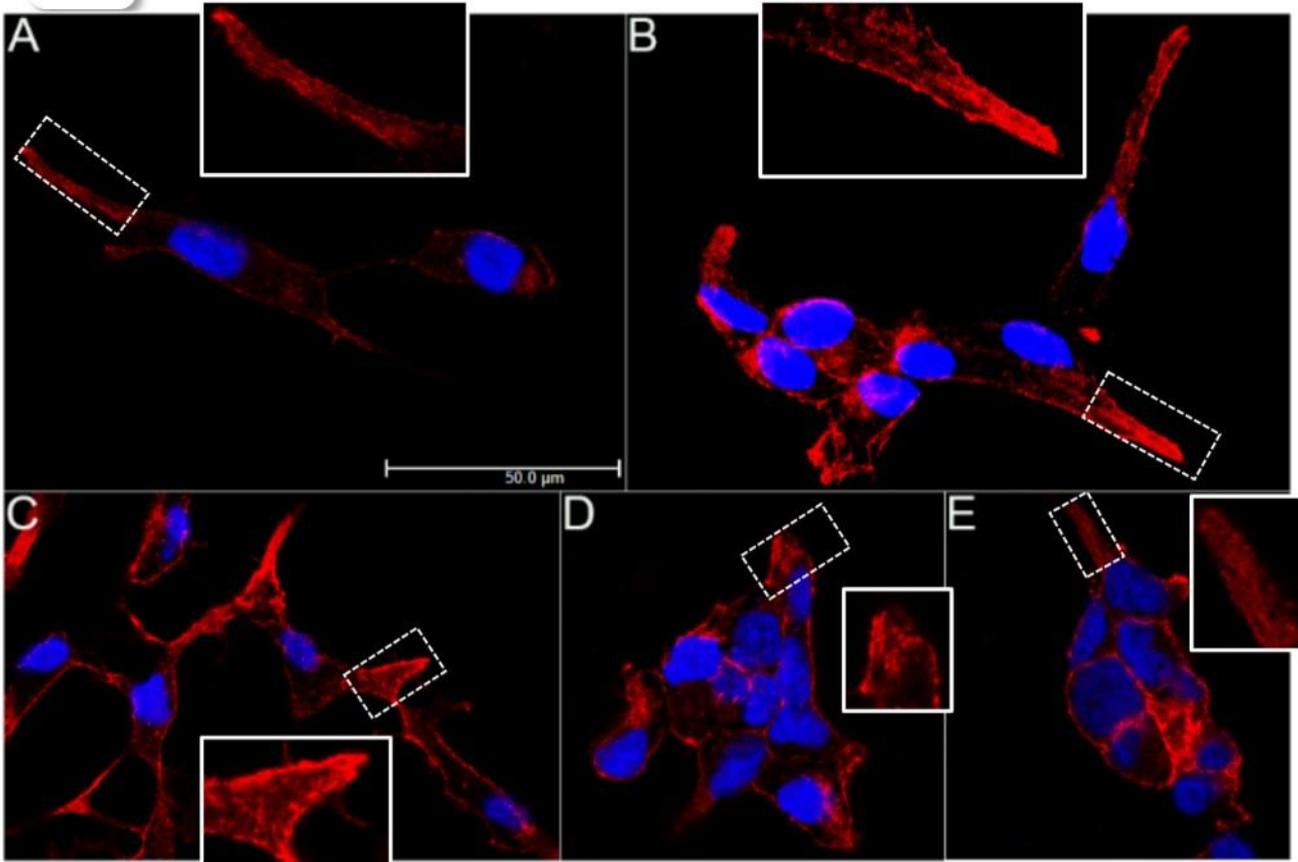


Figura 9. Imunofluorescência das células LNCaP marcadas para actina-F (coradas com faloidina-rodamina e contracoradas com DAPI). As células cresceram expostas a diferentes condições: aderidas à placa de cultura celular em meio padrão (Controle, **A**), em meio de cultura contendo fibronectina solúvel (FN solúvel, **B**), aderidas à superfície recoberta por fibronectina (FN *coating*, **C**), aderidas à superfície recoberta por Geltrex e embebidas em meio de cultura contendo fibronectina (FN+Geltrex), **D** ou somente aderidas à superfície recoberta por Geltrex (Geltrex, **E**). Os pontilhados destacam detalhes de prolongamentos celulares de cada grupo experimental. Barra de escala: 50µm. **F**) Quantificação da intensidade fluorescente de marcação para actina-F, com resultados expressos como média ± SEM. As células do grupo FN solúvel apresentaram maior intensidade de marcação (* $p \leq 0,05$) e as células do grupo FN *coating* menor intensidade de marcação (* $p \leq 0,05$) que o grupo controle.

9.



9.F.

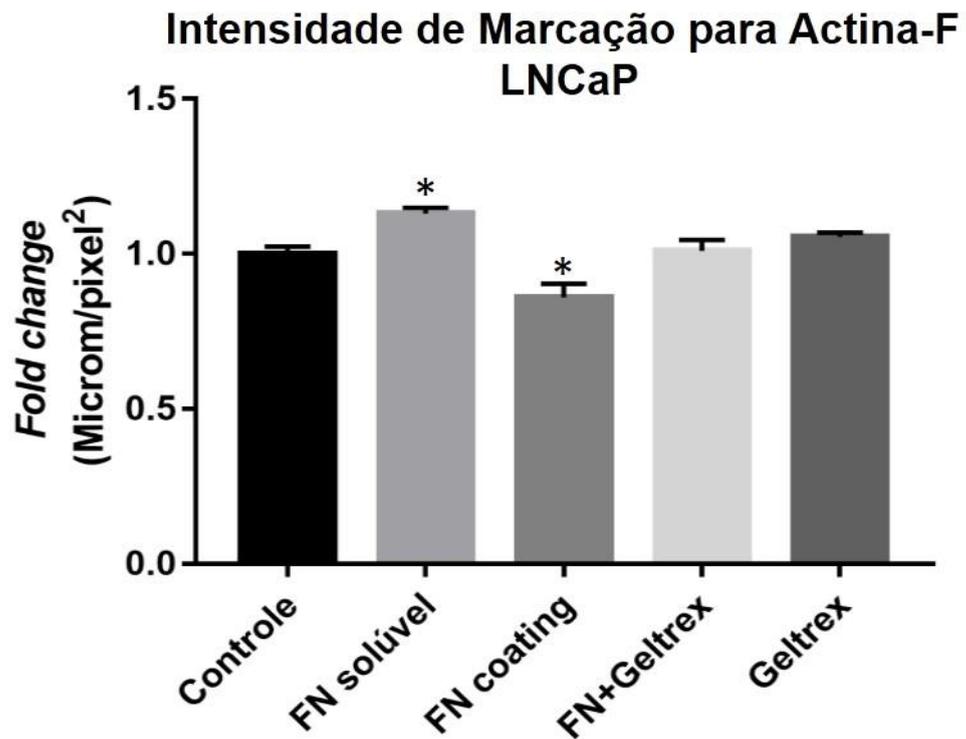


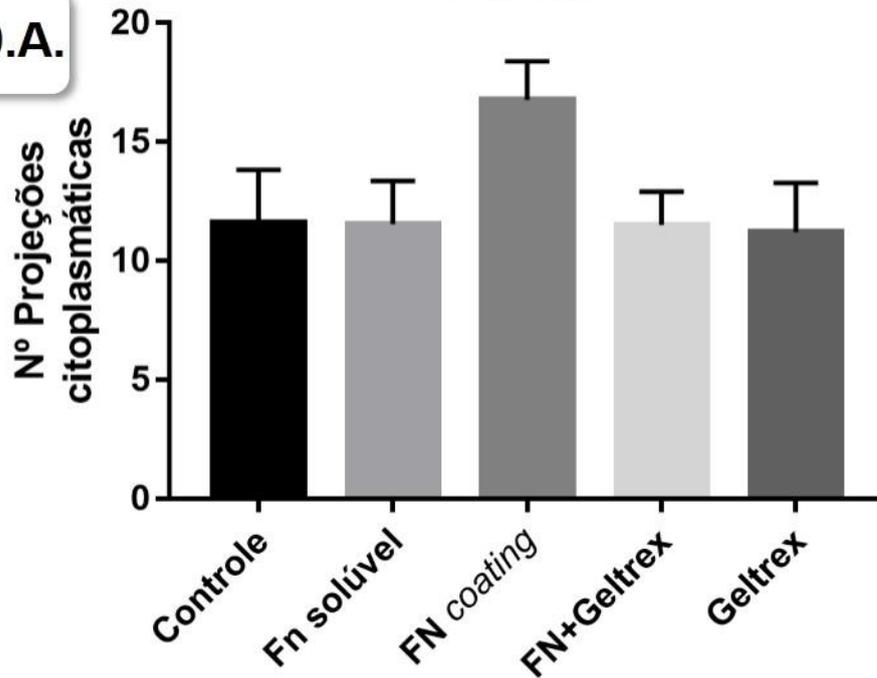
Figura 10A: Número de projeções citoplasmáticas das células LNCaP dos diferentes grupos experimentais. Apesar das células LNCaP expostas à FN *coating* apresentarem tendência ao aumento do número de projeções, não houve diferença significativa entre os grupos. Os resultados são expressos como média \pm SEM.

Figura 10B: Quantificação da área das células LNCaP (em μm^2) dos diferentes grupos experimentais, realizada no programa *Image J*.

Contagem de Projeções Citoplasmáticas

LNCaP

10.A.



Área Celular

LNCaP

10.B.

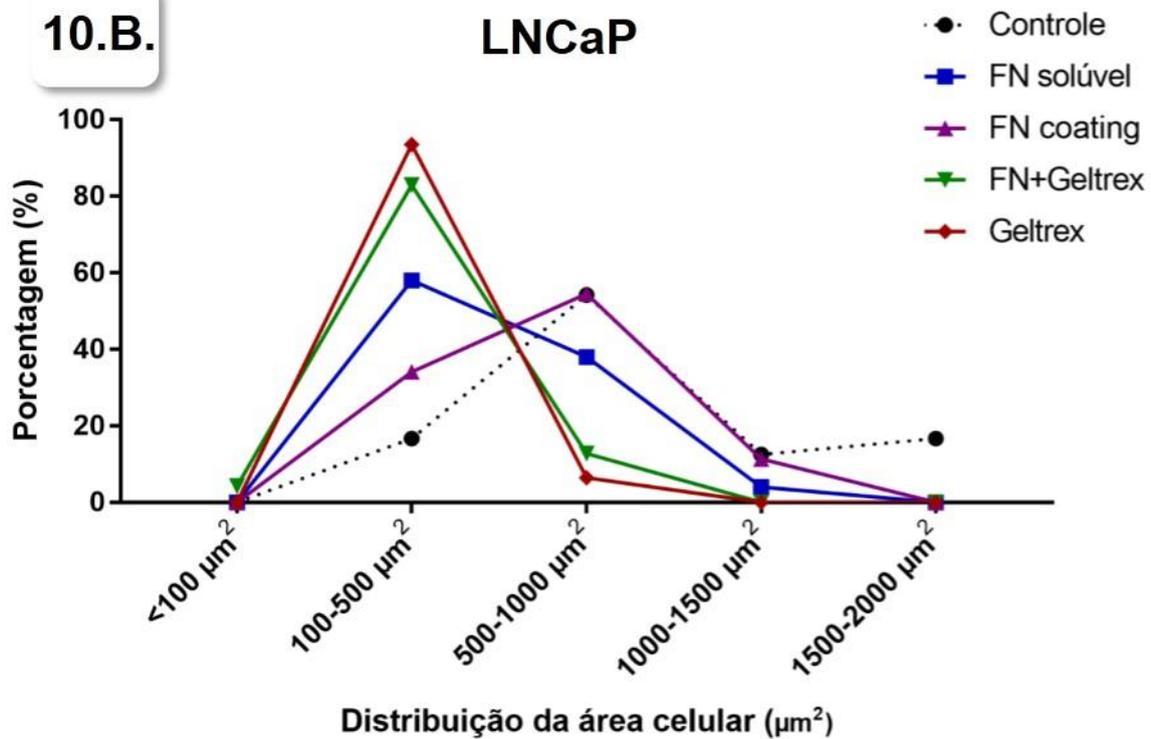
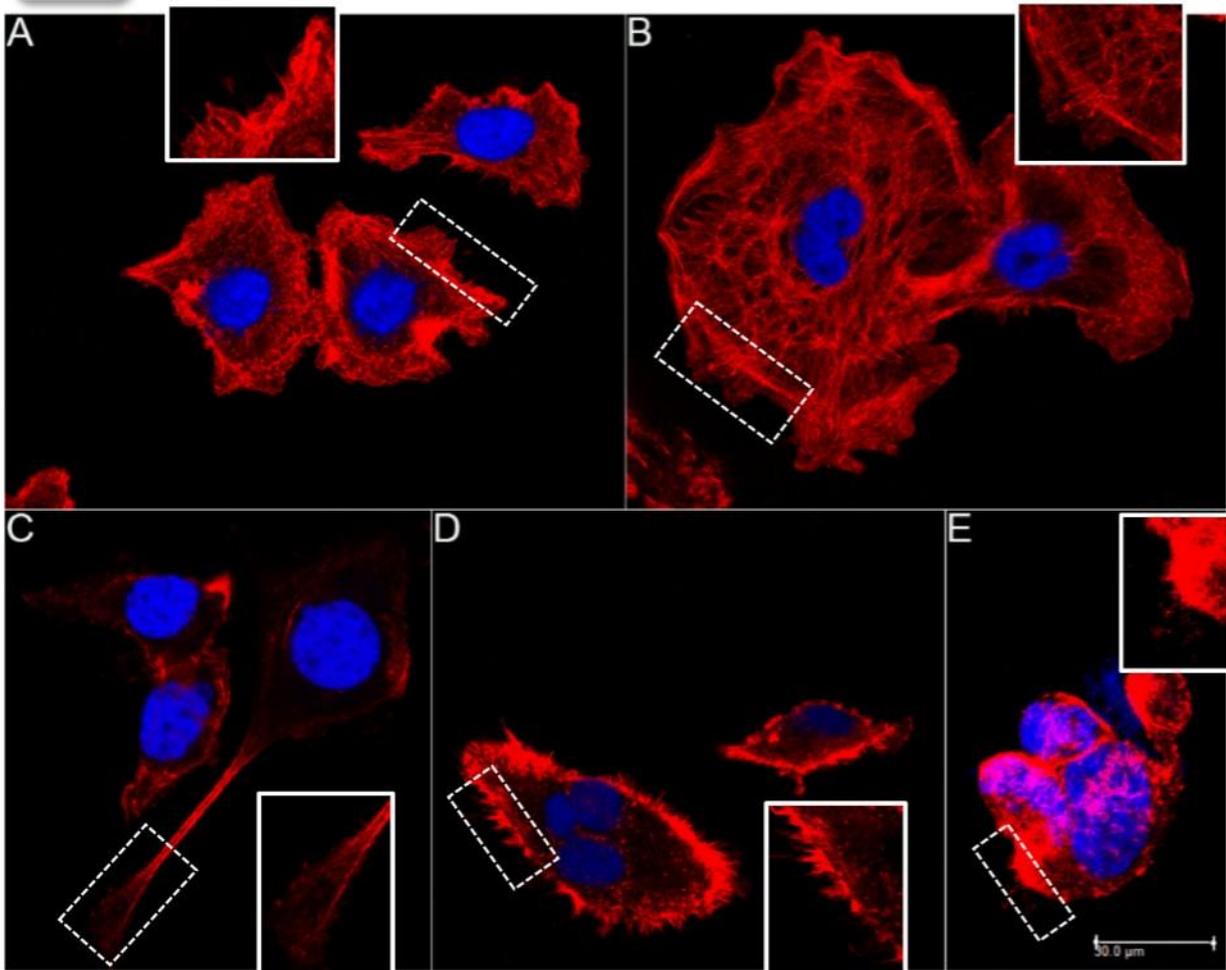


