

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC 2026

Influência de glutaminases na diferenciação de subtipos de CAFs e no crescimento de esferoides de câncer de mama

Pesquisador Responsável: Guilherme Henrique Tamarindo

Coorientadora: Sandra Martha Gomes Dias

Unidade do CNPEM: LNBio

1. INTRODUÇÃO E ESTADO DA ARTE

A reprogramação do metabolismo está entre os *hallmarks* do câncer e envolve ajustes catabólicos e anabólicos que favorecem o crescimento tumoral. Entre estas alterações, estão o metabolismo da glutamina captada do microambiente. A glutamina é o amino ácido mais abundante do plasma humano e sua utilização dá-se na contribuição com carbonos no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) que resulta na geração de energia na forma de coenzimas reduzidas, mas também em intermediários de vias de biossíntese, como acetil-CoA para a lipogênese. A entrada da glutamina no metabolismo energético ocorre por meio das glutaminases GLS e GLS2, as quais produzem glutamato, o qual é convertido em α -cetoglutarato. Ambas as enzimas têm sido descritas como protumorigênicas em diferentes subtipos de câncer de mama, estando associadas a transição epitélio-mesênquima, resistência, proliferação e invasão tumoral (Dias et al., 2020; Katt et al., 2017; Lukey et al., 2019). Apesar do papel crucial da glutamina no suporte às demandas metabólicas e proliferação das células tumorais, células do microambiente tumoral também metabolizam este amino ácido e a competição pode ser determinante nas populações de células do tumor, afetando também a resposta a terapias.

Os fibroblastos são células estromais que ocorrem no tecido saudável, mas também podem assumir um fenótipo tumoral, tornando-se CAFs (*cancer-associated fibroblasts*), que estimulam o crescimento das células tumorais, como também podem se comunicar com outras do microambiente, como as imunes (Lavie et al., 2022). Neste sentido, CAFs podem ser classificados em inflamatórios (produzem citocinas e fatores que recrutam células do sistema imune), miofibroblásticos (remodeladores da matriz extracelular) e imunomoduladores (apresentadores de antígeno via MHCII), conforme sintetizado na Figura 1 (Hartmann et al., 2020). Consistentemente, a presença de CAFs está associada à resistência a tratamentos, incluindo quimioterapia e imunoterapia (Guo et al., 2023; Masuda, 2025; Rivas et al., 2022). Adicionalmente, diferentes populações de CAFs são diferencialmente predominantes entre os subtipos de câncer de mama (Hu et al., 2022) e impactam diretamente no recrutamento de células imunes, como linfócitos CD4 e CD8 (Costa et al., 2018). Este cenário tem corroborado estratégias terapêuticas que têm como alvo estas células estromais, inibindo vias de TGF β (fator beta de crescimento tumoral) e FAP (fator ativador de fibroblasto), como também outras abordagens que propõem sua reprogramação para um estado não-ativado (Yamazaki & Ishimoto, 2025). Portanto, ainda que a maioria das terapias sejam direcionadas às células tumorais, as CAFs também podem oferecer oportunidades ainda pouco exploradas.

