

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Ana Cristina Moura Gualberto**

**AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE MARCADORES  
ASSOCIADOS À PROGRESSÃO TUMORAL METASTÁTICA DE  
ANIMAIS OBESOS**

JUIZ DE FORA, 2015

**ANA CRISTINA MOURA GUALBERTO**

**AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE MARCADORES  
ASSOCIADOS À PROGRESSÃO TUMORAL METASTÁTICA DE  
ANIMAIS OBESOS**

Dissertação de Mestrado do Curso  
de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas, para obtenção do Título  
de Mestre em Ciências Biológicas na  
área de Imunologia e DIP

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jacy Gameiro**

JUIZ DE FORA, 2015

Cristina Moura Gualberto, Ana.

AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE MARCADORES ASSOCIADOS À  
PROGRESSÃO TUMORAL METASTÁTICA DE ANIMAIS OBESOS / Ana  
Cristina Moura Gualberto. -- 2015.

64 p.

Orientadora: Jacy Gameiro

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2015.

1. câncer de mama. 2. obesidade. 3. marcadores de matriz  
extracelular. 4. progressão tumoral. I. Gameiro, Jacy,  
orient. II. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais que me ensinaram a ter dedicação e coragem. Minhas referências!

## AGRADECIMENTOS

É muito difícil transformar sentimentos em palavras. Diante das surpresas da vida nesses dois anos, só tenho a agradecer as pessoas maravilhosas que estiveram sempre ao meu lado. Os meus agradecimentos com muito amor e carinho vão pra essas queridas pessoas que foram imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho.

Agradeço a Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade. A CAPES e Fapemig, pelos financiamentos.

Agradeço a Deus pelo dom da vida e amparo nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Rosângela e José Gualberto, pelo apoio, incentivo, carinho e mãos estendidas de todos os dias. São os melhores pais do mundo e os amores da minha vida!

Às minhas irmãs, Flávia, Daniela e Fabiana, por me presentear com a companhia, amizade e alegria. À minha bolinha de pêlo, Dom, pelo amor e companheirismo diários.

À minha querida orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Jacy Gameiro, agradeço por ser uma pessoa ética e pela liberdade que sempre me deu para trabalhar. Agradeço também por ser amiga compreensível e acima de tudo humana.

Aos professores Flávia de Paoli, e Vinícius Novaes Rocha, Juciane Maria de Andrade Castro, Ana Paula Ferreira, Henrique Teixeira e Gilson Macedo pelas colaborações.

Aos amigos do Gameiros`s Group, Gabriela, Sara, Pollyanna, Diego, Lúcia, Maria Júlia, Felipe, Ranieri, Luiza, Mayara e Guilherme, essenciais para a conclusão desse trabalho.

Aos meus queridos amigos Sara, Diego, Maíra, Luan e Pilar por me mostrarem como viver mais leve, por tanto carinho e parceria. Amo muito vocês!

Aos amigos da Biodelirante, pelos bons momentos. Aos amigos de Mestrado, Luan e Érick, por dois anos de companheirismo.

Ao Ulisses, por me auxiliar em minha própria compreensão.

Aos colegas da Unicamp, agradeço pelos ensinamentos. Aos amigos do Laboratório de Imunologia, companhias agradáveis de trabalho.

Aos professores da banca examinadora, pelas colaborações e disponibilidade ao contribuir para este trabalho.

**O mundo de cada um é feito com o que faz sentido e os move,**

**Jacob von Uexk**

## RESUMO

A obesidade afeta mais de 300 milhões de pessoas no mundo e está relacionada com doenças como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e cânceres. Assim como a obesidade, o câncer é atualmente um problema de saúde pública mundial com um aumento em sua incidência de 20% anualmente. Há uma correlação positiva entre a incidência de tumores com pior prognóstico e a obesidade. No microambiente tumoral a degradação dos elementos de matriz extracelular (MEC) está associada à migração de células tumorais por meio de membranas basais, barreira óssea e estroma intersticial. Moléculas associadas à MEC como metaloproteinase de matriz (MMP-2, 3, 9, 11 e 13) auxiliam a degradação da MEC, permitindo assim maior migração de células tumorais, estão, portanto, associados com as etapas de progressão tumoral assim como seus inibidores (TIMP-1, TIMP-2 e RECK), e outros componentes da MEC como a fibronectina, e colágeno IV. Portanto, a identificação dessas moléculas associadas ao processo metastático em camundongos obesos e a elucidação de seu papel neste processo são importantes para a exploração de novos métodos para o diagnóstico precoce, avaliação prognóstica e padronização de novas estratégias terapêuticas. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar e comparar marcadores associados a processos metastáticos em animais obesos e controle por meio de imunohistoquímica. Para tal a obesidade foi induzida durante 12 ou 16 semanas por meio de uma dieta hiperlipídica em que 60% das quilocalorias foram advindas de lipídeos. Ao final dessas semanas, o câncer de mama foi induzido pela linhagem celular metastática 4T1 com injeção intradérmica na mama superior de camundongos BALB/c (n=40). Os animais foram eutanasiados após 14 ou 21 dias e os tumores foram coletados. A análise histopatológica dos tumores foi feita por coloração Hematoxilina-Eosina observando um aumento de vacúolos lipídicos, que podem contribuir para o recrutamento de células imunes como fatores de crescimento, em tumores de animais obesos comparados aos animais controles. Em relação a imunohistoquímica em tumores obteve-se uma maior concentração dos marcadores MMP-3, 9, 11, 13 nos animais obesos e uma menor concentração em seu inibidor RECK, demonstrando uma possível progressão tumoral mais invasiva nesses animais. Em relação a fibronectina e colágeno IV foi encontrado uma marcação mais intensa em animais obesos em relação ao controle. Entretanto, TIMP-1 e TIMP-2, demonstraram-se super expressos nos obesos, como encontrado na literatura. Assim, os resultados indicam um tumor uma progressão tumoral com um tumor mais invasivo e por isso um pior prognóstico em animais obesos quando comparados aos controles.

Palavras chave: câncer de mama, obesidade, marcadores de matriz extracelular, progressão tumoral

## ABSTRACT

Obesity affects more than 300 million people worldwide and is associated with diseases such as type 2 diabetes, cardiovascular diseases and cancers. As obesity, cancer is currently a global public health problem increasing 20% annually. There is a positive correlation between the incidence of tumors with poor prognosis and obesity. The degradation of extracellular matrix components (ECM) in the tumor microenvironment is associated with tumor cells migration through basement membranes, bone barrier and interstitial stroma. Molecules associated with ECM such as extracellular matrix metalloproteinase (MMP-2, 3, 9, 11 and 13) help the degradation of ECM, and so promote tumor cell migration. Therefore, these molecules are associated with tumor progression stages as well as their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2 and RECK), and other ECM components such as fibronectin and collagen IV. Thus, the identification of these molecules associated with the metastatic process in obese mice and the elucidation of their role in this process are important to explore new methods for early diagnosis, prognostic evaluation and standardization of new therapeutic strategies. Thus, this study aimed to evaluate and compare markers associated with metastatic processes in obese and control animals by immunohistochemistry. For that purpose, obesity was induced for 12 or 16 weeks by a high fat diet (60% of the kilocalories is from lipids). At the end of those weeks, breast cancer was induced by metastatic cell line 4T1 with intradermal injection in the upper breast BALB / c mice (n = 40). These animals were euthanized after 14 or 21 days and the tumors were collected. Histopathology analysis of the tumors was performed by Hematoxylin-Eosin staining. As result, it was observed an increase in lipid vacuoles, which may contribute to the recruitment of immune cells such as tumor growth factors in obese animals compared to control animals. The immunohistochemistry analysis shows a higher concentration of MMP-3, 9, 11, 13 expressions in obese animals and a lower concentration of their inhibitor RECK, suggesting a more aggressive tumor invasion in those animals. Regarding the fibronectin and collagen type IV were found higher concentrations in obese animals compared to controls. However, TIMP-1 and TIMP-2, showed an upregulation in obese, as found in the literature. Thus, the results indicate more invasive breast cancer progression and so a worse prognosis in obese animals when compare to controls.

Keywords: Breast cancer, obesity, extracellular matrix markers, tumor progression

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estimaiva de novos casos de cânceres primários em mulheres em 2014 -----	18
<b>Figura 2:</b> Desenvolvimento de metástases em tumores -----	20
<b>Figura 3:</b> Estrutura das MMPs -----	24
<b>Figura 4:</b> Atividade de metaloproteinasas na invasão tecidual, angiogênese e metástase tumoral -----	26
<b>Figura 5:</b> A progressão tumoral e a atuação de metaloproteinasas de matriz-27	
<b>Figura 6:</b> Análise do perfil bioquímico em camundongos controles e obesos com 12 e 16 semanas de dieta-----	39
<b>Figura 7:</b> Análise de necrose tumoral em camundongos após 12 semanas de dieta -----	40
<b>Figura 8:</b> Análise de vacúolos lipídicos indicados por seta em animais controles e obesos-----	41
<b>Figura 9:</b> Imunohistoquímicas da análise da expressão de MMP-13 em animais controles e obesos-----	42
<b>Figura 10:</b> Imunohistoquímicas da análise da expressão de TIMP-1 em animais controles e obesos-----	43
<b>Figura 11:</b> Imunohistoquímicas da análise da expressão de RECK em animais controles e obesos-----	44
<b>Figura 12:</b> Imunohistoquímicas da análise da expressão de FIBRONECTINA em animais controles e obesos -----	45
<b>Figura 14:</b> Imunohistoquímicas da análise da expressão de MMP-2 em animais controles e obesos de 16 semanas de dieta -----	47
<b>Figura 15;</b> Imunohistoquímicas da análise da expressão de MMP-3 em animais controles e obesos de 16 semanas de dieta -----	48

**Figura 16:** Imunohistoquímicas da análise da expressão de MMP-9 em animais controles e obesos de 16 semanas de dieta -----49

**Figura 17:** Imunohistoquímicas da análise da expressão de MMP-11 em animais controles e obesos de 16 semanas de dieta -----50

**Figura 18:** Imunohistoquímicas da análise da expressão de TIMP-2 em animais controles e obesos de 16 semanas de dieta -----51

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Principais diferenças entre tumores benignos e malignos -----	15
<b>Tabela 2:</b> Características da MMPs humanas -----	23
<b>Tabela 3:</b> Grupo de animais com 12 semanas de dieta. -----	32
<b>Tabela 4:</b> Grupo de animais com 16 semanas de dieta. -----	32
<b>Tabela 5:</b> Componentes da ração hiperlipídica utilizados em 1Kg. -----	34
<b>Tabela 6:</b> Quantificação de vacúolos lipídicos em animais controles e obesos de 12 e 16 semanas de dieta -----	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>MMP</b>	<b>Metaloproteinase de matriz</b>
<b>PRO-MMP</b>	<b>Metaloproteinase inativa</b>
<b>MT-MMP</b>	<b>Metaloproteinase do tipo membrana</b>
<b>VEGF</b>	<b>Fator de crescimento vascular endotelial</b>
<b>IL-4</b>	<b>Interleucina 4</b>
<b>IL-10</b>	<b>Interleucina 10</b>
<b>EGF</b>	<b>Fator de crescimento epidérmico</b>
<b>FGF</b>	<b>Fator de crescimento do fibroblasto</b>
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	<b>Fator transformador de crescimento – <math>\alpha</math></b>
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	<b>Fator transformador de crescimento <math>\beta</math>1</b>
<b>TIMP</b>	<b>Inibidor tecidual de metaloproteinase</b>
<b>RECK</b>	<b>Inibidor de metaloproteinase</b>
<b>HIF1-<math>\alpha</math></b>	<b>Fator induzido por hipóxia 1 – <math>\alpha</math></b>
<b>IMC</b>	<b>Índice de massa corporal</b>
<b>CCL2</b>	<b>Quimiocina da família CC</b>
<b>CXCL8</b>	<b>Quimiocina ou interleucina 8</b>
<b>4T1</b>	<b>Linhagem metastática de carcinoma mamário</b>
<b>MEC</b>	<b>Matriz extracelular</b>
<b>IL-1</b>	<b>Interleucina tipo 1</b>
<b>IL-6</b>	<b>Interleucina tipo 6</b>
<b>TNF</b>	<b>Fator de necrose tumoral</b>
<b>TAM</b>	<b>Macrófagos associados ao tumor</b>
<b>CÉLULA NK</b>	<b>Célula Natural Killer, célula matadora natural</b>
<b>CÉLULA TCD8</b>	<b>Linfócito T citotóxico</b>

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução.....</b>	<b>14</b>
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>29</b>
2.1 Objetivo geral.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
<b>3 Material e métodos.....</b>	<b>30</b>
3.1 Análise do perfil bioquímico.....	30
3.2 Animais.....	30
3.3 Linhagem celular.....	32
3.4 Indução da obesidade.....	32
3.5 Indução do tumor de mama e obesidade.....	33
3.6 Morfologia.....	34
3.7 Imunohistoquímica.....	34
3.8 Análise microscópica.....	35
3.9 Quantificação de imunohistoquímica.....	36
<b>4 Resultados.....</b>	<b>37</b>
4.1 Caracterização do modelo animal.....	37
4.2 Análise histopatológica do tecido tumoral.....	39
4.3 Análise histopatológica de vacúolos lipídicos.....	40
4.4 Relação entre MMP-13 e alguns inibidores.....	41
4.5 Expressão de elementos de matriz extracelular.....	44
4.6 Expressão de metaloproteinases em animais de 16 semanas de dieta.....	46

4.7 Relação entre a expressão de MMP-2 e TIMP-2 em animais de 16 semanas de dieta.....	50
<b>5 Discussão.....</b>	<b>51</b>
<b>6 Conclusão.....</b>	<b>56</b>
<b>7 Referências Bibliográficas.....</b>	<b>58</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Os tumores são caracterizados por uma formação anormal de células em qualquer tecido do corpo. Existem tumores benignos que são formados por células semelhantes à do tecido normal, com células bem delimitadas e sem a ocorrência de metástases e tumores malignos, os cânceres, que possuem um crescimento rápido com células pouco delimitadas e metástase frequentemente presente como mostra a tabela 1 (INCA 2015; OMS).

TUMOR BENIGNO	TUMOR MALIGNO
Formado por células bem diferenciadas (semelhantes às do tecido normal); estrutura típica do tecido de origem	Formado por células anaplásicas (diferentes das do tecido normal); atípico, falta diferenciação
Crescimento progressivo; pode regredir	Crescimento rápido; mitoses anormais e numerosas
Não ocorre metástase, Não invade nem infiltra tecidos adjacentes	Metástase frequentemente presente
Massa bem delimitada	Massa pouco delimitada, localmente invasivo; infiltra tecidos adjacentes

Tabela 1: Principais diferenças entre tumores benignos e malignos (INCA 2012, OMS 2012)

O câncer é atualmente um problema de saúde pública mundial com um aumento em sua incidência de 20% anualmente. Espera-se para 2030, 27 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo. Somente no Brasil, em 2013, registrou-se 520 mil novos casos e, em 2014, 580 mil novos casos de câncer (INCA, 2014).

De acordo com os estudos atuais, o câncer pode ser desencadeado por desordens genéticas devido à exposição a fatores ambientais de risco como radiação solar, tabagismo, álcool, medicamentos, hábitos alimentares, hábitos sexuais ou por uma multicasualidade (INCA, 2014).

Os diferentes tipos celulares se multiplicam passando pelas quatro fases do ciclo celular, G1, S, G2 e M, que possuem pontos de checagem garantindo que a transição de uma fase a outra ocorra sem que haja erros. Entretanto, as células cancerosas surgem devido ao crescimento autônomo das células que não respondem ao controle celular dando origem a clones de células transformadas que estão associadas a uma desordem de funções celulares essenciais como proliferação, morte e diferenciação, formando outras novas células anormais e acarretando transtornos funcionais (Urrego et al., 2014).

Diante da enorme variabilidade entre os vários tipos de câncer exibindo características muito heterogêneas, os tumores malignos adquiriram a propriedade de serem incapazes de morrer por apoptose, uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos. (Hassan, Watari, Abualmaaty, Ohba, & Sakuragi, 2014) A homeostasia celular se dá por um balanço entre a quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. O processo de apoptose também ocorre quando não há uma adesão correta à matriz extracelular, fundamental para a sobrevivência celular e problemas nesse processo de fixação induz um tipo de apoptose denominado *anoikis* (Gilmore, 2005).

Do ponto de vista imunológico, os antígenos expressos pelos tumores são reconhecidos pelo sistema imune, porém, as células tumorais são semelhantes às células do hospedeiro em muitos aspectos resultando em um reconhecimento de poucos antígenos como não próprios e tornando o tumor fracamente imunogênico. Outra justificativa para a falha de respostas imunológicas na prevenção do crescimento tumoral está no fato de a massa tumoral se desenvolver rapidamente, superando a capacidade do sistema

imunológico de erradicar todas as células tumorais existentes por meio de respostas de células CD8+ e células natural killer (NK) (Finn, 2012).