Figura 11. Imunofluorescência das células PC-3 marcadas para actina-F (coradas com faloidina-rodamina e contracoradas com DAPI). As células cresceram expostas a diferentes condições: aderidas à placa de cultura celular em meio padrão (Controle, **A**), em meio de cultura contendo fibronectina solúvel (FN solúvel, **B**), aderidas à superfície recoberta por fibronectina (FN *coating*, **C**), aderidas à superfície recoberta por Geltrex e embebidas em meio de cultura contendo fibronectina (FN+Geltrex), **D**) ou somente aderidas à superfície recoberta por Geltrex (Geltrex, **E**). Os pontilhados destacam detalhes de prolongamentos celulares de cada grupo experimental, como lamelipódios em **A**, **B**, **C** e filopódios em **D**. Barra de escala: 30µm. **F**) Quantificação da intensidade fluorescente de marcação para actina-F, com resultados expressos como média ± SEM. As células do grupo FN *coating* apresentaram intensidade de marcação menor (*p ≤ 0,05) que o grupo controle (**p ≤ 0,001).

11.



Intensidade de Marcação para Actina-F

11.F.

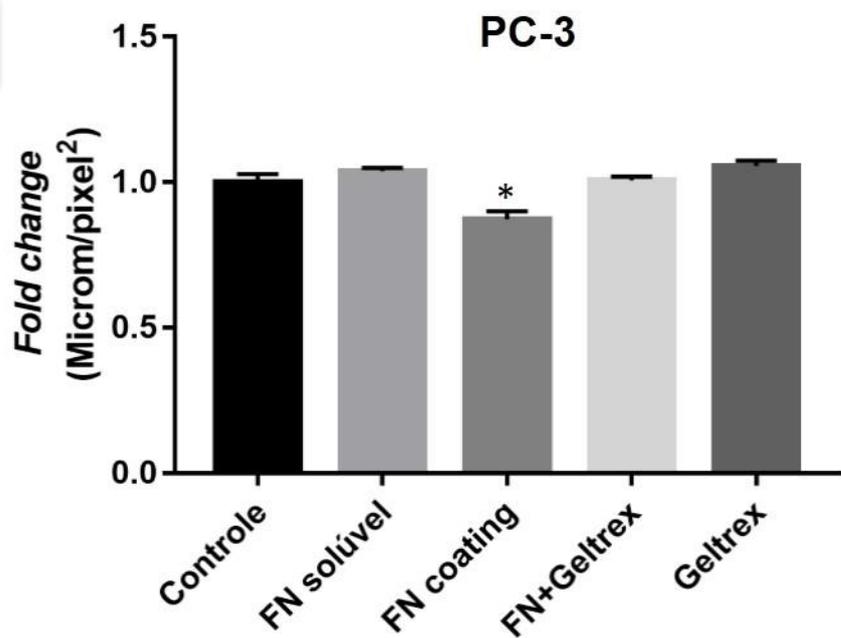


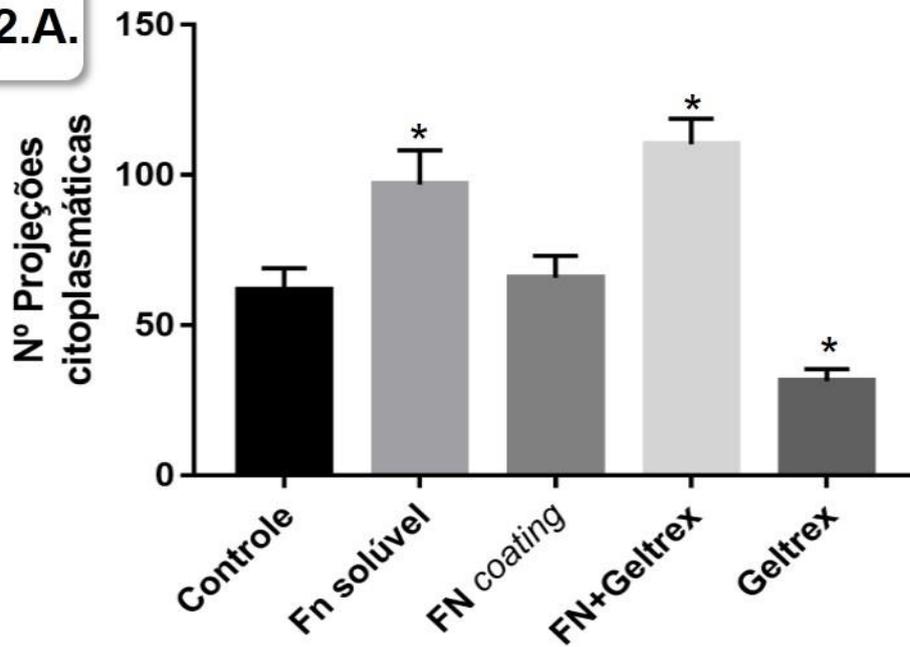
Figura 12A: Número de projeções citoplasmáticas das células PC-3 expostas às diferentes exposições. Os resultados são expressos como média \pm SEM. Células PC-3 expostas à FN solúvel e à FN+Geltrex apresentaram aumento no número de projeções (* $p \leq 0,05$), enquanto as mesmas células expostas apenas ao Geltrex apresentaram diminuição dessa variável ($p \leq 0,05$). Os resultados são expressos como média \pm SEM.

Figura 12B: Quantificação da área das células PC-3 (em μm^2) dos diferentes grupos experimentais, realizada no programa *Image J*.

Contagem de Projeções Citoplasmáticas

PC-3

12.A.



12.B.

Área Celular

PC-3

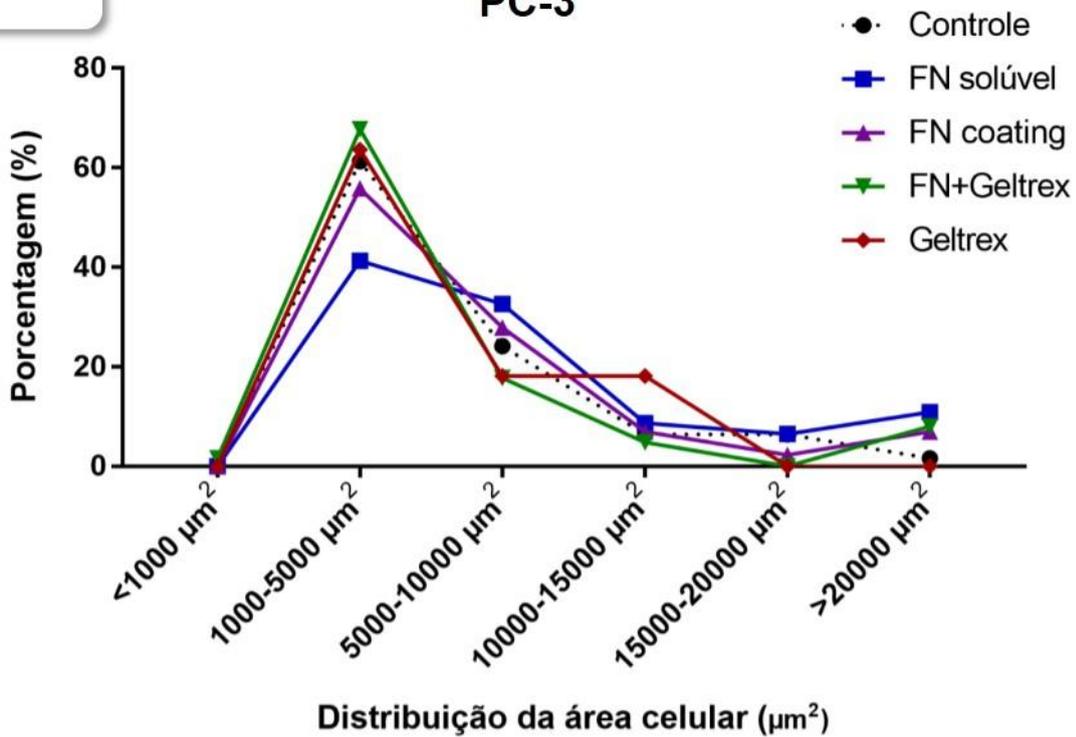
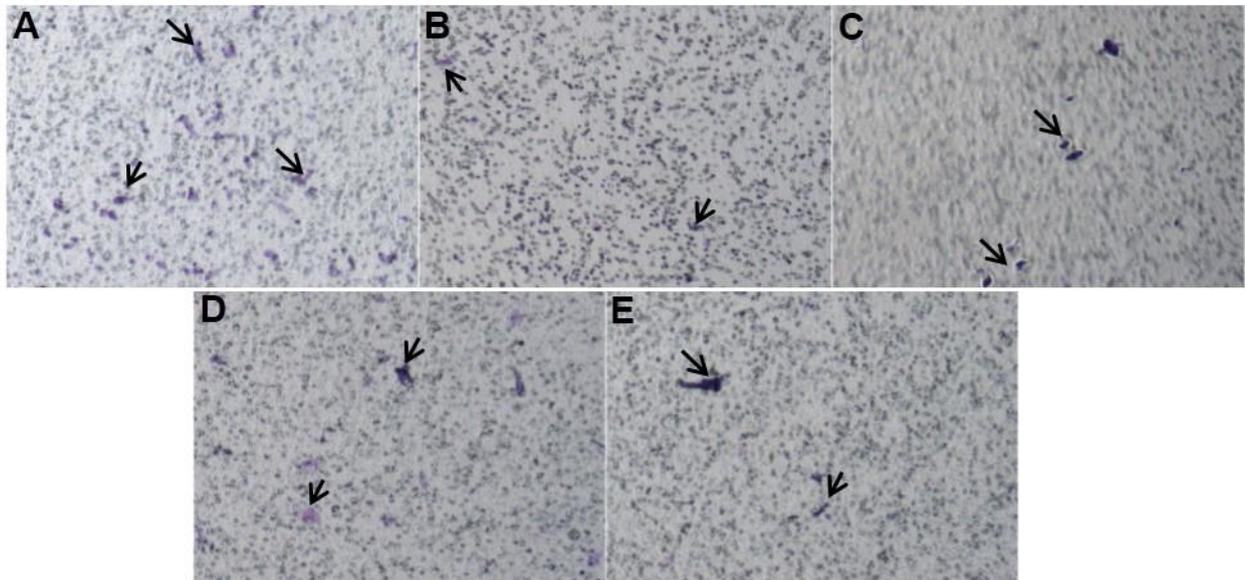


Figura 13. Efeito dos diferentes tipos de exposição na motilidade das células LNCaP. As imagens de **A** a **E** ilustram a membrana porosa do inserto utilizado e as setas indicam células que atravessaram os poros de 8 μm e que foram contadas após coradas. O gráfico representativo mostra que a FN inibiu a migração celular em todas as situações estudadas, com $p \leq 0,003$ (***) . Os resultados são expressos como média \pm SEM.