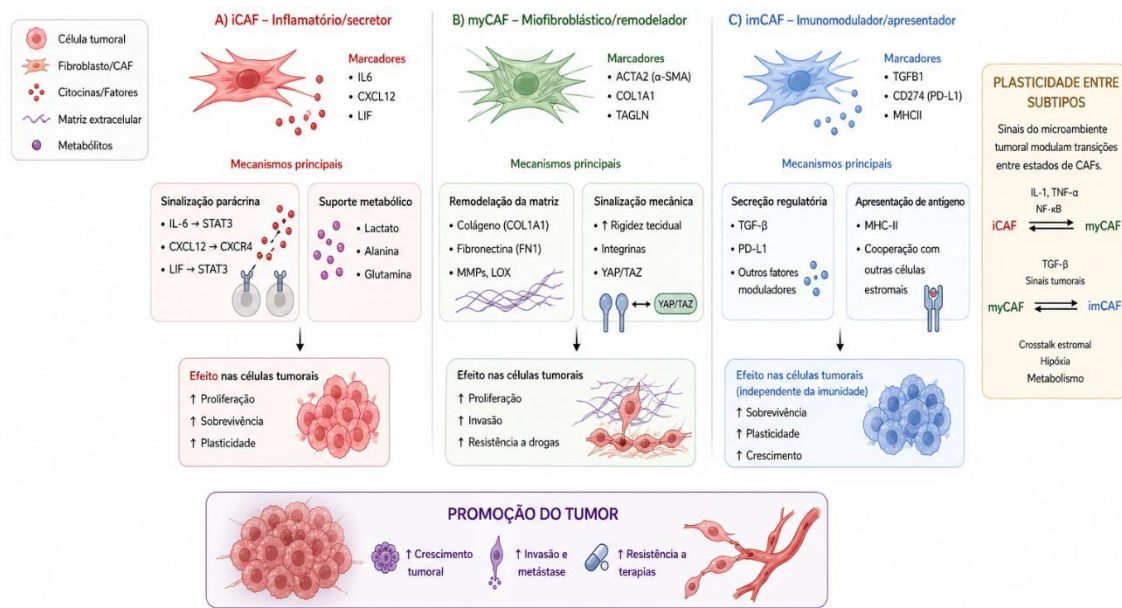


Figura 1. Subtipos de CAFs. A) Inflamatórios, B) Miofibroblásticos e C) Imunomodulador.

Entre outros, um dos fatores que podem contribuir para seu fenótipo tumoral, é o metabolismo de glutamina. Estudos *in vitro* mostraram que CAFs desafiadas com um gradiente de glutamina, migram em direção às maiores concentrações deste amino ácido (Mestre-Farrera et al., 2021). Em câncer de mama, estes fibroblastos utilizam carbonos da glutamina via GLS1 para a síntese *de novo* de prolina para produção de matriz extracelular, como fibras de colágeno (Kay et al., 2022). Interessantemente, CAFs podem construir uma matriz rígida que promove a exclusão de células do sistema imune, limitando a atividade citotóxica de linfócitos TCD8. Apesar do papel de GLS1 ter sido reportado, os dados quanto à GLS2 em fibroblastos são escassos no câncer de mama. No cenário mundial, este está entre os cinco que mais acomete a população de mulheres, sendo os subtipos Luminal A e B os mais incidentes (60-80%). Interessantemente, o subtipo Luminal pode apresentar população de CAFs com expressão de CD149, associadas à resistência à terapia anti-estrogênica e fibrose (Brechbuhl et al., 2017). Em outro estudo, o subtipo luminal apresentou predominância de uma população de CAFs associada à menor imunogenicidade comparado com aquela encontrada nos subtipos triplo-negativo e HER2 amplificado (Costa et al., 2018). Nesse sentido, o estudo da interação entre células tumorais e CAFs pode levar a potenciais estratégias terapêuticas. Portanto, esta proposta testará a hipótese central de a atividade de GLS e GLS2 em fibroblastos mamários reprograma o destino funcional de CAFs favorecendo fenótipos pró-matriz, inflamatórios ou imunomoduladores que promovem invasão tumoral em esferoides.

2. OBJETIVOS

O objetivo desta proposta é avaliar o papel de GLS1 e GLS2 na ativação fibroblastos. Para isso, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1 – Avaliar se a expressão de GLS1 ou GLS2 em fibroblastos murinos leva à diferenciação em CAFs inflamatórias, miofibroblásticas ou apresentadores de antígenos.

2 – Avaliar se estes fibroblastos promovem o crescimento de esferoides e invasão de células de câncer de mama murinos.

3. METODOLOGIA

Especialização de CAFs

Para testar o papel de GLS1 e GLS2 na diferenciação de CAFs, serão utilizadas células murinas MEF imortalizadas com expressão ectópica da isoforma GAB ou GAC ativas, além do controle vazio (MCS). As células serão cultivadas em meio DMEM Alta Glicose (4,5g/L), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 4mM de L-glutamina, 2mM de HEPES e 1µg/mL de TGFβ. A primeira etapa desse projeto será avaliar se a expressão diferencial de cada glutaminase leva à diferenciação específica de CAFs inflamatórias, miofibroblásticas ou apresentadores de antígeno. Para isso as células serão plaqueadas na densidade de 5×10^5 e coletadas após 48h de adesão para avaliação da expressão gênica por RT-qPCR. Para identificação do perfil inflamatório (iCAF), serão analisados os genes *Il6* e *Cxcl12*; para o perfil miofibroblástico (myCAF), *Acta2*, *Colla1* e *Tagln*; e para o perfil imunomodulador (imCAF), *Tgfb1* e *Cd274*.

