



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS – PPGCF**

**Análise da expressão e do papel da ADAM9 humana na  
capacidade invasiva de células tumorais por silenciamento gênico**

**KELLI CRISTINA MICOCCI**

**SÃO CARLOS - SP  
Setembro/2009**

**Análise da expressão e do papel da ADAM9 humana na  
capacidade invasiva de células tumorais por silenciamento gênico**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS – PPGCF**

**Análise da expressão e do papel da ADAM9 humana na  
capacidade invasiva de células tumorais por silenciamento gênico**

**KELLI CRISTINA MICOCCI**



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas, área de concentração: Fisiologia.

**SÃO CARLOS - SP**

**Setembro/2009**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M626ae

Micocci, Kelli Cristina.

Análise da expressão e do papel da ADAM9 humana na capacidade invasiva de células tumorais por silenciamento gênico / Kelli Cristina Micocci. -- São Carlos : UFSCar, 2010. 121 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Bioquímica. 2. Mamas - câncer. 3. RNA interferente. 4. Fisiologia. I. Título.

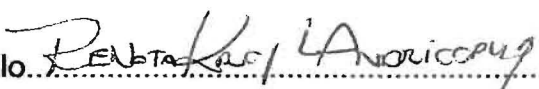
CDD: 612.015 (20ª)

Universidade Federal de São Carlos  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas  
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Defesa de Dissertação de Kelli Cristina Micocci

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo..... 

Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann..... 

Profa. Dra. Renata Krogh Andricopulo..... 

**ORIENTADORA:**

DRA. HELOÍSA SOBREIRO SELISTRE DE ARAÚJO

**CO-ORIENTADORA:**

DRA. MARCIA REGINA COMINETTI

*A mais bela experiência que podemos ter é a do mistério. É a emoção fundamental existente na origem da verdadeira arte e ciência. Aquele que não a conhece e não pode se maravilhar com ela está praticamente morto e seus olhos estão ofuscados (**Albert Einstein**).*

*Dedico este trabalho a meus pais Natal Sebastião e Maria Aparecida, pela admiração, compreensão, cooperação, amor, respeito e apoio para que eu seguisse em frente ... vocês são o meu espelho, é por vocês que cheguei até aqui e vou mais longe ainda. Ao meu irmão Cristian Henrique, pelo amor, carinho, apoio e assistência técnica. Ao meu eterno noivo Adilson, que mudou a minha vida, sem você minha vida não teria sentido ... Vocês são a minha vida (V.S.M.V.), eu tenho sorte por ter essa **GRANDE E MARAVILHOSA FAMÍLIA** ... Amo muito vocês.*



## AGRADECIMENTOS

*A conquista de mais um sonho em minha vida que nasceu desde que entrei no curso de Educação Física e Motricidade Humana da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) em março de 1998. Muitos tropeços foram dados até a concretização deste sonho ... momentos difíceis fizeram com que muitas lágrimas rolassem ... tentativas e erros durante cinco anos quase me fizeram desistir de tudo ... ofensas ... porém sempre com o mesmo objetivo em mente, ou seja, desde que iniciei meu curso eu queria muito fazer mestrado em Fisiologia ... mas confesso, desisti duas vezes, e uma delas foi porque fui fraca ... foi muito difícil para mim e para todos que me amavam e me apoiavam, pois fiz de meu sonho o deles também, então os frustrei ... doeu muito em mim e muito mais em meus pais que sempre me incentivaram a estudar ... abandonei meu sonho para trabalhar. Até que um dia, dando aula para uma “anja” chamada Raquel Agnelli Mesquita Ferrari decidi voltar e correr atrás novamente de meu sonho, na verdade ela precisou me dar um “combat” para me acordar ... amiga, obrigada, você faz parte da concretização desta etapa de minha vida ... você sempre foi e sempre será muito mais que amiga, uma irmã que não tive ... te adoro. Quanto fortalecimento! Em meio tantas idas e vindas cresci muito e aprendi mais ainda ... não foi fácil voltar e novamente enfrentar os meus medos e fraquezas, e além disso, tive que enfrentar uma das piores coisas de minha vida durante o exame de seleção para o mestrado ... a dor da perda ... a dor da ausência ... perdi meu avô querido ... foi muito triste e dolorido ... muito sofrimento ... perdão meu DEUS, perdão meu avô, por muitas vezes estar ausente e não poder dar carinho e atenção quando você mais precisou de mim ... mas sei que o meu sonho também era o seu meu querido VÔ ... então, hoje, mais mulher, mais segura, mais confiante, mais forte, mais decidida e mais amada, só tenho a dizer uma coisa ... VALEU A PENA ... e gostaria de transmitir meus agradecimentos a todos que fizeram parte desta história:*

**A Deus:** *Por mais uma etapa de minha vida encerrada. Mais um ciclo que se fecha. Finda-se uma caminhada diária de mais de 2 anos em que tive a oportunidade de vivenciar alegrias e tristezas. E nessa caminhada tive a presença constante de Deus a me apoiar, orientar, e muitas vezes me levantar e carregar em TEUS braços. Palavras são incapazes de expressar a gratidão que existe em meu coração por todo bem que ELE me fez e ainda fará. ELE que em todos os momentos de minha vida nunca me abandonou. Ele estava sempre presente me acompanhando, ajudando, amparando, e é graças a ELE que hoje estou aqui, comemorando mais essa conquista. Pai, Amigo, Companheiro de jornada, agradeço por proporcionar todos esses anos de grandes lutas e vitórias, pois sem TI, nada sou, e nada posso, pois: “Buscai as coisas do alto, pois é lá que se encontra o verdadeiro tesouro”.*

**Aos meus pais:** *Natal e Maria, pelo apoio, incentivo e amor. Muito obrigada pela dedicação e paciência! Vocês foram e sempre serão meus queridos mestres ... luz da minha vida ... AMO vocês mais que tudo.*

**Ao meu irmão:** *Cristian que mesmo longe, nunca saiu de minhas lembranças e de meu coração. Agradeço muito meu MANO por toda a ajuda com esse “bicho de sete cabeças” que é a informática, te AMO muito.*

**Ao meu noivo Adilson:** *Pelo seu amor incondicional, paciência, e sua extrema compreensão durante todas as etapas deste trabalho. Por sua infinita dedicação e por ter me ensinado a acreditar em mim e em meus sonhos, suas palavras de incentivo e carinho me ajudaram todas as vezes que mais precisei durante as etapas difíceis de minha vida e deste trabalho, V.E.M.V.*

**À minha orientadora:** *Helôisa Sobreiro Selistre de Araújo por ter me recebido em seu laboratório por duas vezes e acreditado em mim, mesmo em meio minhas fraquezas e inseguranças. Pelo incentivo ao crescimento profissional, pela paciência, amizade e companheirismo em todo este período. MULHER forte, segura e admirável, simplesmente não tenho palavras para agradecê-la por tudo de bom que fez para mim e em mim!*

**À minha co-orientadora:** *Márcia Regina Cominetti, que com muita competência, seriedade e amizade me auxiliou em todas as etapas deste trabalho. Obrigada por sua orientação, dedicação, paciência, ensinamentos e por acreditar na minha capacidade. Chefinha, se não fosse o sua orientação dificilmente chegaria até aqui ... muito obrigada ...*

**À minha grande amiga:** *Raquel Agnelli Mesquita Ferrari, por ter acreditado em mim e por ter sido uma grande amiga e chefinha. Obrigada por sua amizade, dedicação, paciência e seriedade. Amiga, sinto muito sua falta ... de nossas risadas ... brincadeiras ... e bobices...amiga insubstituível.*

**Aos amigos e colegas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular:** *Pela compreensão, carinho, auxílio e troca de experiências. Agradeço a todos que de uma forma ou de outra participaram desta etapa de minha vida, entre eles, à Angélica, Araceli, Daíse, Patrícia, Patty, Sílvia, Verônica, Uliana, Zé Roberto e Rafael (soneca).*

**Agradeço em especial,** *a Ana e Sabrina, por toda a ajuda com a informática (“bicho de sete cabeças”); às amigas Ana Carolina (Carol), Carmen Lúcia e Juliana, pelas contribuições e troca de experiências durante todo o trabalho (que não foram poucas), e pelos momentos divertidos, principalmente nas sextas-feiras; á amiga Rita, que me ensinou e ajudou com muita paciência e dedicação a fazer zimografia; e à Beth, pelo auxílio técnico.*

**À Felícia P. Cavalher** *do Instituto Ludwig pela ajuda virtual com a técnica do RNA de interferência.*

**À CAPES,** *pelo apoio financeiro e pela bolsa de mestrado, enfim, a todos que me auxiliaram direta ou indiretamente para que este trabalho pudesse ser finalizado com êxito.*

**Muito obrigada...**

## RESUMO

ADAMs é um termo usado para descrever a presença de domínios desintegrina e metaloprotease (A Disintegrin And Metalloprotease) em uma determinada classe de proteínas de membrana, multifuncionais, expressas em diferentes espécies animais como mamíferos e insetos. Elas possuem funções importantes em muitos processos fisiológicos como na fertilização, fusão de mioblastos, migração, proliferação e sobrevivência celular, entre outros, bem como em processos patológicos tais como muitos tipos de tumores humanos, incluindo mama, próstata, pâncreas, fígado, rins e pele. A ADAM9 está envolvida em diversos processos celulares, tais como adesão celular, migração e sinalização de células tumorais, contribuindo para o desenvolvimento de metástases. **Objetivos:** Analisar a expressão da ADAM9 em linhagens de células tumorais (MDA-MB-231 e DU-145) e não tumorais (FH e C2C12), gerar clones com o gene que codifica para a ADAM9 silenciados e verificar o efeito da ausência desta proteína na invasão, proliferação e expressão gênica das células MDA-MB-231. **Métodos:** As células foram cultivadas e posteriormente plaqueadas ( $2 \times 10^6$  células/placa de 6cm) por 24 horas e em 5ml de meio de cultura DMEM (10% de FBS) e lisadas para o ensaio de *western blotting* e zimografia. Para o ensaio de inibição de adesão as células MDA-MB-231 e FH ( $5 \times 10^6$  células/ml) foram marcadas com CMFDA (clorometil diacetato fluoresceína) e posteriormente incubadas com os anticorpos anti-ADAM9D e anti-RP3ADAM9 em diferentes concentrações. Para a técnica de RNAi foi utilizado um kit (*Silencer<sup>®</sup> siRNA Starter Kit* – Ambion),  $2,0 \times 10^5$  de células (MDA-MB-231) e agente de transfecção (Lipofectamina 2000 - Invitrogen). As células foram plaqueadas em 5ml de meio de cultura DMEM/placa. No terceiro dia de plaqueamento as células foram tratadas com agente de transfecção e *primer* de silenciamento do RNA, para serem utilizadas na RT-PCR, ensaio de proliferação e invasão em matrigel. **Resultados:** Todas as linhagens estudadas expressaram a ADAM9 nas condições de estudo. A atividade MMP-2 (gelatinase-A) intermediária estava presente em todos os tipos celulares testados. O silenciamento de ADAM9 não afetou a taxa de proliferação das células MDA-MB-231 após 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 dias do silenciamento (24 ou 48 horas de incubação). O silenciamento da ADAM9 humana inibiu a invasão celular em células de câncer de mama (MDA-MB-231) em matrigel ( $71,51 \pm 8,02\%$ ) quando comparados com o controle. **Conclusão:** A geração de clones *knockout* sem a expressão da ADAM9 utilizando a técnica de silenciamento de RNA em células de câncer de mama (MDA-MB-231), não afetou a taxa de proliferação celular. No entanto, a invasão das células tumorais em matrigel foi inibida em aproximadamente 70% quando comparada com o controle, demonstrando que ADAM9 é uma importante molécula envolvida no processo de invasão e metástase.

Palavras chaves: ADAM9, Câncer e RNA de interferência (RNAi).

## **ABSTRACT**

ADAMs is a term used to describe the presence of disintegrin and metalloprotease domains (A Disintegrin And Metalloprotease) in a certain class of multi-functional membrane proteins, expressed in several animal species such as mammals and insects. They play important roles in many physiological processes as in fertilization, myoblast fusion, migration, proliferation and cell survival, as well in diseases including breast, prostate, and pancreas cancer. ADAM9 is involved in cellular processes such as adhesion, migration and signaling of tumor cells and it is involved in the metastatic spreading. **Aims:** To analyze the expression of ADAM9 in tumor cell lines (MDA-MB-231 and DU-145), no tumors (FH and C2C12), and to generate knockout clones for ADAM9 expression using silencing RNA techniques for the study of ADAM9 effects on invasion, proliferation and gene expression of MDA-MB-231 cells. **Methods:** Cells were cultured and plated ( $2 \times 10^6$  cells/plate of 6cm) for 24 hours in DMEM (10% FBS) and lysed for western blotting and zymography. To check for inhibition of adhesion to immobilized collagen I, MDA-MB-231 cells and FH ( $5 \times 10^6$  cells/ml) were labeled with CMFDA, and then incubated with anti-ADAM9D and anti-RP3ADAM9 in different concentrations. For ADAM9 silencing, it was used a kit (Silencer® siRNA Starter Kit - Ambion),  $2 \times 10^5$  cells (MDA-MB-231) and the transfection agent (Lipofectamine 2000 - Invitrogen). The cells were plated in 5ml of culture medium DMEM/plate. On the third day cells were treated with the transfection agent and RNA silencing primers. Total RNA was isolated for RT-PCR, and proliferation and invasion in matrigel assays. Results: All the cell lines studied expressed ADAM9 in the tested conditions. MMP-2 (Gelatinase-A) activity was detected in the cell extracts of all studied cell lines. Silencing of ADAM9 did not affect the rate of MDA-MB-231 proliferation, at 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 days after silencing (24 or 48 hours of incubation in 96-well plates). Silencing of human ADAM9 inhibited tumor cell invasion in matrigel ( $71,51 \pm 8,02\%$ ) when compared to control. Conclusion: The generation of MDA-MB-231 knockout clones lacking ADAM9 expression using siRNA technique did not affect the rate of cell proliferation but inhibited tumor cell matrigel invasion, suggesting that ADAM9 is an important molecule in the processes of invasion and metastasis.

Key words: ADAM9, Cancer and interference RNA (iRNA).

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Diagrama esquemático representando alguns componentes da matriz extracelular.....	09
<b>Figura 2</b>	Representação estrutural da subunidade de uma integrina, um receptor de matriz na superfície celular.....	13
<b>Figura 3</b>	Representação estrutural das subunidades $\alpha$ e $\beta$ .....	14
<b>Figura 4</b>	Esquema das diferentes associações entre as subunidades $\alpha$ e $\beta$ e a divisão dos heterodímeros em subgrupos.....	15
<b>Figura 5</b>	Representação esquemática da metástase de células tumorais derivadas do epitélio da glândula mamária.....	22
<b>Figura 6A</b>	Integrinas e sinalização celular. Ativação e montagem das integrinas.....	25
<b>Figura 6B</b>	Agrupamento e desmontagem das integrinas.....	26
<b>Figura 7</b>	Recrutamento do Leucócito para a superfície endotelial.....	27
<b>Figura 8</b>	Sinalização via integrina e receptor tirosina quinase induz a migração e invasão celular.....	29
<b>Figura 9</b>	Representação esquemática dos domínios estruturais básicos das MMPs.....	39
<b>Figura 10</b>	Desenho esquemático representando a estrutura de uma ADAM com seus diferentes domínios e diferentes funções.....	41
<b>Figura 11</b>	Desenho esquemático acima mostra a síntese, processo, e função das ADAMs.....	43
<b>Figura 12</b>	Desenho esquemático acima mostra o papel do domínio metaloprotease da ADAM na ativação de sinalização mediada por receptores.....	45
<b>Figura 13</b>	Desenho esquemático acima mostra a que clivagem realizada pelas ADAMs também podem ocorrer em conjunto com as integrinas, sugerindo-se dois modelos de ação (A) e (B).....	45
<b>Figura 14</b>	Uma dupla fita de RNA longa (dsRNA) desencadeia a via do RNAi.....	53
<b>Figura 15</b>	Proteínas totais extraídas das seguintes linhagens celulares: tumorais (MDA-MB-231, DU-145 e PC-3) e não tumorais (FH e C2C12),.....	73
<b>Figura 16</b>	Expressão da ADAM9 humana extraídas das linhagens celulares, MDA-MB-231 e DU-145.....	74
<b>Figura 17</b>	Expressão da ADAM9 humana e da Actina extraídas das linhagens celulares tumorais: MDA-MB-231, PC-3 e DU-145 e não tumorais: FH e C2C12.....	75

<b>Figura 18</b>	Expressão da ADAM9 humana e da Actina extraídas das linhagens celulares tumorais: MDA-MB-231, PC-3 e DU-145 e não tumorais FH e C2C12.....	75
<b>Figura 19</b>	Expressão da ADAM9 humana e da Actina extraídas das linhagens celulares tumorais, MDA-MB-231, PC-3 e DU-145 e não tumorais FH e C2C12.....	76
<b>Figura 20</b>	Análise da atividade proteolítica dos lisados celulares por zimografia das linhagens tumorais (MDA-MB-231, DU-145 e PC-3) e não tumorais (FH e C2C12).....	77
<b>Figura 21</b>	Representação gráfica da intensidade média das bandas de zimografia em unidade arbitrária (UA) da MMP2 intermediária.....	78
<b>Figura 22</b>	Representação gráfica da intensidade média das bandas de zimografia em unidade arbitrária (UA) da MMP2 ativa.....	79
<b>Figura 23</b>	Representação gráfica da intensidade média das bandas de zimografia em unidade arbitrária (UA) da pró-MMP2.....	80
<b>Figura 24</b>	Representação gráfica da intensidade média das bandas de zimografia em unidade arbitrária (UA) da MMP9.....	81
<b>Figura 25</b>	Análise da atividade proteolítica das lises celulares por zimografia em células, tumorais (MDA-MB-231, DU-145 e PC-3) e não tumorais (FH e C2C12). <b>(A)</b> representa o gel de zimografia sem EDTA e <b>(B)</b> representa o gel de zimografia com EDTA.....	82
<b>Figura 26</b>	Efeito do anticorpo anti-ADAM9D sobre a inibição da adesão celular. Foi usado para este ensaio a linhagem celular MDA-MB-231 e o Anticorpo Anti-ADAM9D.....	83
<b>Figura 27</b>	Efeito do anticorpo anti- RP3ADAM9 sobre a inibição da adesão celular. Foi usado para este ensaio a linhagem celular MDA-MB-231 e o anticorpo Anti-RP3ADAM9.....	84
<b>Figura 28</b>	Efeito do anticorpo anti-RP3ADAM9 sobre a inibição da adesão celular. Foi usado para este ensaio a linhagem celular FH e o Anticorpo Anti-RP3ADAM9.....	85
<b>Figura 29</b>	Amostras do RNA total extraído da linhagem celular MDA-MB-231.....	86
<b>Figura 30</b>	Representação gráfica da expressão da ADAM9 em unidades arbitrárias (UA).....	88
<b>Figura 31</b>	Fotos representativas dos produtos de RT-PCR da proteína ADAM9 <b>(A)</b> e HPRT <b>(B)</b> .....	89

<b>Figura 32</b>	Amostras do RNA total extraído da linhagem celular MDA-MB-231.....	91
<b>Figura 33</b>	Cinética de Silenciamento do gene que codifica para a ADAM9 em células MDA-MB-231.....	92
<b>Figura 34</b>	Efeito do silenciamento da proteína ADAM9 sobre a proliferação das células MDA-MB-231, 4 dias após o silenciamento e 24 horas após a incubação.....	93
<b>Figura 35</b>	Efeito do silenciamento da proteína ADAM9 sobre a proliferação das células MDA-MB-231, 5 dias após o silenciamento e 48 horas após a incubação.....	93
<b>Figura 36</b>	Efeito do silenciamento da proteína ADAM9 sobre a proliferação das células MDA-MB-231, 7 dias após o silenciamento e 24 horas de incubação.....	94
<b>Figura 37</b>	Efeito do silenciamento da proteína ADAM9 sobre a proliferação das células MDA-MB-231, 8 dias após o silenciamento e 48 horas de incubação.....	95
<b>Figura 38</b>	Efeito do silenciamento da proteína ADAM9 sobre a proliferação das células MDA-MB-231, 10 dias após o silenciamento e 24 horas de incubação.....	95
<b>Figura 39</b>	Efeito do silenciamento da proteína ADAM9 sobre a proliferação das células MDA-MB-231, 11 dias após o silenciamento e 24 horas de incubação.....	96
<b>Figura 40</b>	Efeito do silenciamento do gene que codifica a ADAM9 humana sobre a invasão em matrigel das células MDA-MB-231.....	97
<b>Figura 41</b>	Efeito do silenciamento do gene que codifica a ADAM9 humana sobre a invasão em matrigel das células MDA-MB-231.....	98

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b>	Novos casos de câncer e óbitos em países desenvolvidos e em desenvolvimento.....	07
<b>Tabela 2</b>	Ligantes de integrinas e suas distribuições celulares.....	18
<b>Tabela 3</b>	A família das Metalopeptidases de matriz (em humanos).....	36
<b>Tabela 4</b>	As ADAMs humanas.....	46
<b>Tabela 5</b>	Soluções e volumes utilizados para a confecção do gel de poliacrilamida 10%.....	58
<b>Tabela 6</b>	Cálculo da expressão do mRNA da ADAM9 obtido pela PCR em tempo real (RT-PCR).....	88



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

- ADAM:** proteína multimodular com os domínios metalopeptidase e desintegrina-*like*.
- ADAMT:** ADAM com domínio adicional que contém repetições do tipo 1 encontrado nas trombospondinas.
- ADAM9D:** domínio desintegrina produzido em sistema bacteriano.
- BSA:** soro albumina bovina.
- CAM:** molécula de adesão celular.
- CMFDA:** clorometil diacetato fluoresceína.
- DICER:** ribonuclease III.
- DMEM:** meio Dulbecco's modificado.
- DNA:** ácido desoxirribonucléico.
- D/ECD:** seqüência adesiva formada por ácido aspártico/ácido glutâmico – cisteína – ácido aspártico.
- dsRNA:** RNA de dupla fita - "*double strand RNA*".
- EDTA:** ácido etilenodiaminotetraacético.
- EGF:** fator de crescimento epitelial.
- FAK:** quinase de adesão focal.
- FBS:** soro fetal bovino.
- FGF:** fator de crescimento de fibroblastos.
- GAPDH:** gliceraldeído fosfato desidrogenase.
- HB-EGF:** fator de crescimento epidérmico ligado a heparina.
- HPC:** câncer de próstata hereditário.
- HUVEC:** células endoteliais de veia de cordão umbilical humano.
- ICAM:** molécula de adesão intracelular.
- MadCAM:** molécula de adesão celular a adressina mucosa.
- MEC:** matriz extracelular.
- MMPs:** metalopeptidases.
- mRNA-alvo:** ácido ribonucléico mensageiro – alvo.
- MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol -2-il)-2,5-brometo de difenil tetrazólio.
- ODN-AS:** oligonucleotídeos antisenso.
- PBS:** tampão salina fosfato.
- PDGF:** fator de crescimento derivado de plaquetas.