Ensaio de Motilidade Celular LNCaP

13.



13.F.

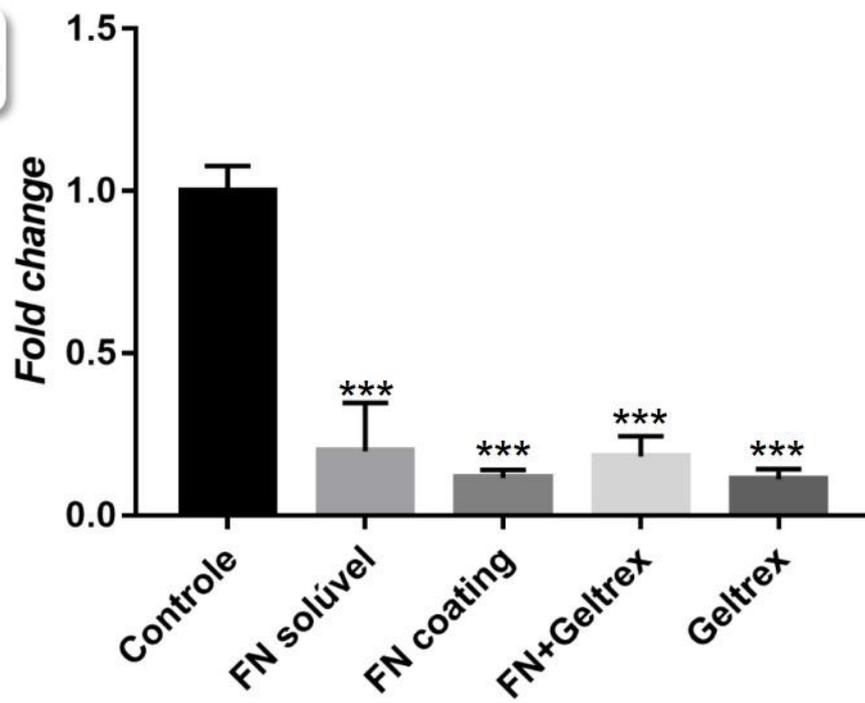
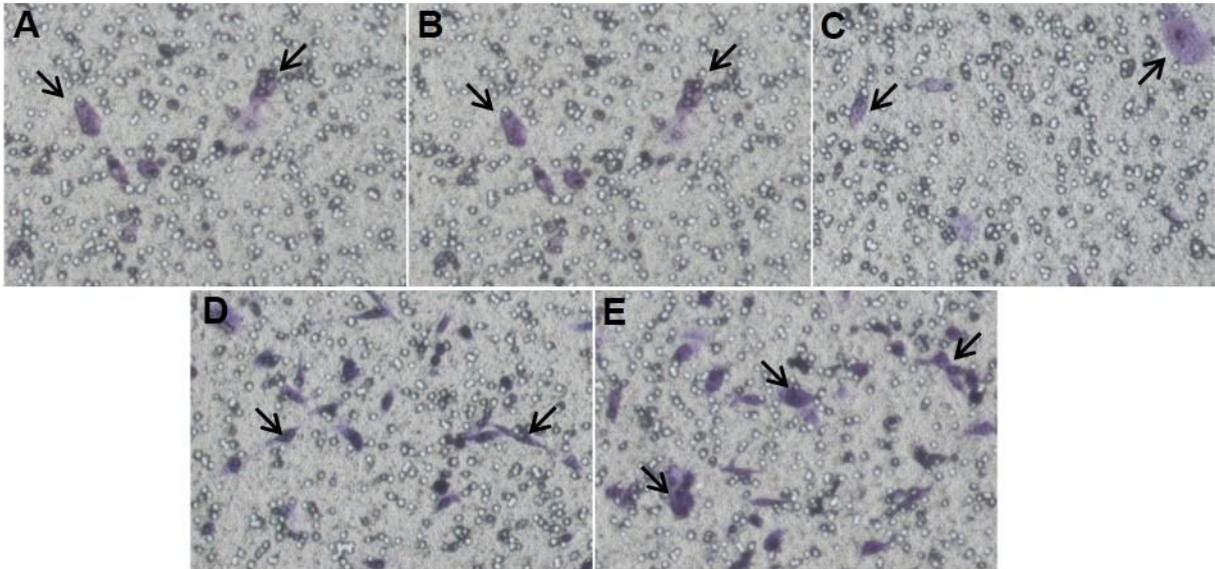


Figura 14. Efeito dos diferentes tipos de exposição na motilidade das células PC-3. As imagens de **A** a **E** ilustram a membrana porosa do inserto utilizado e as setas indicam células que atravessaram os poros de 8 μm e que foram contadas após coradas. O gráfico representativo mostra que a FN associada ao Geltrex e apenas o Geltrex estimularam a migração celular, com $p \leq 0,001$ (***) e $p \leq 0,01$ (**) respectivamente. Os resultados são expressos como média \pm SEM.

Ensaio de Motilidade Celular PC-3

14.



14.F.

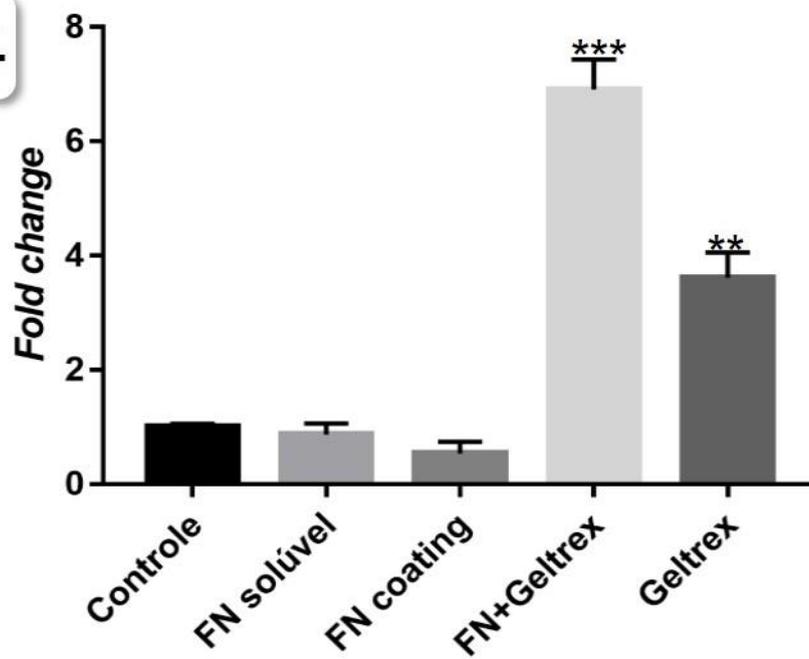
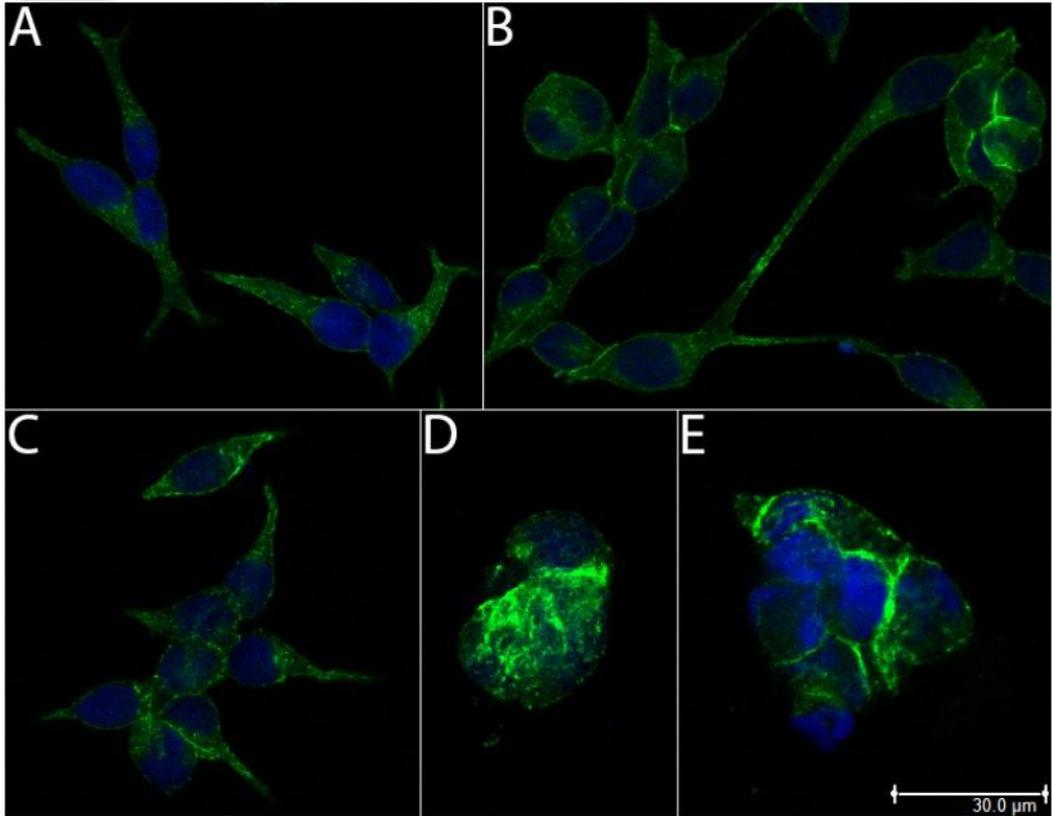


Figura 15. Imunofluorescência das células LNCaP para a proteína Cortactina. Grupo Controle (**A**), FN solúvel (**B**), FN *coating* (**C**), FN+Geltrex (**D**) e Geltrex (**E**). A proteína Cortactina está distribuída por todo citoplasma, com maior intensidade nas áreas de adesão celular e em pontos de ligação entre células vizinhas. Barra de Escala: 30 μ m.

Figura 16. Imunofluorescência das células LNCaP para a proteína MMP14. Grupo Controle (**A**), FN solúvel (**B**), FN *coating* (**C**), FN+Geltrex (**D**) e Geltrex (**E**). A proteína MMP14 distribui-se pontualmente por toda a área de membrana plasmática e mostrou maior intensidade de marcação nas células dos grupos FN solúvel e FN+Geltrex. Barra de Escala: 30 μ m.

15.

IFF Cortactina - LNCaP -



16.