As células tumorais, segundo Hanahan et al., (2000), possuem características que as diferem de células não cancerosas e influenciam a fisiologia normal da célula: 1) auto-suficiência quanto a fatores de crescimento 2) não resposta a fatores inibitórios de proliferação 3) evasão à apoptose 4) alto potencial de replicação 5) angiogênese sustentada 6) invasão tecidual e metástase ( resultado do processo de interação entre as células tumorais e o microambiente em que elas se encontram). Recentemente, os eventos moleculares que correlacionam inflamação e câncer estão sendo elucidados, estabelecendo a inflamação como a sétima característica de alteração que interfere na homeostase celular.

No microambiente tumoral, as células inflamatórias contribuem para a proliferação e sobrevivência das células malignas, angiogênese, metástase e subversão da imunidade adaptativa. Dados recentes sugerem que um mecanismo envolvido na inflamação relacionada ao câncer é a indução de instabilidade genética por mediadores inflamatórios levando ao acúmulo de alterações genéticas aleatórias em células tumorais. As principais características da inflamação relacionadas ao câncer incluem a infiltração de leucócitos do sangue, macrófagos associados ao tumor (TAMs) cujo acúmulo está associado a regiões hipóxicas de tumores, a presença de mensageiros polipeptídicos de inflamação como citocinas (TNF, IL-1, IL-6) e quimiocinas tal como CCL2 e CXCL8 (Colotta, Allavena, Sica, Garlanda, & Mantovani, 2009).

É bem documentado, por exemplo, que em um tecido mamário normal, as estruturas celulares se modificam ciclicamente em resposta aos hormônios

ovarianos. A proliferação celular, a apoptose, invasão e diferenciação são processos que são precisamente regulados, mas, se desregulam em patologias como o câncer alterando os processos fisiológicos supracitados (Lebeau, Nerlich, Sauer, Lichtinghagen, & Löhrs, 1999).

O desenvolvimento de um tumor depende, portanto, de alterações celulares que se estabelecem e levam ao crescimento de uma massa tumoral. Nas neoplasias malignas de acordo com a origem tecidual, os tumores são como de origem epitelial como carcinoma ou adenocarcinoma, de origem conjuntiva como lipossarcoma ou fibrossarcoma, de origem hemolinfopoética como leucemia ou linfomas, entre outros. (INCA, 2014)

A incidência de carcinomas (tumor maligno desenvolvido a partir de células epiteliais) como o de objeto de estudo, corresponde a 80% dos casos em adultos (MELO, *et al.*, 2011). O câncer de mama recebe destaque na literatura por ser o segundo tipo de tumor mais frequente em mulheres, respondendo por 20% dos casos novos de câncer a cada ano como mostra a figura 1 (INCA, 2014).



	casos novos	%
<b>Mulheres</b>		
Mama Feminina	57.120	20,8%
Cólon e Reto	17.530	6,4%
Colo do Útero	15.590	5,7%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Estômago	7.520	2,7%
Corpo do Útero	5.900	2,2%
Ovário	5.680	2,1%
Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Leucemias	4.320	1,6%

Figura 1 - Estimativa de novos casos de cânceres primários em mulheres em 2014 segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2014)

Na população mundial, a média de sobrevida após cinco anos de surgimento do tumor primário, é de 61%. No Brasil, as taxas de mortalidade devido ao câncer de mama continuam elevadas, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados. Relativamente raro antes dos 35 anos, acima desta faixa etária, a incidência do câncer de mama cresce rápida e progressivamente (INCA, 2014)

O câncer de mama possui alto potencial metastático, se espalhando para outras partes do corpo a partir de em média três anos do diagnóstico inicial, e tumores secundários reaparecem, dez anos ou mais após o surgimento do tumor primário. As terapias atuais incluindo o processo cirúrgico, terapia hormonal, quimioterapia, radioterapia e a combinação destas, não são totalmente eficazes se tratando de metástases no câncer de mama (Ali, SM et al., 2003).

A maioria dos tumores sólidos malignos causam metástase a partir de um órgão primário e se espalham para outros órgãos como pulmão, fígado, cérebro e ossos. As células tumorais conseguem evadir à resposta de células T CD8+ e células Natural Killer (NK) e, a partir daí, serão capazes de formar novos vasos sanguíneos, processo chamado de angiogênese, que será imprescindível para o estabelecimento de um microambiente tumoral com nutrientes e oxigenação necessária para a sobrevivência das células tumorais

e da constante proliferação das mesmas, como mostra a figura 2.

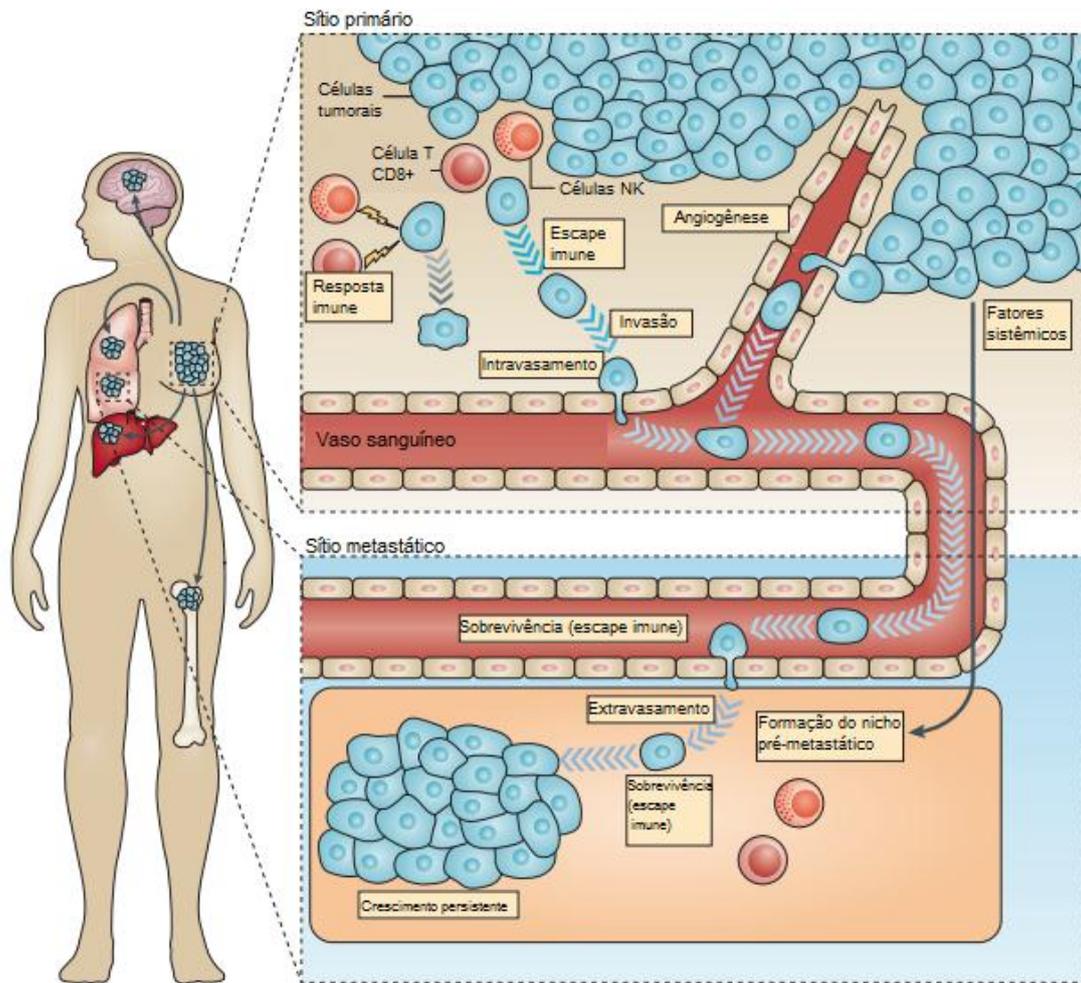


Figura 2: Desenvolvimento de metástases em tumores (Adaptado de Kitamura, Qian, & Pollard, 2015).

A biologia do câncer em todos os seus aspectos celulares, bioquímicos, teciduais, hormonais e imunológicos tiveram grande crescimento com a inserção de modelos animais que pudessem levar os pesquisadores a uma dimensão mais profunda dos acontecimentos que regulam o aparecimento de células tumorais, bem como seu tratamento. Neste sentido, modelos que possibilitam o estudo da biologia do câncer de mama foram desenvolvidos. (Heppner, Miller, & Shekhar, 2000).

Os modelos animais que representam o comportamento do carcinoma mamário humano foram desenvolvidos para lidar com elementos relevantes sobre a biologia, progressão e estabelecimento de metástases do câncer de mama (Heppner et al., 2000). O modelo ortotópico 4T1, baseado em células da linhagem 4T1 derivadas de um carcinoma mamário de camundongos BALB/c, é capaz de promover metástases nos mesmos sítios em que ocorrem no câncer de mama humano, sendo assim uma excelente forma de estudo (Heppner et al., 2000; Lelekakis et al., 1999). Somente com a experimentação animal foi possível estabelecer o papel do microambiente tumoral para sua expressão e estabelecimento de metástases, além de entender como a inflamação está intimamente relacionada com este processo. (Colotta et al., 2009; Heppner et al., 2000).

Para que ocorram metástases e migração celular do tumor, barreiras físicas precisam ser rompidas tais como membrana basal endotelial que permitem a disseminação de células tumorais via sangue ou linfa. Neste sentido, as metaloproteinases de matriz (MMPs – do inglês matrix metalloproteinases) estão associadas com essa quebra de barreiras físicas por meio da degradação de proteínas na matriz extracelular que favorecem a migração de células tumorais (Davies, 2014; Kessenbrock, Plaks, & Werb, 2010).

A matriz extracelular (MEC) se caracteriza por um agrupamento de elementos intercelulares como glicosaminoglicanas (polissacarídeos), proteoglicanas (complexos glicoproteicos), proteínas estruturais (fibras colágenas) e proteínas adesivas (fibronectina). Nos tecidos conjuntivos, as células se encontram dispersas na MEC. Possui diversas funções tais como proteção física, interação entre diversos tipos celulares e liberação de sinais de

sobrevivência e de diferenciação celular. As macromoléculas que constituem a matriz extracelular são secretadas principalmente por fibroblastos, células mais comuns no tecido conjuntivo substrato de MMPs (Kessenbrock et al., 2010; Oskarsson, 2013).

No tecido tumoral, o papel da matriz extracelular não está limitado somente a atuar como barreira física à neoplasia, mas funciona como um reservatório para proteínas ligantes e fatores de crescimento que influenciam o comportamento do mesmo. (DeClerck et al., 2004).

Neste microambiente, a degradação dos elementos de matriz está associada à migração de células tumorais por meio de membranas basais, barreira óssea e estroma intersticial. As metaloproteinases de matriz podem clivar diversos componentes da matriz extracelular e da membrana basal, favorecendo a formação de um microambiente adequado para o desenvolvimento tumoral (Melo, n.d.).

As metaloproteinases de matriz extracelular são uma família de endopeptidases dependentes de zinco para sua atividade que é composta por 24 genes em humanos, sintetizadas como zimogênios inativos (PRO-MMP) (Sternlicht & Werb, 2001) Entre esses genes, há diferentes tipos de metaloproteinases de matriz (MMP): proteinases secretadas e proteinases do tipo membrana (MT-MMP). Classicamente as MMPs são divididas entre collagenases, gelatinases, estromelisinases e metaloproteinases do tipo membrana (EGEBLAD & WER, 2002) conforme mostra a tabela 2.

MMP	Nomes alternativos	Substratos
1	Colagenase 1	Colágeno I, II, III, VII, VIII, X, entactina, agreguina, colágeno desnaturado, proteína básica mielínica, pró-MMP-1, 2, 9
2	Gelatinase A	Colágeno desnaturado, colágeno IV, V,VII,X, XI, XIV, colágeno I, elastina, fibronectina, laminina, agreguina, plasminogênio
3	Estromelina 1	Proteína proteoglicana, laminina, fibronectina, colágeno I, III, IV, V,IX, X, XI, colágeno desnaturado, elastina, proteína básica mielínica
7	Matrilina 1	Colágeno I, IV, V, IX, X, XI, XVIII, colágeno desnaturado, laminina, fibronectina, elastina, agreguina, proteína básica mielínica
8	Colagenase 2	Colágeno I, II, III, V,VII,VIII, X, colágeno desnaturado, agreguina, fibronectina, entactina
9	Gelatinase B ou Colagenase tipo IV	Colágeno desnaturado, colágenos I, IV, V, VII, X, XI, XIV, XVIII, elastina, laminina, fibronectina, plasminogênio, proteína básica mielínica
10	Estromelina 2	Proteína proteoglicana, colágeno I, III, IV, V, laminina, fibronectina, elastina
11	Estromelina 3	Fibronectina, laminina, agreguina, colágeno desnaturado, protease alfa 1
12	Metaloelastase	Elastina, colágeno I, IV, vitronectina, plasminogênio, laminina, fibrinogênio, fibrilina, fibronectina, colágeno desnaturado, proteína básica de mielina
13	Colagenase 3	Colágeno I, II, III, IV, IX, X, XIV, XVIII, colágeno desnaturado, fibronectina, laminina, agreguina
14	MT1-MMP metaloproteinase 1 de membrana	Colágeno I,II, III, colágeno desnaturado, fibronectina, laminina, proteoglicanos, pró-MMPs 2, 13
15	MT2-MMP metaloproteinase 2 de membrana	Fibronectina, laminina, agreguina, proteoglicanos, pró-MMP-2
16	MT3-MMP metaloproteinase 3 de membrana	Colágeno III, colágeno desnaturado, fibronectina, caseína, proteoglicanas de cartilagem, laminina 1, macroglobulina 2, pró-MMP-2
17	MT4-MMP metaloproteinase 4 de membrana	Gelatina, fibrinogênio, fibrina, precursor de TNF, pró-MMP2
18	Colagenase 4	Colágeno I, II, III, gelatina
19	Estromelina 4	Colágeno I, IV, gelatina, agreguina, fibrinogênio, laminina, tenascina, proteína oligomérica da matriz cartilaginosa
20	Enemilina	Amelogenina, agreguina, proteína oligomérica da matriz cartilaginosa
23	CA-MMP	Gelatina
24	MT5-MMP metaloproteinase 5 de membrana	Fibronectina, gelatina, pró-MMP2
25	MT6-MMP metaloproteinase 6 de membrana	Colágeno IV, gelatina, fibronectina, fibrila, pró-MMP2,9
26	Matrilina 2	Gelatina, inibidor da protease alfa, pró-MMP 9
27	C-MMP	?
28	Epilina	Caseína

Tabela 2: Tipos de MMPs (Adaptado de Visse & Nagase, 2003)

As collagenases, incluindo MMPs 1, 5 e 13 catalisam a degradação de formas fibrilares de colágeno I, II e III. As gelatinases como MMP 2 e 9, são collagenases do tipo IV, abundante em membranas basais, que degradam gelatina (colágeno desnaturado) e os tipos V, VII, IX e X. As estromelisinases, exemplificadas por MMP 3, 7, 10 e 11 catalisam a reação de diversas substâncias diferentes como os proteoglicanos, lamininas e fibronectinas. (Lebeau et al., 1999). Por fim, as metaloproteinases do tipo membrana, como MMPs 14, 15 e 16 possuem atividade proteolítica relacionada com a migração de maneira em que a expressão de MT-MMP está associada com células malignas invasivas (Remacle et al., 2013)

A estrutura das metaloproteinases é constituída por um domínio mínimo comum que contém três regiões: uma localização amino-terminal (Pre), um pró-domínio (Pro) contendo um grupo tiol (SH) e o domínio catalisador contendo zinco (Zn). A maioria das MMPs possuem uma região semelhante a hemopexina, um domínio constituído por quatro repetições que contém uma ponte de dissulfeto (SS) entre o primeiro e o último subdomínio, que está ligada ao domínio catalítico de acordo com a figura 3 (Kessenbrock et al., 2010).

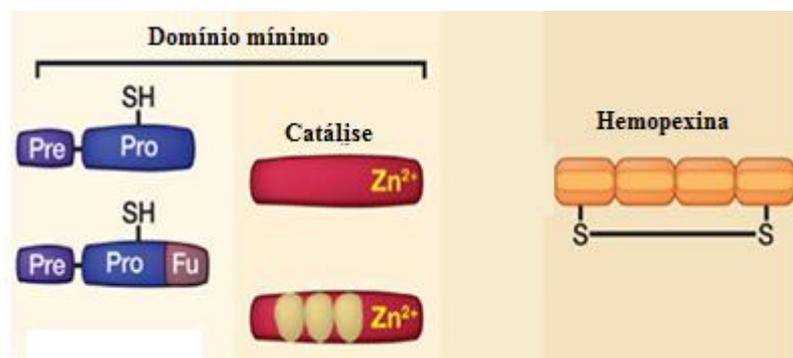


Figura 3: Estrutura das MMPs (Adaptado de Kessenbrock et al., 2010)

As metaloproteinases de matriz do tipo membrana (MT-MMP) são ligadas de forma covalente à membrana extracelular e as proteases secretadas (MMP) podem, também, estarem localizadas na superfície celular por meio da ligação por integrinas ou por meio de interações da superfície celular associados com colágeno tipo IV, proteoglicanos, laminina e fibronectina (Q. Yu & Stamenkovic, 1999; W.-H. Yu, Woessner, McNeish, & Stamenkovic, 2002).