**RGD:** seqüência adesiva formada por arginina – glicina – ácido aspártico.

**Ribozimas:** termo que deriva da combinação das palavras **enzima** e de ácido **ribonucléico**.

**RISC:** complexo específico de silenciamento de RNA.

**RNAi:** RNA interferência.

**RNAm:** ácido ribonucléico mensageiro.

**rpm:** rotações por minuto.

**SDS-PAGE:** eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (dodecil sulfato de sódio).

**siRNAs:** RNA de silenciamento - “*small interference RNA*”.

**SVMP:** metalopeptidases de venenos de serpentes.

**TEMED:** tetrametiletilenodiamina.

**TIMPs:** inibidores teciduais de metalopeptidases.

**TNF- $\alpha$ :** fator alfa de necrose tumoral.

**TGF- $\beta$ :** fator de crescimento de transformação  $\beta$ .

**TRAMP:** adenocarcinoma transgênico de próstata rato.

**TRIS:** tris-(hidroximetil)-aminometano.

**TRITON X-100:** Octilfenoxipolietoxietanol.

**UA:** unidade arbitrária.

**VCAM:** molécula de adesão celular vascular.

**VEGF-C:** fator-C de crescimento do endotélio vascular.

**$\mu$ g:** micrograma.

**$\mu$ l:** microlitros.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1- CÂNCER	1
1.2- A MATRIZ EXTRACELULAR	5
1.3- INTEGRINAS	7
1.3.1- INTEGRINAS E SINALIZAÇÃO	17
1.3.2- SINALIZAÇÃO OUTSIDE-IN	20
1.3.3- SINALIZAÇÃO INSIDE-OUT	24
1.4- METALOPROTEÍNAS	26
1.5- ADAMs	32
1.5.1- PRÓ-DOMÍNIO	35
1.5.2- DOMÍNIO METALOPROTEASE	36
1.5.3- DOMÍNIO DESINTEGRINA	38
1.5.4- DOMÍNIOS RICO EM CISTEÍNA E TIPO EGF	39
1.5.5- DOMÍNIO CITOPLASMÁTICO	39
1.5.6- PRINCIPAIS FUNÇÕES DAS ADAMs	40
1.6- ADAM9	41
1.7- SILENCIAMENTO DE RNA	42
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>47</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>48</b>
3.1- LINHAGENS CELULARES E CULTURA CELULAR	48
3.2- DETECÇÃO DA ADAM9 EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS E NÃO TUMORAIS	48
3.3- DOSAGEM DE PROTEÍNAS	49
3.4- SDS-PAGE (SODIUM DODECYL SULFATE POLIACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS)	49
3.5- WESTERN BLOTTING	50
3.6- ZIMOGRÁFIA	51
3.7- ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ADESÃO	52
3.8- SILENCIAMENTO DE RNA (RNAi)	53
3.8.1- Desenho dos primers de silenciamento do RNA	55
3.8.2- Extração de RNA total	56
3.8.3- Gel de agarose-formaldeído 1%	57
3.8.4- Desenho dos primers para o RT-PCR	57
3.8.5- Produção do cDNA e PCR (reação em cadeia da polimerase) quantitativo	59
3.9- CINÉTICA DE SILENCIAMENTO DO GENE QUE CODIFICA PARA A ADAM9	60
3.10- ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	61
3.11- ENSAIO DE INVASÃO EM MATRIGEL	61
<b>4. ANÁLISE DOS RESULTADOS</b>	<b>64</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>65</b>
5.1- ANÁLISES DAS PROTEÍNAS CELULARES TOTAIS EM SDS-PAGE	65
5.2- WESTERN BLOTTING	66
5.3- ZIMOGRÁFIA	69
5.4- ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ADESÃO	75
5.5- EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	78
5.6- PCR QUANTITATIVO (RT-PCR)	79
5.7- CINÉTICA DE SILENCIAMENTO DO GENE QUE CODIFICA PARA A ADAM9	82
5.8- ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	84
5.9- ENSAIO DE INVASÃO EM MATRIGEL	88
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>91</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>103</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>104</b>
<b>9. ANEXO I</b>	<b>119</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1- CÂNCER

A proliferação, a diferenciação e a sobrevivência das células individuais em organismos pluricelulares são processos cuidadosamente regulados na busca das necessidades do organismo (DE MATOS *et al.*, 2005; EVAN & VOUSDEN, 2001; LOPES *et al.*, 2002). A falência na regulação de tais processos pode ocasionar o crescimento e a divisão irregulares das células. As células resultantes dessa divisão, por sua vez, herdaram a propensão para proliferar sem responder à regulação, resultando em clones de células capazes de expandir-se indefinidamente, formando uma massa chamada de tumor (DE MATOS *et al.*, 2005; EVAN & VOUSDEN, 2001). O crescimento descontrolado das células cancerosas pode fazer com que elas espalhem-se por todo o corpo (metástases), interferindo nas funções dos tecidos e órgãos normais (BAU *et al.*, 2006; DE MATOS *et al.*, 2005; VIDEIRA *et al.*, 2002).

O câncer resulta de uma série de alterações genéticas que levam a uma progressiva desordem dos mecanismos normais de controle do ciclo celular (crescimento, diferenciação e morte celular). A resposta da célula aos danos no seu material genético e sua capacidade de manter a estabilidade genética através da maquinaria de reparo do DNA é essencial na prevenção, iniciação e progressão tumoral (BAU *et al.*, 2006).

O termo **genes críticos do câncer** é usado para todos aqueles genes cujas mutações colaboram para a formação do câncer, sendo eles agrupados em duas classes: genes da primeira classe, chamados de proto-oncogenes, que são os genes nos quais uma mutação causa aumento da função, levando assim a formação do câncer, e os seus mutantes, ou seja, as formas hiperativas denominadas de oncogenes; e os genes da segunda classe, denominados de genes supressores de tumores, nos quais ocorreu a perda da função. Atualmente já foram descritos mais de 100 diferentes genes anormais chamados de oncogenes (ALBERTS *et al.*, 2004; OSBORNE *et al.*, 2004; VOGT *et al.*, 1993).

Dois genes bem caracterizados, BRCA1 e BRCA2, são de suscetibilidade ao câncer de mama, cujos mutantes aumentam dramaticamente o risco de desenvolver a doença (DOMCHEK & WEBER, 2006; HEDENFALK *et al.*, 2001; VISSAC *et al.*, 2002), além de conferirem alta suscetibilidade ao câncer de ovário, sendo que a maioria das famílias com múltiplos casos desses dois tipos de cânceres herdaram mutações em ambos os genes (ESTEVEZ *et al.*, 2009; RAMUS & GAYTHER, 2009; WELCSH *et al.*, 2000).

Estima-se que as mulheres com mutações nos genes que codificam as proteínas BRCA1 e BRCA2 tenham risco muito elevado de desenvolver câncer de mama em aproximadamente 87% (ATCHLEY *et al.*, 2008), geralmente antes dos 70 anos de idade. Além disso, mulheres nesta faixa etária com mutação no gene BRCA1 ou BRCA2 apresentam um risco de desenvolver câncer de ovário de 63% e 27%, respectivamente (ESTEVEVES *et al.*, 2009; HONRADO *et al.*, 2005; VENKITARAMAN, 2009). Embora o risco de desenvolver cânceres de mama e ovário por mutação do gene BRCA1 seja uma exclusividade feminina, indivíduos do sexo masculino, portadores de mutação no gene BRCA2 apresentam um aumento no risco de desenvolver outros tipos de câncer, tais como câncer de mama masculino, pâncreas e de próstata (VENKITARAMAN, 2009).

Mutações patogênicas em outros genes tais como TP53, ATM, CHEK2, BRIP1 e PALB2, têm sido associadas com aumento do risco de câncer de mama e, juntas, são encontradas em pelo menos 25% das famílias de câncer de mama, mostrando um claro padrão de herança (famílias de alto risco) (DESJARDINS *et al.*, 2009). Segundo ESTEVEVES *et al.* (2009), o câncer de mama hereditário é responsável por cerca de 5% a 10% do total deste tipo de câncer, e é causado por mutações no gene BRCA1 ou BRCA2.

Inúmeros fatores, tais como raça, dieta, ambiente e histórico familiar, têm sido reportados como fatores de risco para o câncer de próstata, sugerindo que aproximadamente 42% desses fatores de risco possam ser atribuídos aos fatores hereditários genéticos (FREDRIKSSON *et al.*, 2006). Diversos estudos sugerem o envolvimento de múltiplos genes de suscetibilidade ao câncer de próstata e de expressão fenotípica variável (BERRY *et al.*, 2000; ZHENG *et al.*, 2001), e ao contrário de outras síndromes de cânceres hereditários, nenhum gene parece ser responsável pelo câncer de próstata hereditário (BRUNER *et al.*, 2003), porém mais de sete loci foram identificados em genes potencialmente importantes no desenvolvimento do HPC (*Hereditary Prostate Cancer*). Desde 1996, quando foi identificado o primeiro locus de suscetibilidade ao câncer de próstata, o locus 1 (HPC1) (SMITH *et al.*, 1996), múltiplos genes de suscetibilidade genética ao câncer de próstata foram descritos, entre eles os genes PCAP (1q42) (BERTHON *et al.*, 1998), HPCX (Xq27) (XU *et al.*, 1998), CAPB (1p36) (GIBBS *et al.*, 1999; XU *et al.*, 2001), HPC20 (20q13) (BERRY *et al.*, 2000; ZHENG *et al.*, 2001), ELAC2 (17p11) (FREDRIKSSON *et al.*, 2006; TAVTIGIAN *et al.*, 2001), RNASEL (1q25) (SHOOK *et al.*, 2007; WIKLUND *et al.*, 2004), MSR1 (8p22-23) (FREDRIKSSON *et al.*, 2006), MLH1 (3p) (FREDRIKSSON *et al.*, 2006), e o gene BRCA2 (VENKITARAMAN, 2009).

Ainda não se sabe qual o real papel que estes genes de suscetibilidade desempenham no desenvolvimento do câncer de próstata, porém estima-se que contribuam de 5-10% para o risco da doença. O câncer de próstata hereditário parece iniciar em idade mais jovem quando comparado com o esporádico. Um estudo realizado por Carter e colaboradores mostrou que o câncer de próstata hereditário representou 43% dos cânceres de próstata diagnosticados em homens com 55 anos de idade ou menos, ou seja, freqüentemente afetando os homens precocemente, mas apenas 9% de todas as ocorrências de câncer de próstata, sendo este o responsável por uma pequena porcentagem do câncer de próstata (NOE *et al.*, 2008). Em muitos países desenvolvidos, o câncer de próstata é a neoplasia mais freqüentemente diagnosticada em homens, sendo que um histórico familiar positivo está entre os mais fortes fatores de risco epidemiológico para este tipo de câncer (SIMARD *et al.*, 2002).

Em países economicamente desenvolvidos, os três cânceres mais comumente diagnosticados em homens são: próstata, pulmão e cólon-retal, e em mulheres são: câncer de mama, cólon-retal e pulmão. Já em países em desenvolvimento, os três cânceres mais comumente diagnosticados em homens são: pulmão, estômago e fígado, e em mulheres são: mama, útero e estômago (Tabela 1) (DE MOURA *et al.*, 2005; GARCIA *et al.*, 2007).

Segundo COCO (2002), os cânceres mais freqüentes em países economicamente desenvolvidos estão associados principalmente a fatores alimentares, obesidade, tabaco, sedentarismo, e exposição a fatores de risco decorrentes da urbanização e industrialização, como agentes químicos, físicos e biológicos, como por exemplo, alguns estudos sugerem que a exposição a pesticidas podem estimular a proliferação celular e tumorigênese, bem como afetar a reprodução humana e inibir o funcionamento da tireóide.

**Tabela 1** – Novos casos de câncer e óbitos em países desenvolvidos e em desenvolvimento \*.

PAÍSES DESENVOLVIDOS	CASOS DE CÂNCER		CASOS DE ÓBITOS	
	HOMENS	MULHERES	HOMENS	MULHERES
	Próstata 566.841	Mama 679.682	Pulmão e brônquios 465.540	Mama 203.528
	Pulmão e brônquios 529.176	Cólon-retal 335.756	Cólon-retal 175.774	Pulmão e brônquios 173.842
	Cólon-retal 387.637	Pulmão e brônquios 209.707	Próstata 143.834	Cólon-retal 165.480
	Estômago	Corpus uterine	Estômago	Estômago

	214.534	146.866	141.218	89.620
	Bexiga urinária 191.812	Estômago 123.773	Fígado 78.174	Pâncreas 72.681
	Rim 94.284	Ovário 103.332	Pâncreas 78.009	Ovário 66.925
	Linfoma Não-Hodgkin 89.816	Cérvix do útero 87.466	Bexiga urinária 57.438	Cérvix do útero 42.101
	Fígado 81.448	Linfoma Não-Hodgkin 72.368	Esôfago 55.186	Fígado 40.943
	Pâncreas 77.394	Melanoma de pele 69.624	Leucemia 49.891	Leucemia 40.783
	Leucemia 74.955	Pâncreas 69.418	Rim 44.019	Linfoma Não-Hodgkin 36.940
	Todos os tipos 2.948.054	Todos os tipos 2.478.605	Todos os tipos 1.648.179	Todos os tipos 1.272.358
<b>PAÍSES EM DESENVOLVIMENTO</b>	<b>CASOS DE CâNCER</b>		<b>CASOS DE ÓBITOS</b>	
	<b>HOMENS</b>	<b>MULHERES</b>	<b>HOMENS</b>	<b>MULHERES</b>
	Pulmão e brônquios 564.306	Mama 593.233	Pulmão e brônquios 496.287	Cérvix do útero 272.238
	Estômago 474.580	Cérvix do útero 473.430	Fígado 399.317	Mama 255.576
	Fígado 424.490	Estômago 250.650	Estômago 370.158	Estômago 199.391
	Esôfago 300.763	Pulmão e brônquios 224.580	Esôfago 246.667	Pulmão e brônquios 198.066
	Cólon-retal 228.108	Cólon-retal 186.532	Cólon-retal 137.500	Fígado 166.685
	Próstata 194.914	Fígado 171.794	Próstata 106.537	Esôfago 129.080
	Cavidade Oral 129.356	Esôfago 153.396	Leucemia 87.305	Cólon-retal 112.471
	Bexiga urinária 115.817	Ovário 123.761	Cavidade Oral 68.124	Ovário 72.433
	Leucemia 111.163	Cavidade Oral 84.111	Linfoma Não-Hodgkin 67.280	Leucemia 65.629
	Linfoma Não-Hodgkin 103.433	Leucemia 82.840	Bexiga urinária 65.702	Pâncreas 46.750
	Todos os tipos 3.587.377	Todos os tipos 3.167.802	Todos os tipos 2.658.250	Todos os tipos 2.022.059

\* Novos casos de câncer e óbitos em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Extraído e modificado de GARCIA *et al.*, 2007. À esquerda (homem e mulher) são os números de novos casos de câncer e à direita (homem e mulher) são os números de óbitos e os respectivos tipos de câncer em países desenvolvido ou em desenvolvimento.

Segundo GARCIA *et al.* (2007), mais da metade de todos os novos cânceres e os óbitos por esta doença são potencialmente evitáveis, desta forma, os cânceres causados

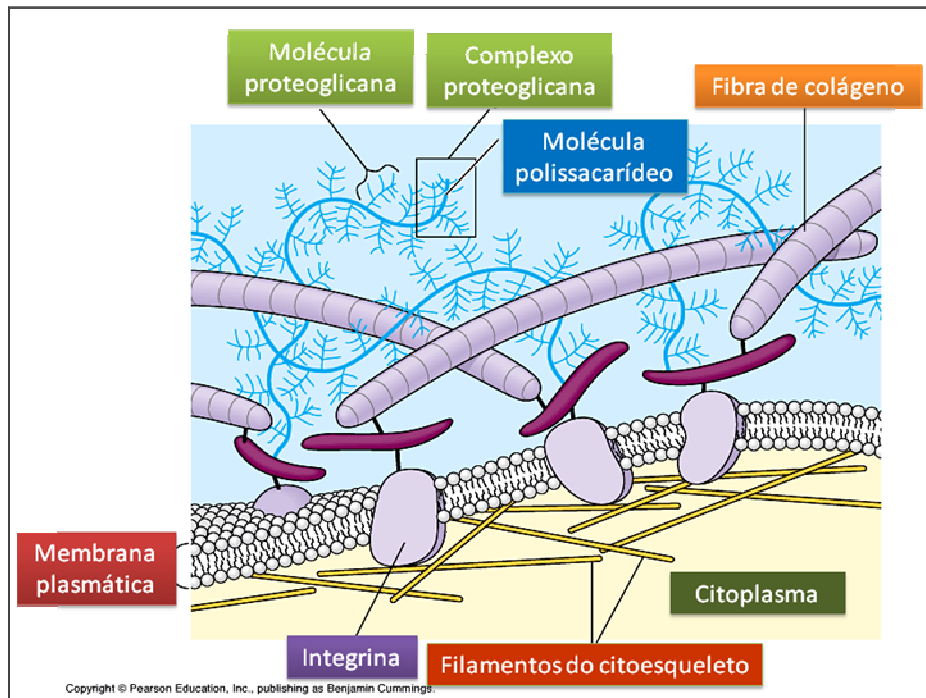
pelo uso excessivo de tabaco e álcool, ou por obesidade são os mais efetivamente evitáveis, sendo necessária, porém, uma combinação de educação e políticas sociais para encorajamento de um comportamento saudável. Outros tipos de cânceres relacionados a agentes infecciosos, tais como hepatite B (HBV), vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus do papiloma humano (HPV) e *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) podem ser evitados através de intervenções conhecidas, tais como vacinas, antibióticos, melhora do saneamento e educação. Além disso, a realização de exames preventivos pode detectar lesões pré-câncer, as quais podem ser removidas, evitando alguns tipos de câncer como o cólon-retal, mama e útero.

Portanto, em uma visão crítica na busca de uma solução para combate do câncer, nota-se que apesar do elevado investimento mundial na pesquisa e desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos, os resultados obtidos ainda são insuficientes. Segundo PIVETTA (2004), a ciência busca uma solução capaz de colocar fim na maioria dos tumores, mas poucas novidades de peso têm se juntado ao tratamento clássico anticâncer (cirurgia – extirpar as células cancerígenas e quimioterapia e radioterapia – matar as células cancerígenas), indicando claramente a necessidade do emprego de novas estratégias capazes de fornecer novos tratamentos.

## **1.2- A MATRIZ EXTRACELULAR**

Os tecidos são constituídos por células, sustentadas por uma rede complexa de macromoléculas que constituem a **matriz extracelular (MEC)** (Figura 1). A MEC é composta por uma grande variedade de proteínas e de polissacarídeos que são secretados localmente formando uma rede organizada que mantém a integridade estrutural dos tecidos. As variações nas quantidades relativas dos diferentes tipos de matrizes macromoleculares e o modo de organização na MEC originam uma surpreendente diversidade de formas, cada uma adaptada às necessidades funcionais de um determinado tecido (ALBERTS *et al.*, 2007).





**Figura 1** – Diagrama esquemático representando alguns componentes da matriz extracelular. Extraído e modificado [kentsimmons.uwinnipeg.ca/cm1504/cellwall.htm](http://kentsimmons.uwinnipeg.ca/cm1504/cellwall.htm). Acesso em: 22/05/2009.

A MEC é capaz de regular diversas funções celulares essenciais, incluindo expressão gênica, sobrevivência, desenvolvimento, proliferação, migração, forma e secreção, sendo assim interações complexas entre as células e a MEC têm um papel crucial na mediação e regulação de muitos processos, tais como adesão, sinalização durante a morfogênese, homeostase de tecidos, cicatrização e tumorigênese (BERRIER & YAMADA, 2007; PARNAUD *et al.*, 2009).

Existem duas formas principais da MEC: a membrana basal e a matriz intersticial. Cada uma varia em sua composição e propriedades dependendo da identidade, localização das células, tecidos que circundam e estágio de desenvolvimento do organismo (GUO & GIANCOTTI, 2004).