IFF MMP 14 - LNCaP -

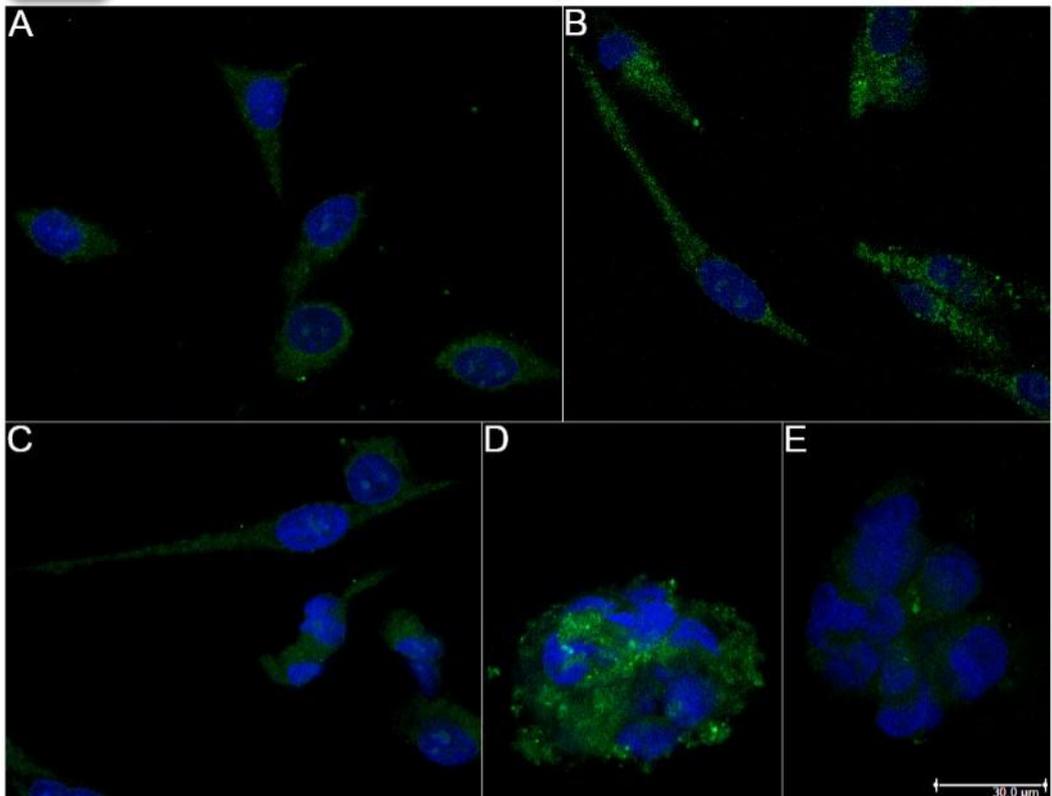
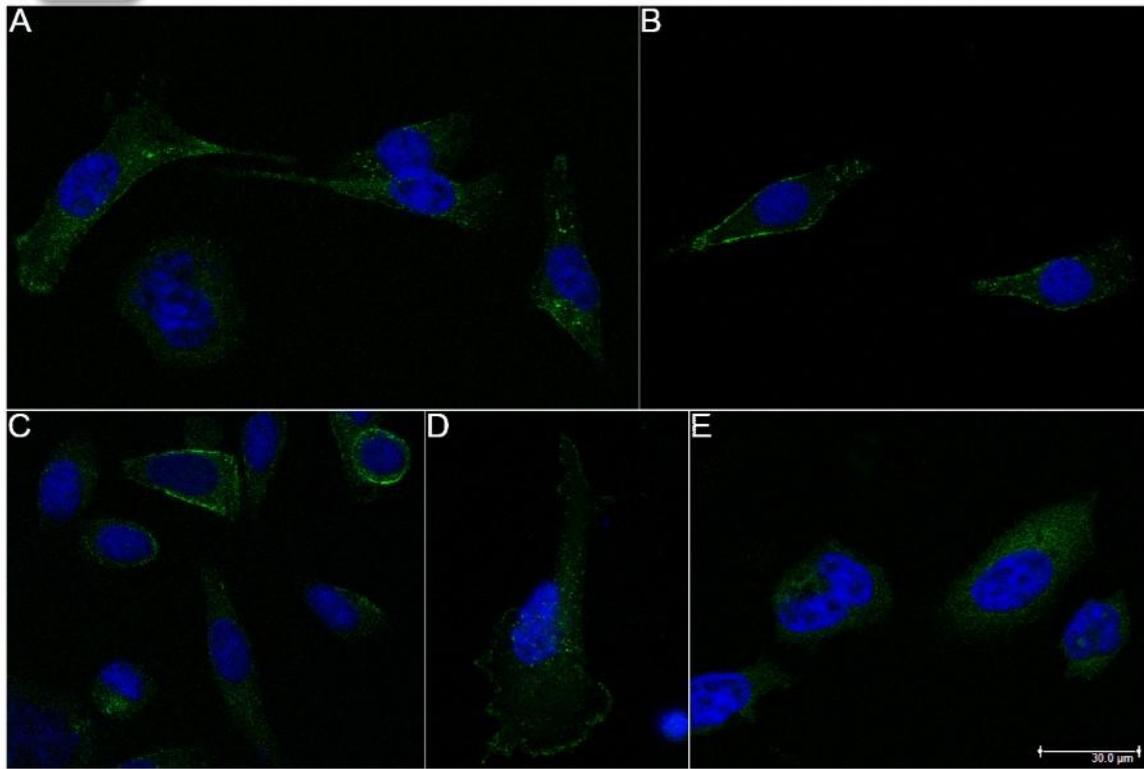


Figura 17. Imunofluorescência das células PC-3 para a proteína Cortactina. Grupo Controle (A), FN solúvel (B), FN *coating* (C), FN+Geltrex (D) e Geltrex (E). A proteína Cortactina está distribuída por todo citoplasma, mostrando maior concentração nas áreas de adesão celular. Barra de Escala: 30 µm.

Figura 18. Imunofluorescência das células PC-3 para a proteína MMP14. Grupo Controle (A), FN solúvel (B), FN *coating* (C), FN+Geltrex (D) e Geltrex (E). A proteína MMP14 distribui-se delicadamente por toda a área de membrana plasmática e mostrou maior intensidade de marcação nas células do grupos Geltrex. Barra de Escala: 30 µm.

17.

IFF Cortactina - PC-3 -



18.

IFF MMP 14 - PC-3 -

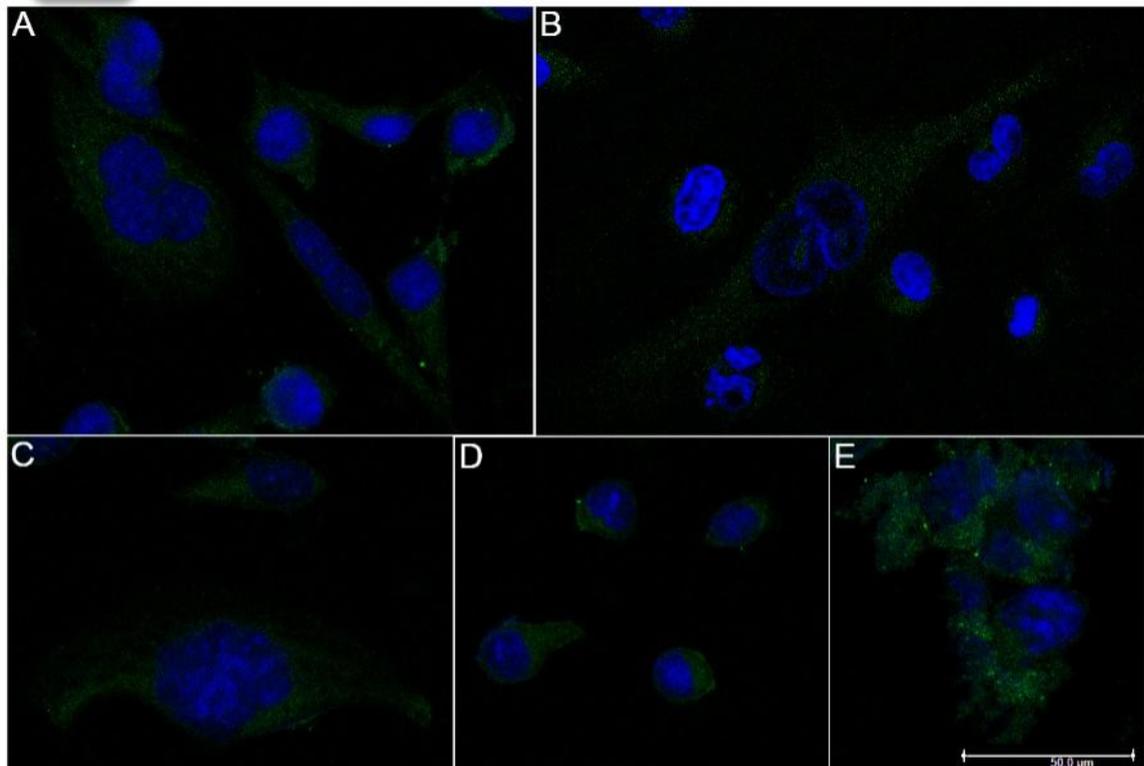
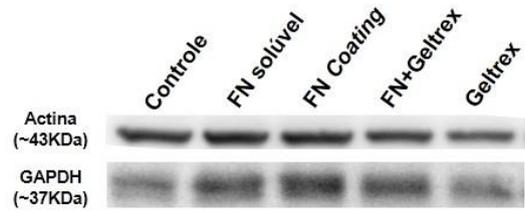
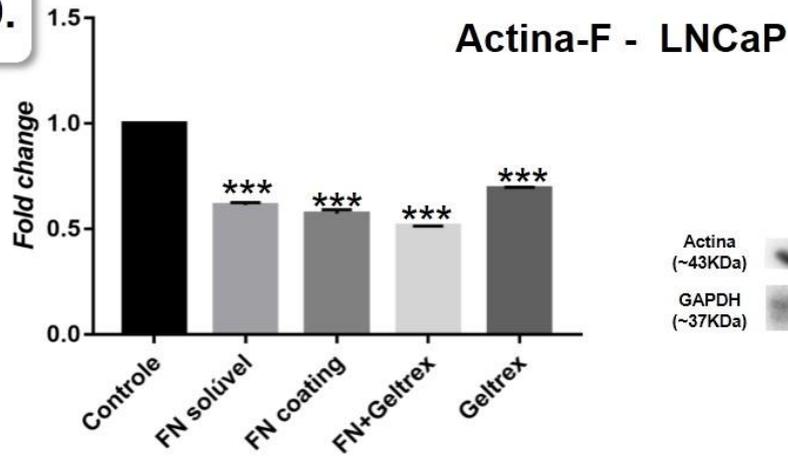


Figura 19. Efeito dos diferentes tipos de exposição na expressão da proteína Actina-F (~43 kDa) nas células LNCaP. **A)** Houve diminuição na expressão da proteína nas células de todos os grupos experimentais ($p < 0,001$). **B)** Bandas representativas da expressão da proteína Actina-F e da proteína constitutiva GAPDH (~37 kDa), utilizada na normalização dos resultados. Os resultados são expressos como média \pm SEM.

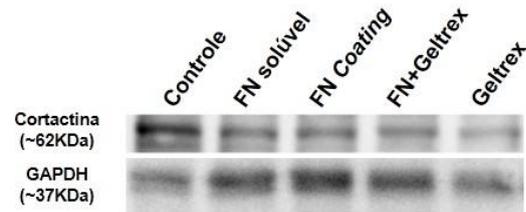
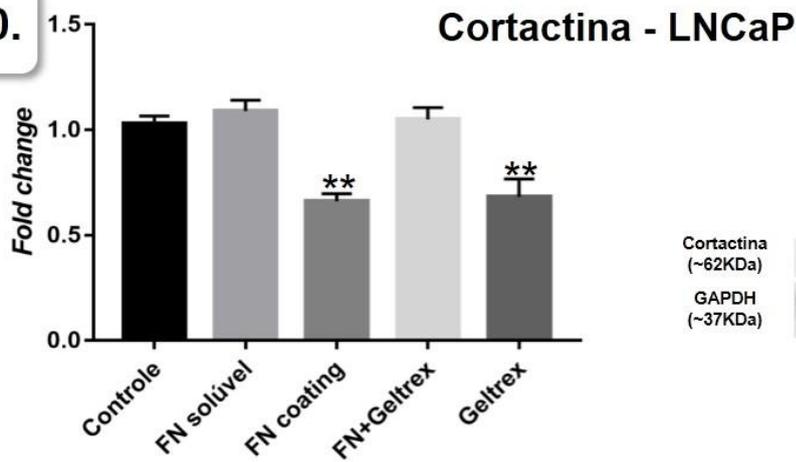
Figura 20. Efeito dos diferentes tipos de exposição na expressão da proteína Cortactina (~62 kDa) nas células LNCaP. **A)** Houve diminuição na expressão da proteína nas células do grupo FN *coating* e Geltrex ($p < 0,033$). **B)** Bandas representativas da expressão da proteína Cortactina e da proteína constitutiva GAPDH (37 kDa), utilizada na normalização dos resultados. Os resultados são expressos como média \pm SEM.

Figura 21. Efeito dos diferentes tipos de exposição na expressão da proteína Dinamina-2 (~100 kDa) nas células LNCaP. **A)** Todos os grupos experimentais apresentaram diminuição na expressão dessa proteína ($p < 0,0031$), quando comparado ao grupo controle. **B)** Bandas representativas da expressão da proteína Dinamina-2 e da proteína constitutiva GAPDH (37 kDa), utilizada na normalização dos resultados. Os resultados são expressos como média \pm SEM.

19.



20.



21.