As metaloproteinases acima descritas são frequentes no estroma não tumoral, sendo produzidas por neutrófilos, macrófagos, linfócitos, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos, células dendríticas e células progenitoras hematopoiéticas. Há um controle transcricional na expressão de MMPs por meio de citocinas como IL-4 e IL-10, fatores de crescimento como EGF, FGF e TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ 1 (Melo, n.d.)

Para que ocorra regulação de metaloproteinases no estroma não tumoral, é imprescindível que haja inibidores das MMPs como os não específicos,  $\alpha$ 2-macroglobulina e  $\alpha$ 1-antiprotease, e os inibidores teciduais específicos como o TIMP (do inglês tissue inhibitors of metalloproteinases) 1, 2, 3 e 4 cujo mecanismo de atuação já está bem elucidado, sendo capazes de inibir a atividade de proteases por meio da ligação não covalente de alta afinidade com MMPs ativas (Davies, 2014), e RECK (do inglês reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs), cuja forma de ação ainda não está esclarecida (Figueira et al., 2009).

Esses inibidores são produzidos pelos mesmos tipos celulares que produzem as MMPs e estão normalmente no estroma não tumoral para regularem a expressão de MMPs atuando concomitantemente (Melo, n.d.). Especificamente, no microambiente tumoral, sabe-se que a atividade

aumentada de MMPs está associada às fases de crescimento do tumor, invasão, metástases e angiogênese, tendo uma super expressão em diferentes cânceres. As metaloproteinases de matriz regulam também, uma variedade de processos fisiológicos e de sinalização do microambiente tumoral e o estroma de acordo com a figura 4 (Vizoso et al., 2007).

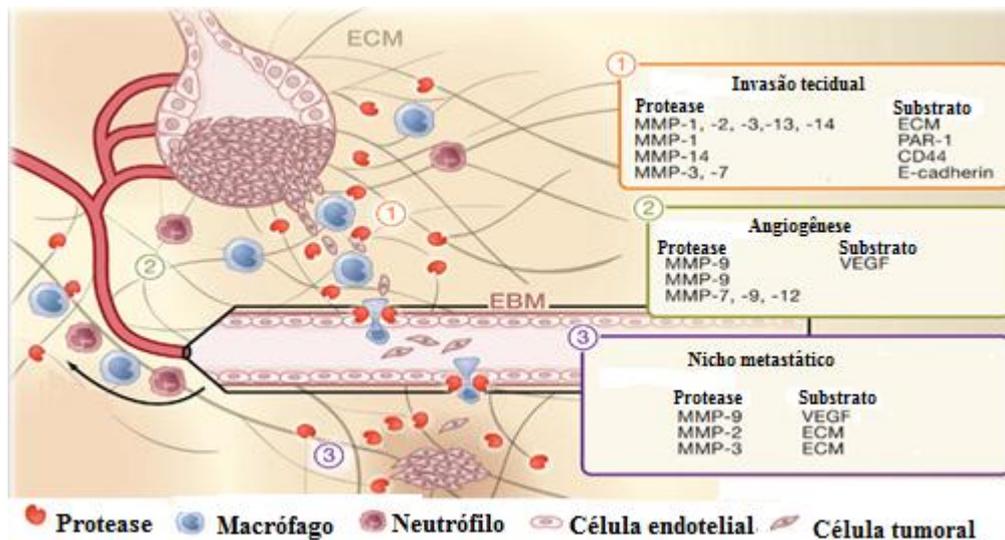


Figura 4: Atividade de metaloproteinases na invasão tecidual, angiogênese e metástase tumoral (Adaptado de Kessenbrock et al., 2010).

Corroborando estas informações, estudos *in vivo* mostrando que a inibição de MMPs envolvidas com a invasão de tumores foi largamente estudada, porém, a taxa de sobrevivência dos pacientes não foi elevada, indicam que a função de MMPs e seus inibidores é mais complexa do que se imaginava (VIZOSO et al., 2007; (Jiang, Goldberg, & Shi, 2002)

O desenvolvimento de uma massa tumoral está, portanto, fortemente relacionada com fatores como as MMPs, que possibilitam não somente sua progressão, mas fornecem os sinais necessários para sua manutenção (figura 5). Assim, outros fatores relevantes para a progressão tumoral podem ser citados, como por exemplo, o HIF1- $\alpha$  (do inglês Hypoxia-inducible factor 1-alpha) que está relacionado com um microambiente em hipóxia, agindo como

um estímulo para a angiogênese e metástase (Semenza, 2002; Subarsky & Hill, 2003; Vaupel, 2004); e o VEGF (*Vascular endothelial growth factor*, sigla em inglês), possui atividade pró-angiogênica e estimula a migração celular (Shibuya, 2011)

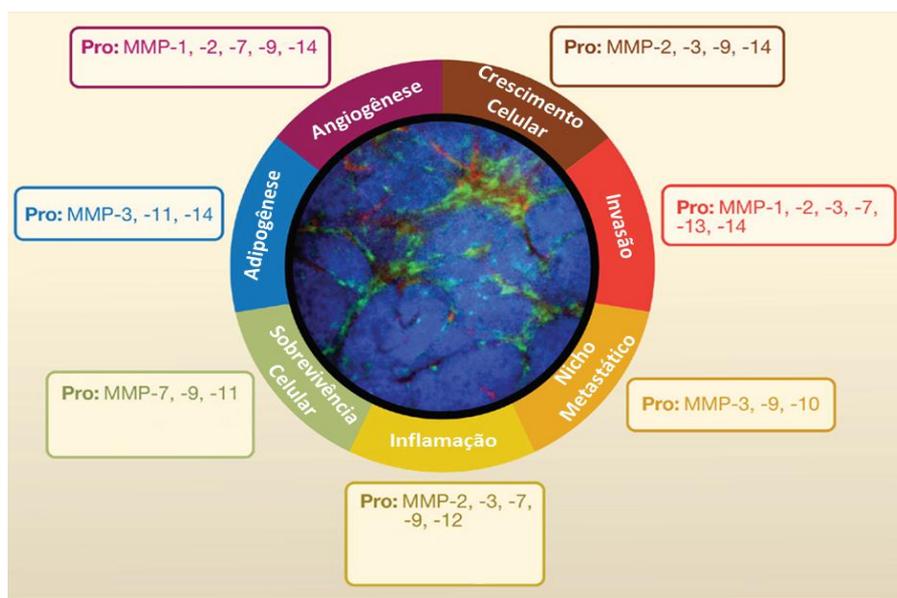


Figura 5: A progressão tumoral e a atuação de metaloproteinases de matriz (Adaptado de Kessenbrock et al., 2010).

Nos últimos anos, a literatura tem apontado uma correlação positiva entre aumento da incidência de tumores e pior prognóstico dos mesmos com a obesidade. A obesidade está associada com um excesso de tecido adiposo, com uma inflamação crônica sistêmica de baixo grau e é considerada uma crise metabólica com fatores múltiplos como genéticos, ambientais e metabólicos. (Dubois, Delort, Billard, Vasson, & Caldefie-Chezet, 2013).

A obesidade afeta mais de 300 milhões de seres humanos no mundo e este número deverá aumentar mais de um bilhão até o ano de 2030 (Kelly, Yang, Chen, Reynolds, & He, 2008).

O incremento do número de indivíduos obesos está intimamente associado ao aumento de doenças como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, esteatose hepática, doenças de vias respiratórias e biliares, neurodegeneração

e certos tipo de câncer (Gregor & Hotamisligil, 2011). Além dessas doenças, destaca-se o risco aumentado de desenvolver-se câncer, incluindo câncer de mama (Grossmann et al., 2010; Loi et al., 2005).

Sabe-se que o aumento do IMC (Índice de Massa Corporal) está associado com o aumento da recorrência de câncer de mama, cânceres mais agressivos e um menor período de sobrevivência. Porém, os mecanismos celulares e moleculares relacionados à interação entre obesidade e câncer de mama não são totalmente entendidos (Renehan, Tyson, Egger, Heller, & Zwahlen, 2007)

Estudos recentes mostram que, o consumo em longo prazo de uma dieta hiperlipídica aumentou o crescimento do tumor sólido de mama por células 4T1 em camundongos BALB/c. Além disso, houve um acréscimo da proliferação de células tumorais, angiogênese e infiltração de células imunes no modelo animal utilizado (Kim et al., 2011).

Aliados a estes resultados, nosso grupo trabalhando com dieta hiperlipídica isocalórica em camundongos BALB/c inoculados com as células da linhagem tumoral 4T1, obteve resultados que indicaram que há metástase óssea mais intensa no camundongo obeso em relação ao controle. Além disso, o tamanho e o peso do tumor no animal obeso também estiveram significativamente aumentados.

A avaliação de marcadores associados a maior progressão tumoral, através de imunohistoquímica dos tumores de animais obesos se torna interessante para futuras avaliações prognósticas e a padronização de novas estratégias terapêuticas, uma vez que os resultados mostram que a progressão dos tumores em animais obesos é alterada em relação aos controles. Assim, no presente trabalho nos propomos a identificar possíveis marcadores para a

identificação de processos metastáticos em um modelo animal que mimetiza a obesidade e o câncer de mama humano.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral:**

Avaliar a expressão de marcadores relevantes à progressão tumoral metastática em mama de camundongos obesos.

### **2.2 Objetivos Específicos:**

- Induzir e avaliar a obesidade
- Analisar e quantificar a expressão de vacúolos lipídicos;
- Analisar e quantificar a expressão das metaloproteinases MMPs 2, 3, 9, 11, 13, importantes para o câncer de mama através de imunohistoquímica em animais obesos;
- Analisar e quantificar a expressão de inibidores de metaloproteinase TIMP-1, TIMP-2 e RECK em câncer de mama através de imunohistoquímica em animais obesos;
- Avaliar e quantificar a expressão de elementos de matriz extracelular fibronectina e colágeno IV em animais obesos.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Análise do perfil bioquímico**

O modelo animal deste estudo é composto por camundongos BALB/c que tem como característica resistência à obesidade. Para isso, foi necessária inicialmente, uma caracterização do modelo animal de 12 e 16 semanas de dieta para confirmar por meio de perfis bioquímicos e pelo peso dos animais as alterações entre os animais controles e obesos. Os resultados foram comparados utilizando o teste two-way ANOVA, com valor de  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas utilizando o software SPSS 20.0. Os gráficos foram construídos utilizando o software SIGMA PLOT 12.4

### **3.2 Animais**

Camundongos fêmeas BALB/c com idade de 6 a 8 semanas foram obtidos do biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora e mantidos sob condições de temperatura e luminosidade controladas recebendo água filtrada e ração controlada (camundongos controles – 10% kcal; camundongos obesos – 60% kcal), no biotério do Laboratório de Imunologia, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora. Protocolo 039/2012

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

<b>Grupo 1</b>	<b>Número de animais</b>
Controle + 14 dias de tumor	5
Obeso + 14 dias de tumor	5
Controle + 21 dias de tumor	5
Controle + 21 dias de tumor	5

Tabela 3: Grupo de animais com 12 semanas de dieta.

<b>Grupo 2</b>	<b>Número de animais</b>
Controle + 14 dias de tumor	5
Obeso + 14 dias de tumor	5
Controle + 21 dias de tumor	5
Obeso + 21 dias de tumor	5

Tabela 4: Grupo de animais com 16 semanas de dieta.

Os dois grupos foram alimentados durante 12 e 16 semanas de dieta respectivamente.

### **3.3 Linhagem Celular**

A linhagem celular metastática de carcinoma mamário 4T1 foi concedida pelo Laboratório de Medicina Experimental do Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro.

As células foram cultivadas em RPMI (Roswell Park Memorial Institute), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), bicarbonato de sódio (3,7g/L), piruvato de sódio (1mM), vitaminas (0,1mM), aminoácidos não essenciais (0,1mM) e aminoácidos essenciais (0,1mM) além de penicilina (10U), estreptomicina (100mg/L) e L-glutamina (2mM) durante aproximadamente 5 dias.

### **3.4 Indução de obesidade**

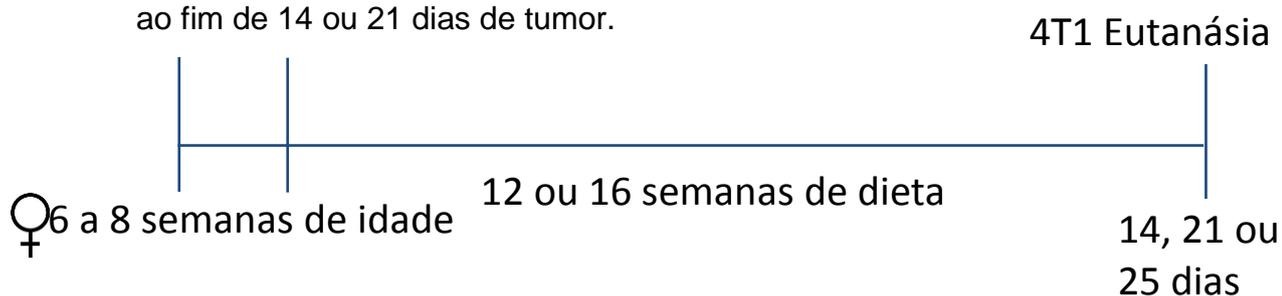
Com a finalidade de induzir a obesidade, camundongos de grupos obesos foram alimentados com uma ração hiperlipídica isocalórica (em que 35,2% de sua composição foram advindas de lipídios) na mesma proporção de proteínas, vitaminas, minerais e fibras que a ração dos camundongos controles como mostra a tabela 4.

<b>Ração Hiperlipídica</b>	
<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade (1 Kg)</b>
Amido de milho	115,5g
Caseína	200g
Milho dextrinizado	132g
Sacarose	100g
Óleo de soja	40g
Banha de porco	312g
Celulose microfina	50g
Mistura de minerais	35g
Mistura de vitaminas	10g
L-cistina	3g
Bitartarato de colina	2,5g

**Tabela 5: Componentes da ração hiperlipídica utilizados em 1Kg.**

### **3.5 Indução do tumor de mama e eutanásia**

A linhagem celular 4T1 foi inoculada na concentração  $5 \times 10^4$  células.ml<sup>-1</sup> e volume de 100µl por animal, com injeção intradérmica na mama superior. Os camundongos foram eutanasiados por meio dos anestésicos xilasina e quetamina diluídos em soro fisiológico em aproximadamente 300µl por animal ao fim de 14 ou 21 dias de tumor.



### **3.6 Morfologia**

Após o 14<sup>o</sup> ou 21<sup>o</sup> dia de tumor, os animais foram sacrificados por meio de sobredose de anestésico. Os tumores foram removidos e mantidos em solução de formaldeído a 10% diluído em tampão PBS durante 24h e em seguida mantidos em álcool 70%. Posteriormente, os tumores foram incluídos utilizando técnicas histológicas rotineiras, os quais foram desparafinizados, hidratados e encaminhados para coloração.

### **3.7 Imunohistoquímica**

As lâminas foram submetidas à recuperação antigênica em micro-ondas durante 7 minutos em potência de 900 watts, seguido por um período de resfriamento de 20 minutos dentro do próprio micro-ondas. Após as lâminas serem lavadas (2 vezes, 5 minutos) em tampão PBS, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado utilizando uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (água oxigenada) a 3% durante 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram novamente lavadas (2 vezes, 5 minutos) com tampão PBS e, em seguida, incubadas com anticorpo primário (diluições descritas a seguir) na temperatura de 4<sup>o</sup> overnight. No dia seguinte, as lâminas foram novamente lavadas em PBS (3 vezes, 5 minutos) e incubadas com anticorpo secundário. Posteriormente, o complexo ABC (Avidina - Biotina - Peroxidase) foi adicionado e incubado em temperatura ambiente por 30 minutos. As lâminas foram lavadas em PBS, reveladas com DAB e contra-coradas com hematoxilina de Haris durante 1 minuto, lavadas, secas ao ar e montadas com ERV-MOUNT (EasyPath).

### 3.8 Análise microscópica

As lâminas foram analisadas em microscópio Olympus BX53 objetiva 10x, 20X ou 40x, acoplado a uma câmera Olympus DP73. O software utilizado para captura de imagens foi o CellSens Dimension Olympus (EUA).