A MEC é formada por macromoléculas que são produzidas localmente pelas células da matriz, principalmente por fibroblastos. Estas células auxiliam na organização da MEC, e a orientação do citoesqueleto no interior da célula pode controlar a produção dos componentes da MEC (GEIGER, *et al.*, 2001). Existem duas classes principais de macromoléculas que constituem a matriz: glicosaminoglicanos (GAGs), cadeia de polissacarídeos, as quais estão normalmente ligadas covalentemente a proteínas na forma de proteoglicanos; e as proteínas fibrosas, incluindo colágeno, elastina, a fibronectina e a laminina, que promove funções estruturais e adesivas (ALBERTS *et al.*, 2007).

A MEC confere estrutura para a adesão celular e desenvolvimento dos tecidos. As células têm vias de comunicação bem desenvolvidas entre as superfícies celulares e a MEC (TANZER, 2006).

O termo adesão celular descreve todas as formas de comunicação celular que ocorrem devido ao contato entre as células ou entre células e a MEC. Estas interações são mediadas por moléculas específicas, localizadas nas membranas celulares (WHITE, 2003). Várias classes dessas moléculas de adesão da superfície celular já foram identificadas e caracterizadas. Dentre as principais representantes destas classes de moléculas estão: (1) os membros da super família das imunoglobulinas; (2) as caderinas; (3) as integrinas; (4) as selectinas; (5) as proteoglicanas da superfície celular e (6) as ADAMs (WOLFSBERG & WHITE, 1996).

### **1.3- INTEGRINAS**

A ligação da célula à MEC requer proteínas de adesão transmembrana, que atuam como receptores da matriz e a conectam ao citoesqueleto celular. Os principais receptores das células animais para a ligação da maioria das proteínas da matriz extracelular, incluindo os colágenos, a fibronectina e as lamininas, são as integrinas, embora existam algumas outras moléculas que atuam como co-receptores para componentes da matriz, como é o caso das proteoglicanas transmembrana (ALBERTS *et al.*, 2007).

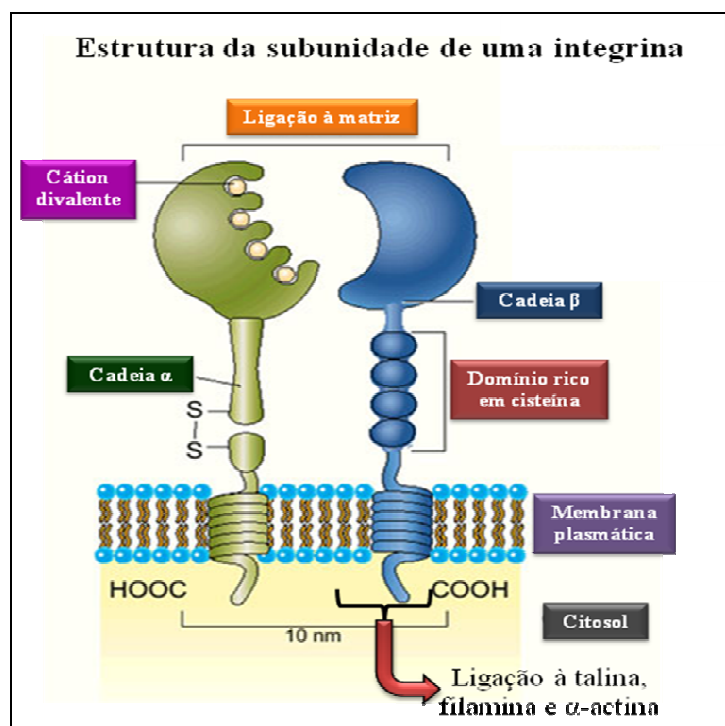
O termo integrina foi proposto por HYNES (1987) para descrever uma família de receptores heterodiméricos da superfície celular, que integram a matriz extracelular ao citoesqueleto intracelular, mediando à migração e adesão celular (HYNES, 1987; PLOW *et al.*, 2000).

Cada integrina consiste de duas subunidades de polipeptídeos transmembrana tipo I, sendo uma subunidade  $\alpha$  e uma  $\beta$ . Cada subunidade contém três domínios: domínio extracelular de glicosilação, que consiste de mais de 90% da molécula inteira (700-900 aminoácidos), domínio transmembrana hidrofóbico que é responsável pelo ancoramento na membrana (20-60 aminoácidos) e o domínio citoplasmático (BERMAN *et al.*, 2003; HYNES, 2002).

Foram identificadas em humanos 18 subunidades  $\alpha$  (120 a 180kDa) e 8  $\beta$  (90 a 110kDa), que associam-se em várias combinações para formar 24 integrinas heterodiméricas que podem se ligar distintamente, e esta diversidade é aumentada por *splicing* alternativo do mRNA para algumas integrinas (GUO & GIANCOTTI, 2004), modificações pós-traducionais

e interações com outras moléculas da superfície celular e intracelular (COPPOLINO & DEDHAR, 2000; PLOW *et al.*, 2000). Membros desta família já foram identificados em mamíferos, aves, peixes e em insetos (*Drosophila melanogaster*), bem como em eucariotos inferiores, tais como esponjas e nematóide (*Caenorhabditis elegans*) (TAKADA *et al.*, 2007).

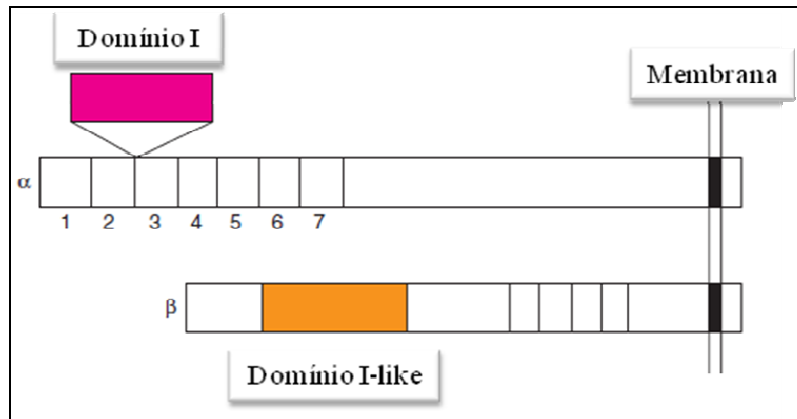
A associação das integrinas aos seus ligantes depende de cátions divalentes extracelulares ( $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ ), que podem influenciar a afinidade e a especificidade da ligação de uma integrina aos seus ligantes (BERMAM *et al.*, 2003; PETRUZZELLI *et al.*, 1999). Abaixo está representada a estrutura de uma integrina (Figura 2).



**Figura 2** – Representação estrutural da subunidade de uma integrina, um receptor de matriz na superfície celular. Extraído e modificado de ALBERTS *et al.*, 2007.

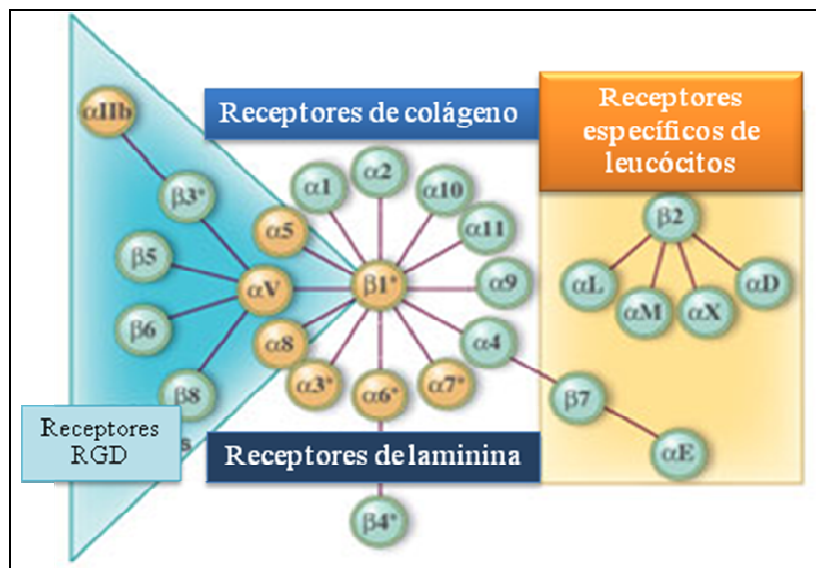
Definindo ainda a estrutura das subunidades das integrinas, as subunidades  $\alpha$  dessas moléculas de adesão específica ao colágeno, como as integrinas  $\alpha_1\beta_1$  e  $\alpha_2\beta_1$  e também as integrinas expressas em leucócitos, como  $\alpha_L\beta_2$ ,  $\alpha_M\beta_2$  e  $\alpha_X\beta_2$ , contém um domínio de inserção ou interação chamado de domínio-I, composto de 200 resíduos de aminoácidos localizados entre o segundo e o terceiro domínio. Essa seqüência também foi encontrada em proteínas da matriz extracelular, tais como colágeno tipo IV, fator de von Willebrand e em alguns fatores complementares. Essa seqüência contém um motivo MIDAS (sítio de adesão dependente de íon metal) envolvido na interação dessas integrinas descritas com seus respectivos ligantes. As subunidades  $\beta$  também contribuem para a ligação das integrinas aos

seus respectivos ligantes, ou seja, estas subunidades possuem um domínio parecido com o domínio I (domínio I-like) que contém um motivo estruturalmente similar ao sítio de adesão dependente de íon metal (Figura 3) (BERMAM *et al.*, 2003; PLOW *et al.*, 2000; TAKADA *et al.*, 2007).



**Figura 3** – Representação estrutural das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . O domínio I (interação ou inserção) está presente em sete subunidades  $\alpha$  humanas, e está relacionado com a ligação da integrina a ligantes. O domínio parecido com o domínio I (domínio I-like) está presente em todas as subunidades  $\beta$  das integrinas humanas. Extraído e modificado de TAKADA *et al.*, 2007.

Abaixo se observa o esquema dos membros pertencentes à superfamília das integrinas humanas e a forma com que elas se combinam para formar as integrinas heterodiméricas (Figura 4).



**Figura 4** – Esquema das diferentes associações entre as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  e a divisão dos heterodímeros em subgrupos. Extraído e modificado do site: [www.the-scientist.com/article/display/15706/](http://www.the-scientist.com/article/display/15706/). Acesso: 05/06/2009.

Baseado nas subunidades  $\beta$ , as integrinas foram divididas em subgrupos (Tabela 2). Embora a diversidade e a complexidade dos receptores de integrinas possa ser algo que dificulte a divisão por subfamílias, para o propósito de organização algumas generalizações podem ser feitas nestas subfamílias de integrinas, sendo assim os subgrupos apresentam certas características fisiológicas (PETRUZZELLI *et al.*, 1999).

As integrinas  $\beta_1$  formam dímeros com 12 subunidades  $\alpha$  distintas (Figura 4) resultando nas integrinas  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_7\beta_1$ ,  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_9\beta_1$ ,  $\alpha_{10}\beta_1$ ,  $\alpha_{11}\beta_1$  e  $\alpha_v\beta_1$ , que são encontradas na maioria das células de vertebrados. A última subunidade  $\alpha$  a associar-se com a subunidade  $\beta_1$  acima citada, é a subunidade  $\alpha_v$ , onde v representa receptor de vitronectina. Essa subunidade pode associar-se com mais de uma subunidade  $\beta$ , formando assim as integrinas  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_v\beta_6$  e  $\alpha_v\beta_8$  (BERMAN & KOZLOVA, 2000; SPRINGER & WANG, 2004). Tais integrinas contribuem para a organização dos tecidos através da ligação de moléculas da MEC com a membrana basal dos tecidos: muscular, sistema nervoso, epitelial e endotelial (COPPOLINO & DEDHAR, 2000).

As integrinas expressas predominantemente pelos leucócitos consistem da subunidade  $\beta_2$  associada com as subunidades homólogas a  $\alpha$  ( $\alpha_L\beta_2$ ,  $\alpha_M\beta_2$ ,  $\alpha_X\beta_2$ , e  $\alpha_D\beta_2$ ) e também uma subunidade  $\alpha_4$  associada com subunidades homólogas a  $\beta$  ( $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_7$ ). Os ligantes da integrina  $\alpha_L\beta_2$  são moléculas de adesão intracelular (ICAMs) expressas primariamente em células do endotélio vascular; a integrina  $\alpha_M\beta_2$ , por sua vez, reconhece diversos ligantes, incluindo proteínas da matriz extracelular, tais como fibrinogênio e fibronectina, bem como o componente iC3b do sistema complemento; a integrina  $\alpha_4\beta_1$ , reconhece moléculas de adesão celular vasculares chamadas de VCAM-1 (*vascular intercellular adhesion molecule*). Essas integrinas expressas em leucócitos são dinamicamente reguladas dependendo do estágio de ativação e extravasamento que essas células do sistema imunológico se encontram e apresentam funções específicas, como por exemplo, a integrina  $\alpha_L\beta_2$  que tem um papel importante no recrutamento dos leucócitos ao sítio de inflamação (ABRAM & LOWELL, 2009; HYUN *et al.*, 2009).

A família da integrina  $\beta_3$  consiste de duas integrinas,  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , ambas podem ligar-se a diversos ligantes. As integrinas  $\beta_3$ , por sua vez, são encontradas em uma grande variedade de células, entre elas as plaquetas sanguíneas e as células da linhagem megacarioblastóides, sendo assim, membros dessa subfamília estão envolvidos na ativação das plaquetas (MOULD, 1996; PETRUZZELLI *et al.*, 1999). A integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  tem sido uma das integrinas mais bem estudadas, é expressa exclusivamente em plaquetas e megacariócitos, e é um mediador da agregação plaquetária (COPPOLINO & DEDHAR, 2000).

A maior parte das interações das integrinas é heterotípica, mas podem ocorrer também interações heterofílicas, especificamente a ligação entre  $\alpha_3\beta_1$  e  $\alpha_2\beta_1$ , que participa da adesão intercelular entre queratinócitos (SYMINGTON *et al.*, 1993). A maioria das interações adesivas das integrinas ocorre através da ligação da integrina a um sítio de ligação celular formado por três peptídeos, Arg-Gly-Asp (RGD), um motivo encontrado em muitas proteínas da MEC, tais como fibrinogênio, vitronectina e fibronectina (SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2005; YAMADA, 1991), e esta pequena seqüência de peptídeo foi a primeira a ser identificada e caracterizada como ligante de integrinas (YOKOSAKI *et al.*, 1998). Este motivo pode ser reconhecido por diversas integrinas, entre elas:  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$ . Entretanto, a seqüência RGD não é a única reconhecida pelas integrinas, outras integrinas também reconhecem muitas seqüências não-RGD como seus ligantes, tais como o tripeptídeo **LDV** presente no membro superfamília da imunoglobulina VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular), expresso em tecido endotelial inflamado, que se liga a integrina  $\alpha_4\beta_1$  (TAKADA *et al.*, 2007). A integrina  $\alpha_4\beta_1$ , por exemplo, reconhece uma pequena seqüência de peptídeos alternativos, não-RGD, tais como Glu-Ile-Leu-Asp-Val (EILDV) e Arg-Glu-Asp-Val (REDV) no *splicing* alternativo da fibronectina, conhecido como IIICS. Essa integrina também se liga a receptores da superfície celular, tais como VCAM-1, para promover a adesão célula-célula (GARMY-SUSINI & VARNER, 2008).

O motivo tripeptídeo LDV exibe variação em sua seqüência, por exemplo, a subfamília da integrina  $\alpha_4$ , as integrinas  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_4\beta_7$ , reconhecem o motivo **LDVP** em fibronectina (fragmento CS-1 de fibronectina); uma seqüência **IDSP** no domínio N-terminal de uma IgCAM nomeada de VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular – 1) e uma seqüência **LDTS** em uma outra IgCAM, chamada de MAdCAM-1 (molécula de adesão celular das mucosas – 1). Já a subfamília da integrina  $\alpha_9$ , a integrina  $\alpha_9\beta_1$ , reconhece uma seqüência **AEIDGIEL**, que esta presente em uma proteína da MEC chamada de tenascina-C (NEWHAM *et al.*, 1997; TAKADA *et al.*, 2007; YOKOSAKI *et al.*, 1998).

Algumas integrinas reconhecem uma única proteína da MEC como ligante, enquanto outras reconhecem mais de um tipo de proteína, como é o caso da integrina  $\alpha_v\beta_3$  que reconhece as três proteínas da matriz extracelular, fibrinogênio, fibronectina e vitronectina como ligantes. Da mesma forma, essas proteínas da MEC podem ser reconhecidas por várias integrinas, como é o caso da fibronectina que pode ser reconhecida por mais de 10 integrinas,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_D\beta_2$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_4\beta_7$ ,  $\alpha_v\beta_6$  e  $\alpha_v\beta_8$  (TAKADA *et al.*, 2007).

Segundo WIESNER *et al.* (2005), um sistema de classificação simplificado baseado na especificidade dos ligantes da MEC produz três classes de receptores: receptores

da sequência adesiva RGD presente em componentes da MEC (fibronectina e vitronectina), receptores de laminina e receptores de colágeno (Figura 4). Além dos componentes da MEC, algumas integrinas como o subgrupo  $\beta_2$  participam da adesão celular célula-célula. Muitas integrinas também se ligam a fragmentos proteolíticos solúveis das membranas basais vasculares, tais como endostatina e um número de agentes patogênicos que fazem uso de integrinas como receptores para a sua entrada na célula.

Entretanto, TAKADA *et al.* (2007) afirmam que em relação a especificidade dos ligantes, as integrinas de mamíferos podem ser agrupadas da seguinte forma: integrinas que se ligam à laminina ( $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_7\beta_1$  e  $\alpha_6\beta_4$ ); integrinas que interagem com o colágeno ( $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_{10}\beta_1$  e  $\alpha_{11}\beta_1$ ); integrinas de leucócitos ( $\alpha_L\beta_2$ ,  $\alpha_M\beta_2$ ,  $\alpha_X\beta_2$  e  $\alpha_D\beta_2$ ) e as integrinas que reconhecem a sequência RGD ( $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_V\beta_1$ ,  $\alpha_V\beta_3$ ,  $\alpha_V\beta_5$ ,  $\alpha_V\beta_6$ ,  $\alpha_V\beta_8$  e  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ). Elas ainda podem ser definidas como aquelas que apresentam na subunidade  $\alpha$  o domínio I:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_{10}$ ,  $\alpha_{11}$ ,  $\alpha_L$ ,  $\alpha_M$ ,  $\alpha_X$ ,  $\alpha_D$ ,  $\alpha_E$ , e as que não apresentam o domínio I:  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_7$ ,  $\alpha_8$ ,  $\alpha_9$ ,  $\alpha_V$  e  $\alpha_{IIb}$ . Nas integrinas que apresentam o domínio I, ele desempenha um papel central na ligação aos ligantes e na adesão intracelular.

**Tabela 2** – Ligantes de integrinas e suas distribuições celulares\*.

SUBUNIDADES		LIGANTES	DISTRIBUIÇÃO CELULAR		Seqüência reconhecimento
			Não-leucócitos	Leucócitos	
$\beta_1$	$\alpha_1$	Colágeno, laminina	F, MB	actB, actT	<b>GFOGER<sup>a</sup></b>
	$\alpha_2$	Colágeno, laminina, trombospondina, Caderina-E, tenascina	P, F, EN,EP	actT	<b>GFOGER<sup>a</sup></b>
	$\alpha_3$	Colágeno, laminina, fibronectina, trombospondina, uPAR	EP, F		<b>RGD</b>
	$\alpha_4$	Fibronectina, VCAM-1, MAdCAM-1, osteopontina, ADAM, ICAM-4	NC, F	B, T, M, LGG	<b>QIDS, peptídeo - CS-1 e CS-5, IDAPS</b>
	$\alpha_5$	Fibronectina, osteopontina, ADAM, fibrilina, trombospondina, COMP, LI	F, EP, EN,P	Th, T	<b>RGD</b>
	$\alpha_6$	Laminina, trombospondina, ADAM, Cyr6I	P	T	
	$\alpha_7$	Laminina	MIO		
	$\alpha_8$	osteopontina, vitronectina, fibronectina, tenascina, LAP-TGF- $\beta$ , nefronectina	EP, CN		<b>RGD</b>
	$\alpha_9$	Tenascina, osteopontina, VCAM-1, uPAR, plasmina, angiostatina,	MIO, EP	NEU	<b>AEIDGIEL</b>

		ADAM, VEGF-D			
	$\alpha_{10}$	Colágeno, laminina	COM		
	$\alpha_{11}$	Colágeno	MÊS		
	$\alpha_V$	Osteopontina, <b>vitronectina</b> , <b>fibronectina</b> , LI, LAP-TGF- $\beta$	F		<b>RGD</b>
$\beta_2$	$\alpha_L$	<b>ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, ICAM-4</b>		B, T, M, G	<b>peptídeos - ICAM</b>
	$\alpha_M$	ICAM, iC3b, <b>fibrinogênio</b> , fator X, ICAM-4		M, G	<b>peptídeo P1 e P2</b>
	$\alpha_X$	ICAM, iC3b, <b>fibrinogênio</b> , ICAM-4, heparina, Colágeno		M, G	<b>GPR</b>
	$\alpha_D$	VCAM-1, ICAM, fibrinogênio, fibronectina, vitronectina, Cyr6I, plasminogênio			
$\beta_3$	$\alpha_{IIb}$	<b>Fibrinogênio</b> , fibronectina, vWF, vitronectina, trombospondina, Cyr6I, ICAM-4, LI, Ligante CD40, colágeno	P		<b>HHLGGAKQ AGDV</b>
	$\alpha_V$	<b>Fibrinogênio, vitronectina, trombospondina, vWF</b> , fibrilina, <b>tenascina</b> , PECAM-1, <b>fibronectina</b> , osteopontina, BSP, MFG-E8, <b>ADAM-15</b> , COMP, Cyr6I, ICAM-4, MMP, FGF-2, uPAR, uPA, LI, angiostatina, plasmina, cardiotoxina, LAP-TGF- $\beta$ , Del-1, <b>colágeno</b> , fibulina	EM		<b>RGD</b>
$\beta_4$	$\alpha_6$	Laminina, desmina	C		
$\beta_5$	$\alpha_V$	<b>Fibronectina, vitronectina</b> , osteopontina, BSP, CCN3, LAP-TGF- $\beta$	C, F, EP, AST		<b>RGD</b>
$\beta_6$	$\alpha_V$	<u>Fibronectina</u> , <b>Tenascina</b>	C, EP		<b>DLXXL, RGD</b>
$\beta_7$	$\alpha_4$	<u>Fibronectina</u> , VCAM-1, <b>MAdCAM-1</b> , osteopontina			<b>LDT, CS-1 peptídeo</b>
	$\alpha_E$	Caderina E		LIE	
$\beta_8$	$\alpha_V$	Fibronectina, VCAM-1, laminina, colágeno, LAP-TGF- $\beta$ , vitronectina	AST	LIE	

\*Baseado em BERMAN *et al.*, 2003; PETRUZZELLI *et al.*, 1999; PLOW *et al.*, 2000; TAKADA *et al.*, 2007; WIESNER *et al.*, 2005. ADAM = uma desintegrina e metaloprotease; AST = astrócitos; actB = células B ativadas; actT = células T ativadas; B = células B; C = células de carcinoma; CCN3= uma proteína da matriz extracelular; COMP = proteína da matriz da cartilagem oligomérica; CON = condrócitos; CN = células derivadas da crista neural; Cyr6I = proteína 6I rica em cisteína; EM = endotélio; EP = epitélio; F = fibroblastos; G = granulócitos; iC3b = , componente iC3b do sistema complemento inativado; LAP-TGF- $\beta$  = peptídeo associado a latência; LI, CDI7I; LIE = linfócitos granulares grandes; M = monócitos; MB = membranas basais; MÊS = células mesenquimais; MIO = miócitos; NEU = neutrófilos; P = plaquetas; PECAM-I = molécula de adesão celular endotelial e de plaqueta I; T = células T; Th = tímócitos; uPA = uroquinase; uPAR = receptor de uroquinase; VEGF = fator de crescimento endotelial vascular; vWF = Fator von Willebrand.