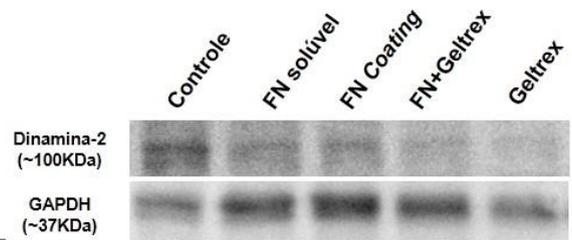
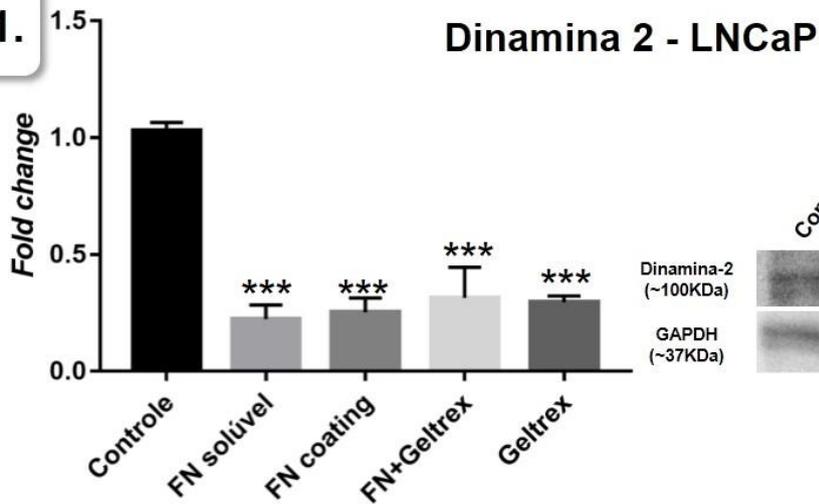
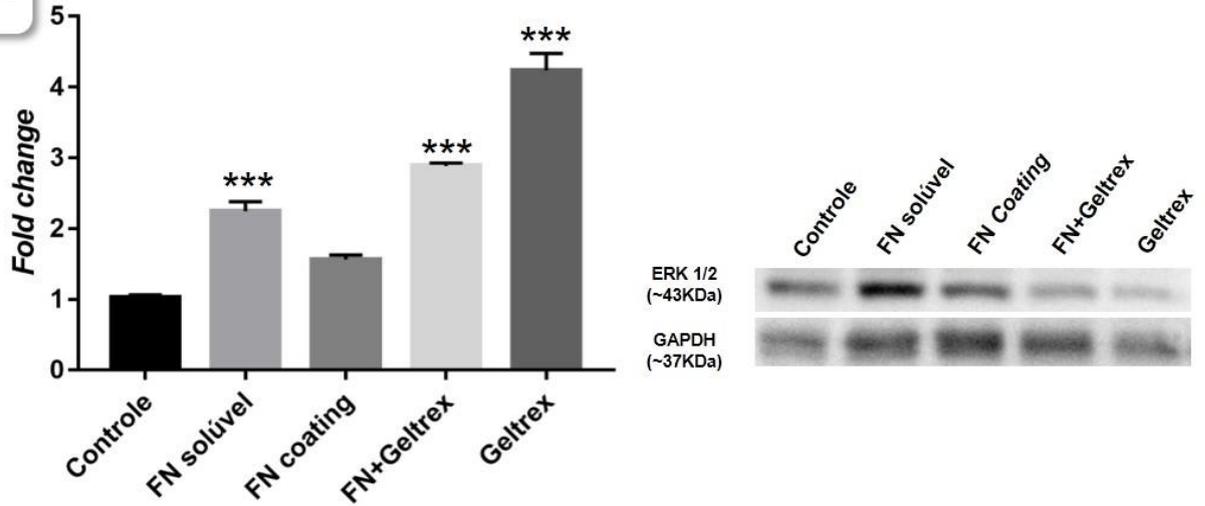


Figura 22. Efeito dos diferentes tipos de exposição na expressão da proteína ERK 1/2 (~43 kDa) nas células LNCaP. **A)** Houve aumento na expressão da proteína nas células do grupo FN solúvel, FN+Geltrex e Geltrex ($p < 0,033$). **B)** Bandas representativas da expressão da proteína ERK 1/2 e da proteína constitutiva GAPDH (37 kDa), utilizada na normalização dos resultados. Os resultados são expressos como média \pm SEM.

Figura 23. Efeito dos diferentes tipos de exposição na expressão da proteína pFAK (~125 kDa) nas células LNCaP. **A)** Apenas os grupos FN *coating* ($p \leq 0,01$) e FN+Geltrex ($p \leq 0,05$) apresentaram aumento na expressão da proteína. **B)** Bandas representativas da expressão da proteína pFAK e da proteína constitutiva GAPDH (37 kDa), utilizada na normalização dos resultados. Os resultados são expressos como média \pm SEM.

22.

ERK 1/2 - LNCaP



23.

pFAK - LNCaP

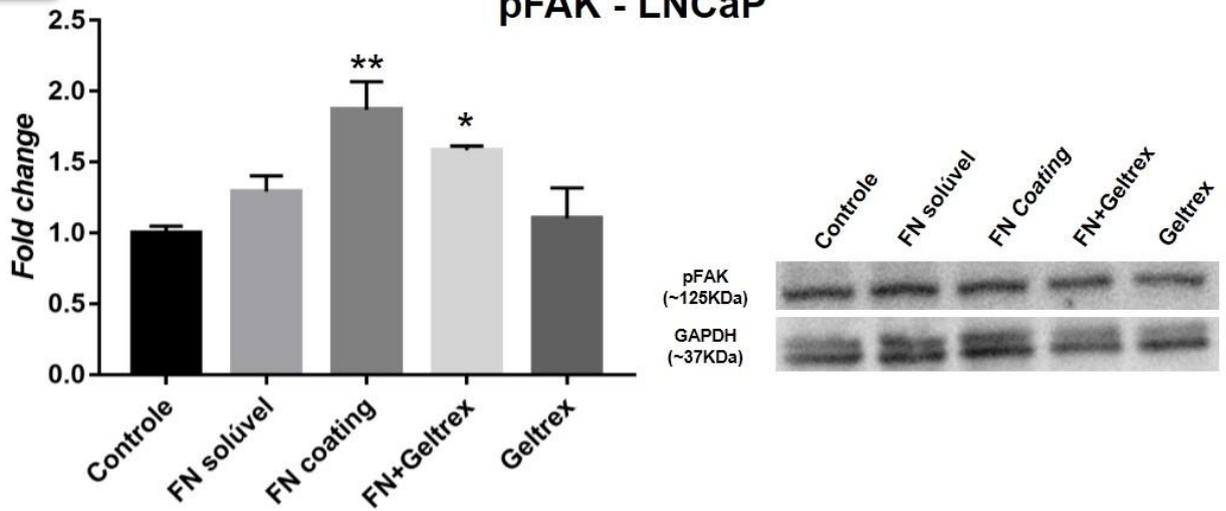
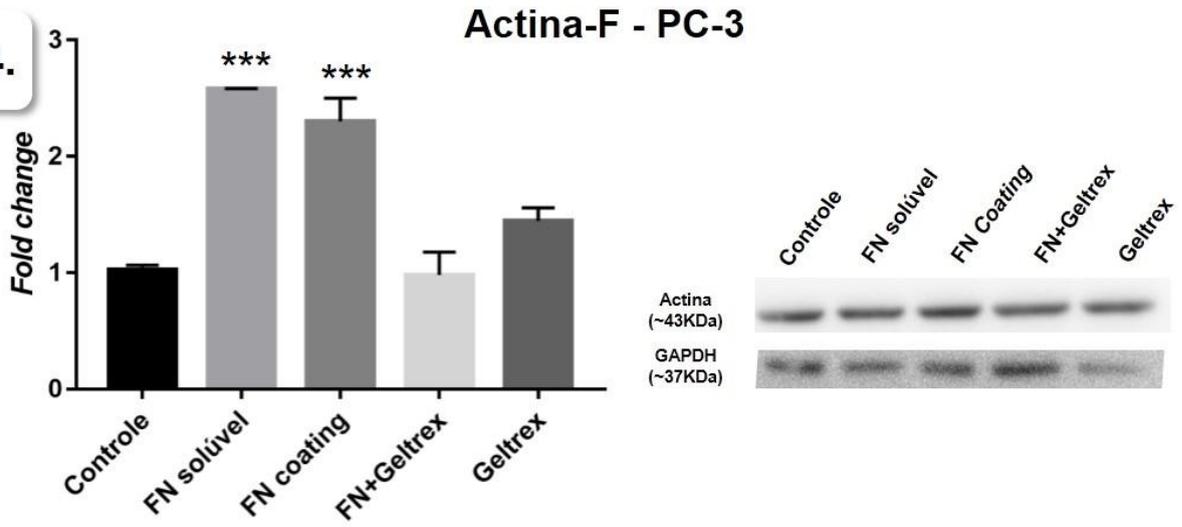


Figura 24. Efeito dos diferentes tipos de exposição na expressão da proteína Actina-F (~43 kDa) nas células PC-3. **A)** Houve aumento na expressão da proteína nas células dos grupos experimentais FN solúvel e FN *coating* ($p < 0,001$). **B)** Bandas representativas da expressão da proteína Actina-F e da proteína constitutiva GAPDH (~37 kDa), utilizada na normalização dos resultados. Os resultados são expressos como média \pm SEM.

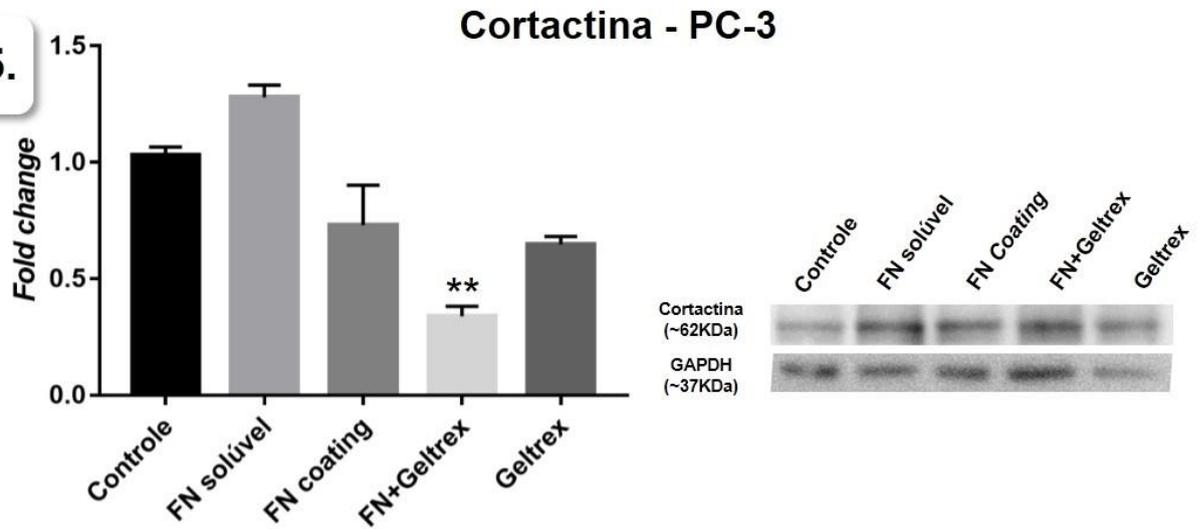
Figura 25. Efeito dos diferentes tipos de exposição na expressão da proteína Cortactina (~62 kDa) nas células PC-3. **A)** Houve diminuição na expressão da proteína nas células do grupo FN+Geltrex ($p < 0,033$). **B)** Bandas representativas da expressão da proteína Cortactina e da proteína constitutiva GAPDH (37 kDa), utilizada na normalização dos resultados. Os resultados são expressos como média \pm SEM.

Figura 26. Efeito dos diferentes tipos de exposição na expressão da proteína Dinamina-2 (~100 kDa) nas células PC-3. **A)** A proteína mostrou-se mais expressa no grupo FN solúvel ($p < 0,01$) e menos expressa nos grupos FN *coating* e FN+Geltrex, com $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,01$, respectivamente. **B)** Bandas representativas da expressão da proteína Dinamina-2 e da proteína constitutiva GAPDH (37 kDa), utilizada na normalização dos resultados. Os resultados são expressos como média \pm SEM.

24.



25.



26.

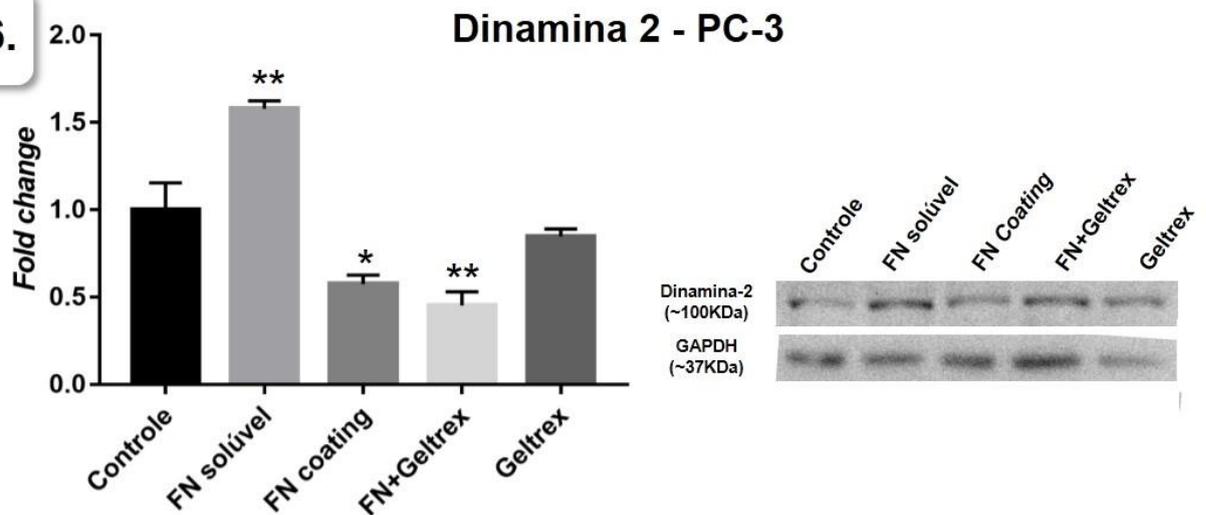
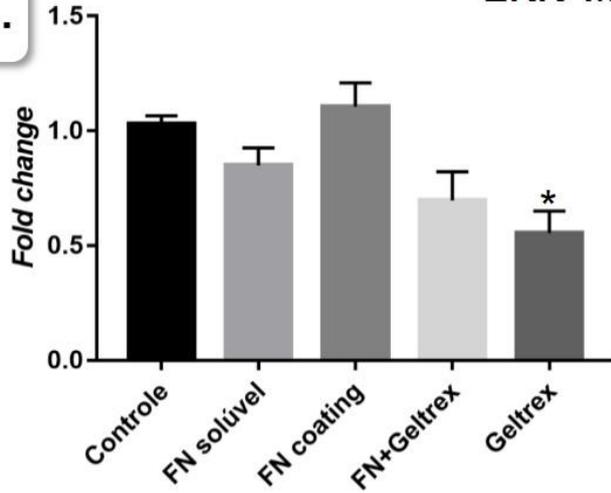


Figura 27. Efeito dos diferentes tipos de exposição na expressão da proteína ERK 1/2 (~43 kDa) nas células PC-3. **A)** O grupo Geltrex apresentou menor expressão da proteína ($p < 0,05$). **B)** Bandas representativas da expressão da proteína ERK 1/2 e da proteína constitutiva GAPDH (37 kDa), utilizada na normalização dos resultados. Os resultados são expressos como média \pm SEM.