 **Padronização:** Os anticorpos foram testados em diversas diluições – 1:200; 1:100; 1:50; 1:20 – para utilizar a mais adequada nas baterias de coloração seguintes.

### 3.9 Anticorpos utilizados:

Anticorpos	Diluição
MMP-2	1:50
MMP-3	1:50
MMP-9	1:50
MMP-11	1:50
MMP-13	1:50
TIMP-1	1:50
TIMP-2	1:50
RECK	1:50
COLÁGENO IV	1:50
FIBRONECTINA	1:50

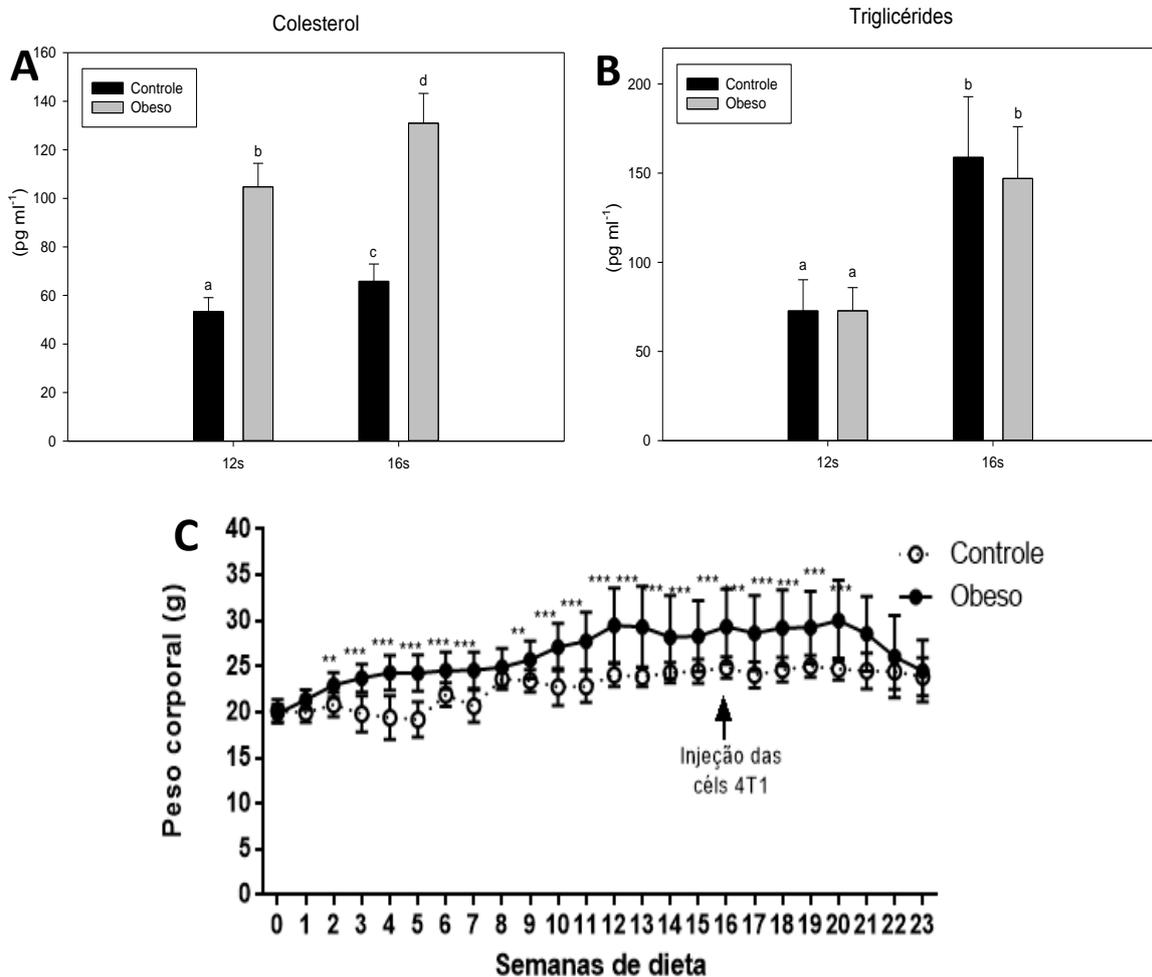
### **3.10 Quantificação de Imunohistoquímicas**

As marcações imunohistoquímicas foram quantificadas por meio do programa Image ProPlus 4.5 com as laminas identificadas por meio de números para evitar uma quantificação tendenciosa. Após a imagem aberta com zoom para facilitar a seleção exata do campo a ser quantificado, no item Perform Segmentation, foi selecionada uma cor para ser colocada no campo de interesse por meio do conta-gotas e aplicar a New Mask. Em seguida, no item Image Histogram, os campos de interesse ficaram na cor branca e a escala de cinza quantificou a porcentagem dos campos marcados. Os resultados foram comparados utilizando o teste t Student com valor de  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas utilizando o software SPSS 20.0. Os gráficos foram construídos utilizando o software SIGMA PLOT 12.4.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização do modelo animal

A caracterização do modelo animal utilizado por nosso grupo, foi feita por meio da análise de perfis bioquímico que incluiu colesterol, triglicérides, leptina e glicemia, mostrando diferenças significativas em níveis expressos por animais obesos quando comparados aos animais controles indicando a obesidade conforme mostra a figura 1.



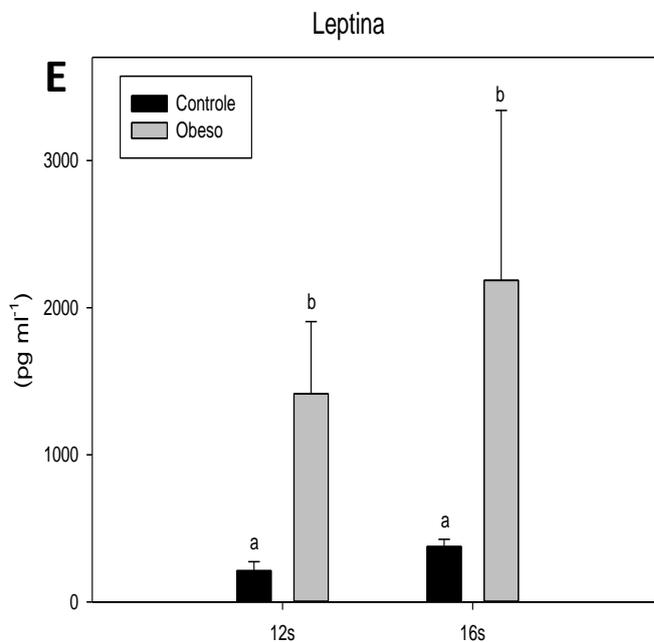
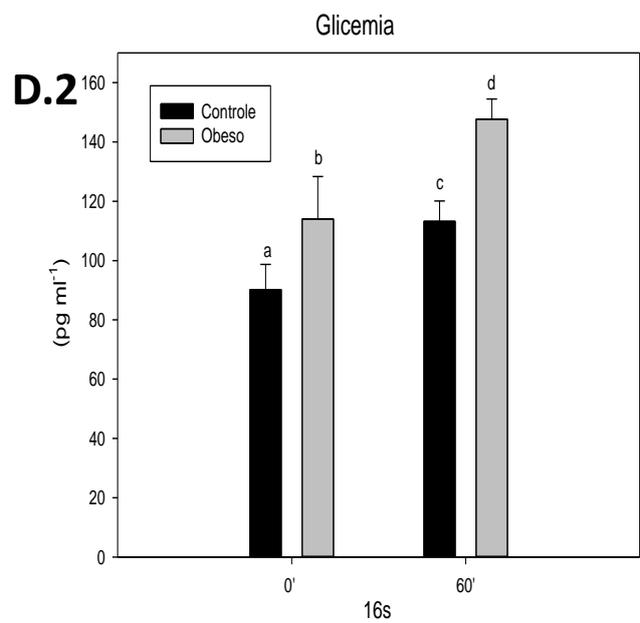
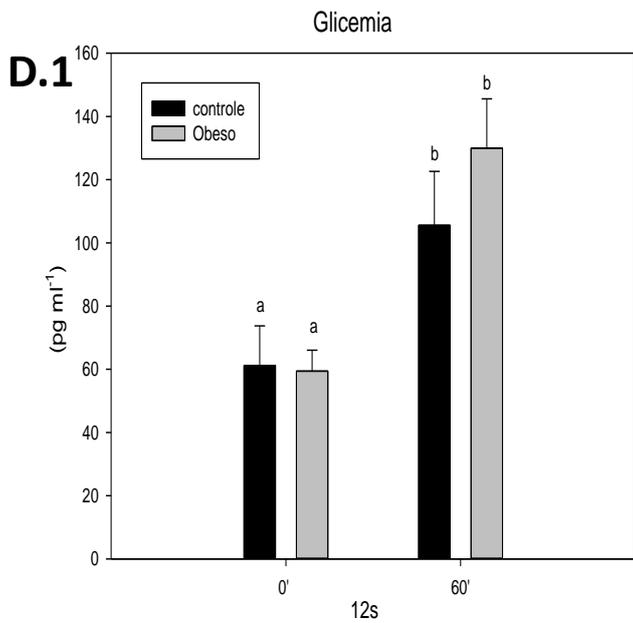


Figura 6: Análise do perfil bioquímico em camundongos controles e obesos com 12 e 16 semanas de dieta. A- Quantificação de colesterol em animais controles e obesos de 12 e 16 semanas de dieta; B- Quantificação de triglicérides em animais controles e obesos de 12 e 16 semanas de dieta; C – Quantificação do peso de animais controles e obesos ao longo das semanas de dieta; D.1 - Quantificação da glicemia em animais controles e obesos com 12 semanas de dieta no tempo 0` e 60` ; D.2- Quantificação de glicemia em animais controles e obesos de 16 semanas de dieta no tempo 0` e 60`. E – Quantificação de leptina no soro de animais controles e obesos com 12 e 16 semanas de dieta. Letras a, b, c, d ou \* indicam diferença estatística.

## 4.2 Análise histopatológica do tecido tumoral

A análise histopatológica realizada através de coloração com Hematoxilina-Eosina revelou o aumento de necrose tecidual caracterizada pela diminuição celular nos tumores analisados após 25 dias de indução quando comparados com tumores analisados após 14 dias de indução em animais controles e obesos conforme mostra a figura 7. A necrose tecidual também foi relevante no estabelecimento dos dias de coleta do tumor para os processamentos imunohistoquímicos pelo fato de estar associada a formação de uma camada de queratina que impossibilitaria os processos histológicos.

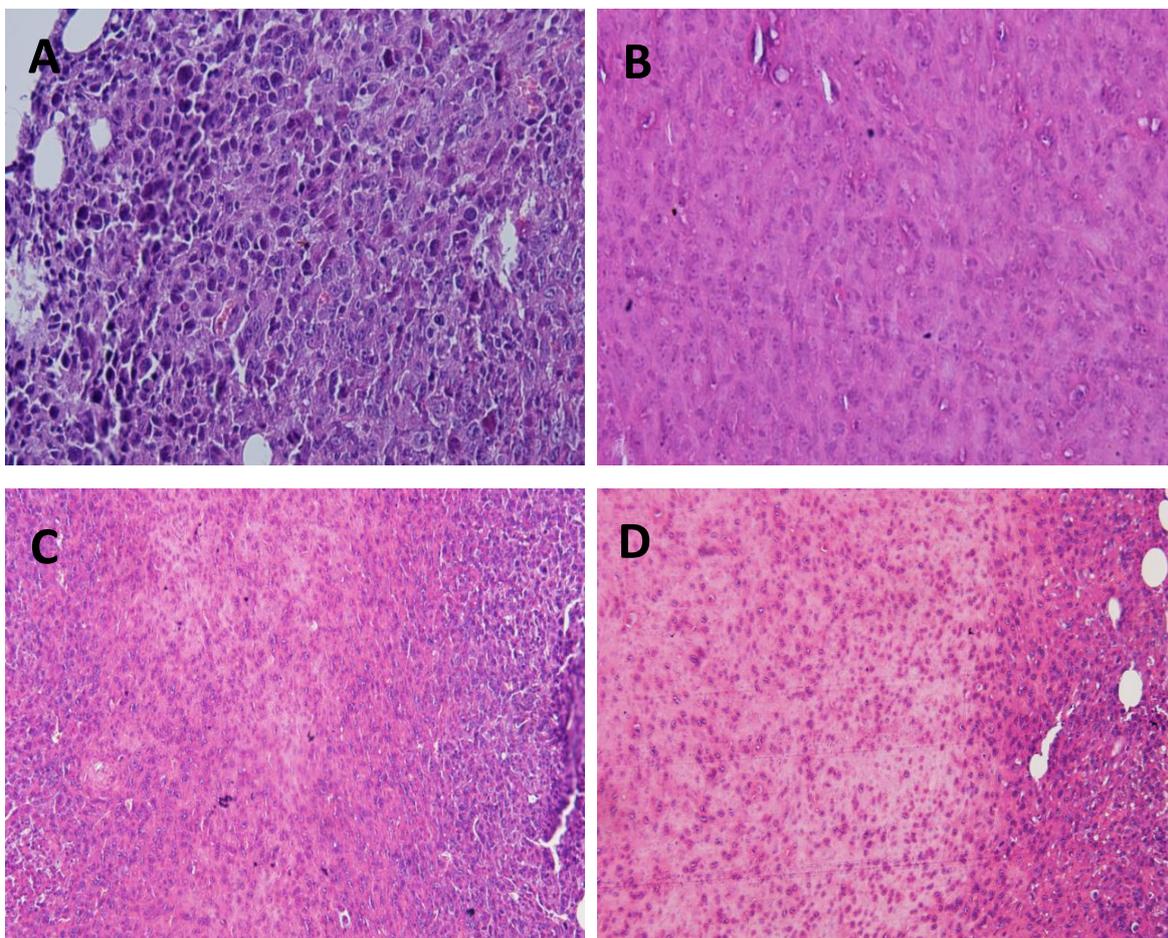


Figura 7: Análise de necrose tumoral em camundongos após 12 semanas de dieta. A- Animal controle 14 dias de tumor; B- Animal controle de 25 dias de tumor; C- Animal obeso de 14 dias de tumor; D- Animal obeso de 25 dias de tumor. Aumento: 200x

### 4.3 Análise histopatológica de vacúolos lipídicos

Foi observado o aumento de vacúolos lipídicos em tumores de animais obesos que podem estar associados com o recrutamento de células imunológicas para o tumor favorecendo a sua progressão. Os animais de obesos de 12 semanas de dieta e 14 dias de tumor e de 16 semanas de dieta e 14 dias de tumor apresentaram um número mais de 5 vezes acima do número de vacúolos encontrados em animais controles. Já os animais obesos de 16 semanas de dieta e 21 dias de tumor apresentaram de 15 vezes mais vacúolos

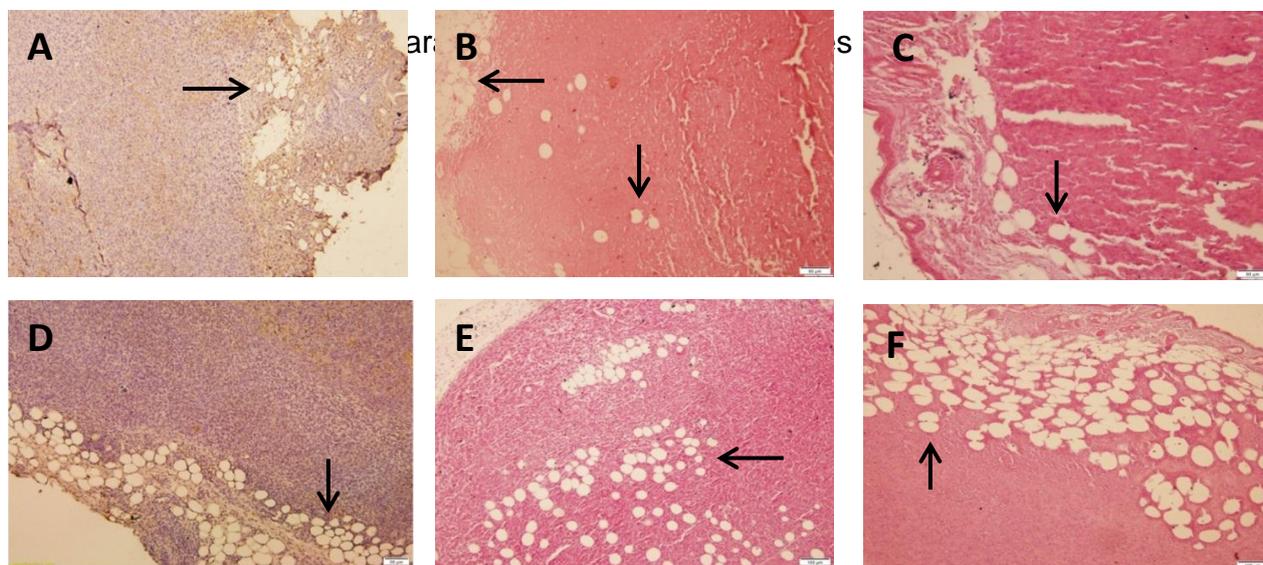


Figura 8: Análise de vacúolos lipídicos indicados por seta em animais controles e obesos em aumento de 100x. A- animal controle de 12 semanas de dieta e 14 dias de tumor; B- animal controle de 16 semanas de dieta e 14 dias de tumor; C- animal controle de 16 semanas de dieta e 21 dias de tumor; D- animal obeso de 12 semanas de dieta e 14 dias de tumor; E- animal obeso de 16 semanas de dieta e 14 dias de tumor; F- animal obeso de 16 semanas de dieta e 21 dias de tumor. Setas indicam os vacuoles lipídicos.