Extração de RNA e RT-qPCR

Os fibroblastos serão submetidos à extração de RNA com TRI Reagent (Sigma-Aldrich), conforme instruções do fabricante. A integridade do RNA será avaliada por gel de agarose 1% com corante desnaturante. Em seguida, a produção da primeira fita de cDNA feita utilizando mix de hexâmetros randômicos (Life Technologies) com Oligo dT (NEB), em 7 partes para 5, e GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega), seguindo instruções dos fabricantes. A quantificação dos transcritos será realizada em triplicata técnica com o EvaGreen SYBR® PCR Master Mix (Solis). Os dados serão normalizados pela expressão do *housekeeping Hprt*. Será utilizado o método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para quantificação da expressão gênica.

Esferoides

Para a formação dos esferoides, as linhagens EO771 (câncer de mama murino luminal-like), MEF MCS, MEF GAB e MEF GAC serão semeadas em placas de ultra-baixa adesão (ULA) de 96 poços, na proporção 1 MEF para 1 tumoral, configurando os grupos: EO771, EO771+MEF MCS, EO771+ MEF GAB e EO771+ MEF GAC. Para diferenciação no esferoide, todas as células MEF expressarão GFP. Esta proporção foi escolhida com base em experimentos prévios e embasado na literatura, que mostrou ser usual em outros modelos de câncer (Kuen et al., 2017) e favorecer a formação ductal/tubular em células 4T1, linhagem de câncer de mama murino (Li & Lu, 2011). Cada esferoide terá o total de 35000 células por poço em volume final de 200 µL, conforme padronização prévia. Após plaqueamento, as placas serão centrifugadas brevemente ($300 \times g$ por 2 min) para favorecer a agregação celular e incubadas nas condições padrão. Para invasão, o esferoide será plaqueado nas mesmas condições em uma matriz de colágeno e quantificado o número de células invasoras (GFP-, tumorais) a cada 24h ao longo de 7 dias. O crescimento dos esferoides e invasão das células tumorais serão monitorados diariamente por citômetro de imagens Celigo (Revvity) e quantificados o diâmetro e volume, como também a quantidade de células GFP negativas que migraram para fora do esferoide. Para ambos, os valores serão expressos em média e desvio padrão. Ao menos três experimentos independentes serão realizados em triplicata para análise estatística.

4. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

	SETEMBRO- OUTUBRO	NOVEMBRO- DEZEMBRO	JANEIRO- FEVEREIRO	MARÇO- ABRIL	MAIO- JUNHO	JULHO- AGOSTO
Transdução das células	X	X				
Validação por WB		X	X			
Extração e análise de expressão gênica		X	X			
Co-cultivos		X	X	X		
Ensaio esferoides			X	X	X	
Relatório final					X	