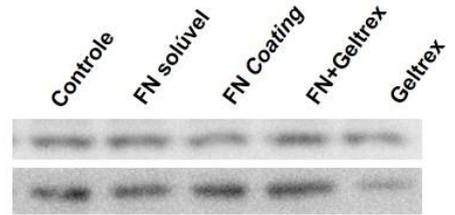
Figura 28. Efeito dos diferentes tipos de exposição na expressão da proteína pFAK (~125 kDa) nas células PC-3. **A)** Os grupos FN solúvel e FN+Geltrex ($p \leq 0,001$) apresentaram aumento na expressão da proteína. **B)** Bandas representativas da expressão da proteína pFAK e da proteína constitutiva GAPDH (37 kDa), utilizada na normalização dos resultados. Os resultados são expressos como média \pm SEM.

27.

ERK 1/2 - PC3

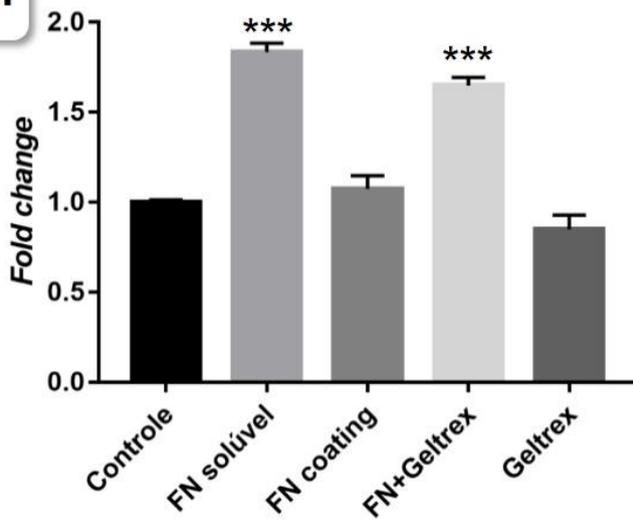


ERK 1/2
(~43KDa)
GAPDH
(~37KDa)



28.

pFAK - PC-3



pFAK
(~125KDa)
GAPDH
(~37KDa)

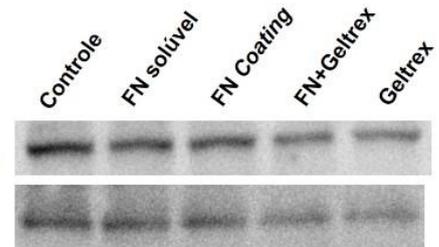


Tabela III. Resumo dos resultados dos diferentes parâmetros analisados comparado ao grupo Controle.

Grupos experimentais	LNCaP				PC-3			
	FN solúvel	FN coating	FN + Geltrex	Geltrex	FN solúvel	FN coating	FN + Geltrex	Geltrex
Viabilidade celular	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔
Área celular	↓	↓	↓	↓	↔	↔	↔	↔
Contagem de projeções	↔	↔	↔	↔	↑	↔	↑	↔
Intensidade de fluorescência (actina-F)	↑	↓	↔	↔	↔	↓	↔	↔
Proliferação Celular	↔	↑	↑	↑	↔	↓	↓	↓
Motilidade celular	↓	↓	↓	↓	↔	↔	↑	↑
IFF (Cortactina)	↔	↔	↑	↑	↔	↔	↔	↔
IFF (MMP-14)	↑	↔	↑	↔	↔	↔	↔	↑
WB (Actina-F)	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↔	↔
WB (Cortactina)	↔	↓	↔	↓	↔	↔	↓	↔
WB (Dinamina-2)	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↔
WB (ERK 1/2)	↑	↔	↑	↑	↔	↔	↔	↓
WB (pFAK)	↔	↑	↑	↔	↑	↔	↑	↔

Abreviações: IFF= imunofluorescência; WB= Western Blotting; ↓ = diminui; ↑ = aumenta; ↔ = nenhuma mudança observada;

VII. DISCUSSÃO

As células tumorais migram através da MEC para invadir tecidos adjacentes e se alojar em órgãos distantes (metástase). Os invadopódios, protrusões citoplasmáticas ricas em actina-F e com intensa capacidade de degradação da MEC, têm sido relacionados à invasão de células tumorais (LABELLE; HYNES, 2012; PAREKH; WEAVER, 2016). O presente estudo avaliou características específicas da migração de células tumorais e da formação dos invadopódios nos diferentes microambientes onde as células se encontram, sendo a MB a primeira barreira a ser degradada e posteriormente outros componentes da MEC, como a FN.

Características moleculares da formação dos invadopódios tem sido amplamente avaliadas em estudos *in vitro* (BUCCIONE et al. 2004; LINDER 2007; DESAI et al. 2008; ARTYM et al. 2011). A formação dos invadopódios demanda ativação de proteínas específicas como a Cortactina, que auxilia na polimerização dos monômeros de actina, e a Dinamina-2, responsável pela ramificação dos filamentos de actina, além de moléculas transdutoras de sinal altamente dependentes da cascata de sinalização iniciada pelo ambiente extracelular (CLAINCHE; CARLIER, 2008; KELLEY et al., 2010; LEE et al., 2015).

Para determinar a morfologia, atividade e função dos invadopódios, utilizamos células tumorais prostáticas LNCaP e PC-3, ambas com grande potencial invasivo e amplamente usadas como importantes ferramentas biológicas no estudo e entendimento dos mecanismos de motilidade celular no câncer (DESAI et al. 2008; LIBERIO et al. 2014). A MEC constitui parte do microambiente tumoral e tem grande influência na formação dos invadopódios e motilidade celular. Nosso estudo procurou mimetizar o ambiente *in vitro* e verificar o potencial da FN na supressão da motilidade dessas células, utilizando a exposição da FN, sendo solúvel ou na forma de recobrimento, além da associação com o Geltrex, que traz em sua composição elementos da MB como laminina e colágeno IV, proporcionando condições para avaliarmos a formação e manutenção dos invadopódios no câncer.

Células LNCaP

A adesão ao substrato é característica fundamental para a sobrevivência de células epiteliais (LABAT-ROBERT et al., 1990). Os nossos resultados mostraram que células LNCaP expostas a FN solúvel ou na forma de cobertura, em associação ou não a MB artificial, não apresentaram diminuição na viabilidade celular, sendo a média de viabilidade em todos os grupos experimentais de 80%. A viabilidade abaixo de 90% para as células LNCaP justifica-se pelo comportamento peculiar dessas células durante a expansão, pois

tendem a crescer não apenas em monocamada, mas também por sobreposição e formando agrupamentos (*clusters*). Esse comportamento faz com que células sobrepostas se soltem, diminuindo a viabilidade geral para esse tipo celular (LIBÉRIO et al. 2014). Maramag e colaboradores (1997) mostraram que a viabilidade das células LNCaP é menor quando cultivadas em meio padrão, em comparação com o cultivo suplementado com vitamina C. Apesar de não inviabilizar a confiabilidade no resultado final, a baixa aderência das células LNCaP diminui o seu uso em alguns tipos de técnicas. Assim, utilizar diferentes tipos de coberturas aumenta a sua adesão e facilita a sua aplicação nos experimentos *in vitro* (ATIENZAR et al. 2011; LIBÉRIO et al. 2014).

Este estudo também analisou se houve variação na dimensão da área celular e na distribuição de filamentos de actina-F. Todas as exposições testadas foram capazes de diminuir a área celular e a distribuição homogênea da actina-F pelo citoplasma das células LNCaP. Esses dados corroboram com a diminuição na expressão das proteínas chaves para a formação dos invadopódios (Cortactina e Dinamina-2), assim como da proteína actina-F, responsável pela protrusão citoplasmática. Mudanças morfológicas estão associadas com outras alterações como motilidade, diferenciação e atividade metabólica (LYDON; HUGHES, 1981). A linhagem LNCaP mostrou suscetibilidade nas respostas às exposições aos diferentes componentes da MEC. Sabe-se que a densidade e a complexidade dos componentes do microambiente estão envolvidos no comportamento celular responsável pela motilidade e mecanossensibilidade das células (ARTYM et al. 2011).

A taxa de motilidade, estabelecida por ensaio utilizando insertos *transwell*, apresentou evidente diminuição em todos os grupos das células LNCaP expostas aos componentes da MEC. Os nossos achados corroboram com Libério e colaboradores (2014), que expuseram células LNCaP à cobertura de FN, na concentração de 1 mg/mL, analisaram a migração celular através do ensaio de *wound healing* e observaram também a redução do potencial migratório, além de aumento na aderência das células ao substrato. E ainda, o estudo mostra que a presença de colágeno IV e laminina, componentes predominantes da membrana basal e do mimético Geltrex, promovem agregação celular e afetam a morfologia das células, corroborando expressivamente com os nossos resultados. Juntos, esses importantes achados refletem, de forma inédita, a influência da FN, isolada ou em combinação com elementos da membrana basal, na formação dos invadopódios, comprovando que esses elementos diminuem a formação dessas complexas estruturas nas células tumorais LNCaP, menos agressivas e responsivas a andrógeno.

Sung et al. (2011) observaram em células de fibrosarcoma HT1080, com *knockdown*

para a proteína Cortactina, migração menos eficiente quando essa linhagem foi semeada sobre recobrimento de FN (10 µg/mL) em relação ao grupo controle que não recebeu nenhum recobrimento. Dessa forma, os nossos resultados não apenas confirmam a importância da proteína Cortactina no processo de migração celular, como apresentam, também de forma inédita, a influência repressora da FN quando em forma de recobrimento na expressão dessa proteína.

A taxa de proliferação das células LNCaP mostrou-se elevada nos grupos com recobrimento de FN (FN *coating*) e Geltrex (FN+Geltrex e Geltrex). Sabe-se que o cultivo de células em sistema 3D, usando componentes da MEC, quando comparado com o cultivo clássico em 2D, promove melhorias nos mecanismos da biologia básica da célula, como viabilidade, morfologia, proliferação, diferenciação, entre outros aspectos (ANTON et al., 2015). Sendo assim, o nosso estudo confirma que o contato das células com a FN e componentes da MB proporciona microambiente estável e favorável à proliferação celular, similar àquele encontrado *in vivo*.

Diversas proteínas colaboram com as integrinas para formar pontos de adesão entre a célula e a MEC, dentre essas moléculas podemos ressaltar a quinase de adesão focal (FAK), responsável pela adesão focal entre a célula e a MEC (MENG et al., 2009). O resultado da sua ativação está intimamente relacionada a ativação da quinase reguladora de sinalização extracelular (ERK). Shibue e colaboradores (2012) observaram que ambas as proteínas aumentaram a taxa de proliferação de linhagem celular de câncer de mama. Este estudo mostrou que as exposições FN solúvel, FN+Geltrex e Geltrex foram capazes de aumentar a expressão da proteína ERK e as exposições FN *coating* e FN+Geltrex a expressão de pFAK. Esses resultados são importantes e sugerem que a ativação dessas importantes quinases pelos recobrimentos de superfície utilizados contribua diretamente com o aumento da proliferação das células LNCaP.

Células PC-3

Kaighn e colaboradores (1979), caracterizaram a linhagem celular PC-3 pelo crescimento em monocama, independente de ancoragem e também pela insensibilidade a soros contendo fatores de crescimento, diferentemente das células epiteliais prostáticas sem alterações neoplásicas. Além disso, as células PC-3 não são responsivas a andrógenos, glicocorticoides e fatores de crescimento epidermal e os produzidos por fibroblastos. Análise por microscopia eletrônica revelou características semelhantes entre a PC-3 e outras células neoplásicas de origem epitelial, como numerosos microvilosidades, núcleo e nucléolos

alterados, mitocôndria anormal e lamelopódios abundantes, mostrando propriedades de um adenocarcinoma pouco diferenciado (KAIGHN et al., 1979).