Tratamentos		N° de vacuólos
12 semanas de dieta 14 dias de tumor	Controle	19
	Obeso	109
16 semanas de dieta 14 dias de tumor	Controle	22
	Obeso	117
16 semanas de dieta 21 dias de tumor	Controle	9
	Obeso	140

Tabela 6: Quantificação de vacúolos lipídicos em animais controles e obesos de 12 e 16 semanas de dieta

#### 4.4 Relação da expressão de MMP-13 e alguns inibidores

Em relação a expressão de MMP 13, que como uma metaloproteinase de matriz está associada a clivagem de macromoléculas da matriz extracelular, em nosso estudo os tumores de animais obesos apresentaram marcação mais intensa, sugerindo maior expressão desta metaloproteinase nestes animais em relação aos controles, conforme demonstra a figura 9.

##### MMP-13

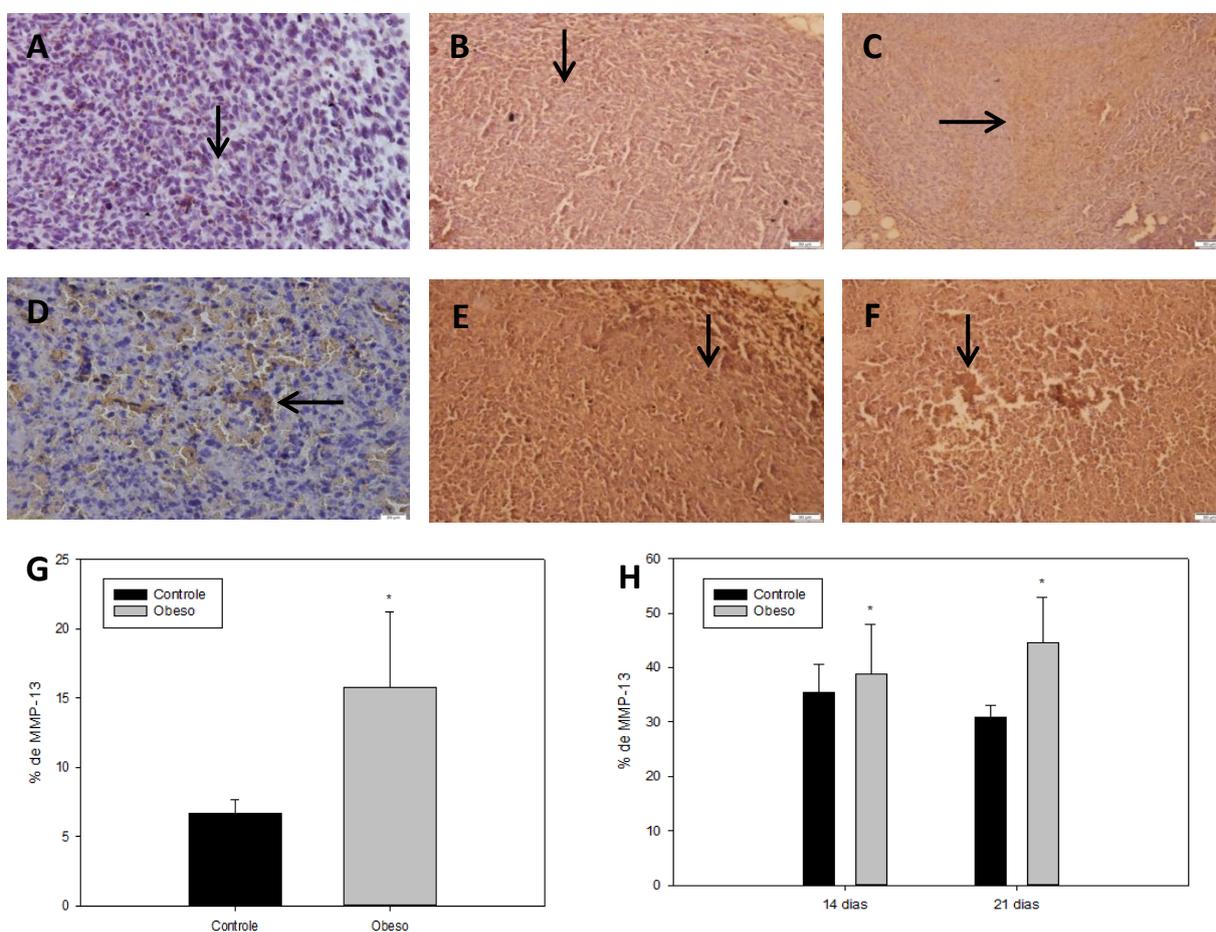


Figura 9: Imunohistoquímicas da análise da expressão de MMP-13 em animais controles e obesos. Aumento de 400x. A- animal controle, 12 semanas de dieta, 14 dias de tumor; B- animal controle, 16 semanas de dietas, 14 dias de tumor; C- animal controle, 16 semanas de dieta e 21 dias de tumor; D- animal obesos, 12 semanas de dieta, 14 dias de tumor; E- animal obeso, 16 semanas de dieta, 14 dias de tumor; F- animal obeso, 16 semanas de dieta e 21 dias de tumor. Setas indicam marcação imunohistoquímica. Gráficos representando a quantificação da marcação imunohistoquímica; cada barra representa a média (n=5); G- 12 semanas de dieta e 14 dias de tumor; H- 16 semanas de dieta. As setas indicam as marcações imunohistoquímicas e os \* indicam que houve diferença significativa.

A marcação para o inibidor de metaloproteinasas TIMP-1, que já foi descrito relacionado a um pior prognóstico em diversos cânceres incluindo o de mama, revelou que o tumor de animais obesos tem aumento de expressão deste marcador quando comparado ao tumor dos animais controle, como apontado na figura 10.

### TIMP-1

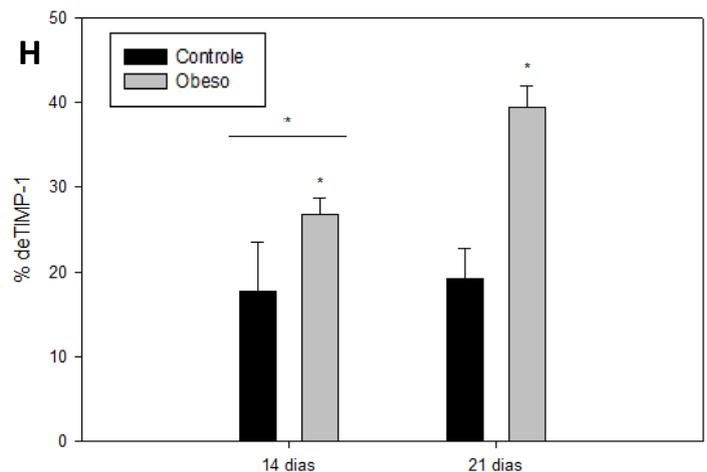
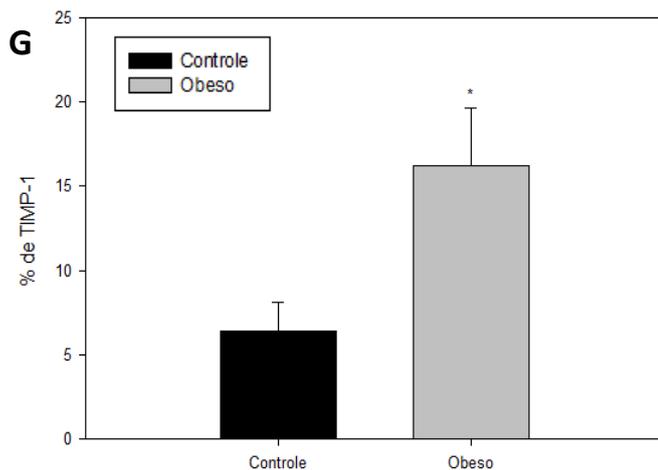
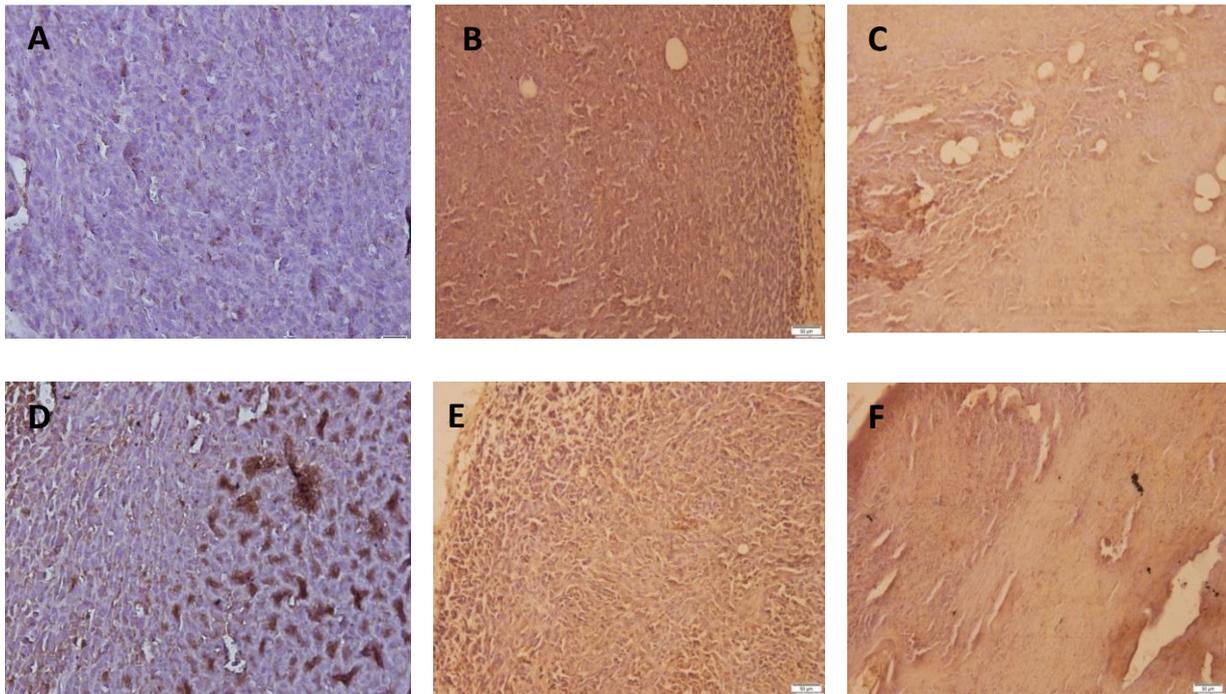


Figura 10: Imunohistoquímicas da análise da expressão de TIMP-1 em animais controles e obesos. Aumento de 400x. A- animal controle, 12 semanas de dieta, 14 dias de tumor; B- animal controle, 16 semanas de dietas, 14 dias de tumor; C- animal controle, 16 semanas de dieta e 21 dias de tumor; D- animal obeso, 12 semanas de dieta, 14 dias de tumor; E- animal obeso, 16 semanas de dieta, 14 dias de tumor; F- animal obeso, 16 semanas de dieta e 21 dias de tumor. Gráficos representando a quantificação da marcação imunohistoquímica; cada barra representa a média (n=5); G- 12 semanas de dieta e 14 dias de tumor; H- 16 semanas de dieta. Os \* indicam que houve diferença estatística.

Sabe-se que o RECK é um inibidor de metaloproteinase de membrana que atua na supressão à invasão tumoral e, portanto, foi descrito como um marcador de bom prognóstico no câncer de mama. Encontramos neste estudo, maior expressão deste marcador em animais controles quando comparados ao tumor dos animais obesos como observado na figura 11 indicando uma possível regulação negativa de MMPs que atuam na progressão do câncer.

## RECK

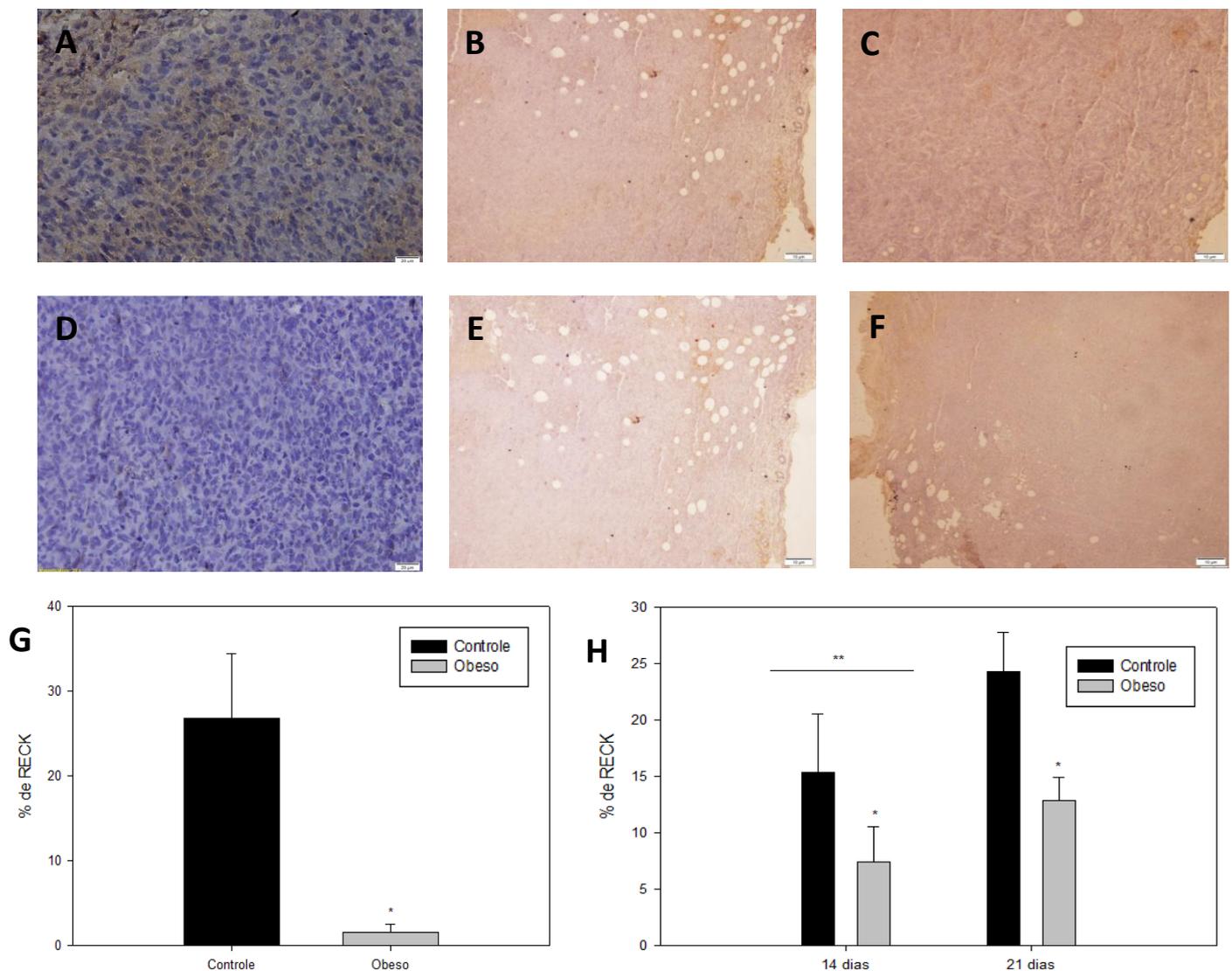


Figura 11: Imunohistoquímicas da análise da expressão de RECK em animais controles e obesos. Aumento de 400x. A- animal controle, 12 semanas de dieta, 14 dias de tumor; B- animal controle, 16 semanas de dietas, 14 dias de tumor; C- animal controle, 16 semanas de dieta e 21 dias de tumor; D- animal obesos, 12 semanas de dieta, 14 dias de tumor; E- animal obeso, 16 semanas de dieta, 14 dias de tumor; F- animal obeso, 16 semanas de dieta e 21 dias de tumor. Gráficos representando a quantificação da marcação imunohistoquímica; cada barra representa a média (n=5); G- 12 semanas de dieta e 14 dias de tumor; H- 16 semanas de dieta. Os \* indicam que houve diferença estatística.