5. REFERÊNCIAS

- Brechbuhl, H. M., Finlay-Schultz, J., Yamamoto, T. M., Gillen, A. E., Citty, D. M., Tan, A. C., Sams, S. B., Pillai, M. M., Elias, A. D., Robinson, W. A., Sartorius, C. A., & Kabos, P. (2017). Fibroblast Subtypes Regulate Responsiveness of Luminal Breast Cancer to Estrogen. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 23(7), 1710–1721. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2851>
- Costa, A., Kieffer, Y., Scholer-Dahirel, A., Pelon, F., Bourachot, B., Cardon, M., Sirven, P., Magagna, I., Fuhrmann, L., Bernard, C., Bonneau, C., Kondratova, M., Kuperstein, I., Zinovyev, A., Givel, A. M., Parrini, M. C., Soumelis, V., Vincent-Salomon, A., & Mehta-Grigoriou, F. (2018). Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell*, 33(3), 463–479. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.01.011>
- Dias, M. M., Adamoski, D., dos Reis, L. M., Ascensão, C. F. R., de Oliveira, K. R. S., Mafra, A. C. P., da Silva Bastos, A. C., Quintero, M., de G. Cassago, C., Ferreira, I. M., Fidelis, C. H. V., Rocco, S. A., Bajgelman, M. C., Stine, Z., Berindan-Neagoe, I., Calin, G. A., Ambrosio, A. L. B., & Dias, S. M. G. (2020). GLS2 is protumorigenic in breast cancers. *Oncogene*, 39(3), 690–702. <https://doi.org/10.1038/S41388-019-1007-Z;TECHMETA>
- Guo, Z., Zhang, H., Fu, Y., Kuang, J., Zhao, B., Zhang, L. F., Lin, J., Lin, S., Wu, D., & Xie, G. (2023). Cancer-associated fibroblasts induce growth and radioresistance of breast cancer cells through paracrine IL-6. *Cell Death Discovery* 2023 9:1, 9(1), 6-. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01306-3>
- Hartmann, F. J., Mrdjen, D., McCaffrey, E., Glass, D. R., Greenwald, N. F., Bharadwaj, A., Khair, Z., Verberk, S. G. S., Baranski, A., Baskar, R., Graf, W., Van Valen, D., Van den Bossche, J., Angelo, M., & Bendall, S. C. (2020). Single-cell metabolic profiling of human cytotoxic T cells. *Nature Biotechnology* 2020 39:2, 39(2), 186–197. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0651-8>
- Hu, D., Li, Z., Zheng, B., Lin, X., Pan, Y., Gong, P., Zhuo, W., Hu, Y., Chen, C., Chen, L., Zhou, J., & Wang, L. (2022). Cancer-associated fibroblasts in breast cancer: Challenges and opportunities. *Cancer Communications*, 42(5), 401. <https://doi.org/10.1002/CAC2.12291>
- Katt, W. P., Lukey, M. J., & Cerione, R. A. (2017). A tale of two glutaminases: homologous enzymes with distinct roles in tumorigenesis. *Future Medicinal Chemistry*, 9(2), 223–243. <https://doi.org/10.4155/FMC-2016-0190>
- Kay, E. J., Paterson, K., Riero-Domingo, C., Sumpton, D., Däbritz, J. H. M., Tardito, S., Boldrini, C., Hernandez-Fernaud, J. R., Athineos, D., Dhayade, S., Stepanova, E., Gjerga, E., Neilson, L. J., Lilla, S., Hedley, A., Koulouras, G., McGregor, G., Jamieson, C., Johnson, R. M., ... Zanivan, S. (2022). Cancer-associated fibroblasts require proline synthesis by PYCR1 for the deposition of pro-tumorigenic extracellular matrix. *Nature Metabolism*, 4(6), 693–710. <https://doi.org/10.1038/S42255-022-00582-0>
- Kuen, J., Darowski, D., Kluge, T., & Majety, M. (2017). Pancreatic cancer cell/fibroblast co-culture induces M2 like macrophages that influence therapeutic response in a 3D model. *PloS One*, 12(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0182039>
- Lavie, D., Ben-Shmuel, A., Erez, N., & Scherz-Shouval, R. (2022). Cancer-associated fibroblasts in the single-cell era. *Nature Cancer* 2022 3:7, 3(7), 793–807. <https://doi.org/10.1038/s43018-022-00411-z>
- Li, L., & Lu, Y. (2011). Optimizing a 3D Culture System to Study the Interaction between Epithelial Breast Cancer and Its Surrounding Fibroblasts. *Journal of Cancer*, 2(1), 458–466. <https://doi.org/10.7150/JCA.2.458>
- Lukey, M. J., Cluntun, A. A., Katt, W. P., Lin, M. chong J., Druso, J. E., Ramachandran, S., Erickson, J. W., Le, H. H., Wang, Z. E., Blank, B., Greene, K. S., & Cerione, R. A. (2019). Liver-Type Glutaminase GLS2 Is a Druggable Metabolic Node in Luminal-Subtype Breast Cancer. *Cell Reports*, 29(1), 76–88. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2019.08.076>
- Masuda, H. (2025). Cancer-associated fibroblasts in cancer drug resistance and cancer progression: a review. *Cell Death Discovery* 2025 11:1, 11(1), 341-. <https://doi.org/10.1038/s41420-025-02566-x>
- Mestre-Farrera, A., Bruch-Oms, M., Peña, R., Rodríguez-Morato, J., Alba-Castellon, L., Comerma, L., Quintela-Fandino, M., Duñach, M., Baulida, J., Pozo, O. J., & de Herrerros, A. G. (2021). Glutamine-Directed Migration of Cancer-Activated Fibroblasts Facilitates Epithelial Tumor Invasion. *Cancer Research*, 81(2), 438–451. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0622>
- Rivas, E. I., Linares, J., Zwick, M., Gómez-Llonin, A., Guiu, M., Labernadie, A., Badia-Ramentol, J., Lladó, A., Bardia, L., Pérez-Núñez, I., Martínez-Ciarpaglini, C., Tarazona, N., Sallent-Aragay, A., Garrido, M., Celià-Terrassa, T., Burgués, O., Gomis, R. R., Albanell, J., & Calon, A. (2022). Targeted immunotherapy against distinct cancer-associated fibroblasts overcomes treatment resistance in refractory HER2+ breast tumors. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 5310-. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32782-3>
- Yamazaki, M., & Ishimoto, T. (2025). Targeting Cancer-Associated Fibroblasts: Eliminate or Reprogram? *Cancer Science*, 116(3), 613–621. <https://doi.org/10.1111/CAS.16443;JOURNAL:JOURNAL:13497006A;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>