Visto as características descritas das células PC-3 e os resultados encontrados no atual estudo, podemos afirmar que as células PC-3 apresentaram menor suscetibilidade à influência dos componentes da MEC, com resultados pontuais e desconexos. A população de células que originou tal linhagem celular foi retirada de um sítio metastático ósseo (DESAI; MA; CHELLAIAH, 2008; KAIGHN et al., 1979), e provavelmente tal população já havia adquirido habilidades de independência e subversividade ao microambiente tumoral, com características mais agressivas e peculiares dentro da biologia dos tumores.

A formação de invadopódios é uma das maneiras das células tumorais migrarem, sendo a MEC uma barreira para esse processo. Porém, para as células PC-3 o substrato oferecido não proporcionou barreira e possivelmente funcionou como influência para o aumento da motilidade das células, como podemos observar nos grupos expostos ao mimético da MB. Contudo, os resultados obtidos na expressão das proteínas chaves para a formação dos invadopódios não foram conclusivos para afirmar que a FN influencia na formação dessas protrusões. E ainda, o aumento na expressão de pFAK no grupo exposto a FN solúvel pode indicar outro tipo de atividade móvel, dependente da atividade de proteínas quinases PKC e PTK relacionadas a mobilidade celular (ENTSCHLADEN et al., 1997; FRIEDL; BORGMANN; BRÖCKER, 2001). Essa hipótese permanece por ser avaliada e determinada.

VIII. CONCLUSÕES GERAIS

Os nossos resultados, revelam a importância e a influência da FN (em diferentes condições - solúvel ou *coating* - e em associação com componentes da membrana basal) no comportamento migratório, morfologia e fisiologia das projeções citoplasmáticas de células tumorais. Pudemos observar que a FN exerce papel supressor na migração celular, com ênfase na redução da atividade dos mecanismos associados a formação dos invadopódios no modelo de células LNCaP, corroborando com nossa hipótese *a priori*. Mas, visto a complexidade molecular na formação dos invadopódios, estudos adicionais devem ser feitos para complementar os efeitos da FN na formação dessas projeções citoplasmáticas envolvidas com a motilidade das células tumorais.

IX. REFERÊNCIAS GERAIS

- ABERCROMBIE, M.; DUNN, G. A.; HEATH, J. P. The shape and movement of fibroblasts in culture. **Society of General Physiologists series**, v. 32, p. 57–70, jan. 1977.
- ADAMS, J. C. Cell-matrix contact structures. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 58, n. 3, p. 371–92, mar. 2001.
- ALEXANDER, N. R. et al. Extracellular Matrix Rigidity Promotes Invadopodia Activity. **Current Biology**, v. 18, n. 17, p. 1295–1299, 9 set. 2008.
- ANTON, D. et al. Three-dimensional cell culture: A breakthrough in vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 5517–5527, 2015.
- ARTYM, V. V. et al. Dynamic membrane remodeling at invadopodia differentiates invadopodia from podosomes. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, n. 2–3, p. 172–180, fev. 2011.
- AUMAILLEY, M. The laminin family. **Cell adhesion & migration**, v. 7, n. 1, p. 48–55, 2013.
- AYALA, I. et al. Multiple regulatory inputs converge on cortactin to control invadopodia biogenesis and extracellular matrix degradation. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 3, p. 369–378, 15 jan. 2008.
- BADOWSKI, C. et al. Paxillin Phosphorylation Controls Invadopodia/Podosomes Spatiotemporal Organization. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, n. 2, p. 633–645, 28 nov. 2007.
- BEATY, B. T.; CONDEELIS, J. Digging a little deeper: the stages of invadopodium formation and maturation. **European journal of cell biology**, v. 93, n. 10–12, p. 438–44, out. 2014.
- BEGUM, A. et al. The extracellular matrix and focal adhesion kinase signaling regulate cancer stem cell function in pancreatic ductal adenocarcinoma. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–21, 2017.
- BERDEAUX, R. L. et al. Active Rho is localized to podosomes induced by oncogenic Src and is required for their assembly and function. **The Journal of cell biology**, v. 166, n. 3, p. 317–23, 2 ago. 2004.
- BISSELL, M. J.; HINES, W. C. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. **Nature Medicine**, v. 17, n. 3, p. 320–329, 7 mar. 2011.
- BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 12, p. 786–801, dez. 2014.
- BRÁBEK, J. et al. CAS promotes invasiveness of Src-transformed cells. **Oncogene**, v. 23, n. 44, p. 7406–7415, 23 set. 2004.
- BRADBURY, P.; FABRY, B.; O'NEILL, G. M. Occupy tissue. **Cell Adhesion & Migration**, v. 6, n. 5, p. 424–520, 20 set. 2012.
- BRANCH, K. M.; HOSHINO, D.; WEAVER, A. M. Adhesion rings surround invadopodia and promote maturation. **Biology Open**, v. 1, n. 8, 2012.
- BRAVO-CORDERO, J. J. et al. A novel spatiotemporal RhoC activation pathway locally regulates cofilin activity at invadopodia. **Current biology : CB**, v. 21, n. 8, p. 635–44, 26 abr. 2011.
- BRAVO-CORDERO, J. J. et al. Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 7, p. 405–417, 19 jun. 2013.
- BUBENDORF, L. et al. Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. **Human pathology**, v. 31, n. 5, p. 578–83, maio 2000.
- BUCCIONE, R.; ORTH, J. D.; MCNIVEN, M. A. Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 5, n. 8, p. 647–57, ago. 2004.
- BURGER, K. L. et al. Src-dependent Tks5 phosphorylation regulates invadopodia-associated invasion in prostate cancer cells. **Prostate**, v. 74, n. 2, p. 134–148, 2014.
- BURRIDGE, K.; CHRZANOWSKA-WODNICKA, M. Focal adhesions, contractility, and signaling. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 12, p. 463–518, jan. 1996.
- BYERS, H. R.; FUJIWARA, K. **Stress Fibers in Cells in Situ: Immunofluorescence Visualization with Antiactin, Antimyosin, and Anti-alpha-actinin**. Disponível em: <<http://jcb.rupress.org/content/93/3/804.full.pdf>>. Acesso em: 28 fev. 2016.
- CAPUANO, A. C. T.; JAEGER, R. G. The effect of laminin and its peptide SIKVAV on a human salivary gland myoepithelioma cell line. **Oral oncology**, v. 40, n. 1, p. 36–42, jan. 2004.
- CHAN, K. T.; CORTESIO, C. L.; HUTTENLOCHER, A. FAK alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate breast cancer invasion. **The Journal of Cell Biology**, v. 185, n. 2, p. 357–370, 20 abr. 2009.
- CLAINCHE, C. LE; CARLIER, M.-F. F. Regulation of actin assembly associated with

- protrusion and adhesion in cell migration. **Physiological Reviews**, v. 88, p. 489–513, 2008.
- CLARK, E. S. et al. Cortactin Is an Essential Regulator of Matrix Metalloproteinase Secretion and Extracellular Matrix Degradation in Invadopodia. **Cancer Research**, v. 67, n. 9, p. 4227–4235, 24 abr. 2007.
- COOPMAN, P. J. et al. Phagocytosis of cross-linked gelatin matrix by human breast carcinoma cells correlates with their invasive capacity. **Clinical Cancer Research**, v. 4, n. 2, 1998.
- CRAMER, L. P. Organization and polarity of actin filament networks in cells: implications for the mechanism of myosin-based cell motility. **Biochemical Society symposium**, v. 65, p. 173–205, jan. 1999.
- CUKIERMAN, E. et al. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5547, p. 1708–12, 23 nov. 2001.
- DALEY, W. P.; PETERS, S. B.; LARSEN, M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. **Journal of cell science**, v. 121, n. Pt 3, p. 255–64, 1 fev. 2008.
- DEEP, G. et al. Silibinin inhibits fibronectin induced motility, invasiveness and survival in human prostate carcinoma PC3 cells via targeting integrin signaling. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 768, p. 35–46, 2014.
- DESAI, B.; MA, T.; CHELLAIAH, M. A. Invadopodia and matrix degradation, a new property of prostate cancer cells during migration and invasion. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 20, p. 13856–66, 16 maio 2008.
- DESTAING, O. et al. Invadosome regulation by adhesion signaling. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 23, n. 5, p. 597–606, out. 2011.
- DOCHEVA, D. et al. Effect of collagen I and fibronectin on the adhesion, elasticity and cytoskeletal organization of prostate cancer cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 402, n. 2, p. 361–6, 12 nov. 2010.
- DOYLE, A. D. et al. One-dimensional topography underlies three-dimensional fibrillar cell migration. **The Journal of Cell Biology**, v. 184, n. 4, 2009.
- EDDY, R. J. et al. Tumor Cell Invadopodia: Invasive Protrusions that Orchestrate Metastasis. **Trends in Cell Biology**, v. 27, n. 8, p. 595–607, ago. 2017.
- EDMONDSON, R. et al. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. **ASSAY and Drug Development Technologies**, v. 12, n. 4, p. 207–218, maio 2014.
- ENTSCHLADEN, F. et al. Differential requirement of protein tyrosine kinases and protein kinase C in the regulation of T cell locomotion in three-dimensional collagen matrices. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 159, n. 7, p. 3203–10, 1 out. 1997.
- EZRATTY, E. J.; PARTRIDGE, M. A.; GUNDERSEN, G. G. Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. **Nature Cell Biology**, v. 7, n. 6, p. 581–590, 15 jun. 2005.
- FRIEDL, P. et al. Migration of highly aggressive MV3 melanoma cells in 3-dimensional collagen lattices results in local matrix reorganization and shedding of alpha2 and beta1 integrins and CD44. **Cancer research**, v. 57, n. 10, p. 2061–70, 15 maio 1997.
- FRIEDL, P.; BORGMANN, S.; BRÖCKER, E. Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 70, n. 4, p. 491–509, 1 out. 2001.
- FRIEDL, P.; BRÖCKER, E.-B. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, v. 57, n. 1, p. 41–64, 1 jan. 2000.
- FRIEDL, P.; WOLF, K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. **The Journal of Cell Biology**, v. 188, n. 1, 2010.
- HALFTER, W. et al. New concepts in basement membrane biology. **FEBS Journal**, v. 282, n. 23, p. 4466–4479, dez. 2015.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 4 mar. 2011.
- HÄRMÄ, V. et al. A Comprehensive Panel of Three-Dimensional Models for Studies of Prostate Cancer Growth, Invasion and Drug Responses. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. e10431, 3 maio 2010.
- HELLERSTEDT, B. A.; PIENTA, K. J. The current state of hormonal therapy for prostate cancer. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 52, n. 3, p. 154–79, 2002.
- HOSHINO, D.; BRANCH, K. M.; WEAVER, A. M. Signaling inputs to invadopodia and podosomes.