## 4.5 Expressão de elementos da matriz extracelular

Alguns componentes de matriz extracelular como fibronectina e colágeno IV estão associados com a progressão tumoral. A expressão de fibronectina foi analisada em camundongos de 12 e 16 semanas de dieta e 14 e 21 dias de tumor revelando-se aumentada no tecido de animais obesos em relação aos controles como mostra a Figura 12.

### FIBRONECTINA

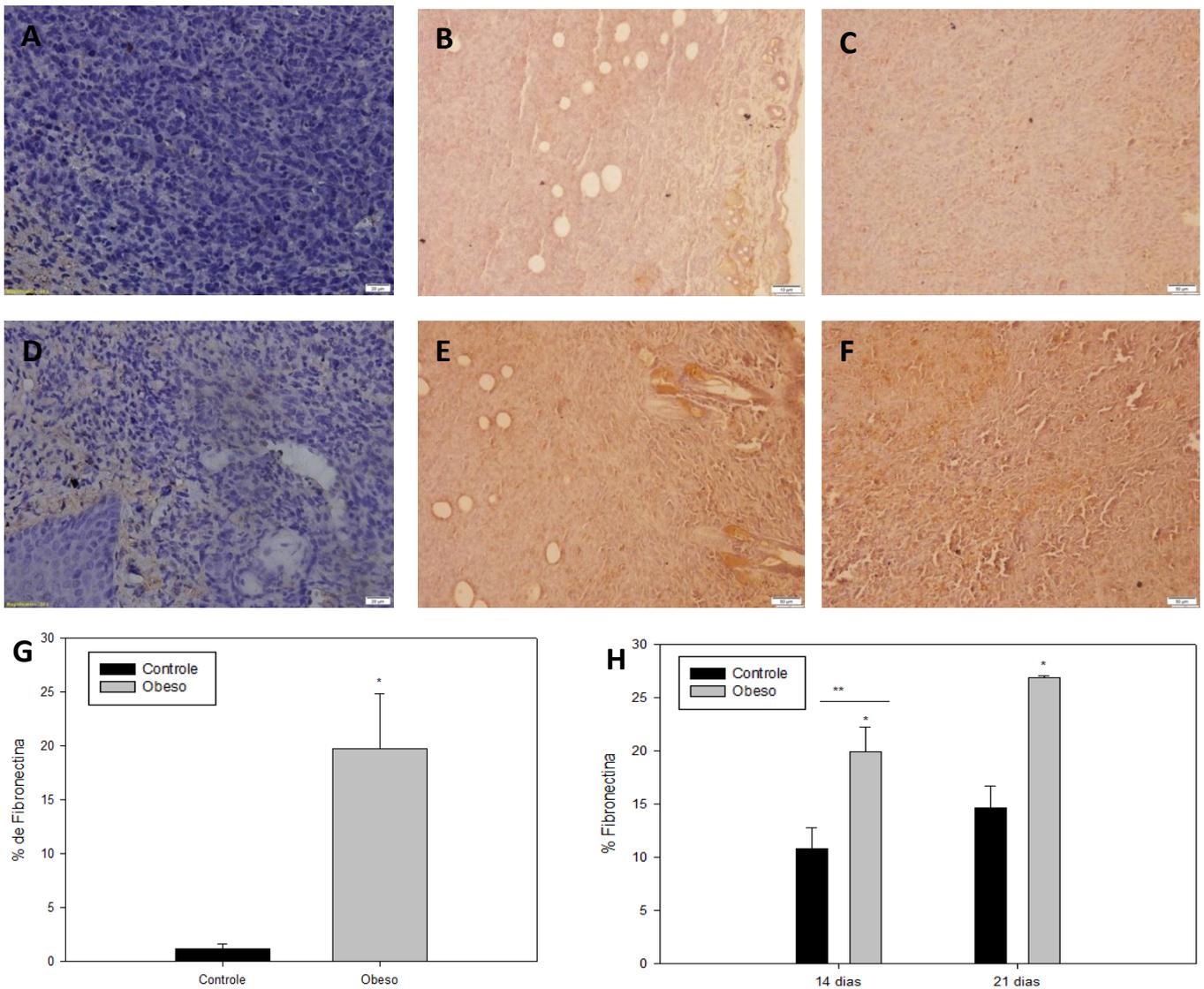


Figura 12: Imunohistoquímicas da análise da expressão de FIBRONECTINA em animais controle e obesos. Aumento de 400x A- animal controle, 12 semanas de dieta, 14 dias de tumor; B- animal controle, 16 semanas de dietas, 14 dias de tumor; C- animal controle, 16 semanas de dieta e 21 dias de tumor; D- animal obesos, 12 semanas de dieta, 14 dias de tumor; E- animal obeso, 16 semanas de dieta, 14 dias de tumor; F- animal obeso, 16 semanas de dieta e 21 dias de tumor. Gráficos representando a quantificação da marcação imunohistoquímica; cada barra representa a média (n=5); G- 12 semanas de dieta e 14 dias de tumor; H- 16 semanas de dieta.

A análise do componente da MEC, Colágeno IV, revelou que os animais controles possuem maior expressão deste elemento de matriz quando comparados aos tumores de animais obesos, conforme demonstrado na figura 13.

### COLÁGENO IV

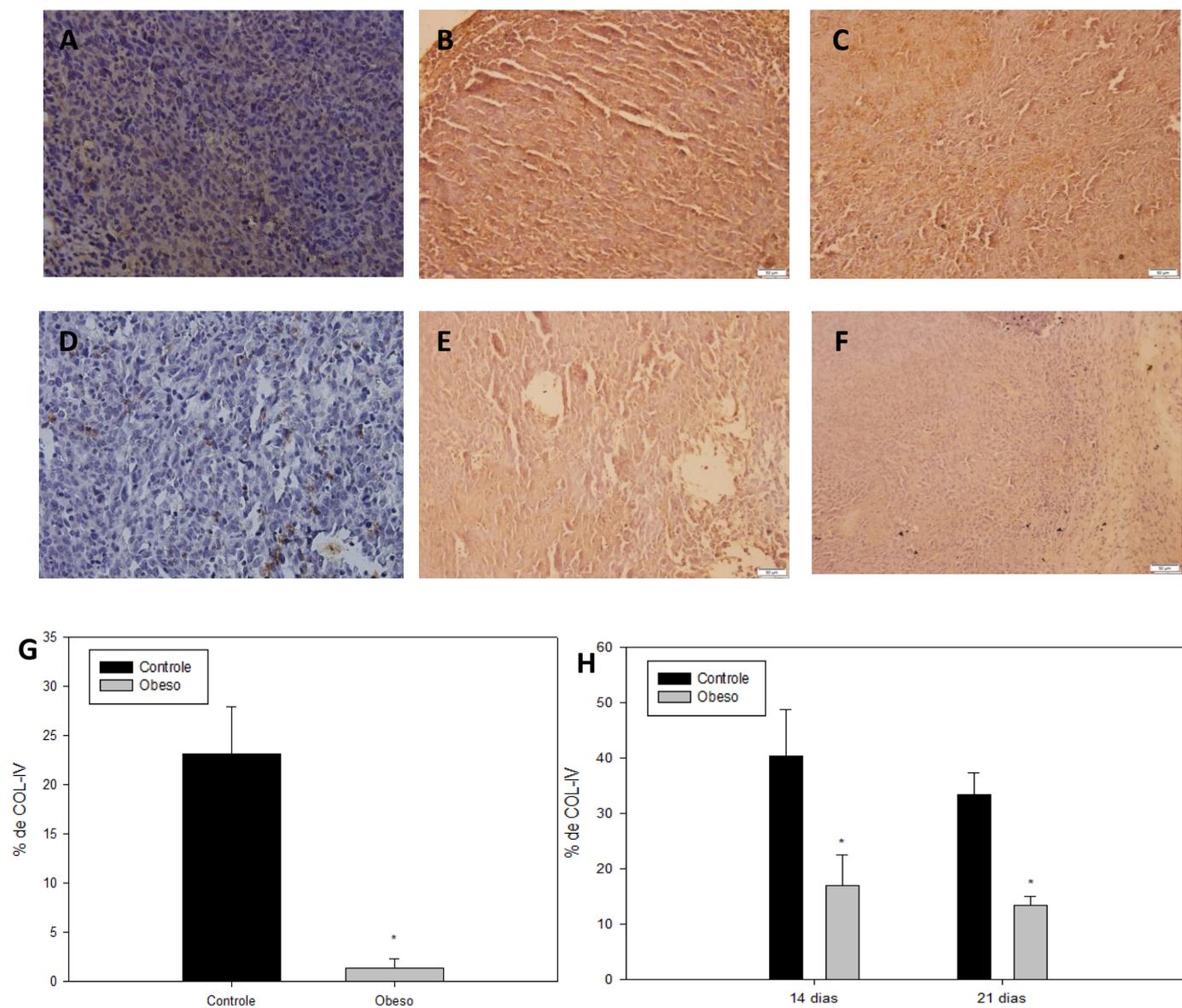


Figura 13: Imunohistoquímicas da análise da expressão de COLÁGENO IV em animais controles e obesos. Aumento de 400x A- animal controle, 12 semanas de dieta, 14 dias de tumor; B- animal controle, 16 semanas de dietas, 14 dias de tumor; C- animal controle, 16 semanas de dieta e 21 dias de tumor; D- animal obesos, 12 semanas de dieta, 14 dias de tumor; E- animal obeso, 16 semanas de dieta, 14 dias de tumor; F- animal obeso, 16 semanas de dieta e 21 dias de tumor. Gráficos representando a quantificação da marcação imunohistoquímica; cada barra representa a média (n=5); G- 12 semanas de dieta e 14 dias de tumor; H- 16 semanas de dieta. Os \* indicam que houve diferença significativa

#### 4.6 Expressão de marcadores em animais de 16 semanas de dieta

A análise de alguns marcadores foi realizada apenas em animais de 16 semanas de dieta. Iniciando pela metaloproteinase de matriz 2, MMP-2, que está descrita como superexpressa em diversos tumores, esteve elevada em animais controles em relação aos obesos além da diferença entre os dias 14 e 21 de tumor como mostra a figura 14.

##### MMP-2

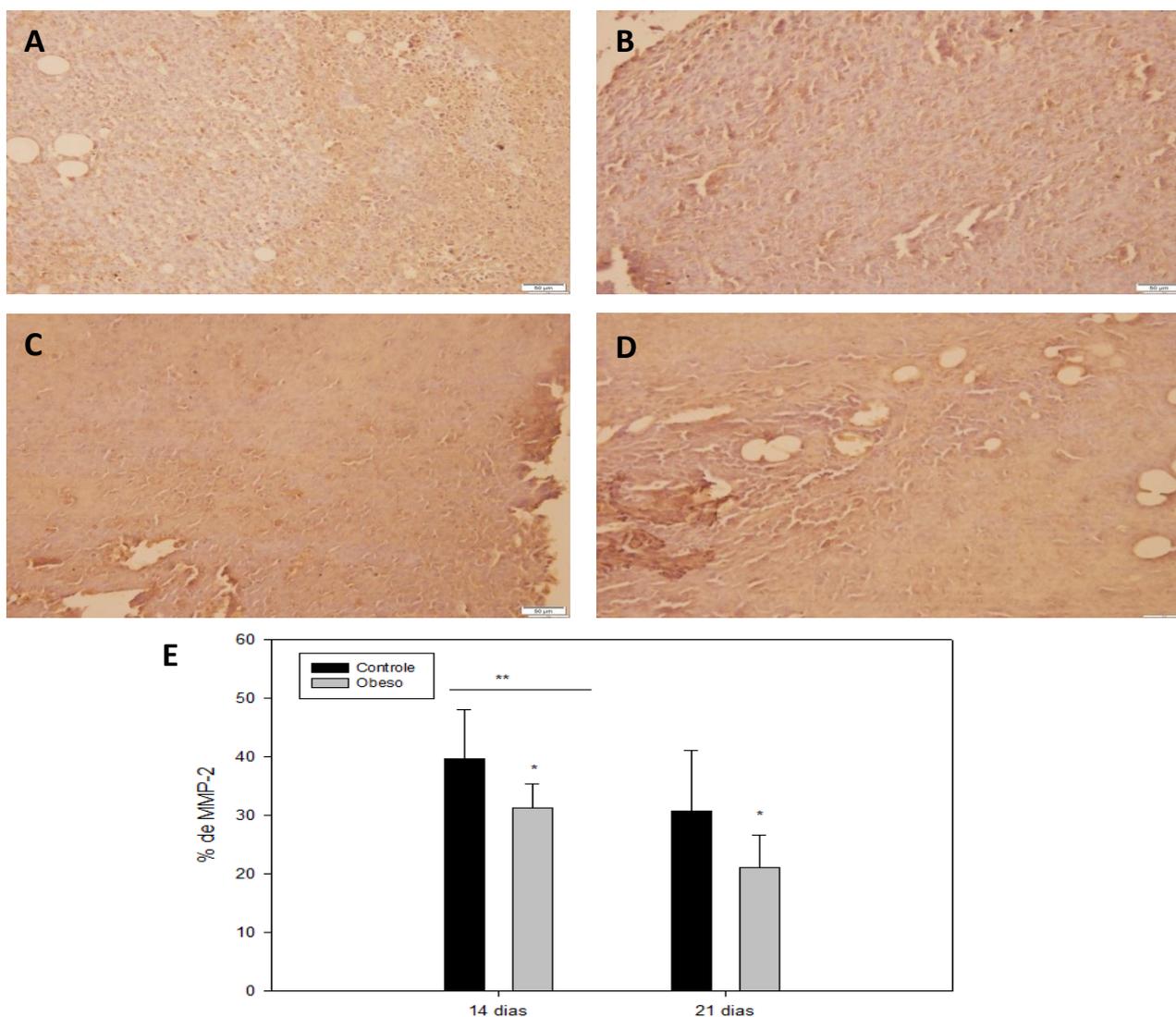


Figura 14: Imunohistoquímicas da análise da expressão de MMP-2 em animais controles e obesos de 16 semanas de dieta. Aumento de 400x. A- animal controle, 16 semanas de dieta, 14 dias de tumor; B- animal controle, 16 semanas de dietas, 21 dias de tumor; C- animal obeso, 16 semanas de dieta, 14 dias de tumor; D- animal obeso, 16 semanas de dieta, 21 dias de tumor. Gráficos representando a quantificação da marcação imunohistoquímica; cada barra representa a média (n=5); E- 16 semanas de dieta.

Sabe-se que a MMP-3 está associada com a clivagem de componentes da MEC que favorecerão que as células tumorais atravessem a membrana basal epitelial e endotelial vascular favorecendo a migração de células tumorais. A análise de MMP-3 em animais de 16 semanas de dieta demonstrou uma expressão significativamente mais elevada em animais obesos quando comparados aos controles sem diferença entre 14 e 21 dias de tumor como demonstrado na figura 15.