As integrinas apresentam papéis cruciais em diversos processos biológicos, tais como, na organogênese, remodelamento de tecidos, trombose, migração de leucócito, adesão, sinalização e proliferação celular (PETRUZZELLI *et al.*, 1999). Desta forma, esta classe de



moléculas pode influenciar o desenvolvimento celular em diversas condições biológicas e patológicas tais como embriogênese e diferenciação, morfogênese, crescimento tumoral e metástase, apoptose e cicatrização de ferimentos (BERMAM *et al.*, 2003; YAMADA *et al.*, 2003).

As integrinas apresentam um papel importante em vários aspectos do câncer. Essas moléculas são expressas em padrões que podem ser alterados nos tumores, participando da adesão e migração celular, processos envolvidos na metástase. A metástase é a principal causa de morte em pacientes com câncer (HOOD & CHERESH, 2002). Trata-se de um processo complexo que envolve a coordenação de diversas vias de transdução de sinais, que permitem as células tumorais: proliferar, remodelar o ambiente no qual estão inseridas, invadir e migram para novos tecidos e diferenciar-se (HOOD & CHERESH, 2002).

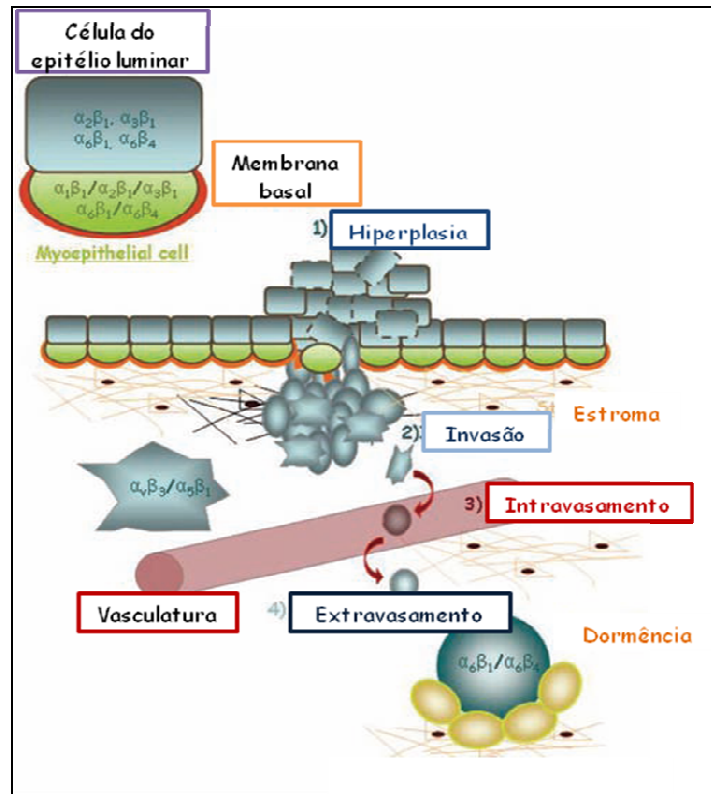
As células metastáticas apresentam a capacidade de sobreviverem sem se aderirem, um fenômeno conhecido como crescimento independente do ancoramento. Além disso, as integrinas têm um papel fundamental na angiogênese dos tumores, o que fornece às células tumorais os nutrientes necessários para a sua proliferação (TANZER, 2005; VAN DER FLIER & SONNENBERG, 2001). A variação fenotípica das células tumorais é inicialmente mediada por alterações na expressão das integrinas, liberação de proteases (que degradam e remodelam a MEC) e deposição de novas moléculas na MEC. Mutações dominantes e mutações recessivas nos genes supressores tumorais perturbam os circuitos regulamentares que controlam o destino das células e conferem a essas células neoplásicas à capacidade de sobreviver e multiplicar em diferentes microambientes e sem a necessidade de estarem aderidas (GUO & GIANCOTTI, 2004; HOOD & CHERESH, 2002).

Estudos recentes demonstraram que as células epiteliais da glândula mamária e suas equivalentes células de câncer, expressam diferentes integrinas heterodiméricas, sendo que, enquanto a expressão de certas integrinas, tal como a integrina  $\alpha_2\beta_1$ , está associada com a inibição da proliferação, elevada expressão de outras, tais como  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_5\beta_1$ , foi observada em células de câncer de mama. Tais integrinas mostraram promover a sinalização proliferativa através de sua capacidade de associar-se a parceiros, tal como receptores de crescimento chamados de proteínas-SHC, sendo que essa união entre integrinas e receptores de crescimento é essencial para a tumorigênese (PONTIER & MULLER, 2008).

Outros estudos também identificaram em células de câncer de mama as integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$ , sendo que elas estão envolvidas no processo de metástase, e desta forma estão envolvidas na adesão e migração destas células. Estudos histopatológicos estabeleceram a correlação entre a expressão da integrina  $\alpha_6\beta_4$  e a progressão tumoral

(BARTSCH *et al.*, 2003; PETRUZZELLI *et al.*, 1999). Segundo BARTSCH *et al.* (2003), a expressão de diversas integrinas nas células de câncer de mama está associada com as diferenças no comportamento metastático. ZUTTER *et al.* (1990), encontrou que aumento na expressão da integrina  $\alpha_2\beta_1$  esta associada com o fenótipo de câncer de mama com maior malignidade. Altos níveis de expressão da integrina  $\alpha_6$  foram identificados em mais de 50% dos cânceres de mama estudados e inversamente correlacionados com pacientes que sobreviveram. MUKHOPADHYAY *et al.* (1999), observou que a expressão da subunidade  $\alpha_6$  esta correlacionada com o potencial metastático em diferentes linhagens de células tumorais.

Segundo WHITE & MULLER (2007), a manipulação genética de modelos experimentais de tumorigênese mamária com ratos, mostra que a expressão de integrina e a adesão mediada por este receptor pode desempenhar um papel importante durante o crescimento do tumor mamário *in vivo*. Tais modelos têm sido utilizados para demonstrar a atividade de receptores de integrina durante a disseminação metastática de tumor primário para tecidos secundários, como por exemplo, o pulmão. A metástase pulmonar de um modelo xenográfico experimental, de câncer de mama, por exemplo, demonstrou ser prejudicada após a administração sistêmica de um anticorpo inibitório anti-integrina  $\beta_1$ . Da mesma forma, a administração de um peptídeo destinado a bloquear receptores das integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_5\beta_1$  demonstrou prejudicar o crescimento e a metástase de células de câncer de mama humano invasivo em estudo xenográfico.



**Figura 5** – Representação esquemática da metástase de células tumorais derivadas do epitélio da glândula mamária. Expressão de diferentes integrinas encontradas em células normais, invasivas ou dormentes. Esta representação é baseada na hipótese de que células únicas dormentes são derivadas da migração de células tronco de câncer. Extraído e modificado de PONTIER & MULLER, 2008.

Em seus estudos BARTSCH *et al.* (2003), encontraram que anticorpos contra as subunidades de integrinas  $\beta_1$  e  $\alpha_5$  inibiram a migração de células de câncer de mama linhagem MDA-MB-231 sobre fibronectina, em 68,5% e 29,5%, respectivamente, e o composto SB 265123 (antagonista de integrina) inibiu a migração dessas integrinas sobre a vitronectina em 81,5%. Desta forma, isto sugere que a migração da linhagem MDA-MB-231 à fibronectina envolve as subunidades  $\beta_1$  e  $\alpha_5$ , enquanto a migração à vitronectina envolve primariamente a integrina  $\alpha_V\beta_3$  ou  $\alpha_V\beta_5$ .

Câncer de próstata também apresenta distúrbios na expressão de integrinas (EDLUND *et al.*, 2004; FORNARO *et al.*, 2001; GOEL *et al.*, 2008; KNUDSEN & MIRANTI, 2006). Entre as subunidades  $\alpha$ , vários estudos mostram que a expressão das subunidades  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_7$  e  $\alpha_V$  esta diminuída e a expressão da subunidade  $\alpha_{IIb}$  esta aumentada (GOEL *et al.*, 2008). A subunidade  $\alpha_2$  tem demonstrado estar com sua expressão diminuída em câncer de próstata, porém em metástase linfonodais a expressão desta subunidade esta aumentada quando comparado com lesões primárias (BONKHOFF *et al.*, 1993). Já a expressão da subunidade  $\alpha_6$  é mantida na neoplasia da próstata, porém sua expressão se torna

mais intensa e sua densidade no sítio de contato com a membrana basal diminui com o aumento do grau histológico (GOEL *et al.*, 2008).

Entre as subunidades  $\beta$ , a expressão das subunidades  $\beta_1$ ,  $\beta_3$ , e  $\beta_6$  esta aumentada em câncer de próstata humano, já a expressão das subunidades  $\beta_{1C}$  e  $\beta_4$  esta diminuída. Cinco subunidades variantes da subunidade  $\beta_1$ , geradas por *splicing* alternativo, têm sido descritas:  $\beta_{1A}$ ,  $\beta_{1B}$ ,  $\beta_{1C}$ ,  $\beta_{1C-2}$  e  $\beta_{1D}$ , sendo que duas variantes,  $\beta_{1C}$  e  $\beta_{1A}$ , demonstraram ser expressas no epitélio da próstata (GOEL *et al.*, 2008). A expressão da subunidade  $\beta_{1A}$  esta aumentada em câncer de próstata humano, bem como em modelos de ratos experimentais designados TRAMP (adenocarcinoma transgênico da próstata de rato). Como a subunidade  $\beta_{1A}$  associa-se com muitas subunidades  $\alpha$ , e as subunidades  $\alpha_2$  e  $\alpha_6$  apresentam sua expressão elevada em câncer de próstata, isto sugere que a subunidade  $\beta_{1A}$  esta presente predominantemente como complexo heterodimérico  $\alpha_2\beta_1$  e/ou  $\alpha_6\beta_1$  (GOEL *et al.*, 2005 e 2008). Desta forma, a expressão da subunidade  $\beta_{1A}$  esta aumentada nas células e essa subunidade é necessária para o crescimento celular independente de ancoramento, sendo este um ponto muito importante para a progressão do câncer de próstata (GOEL *et al.*, 2005).

Segundo KING *et al.* (2008), estudos indicam que receptores de laminina, tais como as integrinas  $\alpha_6\beta_1$  e  $\alpha_3\beta_1$  são mantidos na maioria dos carcinomas de próstata. Durante a transição do PIN humano (neoplasia intraepitelial prostática) para o carcinoma de próstata, a expressão da integrina  $\alpha_6\beta_4$  é perdida e a integrina  $\alpha_6\beta_1$  predomina no câncer de próstata humano invasivo e nas lesões metastáticas.

Recentemente, o aumento da expressão da subunidade  $\beta_1$  e seu ligante, fibronectina, demonstrou estar associado com diminuição da sobrevida dos pacientes com câncer de mama (YAO *et al.*, 2007), mas esta constatação não foi relatada em câncer de próstata. Outro estudo utilizando células isoladas do câncer de próstata humano mostrou que essas células expressam a integrina  $\alpha_V\beta_3$ , enquanto as células epiteliais normais da próstata não apresentaram esta expressão (ZHENG *et al.*, 1999). Da mesma forma, a integrina  $\alpha_V\beta_6$  e a subunidade  $\alpha_{IIb}$ , foram detectadas em adenocarcinoma (AZARE *et al.*, 2007).

### **1.3.1- INTEGRINAS E SINALIZAÇÃO**

Uma das funções básicas das integrinas, bem como de outros receptores de adesão, é de promover uma conexão mecânica forte entre o citoesqueleto celular e a MEC (WIESNER *et al.*, 2005), permitindo assim às células gerar tração durante a sua migração e tensão durante o remodelamento. Além disso, ligações específicas entre os domínios

extracelulares das integrinas e proteínas da matriz extracelular, ou, em alguns casos, com os receptores respectivos das células adjacentes, promovem adesão celular e são cruciais para o desenvolvimento embrionário, manutenção e reparo tecidual, defesa e homeostase (HARBURGER & CALDERWOOD, 2009). Estes processos dependem da ligação das integrinas ao citoesqueleto intracelular, que geralmente acontece através da cauda citoplasmática das integrinas (CALDERWOOD *et al.*, 2000, EVANS & CALDERWOOD, 2007).

A cauda citoplasmática das integrinas é geralmente curta e não apresenta características enzimáticas. Tal porção intracelular desencadeia uma cascata enzimática associada à ativação da integrina, iniciada por estímulos locais intracelulares (através do recrutamento de enzimas) ou extracelulares. Desta forma, as integrinas transduzem sinais através de sua associação às proteínas que as conectam ao citoesqueleto, às quinases citoplasmáticas e aos receptores transmembrana de fatores de crescimento (GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999). Sendo assim, as interações das integrinas com os diversos ligantes transmitem sinais químicos para o interior da célula (sinalização “*outside-in*”), fornecendo informações sobre sua localização, ambiente local, estado adesivo e matriz circundante (HYNES, 2002; MIRANTI & BRUGGE, 2002). Estes sinais determinam respostas celulares tais como sobrevivência, crescimento celular, diferenciação, morte celular, migração, proliferação, motilidade e remodelamento tecidual, e proporcionam um contexto para responder a outros *inputs*, incluindo os transmitidos pelo fator de crescimento ou pelos receptores acoplados a proteína G (HARBURGER & CALDERWOOD, 2009; HOLLY *et al.*, 2000). Além da sinalização *outside-in*, as integrinas podem regular sua afinidade a ligantes extracelulares. Elas sofrem mudanças conformacionais em seus domínios extracelulares que ocorrem em resposta a sinais que afetam a cauda citoplasmática das integrinas - um processo que é chamado de sinalização *inside-out* ou ativação (CALDERWOOD, 2004). Sinalização tanto *outside-in* como *inside-out* requerem dinâmica espacial e temporalmente regulada montagem e desmontagem de complexos multiproteicos que se formam ao redor da cauda citoplasmática das integrinas (HARBURGER & CALDERWOOD, 2009).

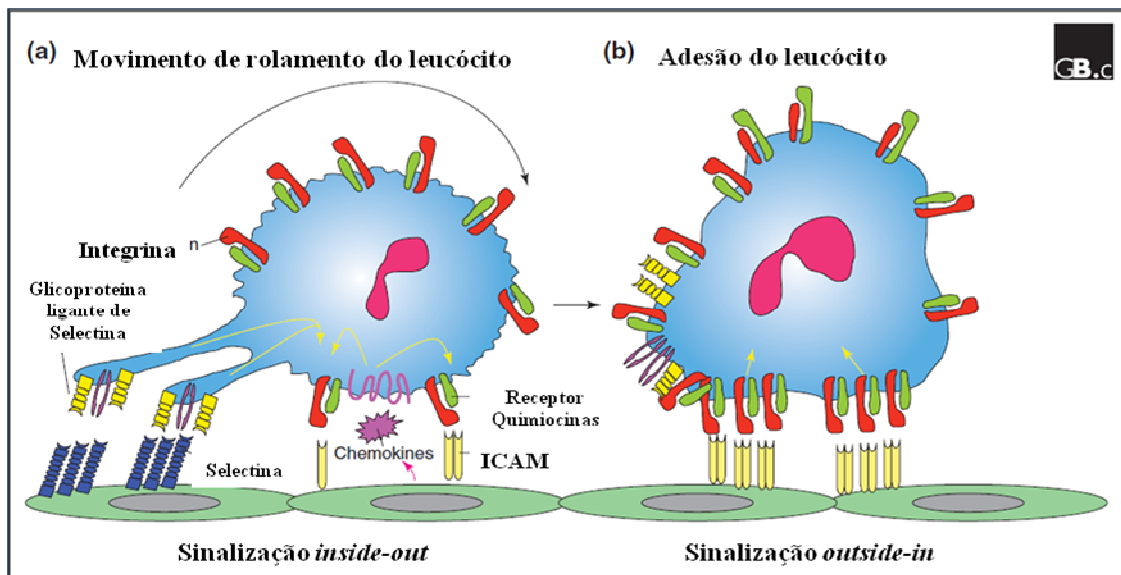
Após a ligação de uma integrina ao seu ligante na MEC, a cauda citoplasmática da subunidade  $\beta$  liga-se a várias proteínas de ancoramento intracelular, incluindo a talina,  $\alpha$ -actina e a filamina. Essas proteínas de ancoramento podem ligar-se diretamente à actina ou a outra proteína de ancoramento, como a vinculina, ligando a integrina aos filamentos de actina do córtex celular, sendo que em condições ideais, esta ligação leva a agregação das integrinas



### **1.3.2- SINALIZAÇÃO OUTSIDE-IN**

A interação do ligante ao domínio extracelular da integrina leva ao agrupamento (“*clusterização*”) desses receptores e à formação de sítios especializados de adesão denominados de adesões focais (FAs) (HEHLGANS *et al.*, 2007). Este complexo multiproteico inclui proteínas estruturais e de sinalização, como as integrinas, proteínas do citoesqueleto e quinases, que incluem FAK (*focal adhesion kinase*), Src, entre outras como a ILK, Talina, Paxilina, Parvins, p130Cas e GTPases da família Rho (BERRIER & YAMADA, 2007; HEHLGANS *et al.*, 2007).

Segundo TAKADA *et al.* (2007), tais mudanças conformacionais incluem o movimento externo do domínio híbrido, a separação dos domínios  $\alpha$  e  $\beta$ , e separação dos domínios transmembrana, que levam à interação das caudas citoplasmáticas com moléculas de sinalização intracelular. Estas incluem enzimas (por exemplo, a quinase de adesão focal/c-Src, e as pequenas GTPases, Ras e Rho) e adaptadores (por exemplo, Cas/Crk e paxilina) que se unem dentro das estruturas de adesão, incluindo adesões focais que se ligam a matriz extracelular das células e podossomos (GINSBERG *et al.*, 2005; SHATTIL, 2005; TAKADA *et al.*, 2007). Desta forma, a afinidade de uma integrina a seus ligantes, tais como a molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1), regulam o grau de sinalização “*outside-in*” nos sítios de contatos de adesão focal (Figura 7). Estes contatos são sítios ativos que transduzem informações, tais como a densidade de ligante extracelular ou a magnitude e a direção das forças extracelulares sobre a célula. Além disso, as integrinas também podem ser ativadas “*outside*” pela ligação de cátions divalentes aos sítios de ligação de íon metal nos domínios I e I-like nas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente (TAKADA *et al.*, 2007).