- Journal of cell science**, v. 126, n. Pt 14, p. 2979–89, 15 jul. 2013.
- HOTARY, K. et al. A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. **Genes & development**, v. 20, n. 19, p. 2673–86, 1 out. 2006.
- HUTMACHER, D. W. et al. Can tissue engineering concepts advance tumor biology research? **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 125–133, mar. 2010.
- HYNES, R. O. **Fibronectins**. [s.l.] Springer New York, 1990.
- HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, v. 110, n. 6, p. 673–87, 20 set. 2002.
- HYNES, R. O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. **Science (New York, N.Y.)**, v. 326, n. 5957, p. 1216–9, 27 nov. 2009.
- JEDRZEJCZAK-SILICKA, M. History of Cell Culture. In: **New Insights into Cell Culture Technology**. [s.l.] InTech, 2017.
- JIA, D. et al. Fibronectin matrix-mediated cohesion suppresses invasion of prostate cancer cells. **BMC cancer**, v. 12, p. 94, jan. 2012.
- KAIGHN, M. E. et al. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). **Investigative urology**, v. 17, n. 1, p. 16–23, jul. 1979.
- KELLEY, L. C. et al. Cortactin phosphorylated by ERK1/2 localizes to sites of dynamic actin regulation and is required for carcinoma lamellipodia persistence. **PLoS one**, v. 5, n. 11, p. e13847, jan. 2010.
- KIKKAWA, Y. et al. Laminin-111-derived peptides and cancer. **Cell adhesion & migration**, v. 7, n. 1, p. 150–256, 2013.
- KNOWLES, L. M.; MALIK, G.; PILCH, J. Plasma Fibronectin Promotes Tumor Cell Survival and Invasion through Regulation of Tie2. **Journal of Cancer**, v. 4, n. 5, p. 383–90, jan. 2013.
- KURATOMI, Y. et al. Laminin gamma 1 chain peptide, C-16 (KAFDITYVRLKF), promotes migration, MMP-9 secretion, and pulmonary metastasis of B16-F10 mouse melanoma cells. **British journal of cancer**, v. 86, n. 7, p. 1169–73, 8 abr. 2002.
- LABELLE, M.; HYNES, R. O. The initial hours of metastasis: The importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 12, p. 1091–1099, 2012.
- LAUFFENBURGER, D. A.; HORWITZ, A. F. Cell migration: a physically integrated molecular process. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 359–69, 9 fev. 1996.
- LEE, C. S. **Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells**. Disponível em: <<http://www.nature.com/nmeth/journal/v4/n4/pdf/nmeth1015.pdf>>. Acesso em: 3 maio. 2016.
- LEE, C. S. et al. GTP-dependent interaction between phospholipase D and dynamin modulates fibronectin-induced cell spreading. **Cellular Signalling**, v. 27, n. 12, p. 2363–2370, 2015.
- LINDER, S.; AEPFELBACHER, M. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. **Trends in cell biology**, v. 13, n. 7, p. 376–85, jul. 2003.
- LINDER, S.; WIESNER, C.; HIMMEL, M. Degrading Devices: Invadosomes in Proteolytic Cell Invasion. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, n. 1, p. 185–211, 10 nov. 2011.
- LUCAS, J. T. et al. Regulation of invasive behavior by vascular endothelial growth factor is HEF1-dependent. **Oncogene**, v. 29, n. 31, p. 4449–4459, 5 ago. 2010.
- LYDON, M. J.; HUGHES, R. C. Fibronectin synthesis and surface expression is correlated with cell morphology and adhesiveness in a cold-sensitive, G1-defective mutant of CHO cells. **Experimental cell research**, v. 135, n. 2, p. 347–54, out. 1981.
- MAASER, K. et al. Functional hierarchy of simultaneously expressed adhesion receptors: integrin alpha2beta1 but not CD44 mediates MV3 melanoma cell migration and matrix reorganization within three-dimensional hyaluronan-containing collagen matrices. **Molecular biology of the cell**, v. 10, n. 10, p. 3067–79, out. 1999.
- MADER, C. C. et al. An EGFR-Src-Arg-Cortactin Pathway Mediates Functional Maturation of Invadopodia and Breast Cancer Cell Invasion. **Cancer Research**, v. 71, n. 5, p. 1730–1741, 1 mar. 2011.
- MAGNUSSON, M. K.; MOSHER, D. F. Fibronectin : Structure, Assembly, and Cardiovascular Implications. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 18, n. 9, p. 1363–1370, 1 set. 1998.
- MCNIVEN, M. A. et al. The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. **Trends in biochemical sciences**, v. 25, n. 3, p. 115–20, mar. 2000.
- MENG, X. N. et al. Characterisation of fibronectin-mediated FAK signalling pathways in lung cancer cell migration and invasion. **British journal of**

- cancer**, v. 101, n. 2, p. 327–34, 21 jul. 2009.
- MITRA, A.; MISHRA, L.; LI, S. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 347–354, jun. 2013.
- MONSKY, W. L. et al. A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells. **Cancer research**, v. 54, n. 21, p. 5702–10, 1 nov. 1994.
- MOREAU, V. et al. Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. **Molecular and cellular biology**, v. 23, n. 19, p. 6809–22, out. 2003.
- MOTT, J. D.; WERB, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n. 5, p. 558–564, out. 2004.
- MURPHY, D. A.; COURTNEIDGE, S. A. The “ins” and “outs” of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 12, n. 7, p. 413–26, jul. 2011.
- NAKAHARA, H. et al. Involvement of Cdc42 and Rac small G proteins in invadopodia formation of RPMI7951 cells. **Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms**, v. 8, n. 12, p. 1019–27, dez. 2003.
- NARGIS, N. N.; ALDREDGE, R. C.; GUY, R. D. The influence of soluble fragments of extracellular matrix (ECM) on tumor growth and morphology. **Mathematical Biosciences**, v. 296, n. November 2016, p. 1–16, 2018.
- NASCIMENTO, C. F. et al. Laminin-111 derived peptides AG73 and C16 regulate invadopodia activity of a human adenoid cystic carcinoma cell line. **Experimental cell research**, v. 317, n. 18, p. 2562–72, 1 nov. 2011.
- NIENHUIS, H. H. et al. Targeting breast cancer through its microenvironment: Current status of preclinical and clinical research in finding relevant targets. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 147, p. 63–79, mar. 2015.
- NØRGAARD, M. et al. Skeletal Related Events, Bone Metastasis and Survival of Prostate Cancer: A Population Based Cohort Study in Denmark (1999 to 2007). **The Journal of Urology**, v. 184, n. 1, p. 162–167, jul. 2010.
- OSER, M. et al. Cortactin regulates cofilin and N-WASp activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation. **The Journal of Cell Biology**, v. 186, n. 4, p. 571–587, 24 ago. 2009.
- OTEY, C. A.; BURRIDGE, K. Patterning of the membrane cytoskeleton by the extracellular matrix. **Seminars in cell biology**, v. 1, n. 5, p. 391–9, out. 1990.
- PAN, Y.-R.; CHEN, C.-L.; CHEN, H.-C. FAK is required for the assembly of podosome rosettes. **The Journal of Cell Biology**, v. 195, n. 1, 2011.
- PANKOV, R.; YAMADA, K. M. Fibronectin at a glance. **Journal of cell science**, v. 115, n. Pt 20, p. 3861–3, 15 out. 2002.
- PAREKH, A.; WEAVER, A. M. Regulation of invadopodia by mechanical signaling. **Experimental Cell Research**, v. 343, n. 1, p. 89–95, 2016.
- PAYNE, H. Management of locally advanced prostate cancer. **Asian journal of andrology**, v. 11, n. 1, p. 81–7, jan. 2009.
- PEEHL, D. M. Primary cell cultures as models of prostate cancer development. **Endocrine-related cancer**, v. 12, n. 1, p. 19–47, mar. 2005.
- PENTYALA, S. N. et al. Androgen induction of urokinase gene expression in LNCaP cells is dependent on their interaction with the extracellular matrix. **Cancer letters**, v. 130, n. 1–2, p. 121–6, 14 ago. 1998.
- PIGNATELLI, J. et al. Hic-5 promotes invadopodia formation and invasion during TGF- β -induced epithelial–mesenchymal transition. **The Journal of Cell Biology**, v. 197, n. 3, 2012.
- PROVENZANO, P. P. et al. Contact guidance mediated three-dimensional cell migration is regulated by Rho/ROCK-dependent matrix reorganization. **Biophysical journal**, v. 95, n. 11, p. 5374–84, dez. 2008.
- RABINOVITZ, I.; MERCURIO, A. M. The Integrin $\alpha 6 \beta 4$ Functions in Carcinoma Cell Migration on Laminin-1 by Mediating the Formation and Stabilization of Actin-containing Motility Structures. **The Journal of Cell Biology**, v. 139, n. 7, p. 1873–1884, 29 dez. 1997.
- REVACH, O.-Y.; GEIGER, B. The interplay between the proteolytic, invasive, and adhesive domains of invadopodia and their roles in cancer invasion. **Cell adhesion & migration**, v. 8, n. 3, p. 215–25, 2014.
- RISBRIDGER, G. P. et al. Breast and prostate cancer: more similar than different. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 3, p. 205–212, 11 mar. 2010.
- RODRÍGUEZ-HERNANDEZ, C. O. Cell culture : History , Development and Prospects International

- Journal of Current Research. n. September 2016, 2014.
- ROHATGI, R. et al. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. **Cell**, v. 97, n. 2, p. 221–31, 16 abr. 1999.
- ROSENTHAL, S. A.; SANDLER, H. M. Treatment strategies for high-risk locally advanced prostate cancer. **Nature Reviews Urology**, v. 7, n. 1, p. 31–38, jan. 2010.
- SABEH, F. et al. Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. **The Journal of Cell Biology**, v. 167, n. 4, p. 769–781, 22 nov. 2004.
- SCHAEFER, L.; REINHARDT, D. P. Special issue: Extracellular matrix: Therapeutic tools and targets in cancer treatment. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 1–3, fev. 2016.
- SCHENK, S.; QUARANTA, V. Tales from the crypt[ic] sites of the extracellular matrix. **Trends in cell biology**, v. 13, n. 7, p. 366–75, jul. 2003.
- SCHOUMACHER, M. et al. Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. **The Journal of Cell Biology**, v. 189, n. 3, p. 541–556, 3 maio 2010.
- SCHULTZ, G. S. et al. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. **Wound Repair and Regeneration**, v. 19, n. 2, p. 134–148, mar. 2011.
- SCHWARZBAUER, J. E.; DESIMONE, D. W. Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 7, 1 jul. 2011.
- SEALS, D. F. et al. The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. **Cancer Cell**, v. 7, n. 2, p. 155–165, fev. 2005.
- SHARMA, V. P. et al. Tks5 and SHIP2 Regulate Invadopodium Maturation, but Not Initiation, in Breast Carcinoma Cells. **Current Biology**, v. 23, n. 21, p. 2079–2089, nov. 2013.
- SIQUEIRA, A. S. et al. Laminin-111 peptide C16 regulates invadopodia activity of malignant cells through $\beta 1$ integrin, Src and ERK 1/2. **Oncotarget**, v. 7, n. 30, p. 47904–47917, 26 jul. 2016.
- SOUZA, A. G. et al. Advances in Cell Culture: More than a Century after Cultivating Cells. **Journal of Biotechnology & Biomaterials**, v. 6, n. 2, 29 set. 2016.
- STURGE, J.; CALEY, M. P.; WAXMAN, J. Bone metastasis in prostate cancer: emerging therapeutic strategies. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 8, n. 6, p. 357–368, 10 jun. 2011.
- SUNG, B. H. et al. Cortactin controls cell motility and lamellipodial dynamics by regulating ECM Secretion. **Current Biology**, v. 21, n. 17, p. 1460–1469, 2011.
- TAGUE, S. E.; MURALIDHARAN, V.; D’SOUZA-SCHOREY, C. ADP-ribosylation factor 6 regulates tumor cell invasion through the activation of the MEK/ERK signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 26, p. 9671–6, 29 jun. 2004.
- TANG, Y. et al. MT1-MMP-Dependent Control of Skeletal Stem Cell Commitment via a $\beta 1$ -Integrin/YAP/TAZ Signaling Axis. **Developmental Cell**, v. 25, n. 4, p. 402–416, maio 2013.
- TATIN, F. et al. A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol ester. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 4, p. 769–781, 15 fev. 2006.
- TECHNOLOGIES, L. S. Cell Culture Enters the Third Dimension. p. 1–3, 2012.
- THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular Matrix Structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 4–27, nov. 2015.
- TOLDE, O. et al. The structure of invadopodia in a complex 3D environment. **European Journal of Cell Biology**, v. 89, n. 9, p. 674–680, set. 2010.
- URTREGER, A. J. et al. Fibronectin is distinctly downregulated in murine mammary adenocarcinoma cells with high metastatic potential. **Oncology reports**, v. 16, n. 6, p. 1403–10, dez. 2006.
- VALYI-NAGY, K. An emerging role of biorepositories in personalized medicine: isolation and processing of primary tumor cells for the establishment of 3D tumor cultures from solid tumor specimens. **Journal of Oncology and Biomarker Research**, v. 1, p. 1–3, 6 ago. 2014.
- WEBB, B. A. et al. PAK1 induces podosome formation in A7r5 vascular smooth muscle cells in a PAK-interacting exchange factor-dependent manner. **AJP: Cell Physiology**, v. 289, n. 4, p. C898–C907, 25 maio 2005.
- WELCH, M. D.; MULLINS, R. D. Cellular control of actin nucleation. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 18, p. 247–88, jan. 2002.
- WHITE, E. S.; BARALLE, F. E.; MURO, A. F. New insights into form and function of fibronectin splice variants. **The Journal of pathology**, v. 216,

n. 1, p. 1–14, set. 2008.

WOLF, K. et al. Compensation mechanism in tumor cell migration. **The Journal of Cell Biology**, v. 160, n. 2, p. 267–277, 20 jan. 2003.

WOLF, K. et al. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 8, p. 893–904, 8 ago. 2007.

WYCKOFF, J. B. et al. ROCK- and Myosin-Dependent Matrix Deformation Enables Protease-Independent Tumor-Cell Invasion In Vivo. **Current Biology**, v. 16, n. 15, p. 1515–1523, ago. 2006.

YAMAGUCHI, H. et al. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. **The Journal of cell biology**, v. 168, n. 3, p. 441–52, 31 jan. 2005.

ZAMAN, M. H. The role of engineering approaches in analysing cancer invasion and metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 8, p. 596–603, 18 ago. 2013.

ZAMIR, E. et al. Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. **Nature cell biology**, v. 2, n. 4, p. 191–6, abr. 2000.

ZHANG, X. et al. Up-regulated microRNA-143 transcribed by nuclear factor kappa B enhances hepatocarcinoma metastasis by repressing fibronectin expression. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 50, n. 2, p. 490–9, ago. 2009.