### **MMP-3**

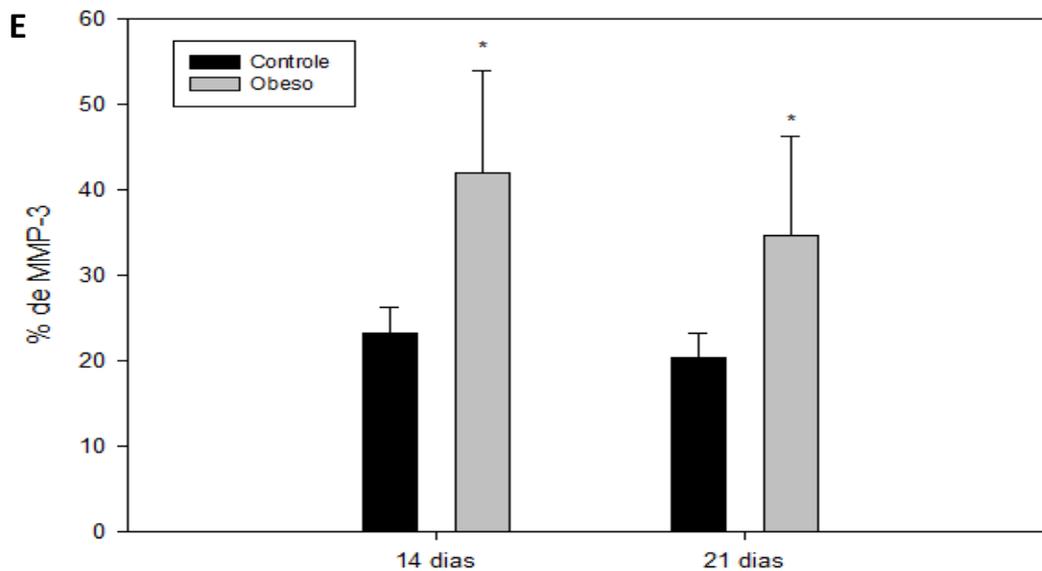
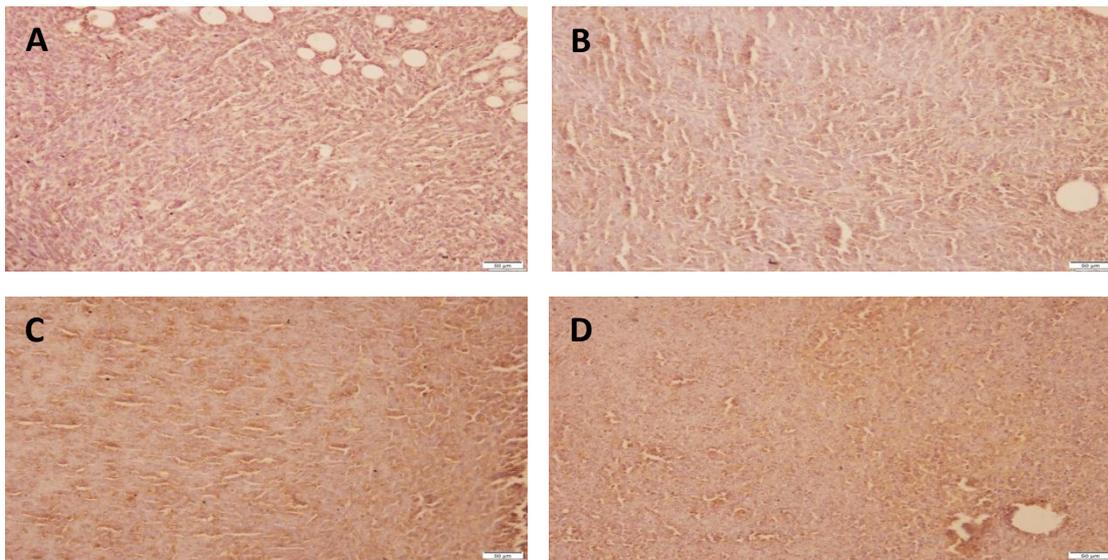


Figura 15; Imunohistoquímicas da análise da expressão de MMP-3 em animais controles e obesos de 16 semanas de dieta. Aumento de 400x A- animal controle, 16 semanas de dieta, 14 dias de tumor; B- animal controle, 16 semanas de dietas, 21 dias de tumor; C- animal obeso, 16 semanas de dieta, 14 dias de tumor; D- animal obeso, 16 semanas de dieta, 21 dias de tumor. Gráficos representando a quantificação da marcação imunohistoquímica; cada barra representa a média (n=5); E- 16 semanas de dieta. Os \* indicam que houve diferença significativa.

A MMP-9, assim como a MMP-2, foi demonstrada superexpressa em diversos tipos de câncer. Analisando o marcador MMP-9 em animais de 16 semanas de dieta, obtivemos um aumento significativo na expressão desta metaloproteinase em animais obesos em relação aos controles. Não houve diferença estatística entre os dias 14 e 21 de tumor como mostra a figura 16.

### **MMP-9**

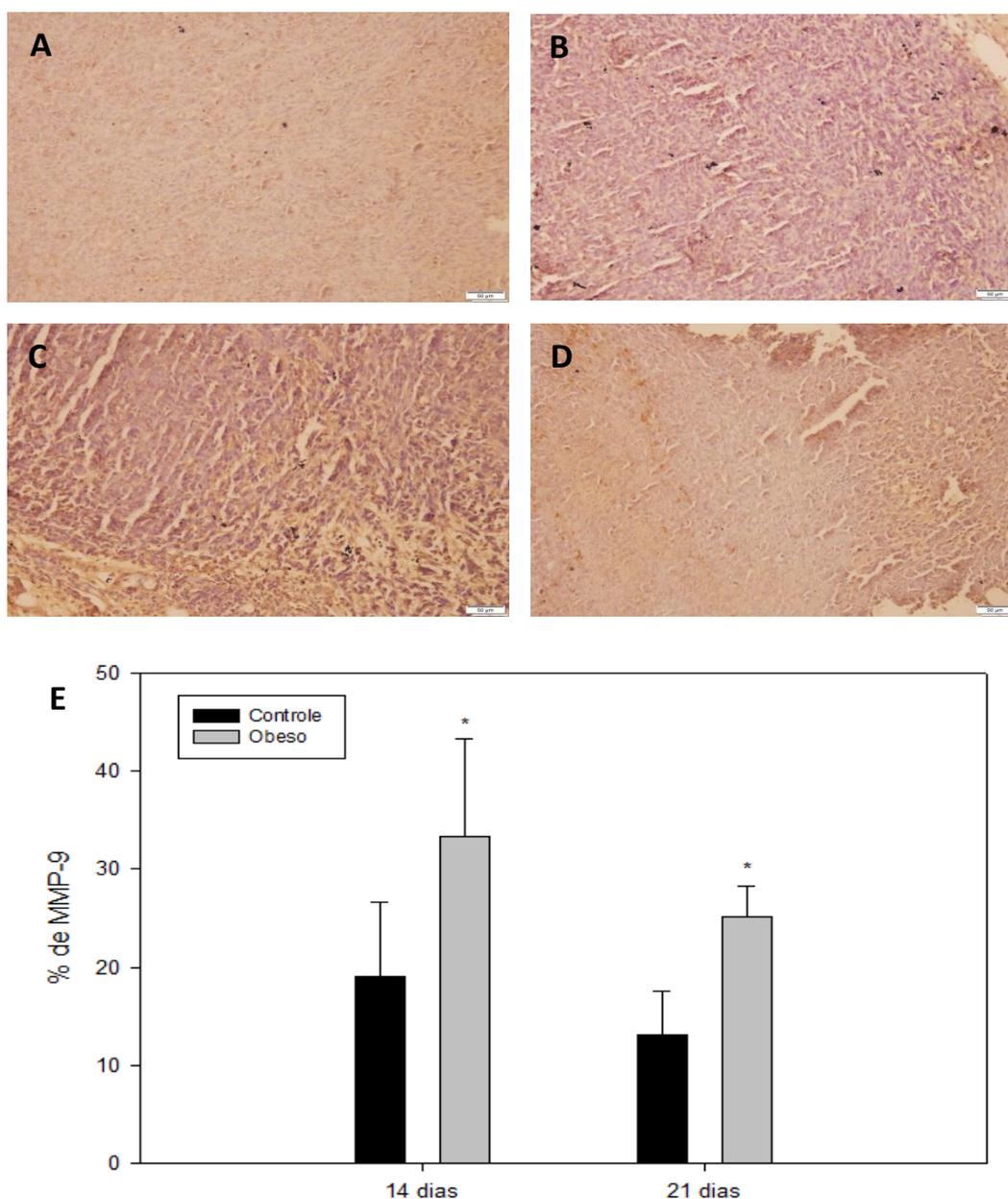


Figura 16: Imunohistoquímicas da análise da expressão de MMP-9 em animais controles e obesos de 16 semanas de dieta. Aumento de 400x. A- animal controle, 16 semanas de dieta, 14 dias de tumor; B- animal controle, 16 semanas de dietas, 21 dias de tumor; C- animal obeso, 16 semanas de dieta, 14 dias de tumor; D- animal obeso, 16 semanas de dieta, 21 dias de tumor. Gráficos representando a quantificação da marcação imunohistoquímica; cada barra representa a média (n=5); E- 16 semanas de dieta. Os \* indicam que houve diferença significativa.

A MMP-11 é produzida por células de origem mesenquimal como adipócitos e está relacionada com um mau prognóstico em carcinomas. A análise imunohistoquímica de MMP-11 em animais de 16 semanas de dieta obteve um aumento significativo na expressão deste marcador em animais obesos comparados à animais controles. Não houve diferença entre os dias 14 e 21 de tumor analisados conforme a figura 17.

### **MMP-11**

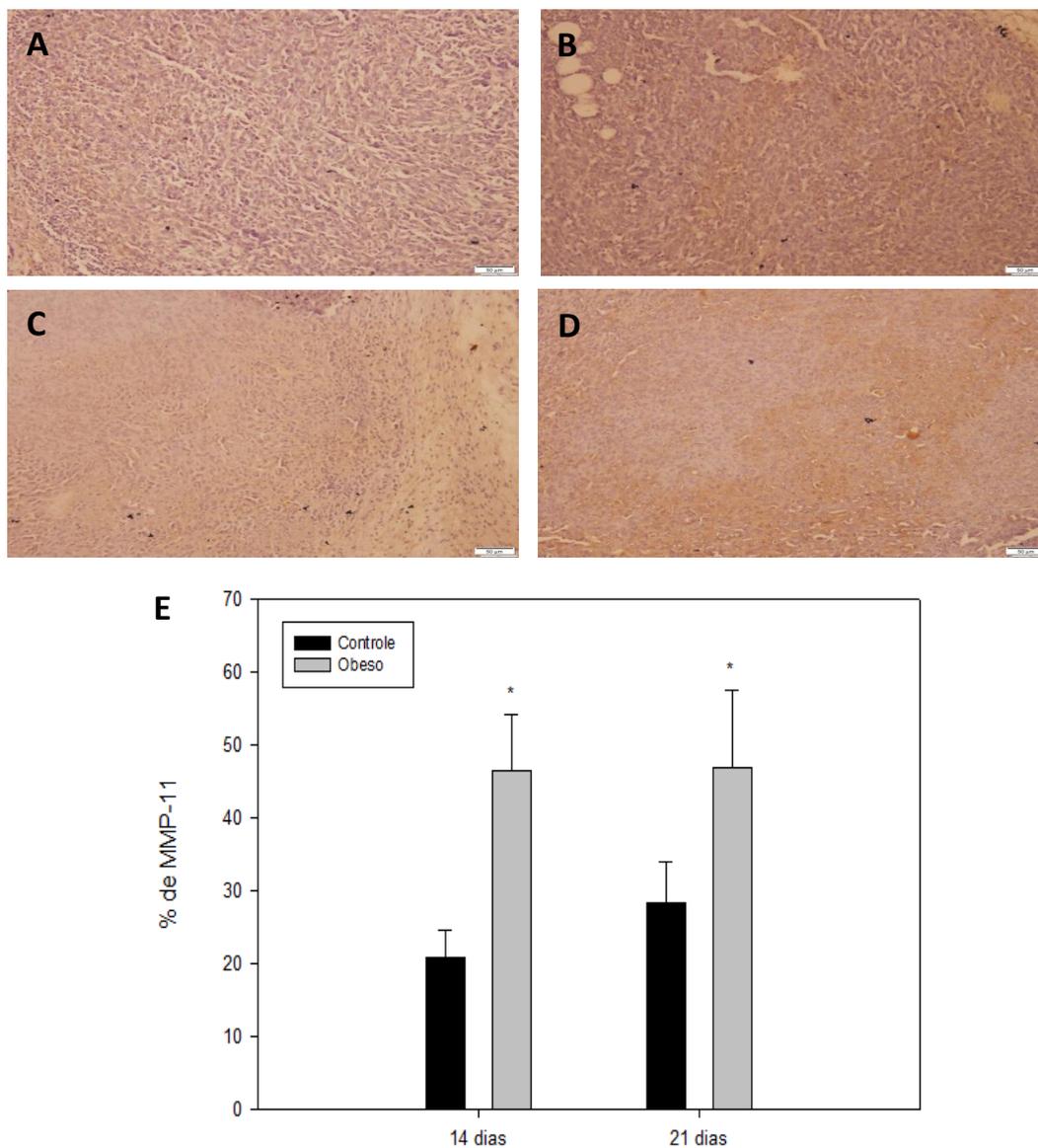


Figura 17: Imunohistoquímicas da análise da expressão de MMP-11 em animais controles e obesos de 16 semanas de dieta. Aumento de 400x. A- animal controle, 16 semanas de dieta, 14 dias de tumor; B- animal controle, 16 semanas de dietas, 21 dias de tumor; C- animal obeso, 16 semanas de dieta, 14 dias de tumor; D- animal obeso, 16 semanas de dieta, 21 dias de tumor. Gráficos representando a quantificação da marcação imunohistoquímica; cada barra representa a média (n=5); E- 16 semanas de dieta. Os \* mostram que houve diferença significativa.

Por fim, o último marcador analisado em animais de 16 semanas de dieta foi o inibidor de metaloproteinase 2 (TIMP-2) que atua como um cofator de MMP-2 aumentando de forma concomitante à MMP-2. Encontramos um aumento significativo na expressão deste marcador em animais obesos em relação aos animais controles. Não houve diferença entre os dias 14 e 21 de tumor conforme mostra a figura 18.

## TIMP-2

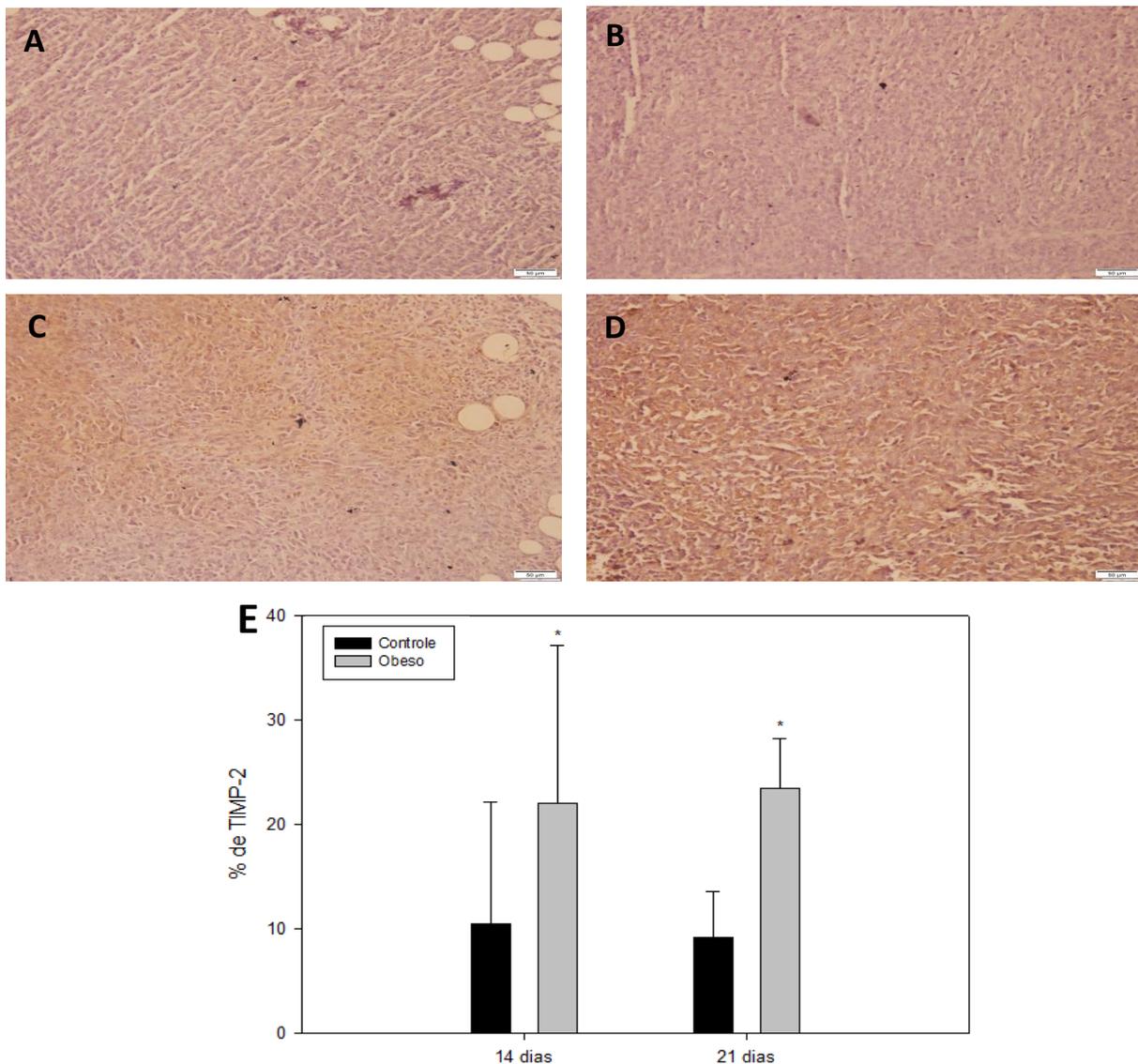


Figura 18: : Imunohistoquímicas da análise da expressão de TIMP-2 em animais controles e obesos de 16 semanas de dieta. Aumento de 400x. A- animal controle, 16 semanas de dieta, 14 dias de tumor; B- animal controle, 16 semanas de dietas, 21 dias de tumor; C- animal obeso, 16 semanas de dieta, 14 dias de tumor; D- animal obeso, 16 semanas de dieta, 21 dias de tumor. Gráficos representando a quantificação da marcação imunohistoquímica; cada barra representa a média (n=5); E- 16 semanas de dieta. Os \* indicam que houve diferença significativa.