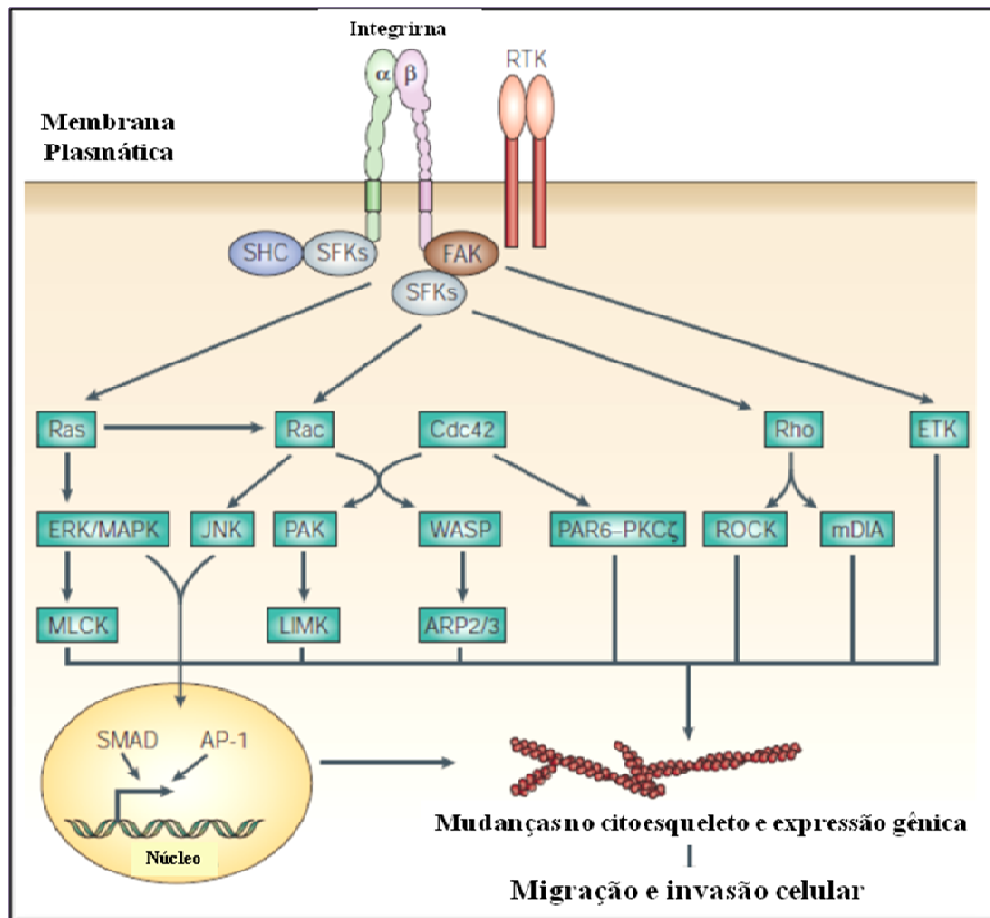


**Figura 7-** Recrutamento do Leucócito para a superfície endotelial. **(a)** ligação da glicoproteína ligante de selectina (amarelo e roxo) com as selectinas dos leucócitos (azul) na superfície endotelial, e ligação de baixa afinidade das integrinas do leucócito (verde) com as ICAMs (amarelo) na célula endotelial facilita o rolamento e a adesão. Essa ligação, juntamente com os sinais das quimiocinas (rosa), gera os sinais *inside-out* (setas amarelas); **(b)** A adesão do leucócito é mediada por aglomerados de integrinas de alta afinidade (vermelho) ligando-se às ICAMs das células endoteliais. Estes aglomerados focais podem transmitir sinais *outside-in* e afetar funções, tais como a polarização celular e migração. Extraído e modificado de TAKADA *et al.*, 2007.

Desta forma, as adesões focais são sítios formados por complexos de várias moléculas dinâmicas que promovem a adesão ao substrato, bem como a localização direcionada do citoesqueleto e dos componentes de sinalização, e devido à sua rica composição são consideradas por alguns autores organelas de transdução de sinais dependente da adesão (HARBURGER & CALDERWOOD, 2009; LO & CHEN, 1994).

As integrinas são essenciais para a migração e invasão celular já que regulam as vias de sinalização intracelular que controlam a organização do citoesqueleto, geração de força e sobrevivência. Durante a migração celular, as interações entre as integrinas e seus ligantes são feitas e desfeitas. Dependendo da composição da MEC, as integrinas ativam uma ou várias vias de sinalização intracelular. Estas vias tipicamente envolvem fosforilação da Quinase de Adesão Focal (FAK), recrutamento de proteínas adaptadoras, ativação de pequenas GTPases e subsequente ativação *downstream* de moléculas efetoras. Estes sinais, em coordenados com os sinais provenientes dos fatores crescimento, regulam o comportamento celular em um microambiente complexo tecidual (HOOD & CHERESH, 2002).





**Figura 8** - Sinalização via integrina e receptor tirosina quinase induz a migração e invasão celular. Quinase de Adesão Focal (FAK) e quinases da família Src (SFKs) integram os sinais pró-migratório das integrinas e receptores tirosina quinases (RTKs). Estes sinais exercem o seu efeito por orquestrar mudanças no citoesqueleto e pela indução da expressão gênica. A quinase de cadeia leve da miosina (MLCK), quinase Rho efetora (Rock) e diáfana de mamíferos (mDia), regulam o agrupamento e a contração das fibras de actomiosina. A quinase Amino-terminal Jun (JNK) e ERK/APK podem ser ativadas por SHC ou FAK, e promovem a migração celular através da ativação do ativador proteína-1 (AP-1)-dependente da expressão gênica. Sinalização através Ras-ERK/MAPK também colabora com transformação do factor-β de crescimento (TGF-β)-SMAD sinalização induz a transição epitélio-mesenquimal. Por último, a ativação da ETK pela FAK é também importante para a migração celular. Extraído e modificado de GUO & GIANCOTTI, 2004.

Uma das primeiras moléculas que participa da sinalização celular juntamente com as integrinas a ser identificada foi a FAK (Figura 8). A FAK é uma proteína quinase citoplasmática que se co-localiza com as integrinas nas adesões focais (GUO E GIANCOTTI, 2004; HARBURGER & CALDERWOOD, 2009; HOOD & CHERESH, 2002). Esta molécula apresenta papel chave na sinalização mediada por integrina, e pode ser ativada pelo domínio citoplasmático da subunidade β da integrina ou por interações de proteínas do citoesqueleto associadas à integrina (BERMAN *et al.*, 2003).

A ligação da célula à MEC pelas integrinas induz a “clusterização” destes receptores e a ativação da FAK. A FAK ativada liga-se a várias moléculas de sinalização, tais

como a RAS – quinase regulada por sinais extralulares (ERK), que promove a proliferação celular. A ativação da FAK também tem demonstrado promover a sobrevivência e migração celular, as quais são induzidas por integrinas ou fatores de crescimento (HOOD & CHERESH, 2002; SCHLAEPFER *et al.*, 1999; SIEG *et al.*, 1999). Além disso, a FAK é expressa em níveis mais elevados em tumores invasivos do que em tumores pré-neoplásicos benignos (HOOD & CHERESH, 2002; OWENS *et al.*, 1995; WEINER *et al.*, 1993).

A regulação da migração celular pela FAK não está completamente entendida. Após “*clusterização*”, a FAK é auto-fosforilada no resíduo de tirosina 397 e recruta a família das quinases SRC para as adesões focais, evento exigido para a motilidade celular de fibroblastos e de células de ovário de *hamster* Chinês (CHO), mediado por integrina (HOOD & CHERESH 2002). De acordo com estes achados, a motilidade celular induzida pela expressão transgênica da FAK em fibroblastos (com FAK nocateada) é prejudicada pela inibição da SRC, e a expressão da SRC resgata motilidade celular em células com deficiência da FAK. Do mesmo modo, a FAK fosforilada pode ativar ERK pelo recrutamento de adaptadores de proteínas, como a proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento (GRB2) e substrato associado a CRK (CAS), assim como pela ativação de proteínas quinases tais como a família das quinases SRC. A ativação mediada pela FAK nessas vias pode, por sua vez, regular a migração e proliferação celular (HOOD & CHERESH, 2002; RICHARDSON *et al.*, 1997; SCHLAEPFER *et al.*, 1999; SIEG *et al.*, 1999).

Uma das principais vias de sinalização ativadas pela FAK mediadas por integrinas é a via MAPK (*mitogen activated protein kinase*). MAPKs são componentes de sinalização, que são importantes na conversão de estímulos extracelulares em uma ampla gama de respostas celulares. Membros dessa família integram sinais que afetam diversos processos celulares importantes, tais como proliferação, diferenciação, sobrevivência, migração, expressão gênica, mitose e morte celular (WAGNER & NEBREDÁ, 2009).

Já a família da SHC compreende um grupo de proteínas adaptadoras que são recrutadas para ativar a tirosina quinase em resposta a ligação das integrinas  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_4$ ,  $\alpha_5\beta_1$  ou  $\alpha_v\beta_3$ , e de alguns receptores extracelulares em resposta a ligação ao fator de crescimento. A formação do complexo leva a progressão do ciclo celular dependente da SHC, migração, sinais anti-apoptóticos e a ativação da ERK. Durante a migração celular *in vivo*, a formação de novos contatos de integrina fornece à célula sinais moleculares e de posição que ativam a sinalização da ERK. As integrinas regulam a atividade da ERK diretamente e também por modulação do fator de crescimento estimulado pela atividade da ERK. A ativação da ERK parece estar ligada a invasão e migração celular através de diversas vias, influenciando a

transcrição gênica e sobrevivência, bem como pela regulação direta de enzimas que são necessárias para a locomoção celular (HOOD & CHERESH, 2002).

A família da proteína quinase C (PKC) das serina/treonina quinases são importantes para a regulação da função e sinalização da integrina. A ligação da fibronectina por integrinas e syndecan-4 recruta a PKC, a qual é exigida na formação da adesão focal, fosforilação da FAK, espalhamento da célula (*spreading*), ativação da ERK dependente da SHC e migração. Do mesmo modo, a PKC é importante na formação da adesão focal mediada pela integrina  $\alpha_v\beta_5$  e na migração celular em substratos contendo vitronectina, juntamente com fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (FRIEDLANDER *et al.*, 1995; HOOD & CHERESH, 2002; LEWIS *et al.*, 1996). Além disso, a ativação da PKC é necessária para mobilizar a integrina  $\alpha_6\beta_4$  de hemidesmosomos das protusões lamelares, onde é exigida para migração por muitas células de tumores epiteliais (KHWAJA *et al.*, 1997).

A PI3K (fosfatidilinositol 3 quinase) regula a motilidade celular dependente de integrinas pela modulação das respostas destes receptores em ambos os tecidos normais e neoplásicos. Em carcinoma da mama, por exemplo, a ligação da integrina  $\alpha_6\beta_4$  ativa a PI3K, que promove a formação de lamelas e invasão. Do mesmo modo, o aumento da adesão mediada pela integrina  $\beta_1$  e migração de carcinomas mamários em resposta ao fator de crescimento epidérmico (EGF) e da heregulina (são expressas pelas células de câncer de mama metastáticas), são dependentes da ativação da PI3K (ADELSMAN *et al.*, 1999; KHWAJA *et al.*, 1997; SHAW *et al.*, 1997).

### **1.3.3- SINALIZAÇÃO INSIDE-OUT**

Segundo COPPOLINO & DEDHAR (2000), a sinalização *inside-out* refere-se a processos nos quais os mecanismos de sinalização dentro das células podem regular as atividades de ligação das integrinas com seus ligantes na superfície celular. Exemplos deste tipo de sinais intracelulares incluem a estimulação da PKC pela ativação da integrina  $\alpha_5\beta_1$  em células CHO, estimulação da integrina  $\beta_2$  em leucócitos por éster forbol ou anticorpos CD3, e ativação da integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  em plaquetas mediada pela trombina. Sinalização *Inside-out* é definida como aqueles eventos que induzem mudanças conformacionais na integrina, levando a um aumento da afinidade de ligação (ativação da integrina) e ao agrupamento (“*clusterização*”) de integrinas na membrana, que, resultam juntas na modulação da avidéz, permitindo assim a adesão celular (ABRAM & LOWEL, 2009).

Estas alterações na atividade das integrinas podem ser explicadas por dois mecanismos principais: mudanças na avidéz e na afinidade, que não são mutuamente exclusivas. Mudanças na avidéz das integrinas são mais prováveis de resultar na redistribuição dos receptores no espaço da membrana plasmática, resultando em aglomerado de integrinas (complexos focais) em sítios de ligação com o ligante (BROWN, 1997; SHATTIL & GINSBERG, 1997). Existe uma boa evidência para este tipo de modulação da avidéz, particularmente em leucócitos, porém os mecanismos moleculares de sua regulação não são conhecidos. Eventos de fosforilação, incluindo fosforilação das integrinas propriamente, têm sido correlacionados com o aumento da avidéz das integrinas em alguns modelos de sistemas, mas a sua importância fisiológica não é clara. Outros eventos intracelulares tais como troca GTP-GDP e metabolismo fosfolípídeo, têm sido sugeridos como moduladores potenciais da avidéz das integrinas (COPPOLINO & DEDHAR, 2000).

Mudanças na atividade das integrinas também podem ocorrer através de alterações intrínsecas na afinidade dos receptores individuais. Na maioria das vezes, as integrinas são expressas na superfície celular na forma inativa, em que a integrina não se liga a seu ligante, e é freqüentemente referido como estado de baixa afinidade (COPPOLINO & DEDHAR, 2000). Análises estruturais mostraram que quando as integrinas se encontram em estado de baixa afinidade, a região N-terminal de ligação ao ligante no domínio extracelular fica “fechada”, voltada para a membrana (XIONG *et al.*, 2001; XIONG *et al.*, 2002). Diversos estudos têm demonstrado que sinais intracelulares podem ativar as integrinas em formas que se ligam muito eficientemente, chamado de estado de alta afinidade. A modulação da afinidade da integrina é dependente de energia, específica para o tipo celular e provavelmente envolve a propagação de mudanças conformacionais do domínio citoplasmático para o domínio extracelular de ligação. Desta forma, a modulação da afinidade da integrina depende de energia, do tipo celular e envolvem mudanças conformacionais que vão do domínio citoplasmático até o domínio extracelular que interage com as moléculas da MEC e/ou outros receptores (HUGHES *et al.*, 1996; O'TOOLE *et al.*, 1994).

Segundo TAKADA *et al.* (2007), a proteína adaptadora citoesquelética talina pode desempenhar um papel na regulação da afinidade da integrina. A ligação da região da cabeça da talina com a cauda citoplasmática da integrina  $\beta$ , causa dissociação das caudas  $\alpha$  e  $\beta$ , e induz uma mudança conformacional da região extracelular (da integrina) que aumenta a sua afinidade pelo ligante (proteína da MEC ou outro receptor) (GINSBERG *et al.*, 2005). Dois modelos foram propostos para esta mudança de afinidade. Em ambos, a integrina inativa está em uma conformação “dobrada”, na qual a porção da “cabeça” fica virada para a

membrana. No "modelo *deadbolt*" a conformação "dobrada" é mantida na integrina inativa, porém, movimentos parecidos com o de pistão, das regiões transmembranas (da integrina) causam deslizamento da porção extracelulares das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , o que perturba a interação entre a porção da "cabeça" e a porção da cadeia  $\beta$  além da membrana (o "*deadbolt*") (ARNAOUT *et al.*, 2005). No "modelo *switchblade* (canivete)", a dissociação da região citoplasmática transmembrana das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  leva ao deslocamento de uma repetição tipo EGF na porção  $\beta$ , o que faz com que a região da "cabeça" se estenda para a região externa em um movimento tipo canivete (LUO *et al.*, 2007). Em ambos os modelos, estes eventos propostos ocorrem dentro de segundos com a ativação da integrina, levando a mudanças conformacionais na porção da cabeça, e conseqüentemente aumentando sua afinidade pelo ligante. Desta forma, a afinidade regula diretamente a natureza da ligação com o ligante e aparece para ajustar o grau e a cinética da adesão celular (TAKADA *et al.*, 2007).

#### **1.4- METALPEPTIDASES**

A síntese, degradação e remodelamento MEC são eventos cruciais em situações fisiológicas normais, tais como desenvolvimento embrionário, reprodução, cicatrização de feridas e angiogênese (KERKELÄ & SAARIALHO-KERE, 2003; MURPHY & NAGASE, 2008). Sendo assim, a manutenção da integridade da matriz envolve a síntese e degradação de seus componentes, tais como colágeno, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, laminina e fibronectina (BODE *et al.*, 1999). Por outro lado, excessiva degradação da MEC ocorre em condições patológicas, tais como feridas crônicas, doenças de pele, aterosclerose, artrite reumatóide, invasão e metástase no câncer (KERKELÄ & SAARIALHO-KERE, 2003; MURPHY & NAGASE, 2008). Desta forma, o processo de remodelamento fisiológico normal, morfogênese e reparo tecidual envolvem a regulação precisa da degradação da matriz extracelular (MEC).

Os componentes da MEC são degradados por vários tipos de enzimas proteolíticas geralmente secretadas por células locais, sendo o principal grupo denominado metalopeptidases de matriz (MMPs), também chamadas de matrixinas (MURPHY & NAGASE, 2008). As MMPs são endopeptidases dependentes da ligação de um metal, geralmente  $Zn^{2+}$ , pertencentes à superfamília de metalopeptidases metzincinas, composta também pelas astacinas, reprotinas, ADAMs (uma proteína com os domínios desintegrina e metaloprotease), proteases ADAM-TS (ADAM com um domínio semelhante a

trombospondina) e SVMs (metalopectidases de venenos de serpentes) (DI NEZZA *et al.*, 2002; GUEDERS *et al.*, 2006; PAGE-MCCAW *et al.*, 2007).

Vários tipos de células produzem as MMPs, entre elas os queratócitos, fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, algumas células sinoviais e uma variedade de células malignas. A expressão gênica das metalopectidases pode ser estimulada pela interleucina-1, pelo fator de crescimento epidérmico (EGF), pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e pelo fator alfa de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (JOBIM *et al.*, 2008; PENDER & MacDONALD, 2004).

O genoma humano apresenta 24 genes que codificam para matrixinas, o qual inclui um gene duplicado, o MMP-23. Desta foram, existem 23 diferentes genes que codificam MMPs distintas, sendo também possível encontrá-las em: mosca de frutas (*Drosophila melanogaster*), nematóides (*Caenorhabditis elegans*), ouriço do mar (*Paracentrotus lividus*), *Hidra vulgaris* e plantas (*Arabidopsis thaliana*) (MURPHY & NAGASE, 2008).

A maioria das metalopectidases é secretada como zimogênios inativos (pró-MMPs) e são ativadas extracelularmente, sendo que as MMPs tipo membrana são as únicas exceções, pois estão ancoradas na membrana celular (DI NEZZA *et al.*, 2002; SHIOMI & OKADA, 2003). Os TIMPs são inibidores teciduais de MMPs que particularmente regulam a sua atividade. Esses inibidores formam juntamente com todas as MMPs ativas um complexo não-covalente com alta afinidade (DI NEZZA *et al.*, 2002).

A estrutura básica das MMPs consiste de três domínios comuns para todas as enzimas desse tipo: um peptídeo sinal, que direciona o produto translacional para o retículo endoplasmático para a sua secreção, sendo as formas ativas das MMPs desprovidas desse peptídeo; um domínio pró-peptídeo, que mantém a atividade enzimática na forma latente pela presença de um resíduo de cisteína que interage com o sítio catalítico; um domínio catalítico que contém um átomo de zinco (Zn<sup>2+</sup>) coordenado por três resíduos de histidina, sendo que a liberação proteolítica do zinco leva a ativação do sítio catalítico; e por último, um domínio C-terminal que tem um importante papel na ligação com o seu substrato e/ou interação com os TIMPs. O domínio catalítico contém uma seqüência altamente conservada – HEXGHXXGXXH - vinculada ao zinco, característica da superfamília das proteinases metzincinas, seguida por uma metionina invariante, a qual está envolvida por uma estrutura denominada “*Met-turn*” (XXMXP) (CLARK *et al.*, 2008; CHABOTTAUX & NOEL, 2007). Algumas MMPs têm domínios adicionais, tais como o domínio hemopexina e um domínio

homólogo a vitronectina, os quais são essenciais para as MMPs identificarem o substrato (JEZIERSKA & MOTYL, 2009; NGUYEN; ARKELL; JACKSON, 2001) (Figura 9).

Desde sua primeira descrição por Gross e Lapiere (1962), 28 MMPs foram descritas e 24 MMPs foram identificadas em vertebrados (GUEDERS *et al.*, 2006). A família das metalopeptidases de matriz (MMPs) em humanos constitui-se de 23 membros, os quais podem ser divididos em cinco subgrupos de acordo com sua estrutura e especificidade a substrato (Tabela 3): collagenases (MMP-1, -8 e -13), gelatinases (MMP-2 e -9), estromelisinases (MMP-3, -10 e -11), MMPs tipo membrana (MT-1, -2, -3, -4, -5 e -6 – MMPs) e outras como (MMP-7, -12, -18, -19, -20, -21, -23, -26, -27 e -28) (GUEDERS *et al.*, 2006; MASSOVA *et al.*, 1998; MURPHY & NAGASE, 2008; SHIOMI & OKADA, 2003; STERNLICHT & WERB, 2001).

**Tabela 3** – A família das Metalopeptidases de matriz (em humanos) \*.

Nome do grupo	Número da MMP	Localização cromossômica	Substratos	Fontes celulares
<b>I. Collagenase</b>				
Colagenase-1 (colagenase intersticial)	MMP-1	11q22-q23	Colágeno I, II, III, VII, X, gelatina, MMP-2, proteoglicana, proteína símili, MMP-9, entactina, tenascina	Macrófagos, células do músc. liso, células endoteliais
Colagenase-2 (colagenase neutrófila)	MMP-8	11q21-q22	Colágeno I, II, III, V, VII, VIII, gelatina, proteoglicana, proteína símili, entactina, tenascina	Neutrófilos, macrófagos, células do músc. liso, células endoteliais
Colagenase-3	MMP-13	11q22.3	Colágeno I, II, III, IV, IX, X, XVI, proteoglicana, fibronectina, tenascina, MMP-9	Macrófagos, células do músc. liso, células endoteliais
Colagenase-4	MMP-18		Colágeno I	-
<b>II. Gelatinase</b>				
Gelatinase-A (72kDa colagenase tipo IV)	MMP-2	16q13	Gelatina, colágeno I, IV, V, VII, X, XI, XIV, laminina, fibronectina, elastina, vitronectina, proteoglicana, proteína símili, MMPs-1, 9 e 13	Células do músc. liso, macrófagos, células endoteliais, linfócitos T
Gelatinase-B (92kDa colagenase tipo IV)	MMP-9	20q11.2-q13.1	Gelatina, colágeno III, IV, V, VII, X, XIV, elastina, fibronectina, entactina, proteína símili, plasminogênio, agrecana, vitronectina	Macrófagos, células do músc. liso, células endoteliais, linfócitos T

<b>III. Estromelisininas</b>				
Estromelisininas-1	MMP-3	11q23	Proteoglicanas, colágeno III, IV, V, IX, X, laminina, fibronectina, gelatina, tenascina, proteína símili, elastina, entactina, vitronectina, MMPs-1, 7, 8, 9 e 13	Macrófagos, células do mús. liso
Estromelisininas-2	MMP-10	11q22.3-q23	Colágeno III, IV, V, gelatina, fibronectina, caseína, entactina, laminina, proteoglicanas, proteína símili, elastina, tenascina, fibriongênio, vitronectina, MMPs-1e 8	-
Estromelisininas-3	MMP-11	22q11.2	Fibronectina, laminina, proteoglicanas, Gelatina, caseína, agrecana, colágeno IV	-
<b>IV. Tipo membrana</b>				
MT1-MMP	MMP-14	14q11-q12	Colágeno I, II, III, gelatina, caseína, proteoglicanas, fibronectina, laminina, elastina, vitronectina, agrecana, MMPs-2 e 13	Células do mús. liso, células endoteliais, macrófagos
MT2-MMP	MMP-15	15q13-q21	Fibronectina, tenascina, entactina, gelatina, agrecana, perlecana, laminina, vitronectina e MMP-2	-
MT3-MMP	MMP-16	8q21	Colágeno III, gelatina, fibronectina, caseína, vitronectina, MMP-2	-
MT4-MMP	MMP-17	12q24.3	Gelatina e pró-MMP-2	-
MT5-MMP	MMP-24	20q11.2	Proteoglicanas, pró-MMP-2, colágeno I, gelatina, fibronectina, laminina	-
MT6-MMP	MMP-25	16p13.3	Gelatina, fibrina, colágeno V, fibronectina, pró-MMP-8 e 9, laminina-1	-
<b>V. Matrilisininas</b>				
Matrilisina	MMP-7	11q21-q22	Proteoglicanas, gelatina, fibronectina, caseína, tenascina, elastina, colágeno III, IV, V, IX, X, XI, entactina, laminina, proteína	Macrófagos



			símili, vitronectina, MMPs-1, 2, 9, complexo MMP-9/TIMP-1	
Matrilisina 2	MMP-26	11p15	Colágeno IV, fibronectina, gelatina, fibrionogênio, elastina, pró-MMP-9	-
<b>VI. Outras</b>				
Metaloelastase	MMP-12	11q22.2-q22.3	Elastina, colágeno IV, gelatina, caseína, fibronectina, fibrinogênio, plasmogênio, laminina, proteoglicana, MMP-2	Macrófagos
RAS I-1	MMP-19	12q14	Tenascin, gelatina, agrecana	-
Enamelisina	MMP-20	11q22.3	Amelogenina, COMP (proteína da matriz oligomérica da cartilagem)	-
XMMp	MMP-21	10	?	-
Nome não comum	MMP-23	1p36.3	Gelatina	-
Nome não comum	MMP-27	11q24	?	-
Epilisina	MMP-28	17q21.1	Caseína	-

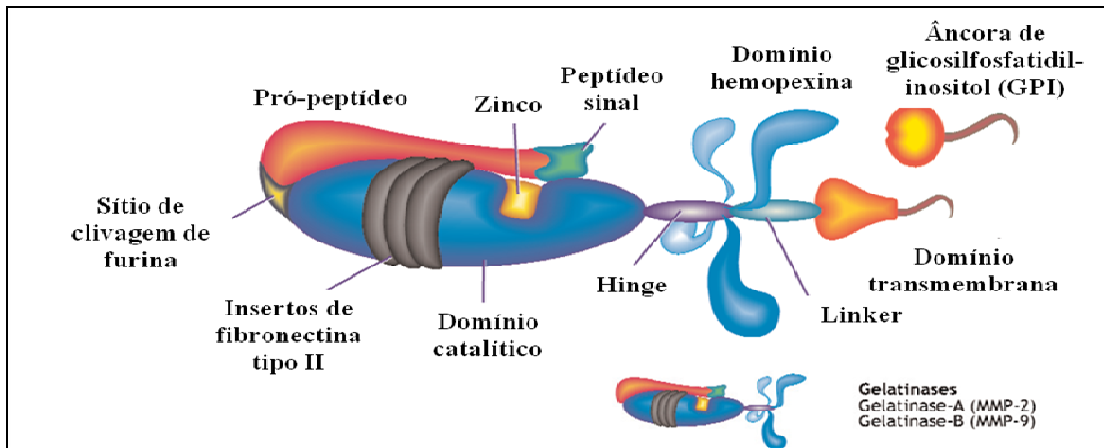
\* Baseado em GUEDERS *et al.*, 2006; JEZIERSKA & MOTYL, 2009; MURPHY & NAGASE, 2008.

As MMPs são importantes em muitos aspectos biológicos, os quais vão desde a proliferação celular, diferenciação e remodelamento da MEC para a vascularização e migração celular. Esses eventos ocorrem diversas vezes durante a organogênese no desenvolvimento normal ou durante a progressão tumoral (CHANG & WERB, 2001).

A progressão do câncer é um processo complexo e com muitas etapas, que inclui o crescimento, a migração, invasão, metástase e angiogênese. Cada etapa neste processo é fundamental para o desenvolvimento metastático, sendo reguladas através de interações de muitos genes, incluindo aqueles para as MMPs (MARTIN & MATRISIAN, 2007).

As matrilisinas (por exemplo, MMP-7 e MMP-26) são expressas por células fisiológicas e patológicas do endométrio, intestino delgado, mama, pâncreas, fígado e próstata. As colagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) e estromelinas apresentam um domínio parecido com hemopexina. Fisiologicamente, as colagenases regulam o desenvolvimento ósseo e reparo de ferimento no feto por remodelamento rápido da MEC. Além disso, MMP-13 é expressa em doenças como artrite e tumor maligno de melanoma, mama, cabeça e pescoço, e carcinoma de bexiga (JEZIERSKA & MOTYL, 2009). As gelatinases (MMP-2 e MMP-9) apresentam uma região contendo três repetições de

fibronectina tipo II nos seus domínios catalíticos (JEZIERSKA & MOTYL, 2009; KERKELÄ & SAARIALHO-KERE, 2003).



**Figura 9** – Representação esquemática dos domínios estruturais básicos das MMPs. As gelatinases apresentam três repetidas fibronectinas tipo II no seu domínio catalítico. Extraído e modificado de RUNDHAUG, 2005.

A expressão da MMP-2/gelatinase A (72kDa colagenase tipo IV) que pode ser encontrada numa variedade de células normais (Figura 9), bem como em algumas células que sofreram transformações, incluindo fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e condrócitos (CARPENA *et al.*, 2008) e MMPs tipo membrana (MT-MMPs) estão claramente correlacionadas com o fenótipo invasivo e metastático da célula tumoral *in vivo* e *in vitro*. Além disso, as MMPs-1/colagenase intersticial, MMP-3/estromelisina-1, MMP-7/matrilisina e MMP-9/gelatinase B (92kDa colagenase tipo IV) (Figura 9) são produzidas apenas em situações patológicas, tais como queratinócitos e macrófagos alterados e também em muitas células malignas (CARPENA *et al.*, 2008; SATO *et al.*, 2004), estão associadas com a malignidade de tumores *in vivo* e *in vitro*. Portanto, diferentes conjuntos de MMPs estão provavelmente envolvidos na degradação da MEC durante a invasão tumoral e metástase (SATO *et al.*, 2004).

A MMP-2 e MT1-MMP degradam a matriz extracelular, levando à invasão e metástase de células de câncer de mama. Diversas pesquisas confirmam o envolvimento da MMP-2 em todos os cânceres humanos, desta forma, elevado nível de MMP-2 foi encontrado em pacientes com cânceres gástrico, pancreático e próstata (JEZIERSKA & MOTYL, 2009). Estudos sobre a expressão das MMPs e TIMPs em vários tecidos de cânceres humanos têm demonstrado que a ativação da pró-MMP-2 mediada pela combinação com TIMP-2 e MT1-MMP (sistema pró-MMP-2/TIMP-2/MT1-MMP) se correlaciona com a progressão da maioria dos tipos de cânceres, tais como adenocarcinomas de mama, carcinomas papilares da

tireóide, adenocarcinomas gástricos, carcinomas epidermóides orais e gliomas, enquanto MMP-7 tem um papel importante na metástase endometrial e carcinomas gastrointestinais (OKADA, 2000; SHIOMI & OKADA, 2003). Estudos de NAKAMURA *et al.* (1999) sugerem que a expressão aumentada da pró-MMP-2 e sua ativação mediada pela MT1-MMP em células de carcinoma, são importantes para o comportamento maligno de carcinomas da tireóide.

Acredita-se que a MMP-9 tenha um importante envolvimento na invasão de células cancerígenas. Na literatura encontram-se estudos que relacionam o aumento dos níveis de MMP-2 e MMP-9 com o potencial de invasão neoplásico geral, aumento da angiogênese e metástase (CARPENA *et al.*, 2008). Devido ao papel importante das gelatinases, e de maneira especial a MMP-2 na degradação da MEC, que esta associada com o comportamento maligno das células de tumor, diversos autores têm relacionado os níveis de MMP-2 e MMP-9 com carcinomas de esôfago, oral, endométrio, pele, laringe, entre outros (NAKAMURA *et al.*, 1999; PEREIRA *et al.*, 2006).

### **1.5- ADAMs**

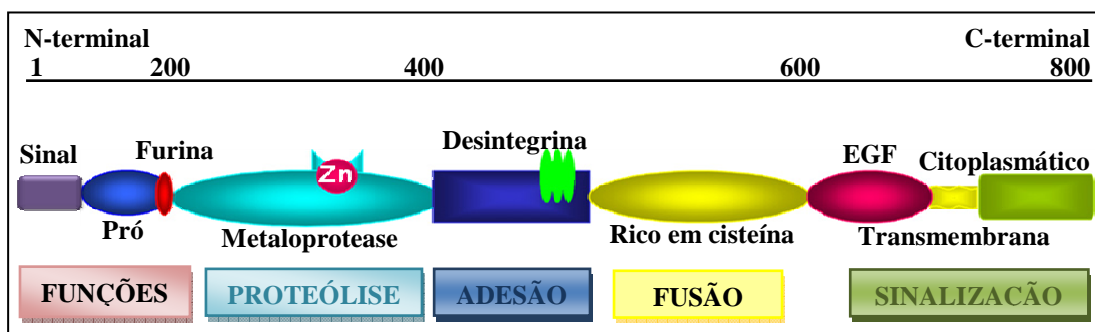
Na curta história do campo das proteínas metaloprotease-desintegrinas, diversos caminhos fascinantes e notavelmente diferentes de investigação convergiram na descoberta de novos membros desta família de proteínas. Há alguns anos a purificação, a partir de veneno de serpente, de uma potente toxina anticoagulante ligante da integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , resultou na primeira descrição de uma desintegrina (HUANG *et al.*, 1989). Alguns anos mais tarde, a purificação e clonagem das ADAMs (**A** **D**isintegrin **A**nd **M**etalloprotease) 1 e 2, originalmente chamadas de fertilina  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente (SEALS & COURTNEIDGE, 2003) revelou que ambas são metaloprotease-desintegrinas ancoradas na membrana do espermatozóide e implicadas na fusão deste com o óvulo (BLOBEL, 1997; CHO *et al.*, 1998; WOLFSBERG & WHITE, 1996; YUAN *et al.*, 1997).

Subseqüentemente, outras ADAMs foram sendo descritas. A meltrina- $\alpha$  foi ligada ao processo de fusão muscular de mioblastos da linhagem C2C12 (SEALS & COURTNEIDGE, 2003; YAGAMI-HIROMASA *et al.*, 1995). Em drosófila, dois trabalhos distintos revelaram que a Kuzbanian (ADAM10), tem um papel na promoção e inibição do destino da célula neural em diferentes estágios da neurogênese (ROOKE *et al.*, 1996) e na extensão axional (FAMBROUGH *et al.*, 1996). As ADAMs também estão envolvidas em clivagem de pelo menos dois substratos altamente relevantes, a citocina pro-inflamatória

ancorada na membrana, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), que é liberada da membrana plasmática pela TACE (convertase de TNF- $\alpha$ ) ou ADAM17. A TACE, por sua vez, tem um papel crítico nas desordens auto-imunes em certas doenças como a artrite reumatóide (BLACK *et al.*, 1997; MOSS *et al.*, 1997; ZHENG *et al.*, 2004).

As ADAMs têm papel fundamental nas interações entre células ou entre células e a MEC. Tais interações são de fundamental importância em processos de adesão, migração, proliferação, desenvolvimento, diferenciação, transdução de sinais, resposta imunológica, manutenção da estrutura tecidual e cicatrização de ferimentos, como também em situações patológicas, como por exemplo, câncer e formação de metástases tumorais (BLOBEL, 1997; BLACK & WHITE, 1998; WAGNER & WYSS, 1994).

As ADAMs são glicoproteínas de membrana que contém multi-domínios, com funções e estruturas específicas. Entre os domínios apresentados pelas ADAMs estão um peptídeo sinal, um pró-domínio e domínios metaloprotease, desintegrina ou desintegrina-like, rico em cisteína, EGF-like (*Epidermal Growth Factor-like*), transmembrana e citoplasmático (Figura 10) (BLOBEL, 1997; SEALS & COURTNEIDGE, 2003; WHITE, 2003).

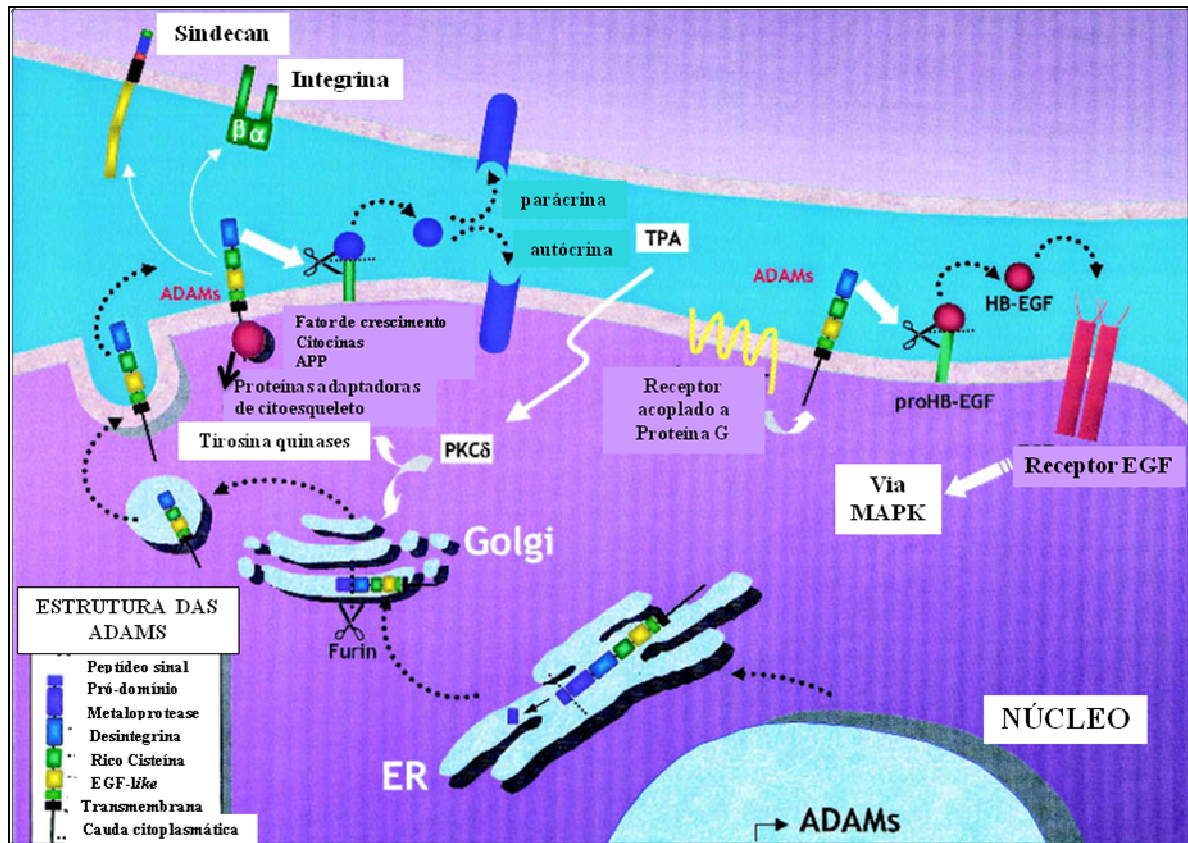


**Figura 10** – Desenho esquemático representando a estrutura de uma ADAM com seus diferentes domínios e diferentes funções. EGF-like: domínio *Epidermal Growth Factor-like*, TM: domínio transmembrana. Os números acima representam a quantidade de resíduos de aminoácidos na proteína. N-term. = região amino-terminal, C-term. = região carboxi-terminal. Extraído e modificado de BLACK & WHITE, 1998; ROCKS *et al.*, 2008; SEALS & COURTNEIDGE, 2003.

Já foram identificados 20 genes que codificam para ADAMs e mais de 30 membros protéicos desta família foram descritos (DUFFY *et al.*, 2003; PRIMAKOFF & MYLES, 2000; STONE *et al.*, 1999). Os genes para esta família de proteínas são classificados em dois grupos: o primeiro é o grupo de metaloproteases ativas ou potencialmente ativas, as quais possuem seqüência consenso para a ligação do zinco no domínio catalítico; o outro grupo corresponde as ADAMs com o domínio metaloprotease proteoliticamente inativo, devido a ausência de motivos íntegros para a ligação de zinco envolvido na catálise enzimática (EMI *et al.*, 1993; WOLFSBERG *et al.*, 1993; WOLFSBERG & WHITE, 1996).

Além do *Homo sapiens*, as ADAMs podem ser encontradas também em outras espécies, incluindo *C. elegans*, *Drosophila*, *Xenopus* e camundongos, mas não estão presentes em *E. coli*, *S. cerevisiae*, ou em plantas (BLOBEL, 1997; FAMBROUGH *et al.*, 1996; SEALS & COURTNEIDGE, 2003).

Estudos realizados até o momento indicam que as ADAMs são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e em seguida transportadas ao complexo de Golgi para maturação (Figura 11). A maturação envolve a remoção do pró-domínio da estrutura da ADAM, o que torna o domínio metaloprotease competente, ou seja, torna-o ativo (LUM *et al.*, 1998; ROGHANI *et al.*, 1999; SEALS & COURTNEIDGE, 2003). No entanto, a localização intracelular na qual ocorre o reconhecimento e clivagem dos substratos das ADAMs permanece incerta. Alguns estudos apontam resíduos de ADAMs próximo ao núcleo, em alguns casos co-localizados com marcadores de Golgi e ainda podem também ser detectados na superfície celular (SEALS & COURTNEIDGE, 2003). Abaixo segue o desenho esquemático da síntese, processo, e função das ADAMs.



**Figura 11** – Desenho esquemático acima mostra a síntese, processo, e função das ADAMS. Diversas atividades representativas das ADAMS estão esquematizadas. Extraído e modificado de SEALS & COURTNEIDGE, 2003.

A seguir serão descritas de forma mais detalhada as principais funções identificadas até o momento dos diferentes domínios presentes nas ADAMS.

### 1.5.1- PRÓ-DOMÍNIO

As ADAMS possuem uma região N-terminal (Figura 10) com uma sequência sinal que as direciona para a via secretória e um pró-domínio que possui função na maturação, pois sua presença mantém o domínio metaloprotease inativo. A ativação deste domínio se dá através de um mecanismo de *cystein-switch* (BECKER *et al.*, 1995; SEALS & COURTNEIDGE, 2003; VAN WART & BIRKEDAL-HANSEN, 1990), no qual um resíduo conservado de cisteína, presente no pró-domínio, coordena o íon zinco ( $Zn^{2+}$ ) do sítio ativo e assim mantém o domínio metaloprotease na conformação inativa. Após a remoção do pró-domínio, o domínio metaloprotease torna-se ativo e é capaz de realizar suas funções catalíticas. Uma função secundária sugerida para o pró-domínio seria a de chaperona, possibilitando a configuração estrutural apropriada para a proteína como um todo ou especificamente para o domínio metaloprotease (SEALS & COURTNEIDGE, 2003).