## 5 DISCUSSÃO

Estudos anteriores do nosso grupo com o modelo de dieta hiperlipídica em camundongos BALB/c inoculados com as células da linhagem tumoral 4T1, obtiveram resultados que indicam que há metástase óssea mais intensa no camundongo obeso em relação ao controle e, além disso, o tamanho e o peso do tumor no animal obeso também estiveram significativamente aumentados.

Desta forma, o principal objetivo desse estudo foi determinar se a expressão de proteínas associadas ao câncer de mama está relacionada com a maior progressão tumoral já observada em animais obesos. Um evento associado com a progressão tumoral é a degradação de macromoléculas da matriz extracelular (MEC) como colágeno IV, fibronectina e outras glicoproteínas (Yurchenco, 1990). No entanto, diferentes proteases, especialmente o grupo das metaloproteinases de matriz (MMPs) que quebram macromoléculas da MEC, tem sido relacionadas com o pior prognóstico em diversos cânceres humanos (Figueira et al., 2009; Yurchenco, 1990).

Até o ano de 2000, os mecanismos de invasão e metástase tumoral eram desconhecidos. Atualmente, já se sabe que as células cancerosas possuem alterações em sua forma, estão associadas à fixação a outras células e à matriz extracelular e há participação de metaloproteinases na invasão e progressão de diversos cânceres. (Hanahan & Weinberg, 2011)

Segundo Kim et al., (2011), em camundongos BALB/c obesos submetidos à uma dieta hiperlipídica, há um aumento de gotículas de gordura, os chamados vacúolos lipídicos no tecido tumoral mamário. Associados com as células tumorais, esses vacúolos podem atuar no recrutamento de células

imunológicas para o tumor e na produção de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas que permitem uma angiogênese sustentada por meio de fatores pró-apoptóticos, auto-suficiência quanto a fatores de crescimento, invasão tecidual e metástase. Em animais obesos de 12 e 16 semanas de dieta, 14 e 21 dias de tumor, observamos um aumento significativo de vacúolos lipídicos o que mostra que de fato, a dieta hiperlipídica altera o número destes vacúolos favorecendo o estabelecimento do microambiente tumoral e progressão do tumor.

Pivetta et al., (2011) propôs em seu estudo com células de adenocarcinoma de mama humano da linhagem MDA-MB-23, que grandes quantidades de MMP-13 é expressa no tumor e, que, assim como a expressão de MMP-13, houve uma regulação positiva do inibidor tecidual de metaloproteinase TIMP-1. A expressão de TIMP-1 está relacionada à um pior prognóstico em diversos cânceres incluindo o câncer de mama (Figueira et al., 2009). Em nosso estudo, observamos o aumento da expressão de MMP-13 e TIMP-1 em animais obesos de 12 e de 16 semanas de dieta com 14 e 21 dias de tumor, o que pode explicar o tumor mais invasivo e metastático em animais obesos.

Hagedorn et al., (2001) verificaram defeitos na membrana basal peritumoral pela perda da expressão significativa de colágeno IV. Foi evidenciado por Tosios et al., (1998) uma tendência para descontinuidade linear do colágeno IV durante o aumento gradativo da displasia. Stetler-stevenson, (1990) também mostrou que o colágeno IV é bloqueado por inibidores de metaloproteinases (TIMP). Nossos resultados indicam uma diminuição da expressão de colágeno IV em animais obesos quando comparados a animais controles.

Sabe-se que o inibidor de metaloproteinases do tipo RECK está associado a metaloproteinases do tipo membrana que atuam na supressão à invasão tumoral e metástases, regulando negativamente MMPs envolvidas na carcinogênese. Por isso, RECK foi descrito como um marcador de bom prognóstico em diversos cânceres como o de mama (Hardwick, Rhee, & Coussens, 2002). Em nosso estudo, os controles expressaram visualmente maiores quantidades de RECK em relação ao grupo obeso.

A constituição básica da matriz extracelular é de proteínas fibrosas como o colágeno e elastina, e de glicoproteínas alongadas como a fibronectina e laminina, que têm uma função de proporcionar adesão célula-matriz, além de glicosaminoglicanas e proteoglicanas que formam um local onde se encontram imersos todos os constituintes da matriz. A desregulação da matriz extracelular pode ter como consequências condições patológicas como o câncer. No câncer de mama, componentes da matriz, entre eles a fibronectina, estão associados com a progressão tumoral e metástase. De forma intrigante, esses mesmos componentes de matriz extracelular relacionados ao câncer também estão associados à remodelação tecidual (OSKARSSON, 2013). Tem sido sugerido que a perda de fibronectina durante a carcinogênese pode permitir a livre migração das células neoplásicas (Kosmehl et al., 1999). Entretanto, segundo BAE et al., 2013, há uma correlação positiva entre a expressão de fibronectina e a agressividade do câncer de pulmão. Nas análises imunohistoquímicas do presente estudo, o tumor de animais obesos expressam, visualmente, maior expressão de fibronectina que o tumor de animais controles. Portanto, devido às funções sobrepostas e a resultados contraditórios da fibronectina mostradas

na literatura, ela reflete um marcador inconclusivo, que necessita ser melhor avaliado neste modelo.

A MMP-3, também chamada de estromelisina-1, é regulada por meio de estímulos como fatores de crescimento, citocinas, promotores de tumores e produtos de oncogenes (Munhoz, F.B.A., et al., 2010). Essa protease pode desempenhar um papel tanto na invasão local e propagação metastática que está associada com a capacidade das células tumorais atravessarem a membrana basal do epitélio e o endotélio vascular. Portanto, a super expressão de MMP-3 está associada com alguns tipos de tumor relacionada angiogênese invasão tumoral e metástase (Johansson N, et al., 2000). Em nosso estudo, obtivemos uma expressão aumentada de MMP-3 em animais obesos de 12 e 16 semanas de dieta e 14 e 21 dias de tumor.

Na literatura, sabe-se que as metaloproteinases de matriz 2 e 9 estão super expressas em diversos tipos de tumores humanos graves resultando em um prognóstico ruim desses tumores. Em nosso estudo, houve uma expressão significativa dessas proteases em tumores de 16 semanas de dieta de 14 e 21 dias de tumor. Porém, a MMP-2 foi menos expressa em animais obesos em relação aos controles e a MMP-9 teve um aumento na expressão em animais obesos.

Bajracharya D. et al., 2014, propôs que há um aumento concomitante na expressão de MMP-2 e TIMP-2 sugerindo que a ativação de MMP-2 é dependente de TIMP-2 que atua como um cofator. Mudanças nos níveis TIMP-2 são considerados importantes porque afetam diretamente o nível de MMP-2. Nesse estudo, obtivemos um aumento em obesos de TIMP-2 de 16 semanas

de dieta, que pode estar relacionado à invasão tumoral com a ativação da MMP-2.

Segundo Buache et al., (2014) e a MMP-11, também chamada de estromelina-3, é produzida por células de origem mesenquimal principalmente células como fibroblastos e adipócitos. Em carcinomas, como no mamário, altos níveis de MMP-11 nos tumores primários são correlacionados com mau prognóstico (Basset, P. et al., 1997). Nos resultados apresentados, a MMP-11 foi mais expressa em tumores de animais obesos quando comparados a animais controles.

Os resultados obtidos neste estudo complementam os achados anteriores do nosso grupo em que houve aumento dos tumores e da agressividade das metástases. Com isso é interessante ressaltar que a correlação positiva obtida entre componentes da matriz extracelular, metaloproteinases de matriz e seus inibidores com a progressão do tumor de mama em animais obesos poderá contribuir para o desenvolvimento de avaliações prognósticas e estratégias terapêuticas futuras.

## 6 CONCLUSÕES

Camundongos BALB/c submetidos a uma dieta hiperlipídica e inoculados com células 4T1 metastáticas de carcinoma mamário submetidos à análise histopatológica de seus tumores permitiram concluir:

- O aumento de vacúolos lipídicos em animais obesos sugere o recrutamento de células imunes, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que contribuirão para a progressão tumoral.

- As metaloproteinases de matriz analisadas (MMP-2, 3, 9,11,13), exceto MMP-2, estiveram expressão significativamente aumentada em animais obesos em relação aos controles o que possibilita inferir que houve correlação positiva entre a metástase tumoral e estes marcadores analisados.

- Os inibidores de metaloproteinases TIMP-1 e TIMP-2 estiveram super expressos em obesos. Associado à ativação de algumas metaloproteinases de matriz, o aumento na expressão desses inibidores indicou uma contribuição para a invasão de células tumorais.

- O inibidor RECK esteve aumentado em animais controles por está relacionado à metaloproteinases de membrana que atuam na supressão à metástase indicando um marcador de bom prognóstico tumoral associado aos resultados de tumores mais invasivos em animais obesos.

- A fibronectina, componente de matriz extracelular, esteve aumentada em animais obesos podendo contribuir para a agressividade tumoral por permitir a livre migração de células neoplásicas.

- Outro componente de matriz extracelular, colágeno IV, esteve aumentado em animais controles. Esse fato pode ser explicado pelo marcador analisado ser degradado por MMP-13, que esteve aumentada em animais obesos. Além disso, a degradação de colágeno IV está relacionada à integridade da matriz extracelular que facilita a migração de células neoplásicas.

- Por fim, é necessário que o estudo continue por meio da análise de outros aspectos do câncer de mama em animais obesos como genéticos, bioquímicos e nanobiológicos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COLOTTA, F., ALLAVENA, P., SICA, A., GARLANDA, C., MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**, v. **30**, n. **7**, p. 1073–81, jul. 2009.

DAVIES, K. J. The Complex Interaction of Matrix Metalloproteinases in the Migration of Cancer Cells through Breast Tissue Stroma. **International journal of breast cancer**, v. **2014**, p. 839094, jan. 2014.

DECLERCK, Y. A., MERCURIO, A. M., STACK, M. S., CHAPMAN, H. A., ZUTTER, M. M., MUSCHEL, R. J., RAZ, A., MATRISIAN, L. M., SLOANE, B. F., NOEL, A., HENDRIX, M. J., COUSSENS, L., PADARATHSINGH, M. Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. **The American journal of pathology**, v. **164**, n. 4, p. 1131–9, abr. 2004.

DUBOIS, V., DELORT, L., BILLARD, H., VASSON, M. Breast cancer and obesity: in vitro interferences between adipokines and proangiogenic features and/or antitumor therapies? **PloS one**, v. **8**, n. 3, p. e58541, jan. 2013.

FIGUEIRA, R. C. S., GOMES, L. R., NETO, J. S., SILVA, F. C., SILVA, I. D. C. G., SOGAYAR, M. C. Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential. **BMC cancer**, v. **9**, p. 20, jan. 2009.

FINN, O. J. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. **Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. **23** Suppl 8, n. Supplement 8, p. viii6–9, set. 2012.

GILMORE, A. P. Anoikis. **Cell death and differentiation**, v. **12** Suppl 2, p. 1473–7, nov. 2005.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annual review of immunology**, v. **29**, p. 415–45, jan. 2011.

GROSSMANN, M. E., RAY, A., NKHATA, K. J., MALAKHOV, D. A., ROGOZINA, O. P., DOGAN, S., CLEARY, M. P. Obesity and breast cancer: status of leptin and adiponectin in pathological processes. **Cancer metastasis reviews**, v. **29**, n. 4, p. 641–53, dez. 2010.

HAGEDORN, H. G., SAUER, U., SCHLEICHER, E. Divergence in distribution and prognostic significance of major basement components in laryngeal carcinomas. **International journal of oncology**, v. **18**, n. 5, p. 1045–51, maio 2001.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: **The next generation Cell**, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A.; FRANCISCO, S. The Hallmarks of Cancer **Cell**, v. **100**, p. 57–70, 2000.

HARDWICK, K. G.; RHEE, J.; COUSSENS, L. M. RECKing MMP function: implications for cancer development. **Cell Biology**, v. **12**, n. 5, p. 209–211, 2002.

HEPPNER, G. H.; MILLER, F. R.; SHEKHAR, P. V. M. Nontransgenic models of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. **2** p. 2–5, 2000.

**Instituto Nacional de Câncer - INCA.** Incidência de Câncer no Brasil Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acesso em: 18 dez. 2014a.

**Instituto Nacional de Câncer - INCA.** Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2014b.

JIANG, Y.; GOLDBERG, I. D.; SHI, Y. E. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. **Oncogene**, v. **21** October 2001, p. 2245–2252, 2002.

KELLY, T., YANG, W., CHEN, C. S., REYNOLDS, K., HE, J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. **International journal of obesity**, v. **32**, n. 9, p. 1431–7, set. 2008.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, v. **141**, n. 1, p. 52–67, 2 abr. 2010.

KIM, E. J., CHOI, M. R., PARK, H., KIM, M., HONG, J. E., LEE, J. Y., CHUN, H. S., LEE, K. W., PARK, J. H. Y. Dietary fat increases solid tumor growth and metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells and mortality in obesity-resistant BALB/c mice. **Breast cancer research : BCR**, v. **13**, n. 4, p. R78, jan. 2011.

KOSMEHL, H., BERNDT, A., STRASSBURGER, S., BORSI, L., ROUSSELLE, P., MANDEL, U. HYCKEL, U., ZARDI, P., KATEMKAMP, D. Distribution of laminin and fibronectin isoforms in oral mucosa and oral squamous cell carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. **81**, p. 1071–1079, 1999.

LEBEAU, A., NERLICH, A., SAUER, U. Tissue distribution of major matrix metalloproteinases and their transcripts in human breast carcinomas. **Anticancer research**, v. **19**, n. 5B, p. 4257–64, 1999.

LELEKAKIS, M., MOSELEY, J. M., MARTIN, T. J., HARDS, D., WILLIAMS, E., HO, P., LOWEN, D., JAVNI, J., MILLER, F. R., SLAVIN, J., ANDRESON, R. L. A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. **17** p. 163–170, 1999.

LOI, S., MILNE, R. L., FRIEDLANDER, M. L., MCCREDIE, R. E., GILES, G. G., HOPPER, J. L., PHILLIPS, K. A. **Obesity and Outcomes in Premenopausal and Postmenopausal Breast Cancer. v. 7** p. 1686–1691, 2005.

OSKARSSON, T. Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. **The Breast. v. 22** S66-S72, 2013

PIVETTA, E., SCAPOLAN, M., PECOLO, M., WASSERMANN, B., ABURUMEILEH, I., BALESTRERI, L., BORSATTI, E., TRIPODO, C., COLOMBATTI, A., SPESSOTTO, P. MMP-13 stimulates osteoclast differentiation and activation in tumour breast bone metastases. **Breast cancer research : BCR, v. 13**, n. 5, p. R105, jan. 2011.

REMACLE, A. G., SHIRYAEV, S. A., GOLUBKOV, V. S., FRESKOS, J. N., BROWN, M. A., KARWA, A. S., NAIK, A. D., HOWARD, C. P., SYMPSON, C. J., STRONGIN, A. Y. Non-destructive and selective imaging of the functionally active, pro-invasive membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) enzyme in cancer cells. **The Journal of biological chemistry, v. 288**, n. 28, p. 20568–80, 12 jul. 2013.

RENEHAN, A. G., TYSON, M., EGGER, M., HELLER, R., ZWAHLEN, M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. **The lancet, v. 371**, p. 569–578, 2007.

SEMENZA, G. L. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. **Trends in Molecular Medicine, v. 8**, n. 4, p. S62–S67, abr. 2002.

SHIBUYA, M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. **Genes & cancer, v. 2**, n. 12, p. 1097–105, dez. 2011.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual review of cell and developmental biology, v. 17**, p. 463–516, jan. 2001.

SUBARSKY, P.; HILL, R. P. The hypoxic tumour microenvironment and metastatic progression. **Clinical & Experimental Metastasis, v. 20** p. 237–250, 2003.

TOSIOS, K. I.; KAPRANOS, N.; PAPANICOLAOU, S. I. Loss of basement membrane components laminin and type IV collagen parallels the progression of oral epithelial neoplasia. **Histopathology, v. 33**, n. 3, p. 261–268, set. 1998.

VAUPEL, P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. **The oncologist, v. 9** Suppl 5, p. 10–7, jan. 2004.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation research**, v. **92**, n. 8, p. 827–39, 2 maio 2003.

VIZOSO, F. J., GONZÁLEZ, L. O., CORTE, M. D., RODRIGUEZ, J. C., VAZQUES, J., LAMELAS, M. L., JUNQUERA, S., MERINO, A. M., GARCIA-MUNIZ, J. L. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. **British journal of cancer**, v. **96**, n. 6, p. 903–11, 26 mar. 2007.

YU, Q.; STAMENKOVIC, I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. **Genes & Development**, v. **13**, n. 1, p. 35–48, 1 jan. 1999.

YU, W. H., WOESSNER, F. J., MCNEISH, J. D., STAMENKOVIC, I. CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. **Genes & development**, v. **16**, n. 3, p. 307–23, 1 fev. 2002.

YURCHENCO, D., SCHITTNY, J. C. Molecular architecture of basement membranes. **The FASEB Journal**, v. **J4**, p. 1577–1590, 1990.