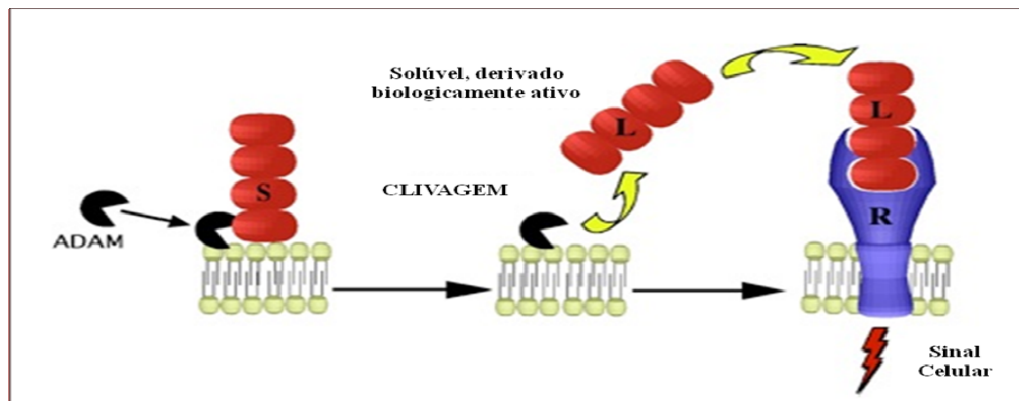
Portanto, o pró-domínio é necessário para manter a latência destas proteínas, na estruturação do sítio catalítico ativo e na própria passagem das ADAMs ao longo da via secretória.

### **1.5.2- DOMÍNIO METALOPROTEASE**

Todas as ADAMs possuem um domínio metaloprotease, sendo que em apenas 17 das 29 ADAMs de mamíferos (Tabela 4) a atividade está presente devido à conservação do motivo de ligação ao  $Zn^{2+}$  (WHITE, 2003). O domínio metaloprotease é responsável pelo processamento hidrolítico dos substratos das ADAMs. Três resíduos conservados de histidina e um de metionina coordenam o  $Zn^{2+}$  do sítio ativo. O resíduo de metionina faz parte de um motivo denominado de *Met turn* que flanqueia o motivo consenso HExxHxxGxxH (SEALS & COURTNEIDGE, 2003; WOLFSBERG *et al.*, 1995; WOLFSBERG & WHITE, 1996).

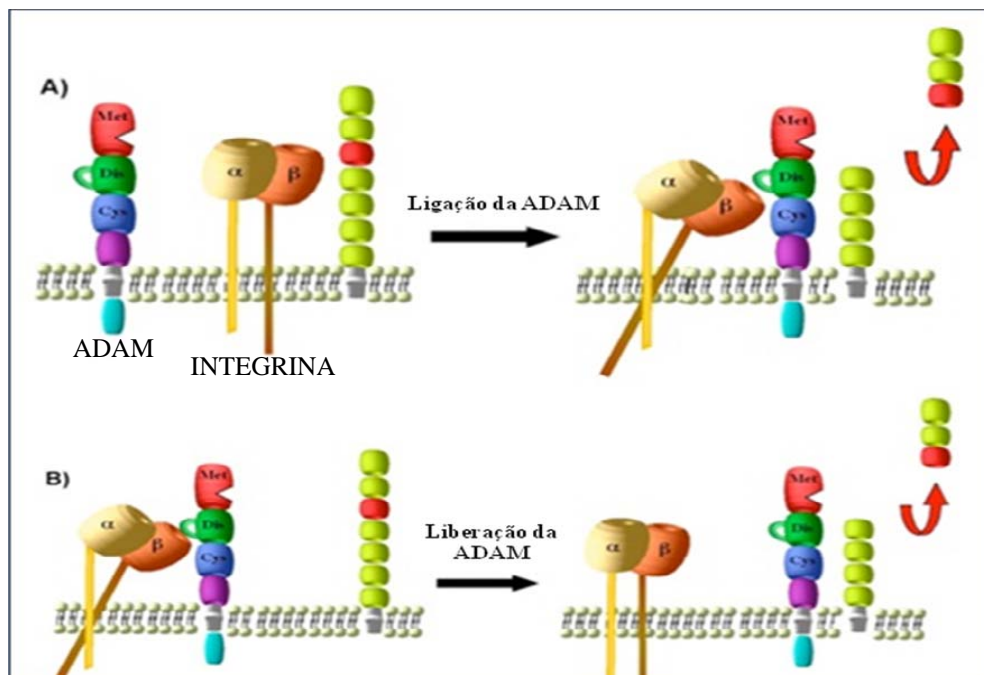
Os inibidores da atividade do domínio metaloprotease das ADAMs podem ser divididos em quatro classes: os que agem por denaturação, os quelantes de  $Zn^{2+}$ , as moléculas pequenas inibidoras do mecanismo de catálise e os inibidores protéicos chamados TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteases*). O domínio N-terminal dos TIMPs se adapta encaixando-se dentro do sítio catalítico das metaloproteases e o domínio C-terminal provavelmente está relacionado à especificidade destes inibidores para seus substratos (SEALS & COURTNEIDGE, 2003).

O domínio metaloprotease foi mais bem caracterizado por sua capacidade de executar a função crítica de clivagem de ectodomínios. A figura abaixo ilustra o papel do domínio metaloprotease da ADAM na ativação de sinalização mediada por receptores. A ADAM reconhece um substrato ancorado na membrana e cliva o mesmo, resultando em um ligante solúvel que pode difundir-se e interagir com o seu receptor em outro local. Desta forma, a ADAM participa da sinalização mediada por outras moléculas presentes na membrana (BRIDGES & BOWDITCH, 2005; WHITE *et al.*, 2005).



**Figura 12** – Desenho esquemático acima mostra o papel do domínio metaloprotease da ADAM na ativação de sinalização mediada por receptores. Extraído e modificado de BRIDGES & BOWDITCH, 2005 e WHITE *et al.*, 2005.

A clivagem realizada pelas ADAMs também podem ocorrer em conjunto com as integrinas, sugerindo-se dois modelos de ação (Figura 13). No primeiro (A), a ADAM associa-se com a integrina, facilitando o reconhecimento da localização do substrato da ADAM e proporcionando a clivagem proteolítica. No outro modelo (B), a associação da integrina com a ADAM impediria a clivagem, que só ocorreria após a liberação da ADAM pela integrina. Após a dissociação do complexo ADAM-integrina, a ADAM poderia difundir livremente pela membrana e encontrar seu substrato para clivagem (BRIDGES & BOWDITCH, 2005; WHITE *et al.*, 2005).



**Figura 13** – Desenho esquemático acima mostra que clivagem realizada pelas ADAMs também podem ocorrer em conjunto com as integrinas, sugerindo-se dois modelos de ação (A) e (B). Extraído e modificado de BRIDGES & BOWDITCH, 2005 e WHITE *et al.*, 2005.



**Tabela 4** – As ADAMs humanas \*.

ADAM	Nome comum	Função provável	Expressão
ADAM2	Fertilin- $\beta$ , PH-30 $\beta$	Ligação/fusão espermatozóide/óvulo	Testículo
ADAM7	EAP1, GP-83		Epidídimo
ADAM8	MS2, CD156	Infiltração Neutrofil, clivagem da CD23	Granulócitos/Monócitos, Macrófagos, Neutrofil
ADAM9	Meltrin- $\gamma$ , MDC9, MCMP	Migração celular, clivagem de ectodomínios, digestão de fibronectina e gelatina	Células Somáticas
ADAM10	Kuz, MADM, SUP-17	Clivagem de ectodomínios, destino celular, digestão do colágeno IV, gelatina e proteína básica mielina.	Células Somáticas (Rins, Cérebro, Condrócitos)
ADAM11	MDC	Repressor tumoral	Cérebro
ADAM12	Meltrin- $\alpha$ , MCMP, MLTN, MLTNA	Clivagem de ectodomínios, Fusão de mioblastos, digestão do colágeno IV, gelatina e fibronctina, digestão de IGFBP-3 e 5	Células Somáticas (Osteoblasto, Músculo, Condrócitos, Placenta)
ADAM15	Metagirdin, MDC15	Ligação célula-célula, digestão do colágeno IV e gelatina, Expressão na aterosclerose	Células Somáticas (Célula do Músculo Liso, Condrócitos, Célula Endotelial, Osteoclasto)
ADAM17	TACE	Clivagem de ectodomínios	Células Somáticas, Macrófagos
ADAM18	Tmdciiii		Testículo
ADAM19	Meltrin- $\beta$ , MADDAM, FKSG34	Clivagem de ectodomínios, Desenv. Células dendríticas, digestão de neuregulina	Células Somáticas
ADAM20			Testículo
ADAM21	ADAM 31		Testículo
ADAM22	MDC2		Cérebro
ADAM23	MDC3	Adesão Celular, Desenv. Neural	Cérebro, Coração
ADAM28	e-MCD II, MDC-Lm	Vigilância imune, digestão proteína básica mielina e IGFBP-3	Epidídimo, Pulmões, Linfócitos, Pâncreas, Útero
ADAM29	svph1		Testículo
ADAM30	svph4		Testículo
ADAM33		Ligada geneticamente com asma, clivagem de APP, KL-1 e cadeia B insulina	Células Somáticas (Pulmões, Músculo Liso)

\* Extraído e modificado de MOCHIZUKI & OKADA, 2007e SEALS & COURTNEIDGE, 2003.

### **1.5.3- DOMÍNIO DESINTEGRINA**

O domínio desintegrina das ADAMs é ligante de integrinas ou de outros receptores (WOLFSBERG *et al.*, 1995). O nome desintegrina é dado para descrever a função deste domínio na ligação com as integrinas (SEALS & COURTNEIDGE, 2003).

Estruturalmente, as ADAMs estão relacionadas com as SVMPs da classe PIII, porém, a maioria das ADAMs possui domínios adicionais (EGF-like, transmembrana e citoplasmático), os quais não estão presentes nas SVMPs. Uma diferença adicional entre estas famílias é que as SVMPs são proteínas secretadas, considerando que as ADAMs estão, em sua maioria, ligadas a membrana (DUFFY *et al.*, 2003; IBA *et al.*, 1999).

O domínio desintegrina das ADAMs consiste de aproximadamente 90 aminoácidos. A maioria dos ligantes de integrinas interage com os seus substratos via seqüência RGD (Arg-Gly-Asp) (DUFFY *et al.*, 2003). O domínio desintegrina da ADAM15 é o único a possuir a seqüência RGD, o qual se associa com as integrinas  $\alpha_v\beta_3$  ou  $\alpha_5\beta_1$  (DUFFY *et al.*, 2003; WOFSEBERG, 1995; WOFSEBERG & WHITE, 1996). As ADAMs 2 e 9, fazem ligação com a integrina  $\alpha_6\beta_1$  através de um tripeptídeo ECD (Glu-Cys-Asp) (DUFFY *et al.*, 2003; SEALS & COURTNEIDGE, 2003). Entretanto, as bases estruturais e os detalhes da ligação entre ADAMs e as integrinas ainda não estão completamente elucidadas, bem como os efeitos biológicos resultantes desta ligação.

#### **1.5.4- DOMÍNIOS RICO EM CISTEÍNA E TIPO EGF**

O domínio rico em cisteína é caracterizado pela presença de elevado número de resíduos deste aminoácido (cerca de 160 aminoácidos com 10 a 14 resíduos de cisteína). Já o domínio tipo EGF possui cerca de 40 aminoácidos e 6 resíduos de cisteína (SEALS & COURTNEIDGE, 2003). Acredita-se que tal domínio possa participar na manutenção da estrutura do domínio desintegrina ou que esteja envolvido em interações com ligantes (JIA *et al.*, 1996). Foi notado originalmente que as ADAMs 1, 3, 12, e 14 apresentam um motivo em seu domínio rico em cisteína muito similar às seqüências encontradas em peptídeos de fusão viral (BLOBEL & WHITE, 1992). Além disso, já foi descrito que o domínio rico em cisteína age como um ligante para a adesão celular da molécula sindecan (MILLA *et al.*, 1999; REDDY *et al.*, 2000; SHI *et al.*, 2000).

#### **1.5.5- DOMÍNIO CITOPLASMÁTICO**

A região citoplasmática, ou domínio citoplasmático, está localizado C-terminalmente e pode variar amplamente entre as diferentes ADAMs, tanto em comprimento (40 a 250 aminoácidos) como em seqüência (DUFFY *et al.*, 2003). As ADAMs possuem uma cauda citoplasmática rica em prolina, serina, ácido glutâmico, lisina ou tirosina (WOLFSBERG *et al.*, 1995). A presença destes resíduos no domínio citoplasmático sugere sua participação em vias de transdução de sinais. A presença de resíduos de prolina, por exemplo, sugere a presença de sítios de ligação para proteínas associadas ao citoesqueleto ou para proteínas que contêm domínios de ligação SH3 (*Src homology 3*). Os resíduos de tirosina podem sofrer fosforilação e interagir com proteínas citoplasmáticas contendo sítio de ligação

SH2, o que novamente sugere o envolvimento das ADAMs em processos de sinalização intracelular levando a regulação de sua e/ou ao controle de sua maturação e localização intracelular (DUFFY *et al.*, 2003; WOFSEBERG & WHITE, 1996).

### **1.5.6- PRINCIPAIS FUNÇÕES DAS ADAMs**

A organização das ADAMs em domínios sugere sua participação em importantes e variadas funções fisiológicas, incluindo proteólise, processamento de formas precursoras de fatores de crescimento, adesão e fusão celular, interações célula-célula e célula-MEC e sinalização celular (BLACK & WHITE, 1998).

Estudos recentes mostram os diferentes processos biológicos nos quais as ADAMs estão envolvidas, incluindo a fertilização, a neurogênese, a miogênese, a liberação embrionária de TGF- $\alpha$ , a clivagem de ectodomínios de proteínas de membrana, migração, proliferação, sobrevivência celular, resposta inflamatória (BLOBEL *et al.*, 1992), doenças humanas (como por exemplo, câncer, hipertrofia cardíaca, asma, artrite, aterosclerose, doença de Alzheimer e infecções bacterianas), entre outros processos (DUFFY *et al.*, 2003; SEALS & COURTNEIDGE, 2003).

Aumento da proliferação celular, invasão e metástase são as características oficiais da progressão do câncer. Várias ADAMs podem liberar formas ativas de fatores de crescimento específicos, como por exemplo a heparina madura, que se liga ao fator de crescimento epidérmico (HB-EGF), um mitógeno para células lisas e certos tipos de fibroblastos liberado pelas ADAMs 9, 10 e 12 (DUFFY, *et al.*, 2003). Células tumorais, muitas vezes móveis e invasivas, produzem fatores de crescimento e sua proliferação independente dos fatores de crescimento exógenos contribui com sua tumorigenicidade. Baseado em suas atividades já conhecidas, ou seja, de seu papel na regulação da clivagem dos fatores de crescimento em células normais, alguns ou determinados membros da família das ADAMs podem estar envolvidas nestes processos também em células tumorais (SEALS & COURTNEIDGE, 2003). A ADAM9 tem sua expressão aumentada em um grande número de carcinomas humanos, entre eles, próstata, mama e intestino (MAZZOCA *et al.*, 2005; MOCHIZUKI & OKADA, 2007; ZHOU *et al.*, 2001). Outras ADAMs, como a ADAM10, 12, 15 e 17, também apresentam sua expressão aumentada em diversos carcinomas humanos (DUFFY *et al.*, 2003; IBA *et al.*, 1999; SEALS & COURTNEIDGE, 2003).

Algumas ADAMs, como as ADAMs9, 10 e 17, desempenham funções de  $\alpha$ -secretase. A primeira causa da doença de Alzheimer é a acumulação do peptídeo  $\beta$ -amilóide

(A $\beta$ ) no córtex cerebral. O peptídeo A $\beta$  é derivado de uma proteína transmembrana conhecida como proteína precursora amilóide (APP), sendo que esta pode ser degradada por proteases, tais como a  $\alpha$ - $\beta$ - e  $\gamma$ -secretase (ASAI *et al.*, 2003; DUFFY *et al.*, 2003; SEALS & COURTNEIDGE, 2003).

## **1.6- ADAM9**

A ADAM9 (MDC9 ou meltrin  $\gamma$ ) é um importante membro desta família de glicoproteínas ancoradas na membrana (FRITZSCHE *et al.*, 2008<sup>b</sup>; FRITZSCHE *et al.*, 2008<sup>a</sup>; ZUBEL *et al.*, 2009). Trata-se de uma molécula de adesão que interage com a integrina  $\alpha_V\beta_5$ , está envolvida no processamento proteolítico (clivagem de ectodomínio) do fator de crescimento tipo fator de crescimento epidérmico ligado à heparina (HB-EGF) e ancorado à membrana (FRITZSCHE *et al.*, 2008<sup>b</sup>; FRITZSCHE *et al.*, 2008<sup>a</sup>; GRÜTZMANN *et al.*, 2004). Além disso, essa proteína está envolvida em processos celulares, tais como adesão celular, migração e sinalização (ZUBEL *et al.*, 2009). A ADAM9 também pode estar essencialmente envolvida na carcinogênese e progressão tumoral, pois participa da atividade do receptor de EGF e por promover a invasão das células de câncer via regulação de E-caderina e diversos tipos de integrinas (FRITZSCHE *et al.*, 2008<sup>b</sup>). Diversos estudos mostram a ADAM9 como uma proteína com potente atividade biológica, ou seja, o domínio metaloprotease da ADAM9 pode clivar a cadeia  $\beta$  da insulina, fator de necrose tumoral  $\alpha$ , gelatina, caseína- $\beta$  e fibronectina, e induzir a liberação do EGF, do receptor do fator de crescimento fibroblástico 2IIIB ou do fator de crescimento tipo EGF que se liga à heparina. Além disso, o domínio desintegrina da ADAM9 contém o motivo ECD (Glu-Cys-Asp), que pode participar da adesão celular via integrinas  $\alpha_6\beta_1$  e  $\alpha_V\beta_5$ . A cauda citoplasmática da ADAM9 apresenta um motivo de ligação a SH3, o qual interage com importantes proteínas regulatórias, tais como endofilina 1 (SH3GL2) e SH3PX1 (SUNG *et al.*, 2006).

Embora ADAM9 seja considerada uma proteína transmembrana, uma forma solúvel ADAM9-S foi descrita (HOTODA *et al.*, 2002). A ADAM9-S é derivada de um *splicing* alternativo do gene que codifica para a ADAM9. Essa proteína solúvel promove o fenótipo invasivo em linhagens celulares de carcinoma. Um modelo proposto para metástase hepática por MAZZOCCA *et al.* (2005), mostraram que a ADAM9-S liberada pelas células hepáticas ativadas se liga às integrinas  $\alpha_6\beta_4$  e  $\alpha_2\beta_1$  na superfície do tumor, e através de sua atividade proteolítica, ADAM9-S promove a invasão pela degradação dos componentes da

membrana basal, incluindo laminina-1, e desta forma permitindo que células tumorais invadam a matriz ao seu redor (MAZZOCCA *et al.*, 2005).

A expressão aumentada da ADAM9 tem sido reportada em diversos carcinomas humanos, tais como carcinomas de rim (FRITZSCHE *et al.*, 2008<sup>a</sup>), próstata (FRITZSCHE *et al.*, 2008<sup>b</sup>), mama (O'SHEA *et al.*, 2003), fígado (TANNAPFEL *et al.*, 2003), pâncreas (GRÜTZMANN *et al.*, 2004; MOCHIZUKI & OKADA, 2007), estômago (CARL-McGRATH *et al.*, 2005; MOCHIZUKI & OKADA, 2007) e intestino (PEDUTO *et al.*, 2005). Da mesma forma, a ADAM9 também tem sua expressão aumentada em melanoma (MOCHIZUKI & OKADA, 2007).

Um estudo experimental utilizando um modelo de rato demonstrou que ADAM9 contribui para a carcinogênese prostática por clivagem de ligantes do receptor EGF e do receptor do fator de crescimento fibroblástico (FGFR) (PEDUTO *et al.*, 2005). Além disso, a ADAM9 secretada por células estromais ativadas, parece induzir invasão celular de carcinoma cólon (*in vitro*) através de ligação as integrinas  $\alpha_6\beta_4$  e  $\alpha_2\beta_1$  (MAZZOCCA *et al.*, 2005). A ADAM9 aumenta a adesão e invasão de células de carcinoma de pulmão através da modulação de moléculas de adesão, tal como a integrina  $\alpha_3\beta_1$ , e sensibilidade de fatores de crescimento, e, desta forma, promove a capacidade de metástase para o cérebro. Assim, a ADAM9 desempenha um papel importante na tumorigênese, invasão e metástases através da modulação da função da atividade do fator de crescimento e de integrinas (MAZZOCCA *et al.*, 2005; SHINTANI *et al.*, 2004).

O gene que codifica a ADAM9 localiza-se no cromossomo 8, mais precisamente na posição 8p11.23. A seqüência de nucleotídeos do cDNA da ADAM9 (NM\_001005845) correspondente possui 4005 pares de bases. Essa seqüência é traduzida em 819 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 91kDa (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### **1.7- SILENCIAMENTO DE RNA**

A conclusão do seqüenciamento do genoma humano em 2003 e intensos estudos sobre genes que participam de diversas doenças, entre elas, a progressão do câncer e resistência terapêutica, identificaram muitos genes terapêuticos alvos que regulam apoptose, proliferação, migração e sinalização celular. Moléculas que podem inibir a expressão desses genes são ferramentas poderosas na investigação oncológica. Desta forma, a medicina moderna vem enfrentando uma importante transformação no que diz respeito à terapêutica, ou

seja, drogas farmacológicas e intervenções cirúrgicas estão sendo gradativamente substituídas por terapias gênicas, colocando a medicina moderna na chamada era da terapia gênica (TAKESHITA & OCHIYA, 2006).

Nas últimas décadas, muitos esforços centrados na descoberta de estratégias para supressão de seqüências gênicas específicas têm sido desenvolvidos, tais como oligonucleotídeos antisense (ODN-AS) e ribozimas (termo que deriva da combinação das palavras **enzima** e de ácido **ribonucléico**), porém suas aplicações como ferramentas terapêuticas não foram possíveis. Entretanto, na década passada, mais precisamente em 1998, uma nova estratégia de silenciamento gênico utilizando o RNA de interferência (RNAi) foi descoberta, sendo considerada um dos grandes avanços da biologia molecular (FIRE *et al.*, 1998). RNAi tornou-se rapidamente uma poderosa ferramenta para a descoberta de drogas, validação alvo em cultura celular, potencial aplicação terapêutica, diagnósticos moleculares e agora, tem mostrado amplos esforços envolvendo ODN-AS e ribozimas (JAIN, 2006; TAKESHITA & OCHIYA, 2006).

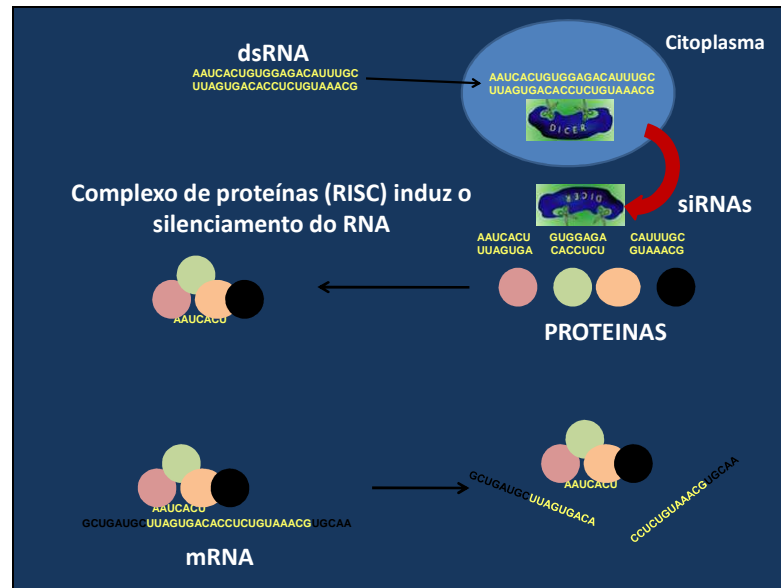
O RNA de interferência (RNAi) é um processo pós-transcricional ativado pela introdução de um RNA de dupla fita (“*double strand RNA*” - dsRNA), levando ao silenciamento de um gene com uma seqüência específica. Este mecanismo tem sido relatado como uma ocorrência natural em diversos organismos como nematóides, plantas, *Neurospora*, *Drosófila* spp, mamíferos e fungos (MELLO & CONTE JR, 2004; WALL & SHI, 2003), sugerindo ser um fenômeno universal em organismos eucariotos (VINEY & THOMPSON, 2008). O RNA de interferência em animais, co-supressão em plantas e “*quelling*” (submissão) em fungos, parece ser uma manifestação do mecanismo de defesa celular contra invasão de ácidos nucléicos estranhos, tais como vírus, transposons e outros agentes patogênicos (HAJERI & SINGH, 2008). Desta forma, este fenômeno foi inicialmente caracterizado como um mecanismo de defesa celular (KETTING *et al.*, 1999; TIJSTERMAN *et al.*, 2002). Segundo MELLO & CONTE JR (2004) diversos organismos quando expostos a materiais genéticos estranhos (RNA ou DNA) organizam uma maquinaria altamente específica contra ataques para silenciar a invasão dessas seqüências de ácidos nucléicos antes delas se integrarem ao genoma do hospedeiro ou subverterem os processos celulares, sendo que no centro dessa seqüência dirigida ao mecanismo de imunidade está o dsRNA.

Após a descoberta do RNA de interferência em *Caenorhabditis elegans* (FIRE *et al.*, 1998) como uma poderosa ferramenta para o estudo das funções dos genes, essa técnica tem sido usada extensivamente em numerosos organismos, incluindo *Drosophila melanogaster* (KENNERDELL & CARTHEW, 1998; MISQUITTA & PATERSON, 1999),

plantas (NAPOLI *et al.*, 1990), fungos (ROMANO & MACINO, 1992), peixe-zebra (WARGELIUS *et al.*, 1999), planária (SANCHEZ ALVARADO & NEWMARK, 1999) e em mamíferos (SVOBODA *et al.*, 2000; WIANNY & ZERNICKA-GOETZ, 2000), sendo que em todos os casos a quantidade enorme de dados funcionais gerados pelo RNAi tem sido um grande passo para o entendimento da função gênica nesses organismos (FORTUNATO & FRASER, 2005; PERSENGIEV *et al.*, 2004; VINEY & THOMPSON, 2008).

Existem duas formas de RNA envolvidas no RNAi: miRNAs (microRNA) e siRNAs (“*small interference RNA*”) (FIRE *et al.*, 1998). Os miRNA são RNAs endógenos (intrínsecos), ou seja, pertencem ao organismo, apresentam cerca de 22 pares de bases (REINHART *et al.*, 2002) e exibem importantes papéis regulatórios em animais e plantas: induzem a degradação de mRNAs ou reprimem sua tradução. Já os siRNAs são RNAs de interferência sintéticos (extrínsecos) (RAO *et al.*, 2009). O RNAi também pode ser induzido em células de mamíferos introduzindo pequenos RNAs de interferência sintéticos (siRNA) contendo de 21-23 pares de bases ou também por sistemas de vetores virais e plasmídios que expressam pequenos RNAs *hairpin* (estrutura de grampo) (shRNA) que são posteriormente transformados em siRNA pela maquinaria celular (LENZ, 2005; TAKESHITA & OCHIYA, 2006).

As proteínas que participam do mecanismo de RNAi são parte de uma via celular evolutivamente conservada. Neste mecanismo, seqüências específicas levam ao silenciamento pós-transcricional de genes específicos, por intermédio de moléculas de RNAs de dupla fita (dsRNA) como um sinal para desencadear a degradação do mRNA homólogo, sendo que este mecanismo pelo qual dsRNA induz em silenciamento gênico envolve um processo de duas etapas: primeiramente os dsRNAs são reconhecidos por uma enzima chamada de ribonuclease III (DICER), que cliva os dsRNAs em pequenos RNAs de aproximadamente 21-23 pares de bases. Esses pequenos RNAs de interferência (siRNA) são incorporados em um complexo de proteínas multicomponente chamado de complexo específico de silenciamento de RNA (RISC), que reconhece um mRNA complementar e o induz à degradação, e conseqüentemente resultando no silenciamento gênico (Figura 14) (PERSENGIEV *et al.*, 2004; ZAWADZKI *et al.*, 2006).



**Figura 14** – Uma dupla fita de RNA longa (dsRNA) desencadeia a via do RNAi. A Nucleíase citoplasmática DICER primeiramente cliva o RNA de dupla fita (dsRNA) em seqüências menores contendo de 21-23 pares de bases chamadas de pequenos RNAs de interferência (siRNAs), que então se desenrola e une-se ao complexo de silenciamento de RNA (RISCs). A seqüência antisense do siRNA guia o complexo RISC para as moléculas de RNA complementar, e o RISC cliva o RNA mensageiro (mRNA), levando ao específico silenciamento gênico.

O complexo RISC é formado por um membro da família de proteína Argonauta e uma seqüência guia (antisense ao RNA alvo). Este complexo é responsável pela localização das seqüências nos RNAs mensageiros alvos que possuem seqüências complementares idênticas as fitas guias e clivagem dessas seqüências específicas dos mRNAs dentro da célula. O complexo RISC age clivando o mRNA-alvo no meio da região complementar [dez nucleotídeos “*upstream*”] do nucleotídeo pareado com a região 5’ do siRNA guia), e uma proteína da família da Argonauta provavelmente age como endonuclease clivando o mRNA-alvo, e desta forma resultando na degradação do mRNA (Figura 14) (BAULCOMBE, 2007; SOUZA *et al.*, 2007; WALL & SHI, 2003).

O mecanismo de RNAi em mamíferos foi primeiramente descrito em embriões de camundongos usando longas fitas de RNA dupla fita (SVOBODA *et al.*, 2000, WIANNY & ZERNICKA-GOETZ, 2000). Posteriormente, ELBASHIR *et al.* (2001<sup>a</sup>) foram os primeiros a mostrar o silenciamento gênico utilizando siRNA em células de mamíferos em cultura. Esses autores mostraram que duplex siRNAs contendo 21 nucleotídeos especificamente são capazes suprir a expressão de genes endógenos e heterólogos em diferentes linhagens celulares de mamíferos, tais como células embrionárias do rim humano e células HeLa. Desta forma, foi este grupo de pesquisadores o responsável por demonstrar que



a maioria das células dos mamíferos organizam uma potente resposta antiviral em relação à introdução de dsRNAs superiores a 30 pares de bases, sendo assim, a transfecção dessas células com duplex siRNAs contendo 21 nucleotídeos proporciona uma nova ferramenta para o estudo das funções gênicas em mamíferos, tornando-se potencialmente útil para aplicações terapêuticas (ELBASHIR *et al.*, 2001<sup>b</sup>; ELBASHIR *et al.*, 2002).

A descoberta do papel dos miRNAs em diversos processos patológicos abriu possíveis aplicações nos diagnósticos moleculares, especialmente no câncer, pois a expressão aumentada de miRNAs é uma assinatura para diversos tipos de cânceres (JAIN, 2006).

As primeiras aplicações da tecnologia do RNAi no campo da oncologia incluiu a busca de oncogenes dominantes mutantes, oncogenes amplificados, produtos de translocação e oncogenes virais, esta técnica também proporcionou a oportunidade de definir o papel de novas moléculas de sinalização, tal como a *polo-like* quinase (PLK) em tumorigênese (CHENG *et al.*, 2003).

Várias descobertas foram possíveis após tais pesquisas, tais como SUN *et al.* (2008) utilizando a técnica do RNAi, os quais silenciaram o VEGF-C (fator-C de crescimento do endotélio vascular) em células de câncer de mama linhagem MCF-7, e puderam observar que a inibição da expressão do VEGF-C em linhagens celulares de câncer pode levar a uma regulação negativa de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e induzir a apoptose. Outro estudo com VEGF-C-siRNA mostrou ser uma ferramenta efetiva na inibição da expressão do VEGF-C por células tumorais do cólon do reto *in vivo* e *in vitro*, reduzindo assim a formação de vasos linfáticos, a angiogênese e a metástase de nodos linfáticos, aumentando assim a sobrevivência (XIAO-WEN *et al.*, 2008). GÖÖZ *et al.* (2009), observaram que diminuindo a expressão da proteína ADAM17 em HUVECs utilizando siRNA derivado de lentivírus, diminuiu a proliferação celular e a capacidade das células formarem contatos em culturas bidimensional. Além disso, as descobertas sugerem que a ADAM17 é parte de uma nova via pró-angiogênica, que leva a ativação da MMP-2 e a formação de novos vasos, sendo uma importante intermediária na sinalização de VEGF em HUVECs.

Portanto, os recentes progressos conquistados com o emprego da técnica do RNAi em tumorigênese trazem uma nova esperança para um tratamento específico do câncer (LENZ, 2005).

## **2. OBJETIVOS**

- Analisar a expressão da ADAM9 em diferentes linhagens de células tumorais (mama e próstata) e não tumorais, através de Western Blotting.
- Gerar clones *knockout* sem a expressão da glicoproteína ADAM9 utilizando a técnica de silenciamento de RNA e verificar o efeito da ausência desta proteína na capacidade invasiva de células tumorais.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1- Linhagens celulares e cultura celular**

Foram utilizadas células de tumor humano de mama (MDA-MB-231), células de tumor humano de próstata (DU-145 e PC-3), fibroblasto humano (FH) e células C2C12 (células de camundongo com características similares a células satélites). As células MDA-MB-231 foram gentilmente cedidas pelo Dr. Michel Crépin (INSERM, Paris, França). A Profa. Dra. Maria Luisa Vilela Oliva, (UNIFESP) cedeu gentilmente às células da linhagem PC-3. As células da linhagem DU-145 foram também gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Verônica Morandi (UERJ). Já as células FH, foram compradas do banco de células do Rio de Janeiro (<http://www.bcrj.hucff.ufrj.br/>). E as células da linhagem C2C12 foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari, da UNINOVE de São Paulo. As células MDA-MB-231, FH e C2C12, foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Gibco), contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), L-glutamina (2mM), penicilina (100U/ml), estreptomicina (100µg/ml) e anfotericina B (250UG/ml) (Gibco). Células DU-145 e PC-3 foram cultivadas em meio RPMI 1640, contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), L-glutamina (2mM), penicilina (100U/ml), estreptomicina (100µg/ml) e anfotericina B (250UG/ml) (Gibco). As culturas celulares foram mantidas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

#### **3.2- Detecção da ADAM9 em linhagens de células tumorais e não tumorais**

As células foram cultivadas em estufa *water-jacketed* na presença de 5% de CO<sub>2</sub> e em temperatura de 37°C até que as mesmas atingissem 80% de confluência nas garrafas médias. Em seguida, eram tripsinizadas e contadas. Em placas de Petri de 6cm de diâmetro foram plaqueadas 2x10<sup>6</sup> de células/placa de cada linhagem celular testada, e em 5ml de meio de cultura. Após 24 horas de incubação em estufa, o meio de cultura foi retirado das placas e as células foram lavadas com 2ml de PBS 1X (tampão salina fosfato), e posteriormente as células foram lisadas com tampão de lise contendo: [NaCl (150mM), Hepes (50mM), MgCl<sub>2</sub> (1,5mM), Triton X-100 (1%), SDS (0,1%) e coquetel inibidor de proteases da Sigma (S2711)], NaF (100mM) e Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (100mM), sendo: 425µl de tampão de lise, 25µl de NaF e 50µl de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, e todas as manipulações foram realizadas em gelo, para a obtenção

da proteína de interesse. A concentração protéica foi determinada, e em seguida 30µg de cada amostra foi aplicada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate Poliacrylamide Gel Electrophoresis*, LAEMMLI, 1970).

### **3.3- Dosagem de proteínas**

A determinação da concentração protéica das amostras foi realizada utilizando o *kit* de detecção colorimétrica BCA (*BCA Protein Assay*, Pierce).

Foi feita uma solução com 50 partes do reagente **A** para 1 parte do reagente **B** do *kit* BCA. Foi colocado 200µl dessa solução em cada poço da placa de 96 poços. A curva padrão foi feita com diluição de soro albumina bovina (BSA) nas seguintes concentrações: 30µg/ml, 60µg/ml, 125µg/ml, 250µg/ml, 500µg/ml, 1.000µg/ml, e 2.000µg/ml. Após a adição de 200µl da mistura dos reagentes A e B em cada poço, foram adicionados 10µl de cada solução de amostra e solução da curva padrão. A placa foi incubada em estufa a 37°C por 30 minutos. Retirada da estufa, a placa foi resfriada em temperatura ambiente e em seguida foi realizada a leitura no leitor de placa (*Dynex Revelation 4.02 - software*) com comprimento de onda de 595nm.

### **3.4- SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Poliacrylamide Gel Electrophoresis*)**

A expressão da ADAM9 em células tumorais (MDA-MB-231 e DU-145) e células não tumorais (FH e C2C12) foi acompanhada por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (LAEMMLI, 1970), utilizando o sistema miniVE *Vertical Electrophoresis System* (Hoefer). O gel de empilhamento foi preparado em uma concentração de 5% de poliacrilamida, enquanto para o gel de separação foi utilizada a concentração de 10%. Sendo assim, o perfil eletroforético das amostras foi obtido através de géis de poliacrilamida preparados da seguinte forma:

**Tabela 5** - Soluções e volumes utilizados para a confecção do gel de poliacrilamida 10%.

Reagentes da solução	Gel de separação (1 gel) 10%	Gel de empilhamento (1 gel) 5%
Tris HCl 1,5 M pH 8,8	1,3ml	-----
Tris HCl 1,0 M pH 6,8	-----	130µl
Acrilamida/ Bis 30%	1,7ml	170µl
SDS 10 %	50µl	10µl
H2O Mili-Q	1,9ml	0,68ml
TEMED	50µl	10µl
PSA 10%	6µl	3µl

Para a aplicação das amostras (30µg) no gel foi usado um tampão de amostra que consistiu de: Tris-HCl 0,125M, pH 6,8, dodecil sulfato de sódio (4%, m/v), azul de bromofenol (0,025%, m/v) e glicerol (20%, v/v). Para a análise das amostras em condições redutoras, adicionou-se ao tampão de amostra o agente redutor β-mercaptoetanol (na concentração final de 0,1M), capaz de clivar as pontes dissulfeto presentes nas proteínas, em uma proporção de 1 de tampão de amostra para 2 de amostra. Antes da aplicação das amostras no gel, as mesmas foram fervidas durante 5 minutos a 100°C. Após o tratamento desnaturante, as amostras foram submetidas à eletroforese com uma corrente elétrica de 25mA e 70V no gel de empilhamento e 100V no gel de separação, por aproximadamente 1 hora e 30 minutos.

As bandas protéicas foram reveladas incubando os géis de poliacrilamida em solução corante contendo: 0,25% (v/v) de *Comassie Blue R-250* (Sigma, USA) dissolvido em 50% (v/v) de isopropanol e 10% (v/v) de ácido acético durante 30 minutos, e depois na solução descorante de 10% (v/v) de ácido acético e 10% (v/v) de metanol.

### **3.5- Western Blotting**

Para os ensaios de *Western Blotting*, as amostras de proteínas celulares obtidas a partir do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida, foram transferidas para membranas de nitrocelulose (*Immobilon-NC HAHY – Millipore*) em sistema de transferência MINI-V 8/10 (Gibco), para posterior incubação com os anticorpos. Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio (leite mólico em pó desnatado) até o dia seguinte.

No dia seguinte as membranas foram lavadas com tampão de TBST (*Tris-Buffered Saline Tween-20*), e em seguida as membranas foram incubadas por 2 horas com os seguintes anticorpos primários: anti-ADAM9 (1:1000) (N-Terminal ativo – Sigma - n°

catálogo A6977), anti- RP2ADAM9 (1:1000) (Abcam), anti- RP3ADAM9 (1:1000) (Abcam), anti-ADAM9D (1:1000) (produzido no laboratório - LBBM) e o anti-actina (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, INC - n° catálogo sc-1616).

Para verificar a presença da glicoproteína ADAM9 nas linhagens celulares descritas acima (item 3.1), foram utilizados quatro tipos diferentes de anticorpos, que tem como função detectar e localizar a ADAM9, sendo que cada um deles reconhece uma região específica dessa proteína. O anticorpo anti-ADAM9 N-Terminal ativo da Sigma, foi usado para a detecção e localização da ADAM9, ou seja, esse anticorpo reconhece a extremidade N-terminal e a ADAM9 ativa. Já o anticorpo anti-RP2ADAM9 reconhece a extremidade C-terminal. O anticorpo RP3ADAM9, assim como o anticorpo anti-ADAM9 N-terminal reconhece a extremidade N-terminal e ADAM9 ativa. E por último, o anticorpo anti-ADAM9D produzido no laboratório reconhece o domínio desintegrina desta proteína.

Posteriormente, as membranas foram incubadas com os seus respectivos anticorpos secundários marcados com fosfatase alcalina por 2 horas. Foram utilizados os seguintes anticorpos secundários: anticorpo de coelho produzido em cabra conjugado com fosfatase alcalina (1:5000) (Santa Cruz Biotechnology, INC - n° catálogo sc - 2007), anticorpo de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (1:5000) (Santa Cruz Biotechnology, INC - n° catálogo A3562), e anticorpo de cabra conjugado com fosfatase alcalina (1:5000) (Sigma – n° catálogo A4187).

Após as incubações com os devidos anticorpos secundários e lavagens, a ligação dos mesmos à proteína presente na membrana de nitrocelulose foi revelada utilizando o substrato BCIP/NBT (*Fast BCIP/NBT Buffered Substrate Tablet* – Sigma).

### **3.6- Zimografia**

A presença de atividade proteolítica foi determinada através da técnica de zimografia, conforme descrito por CLEUTJENS (1995), e adaptado para lisados celulares. Em placas de Petri de 6cm de diâmetro foram plaqueadas  $2 \times 10^6$  células/placa de cada linhagem celular testada (item 3.1) e 5ml de meio de cultura. Após 24 horas de incubação em estufa, o meio de cultura foi retirado das placas e as células foram lavadas com 2ml de PBS 1X (tampão salina fosfato). Em seguida, foram lisadas acrescentando-se 500µl de tampão de lise contendo: 0,2% de Triton X-100 em 0,2M de Tris-HCl (pH 7,4), e sem coquetel inibidor de proteases, por 5 minutos. Após este tempo, o material foi centrifugado por 10 minutos, 4°C em 13000 x g.

O teor de proteínas das amostras foi dosado conforme a metodologia descrita no item acima (item 3.3). As amostras foram concentradas (ou não) de maneira que cada poço do gel de zimografia continha 20µg de proteína em 10µl de tampão de amostra sem β-mercapto (agente redutor), totalizando 30µl de solução por poço. As amostras foram resolvidas por eletroforese em gel de policriamida contendo SDS e gelatina na concentração final de 2mg/ml. Após a corrida, o gel foi lavado uma vez durante 30 minutos em solução 2,5% de Triton X-100 para remoção do SDS.

O gel foi incubado no tampão de substrato (Tris-HCl 50mM pH 8,0, CaCl<sub>2</sub> mM e NaN<sub>3</sub> 0,02%), a 37°C, durante aproximadamente 20 horas. Após este tempo, o gel foi corado com *Coomassie Blue Brilliant R-250* (Bio-Rad) por 1 hora e 30 minutos, e descorado com ácido acético: metanol: água (1:4:5) para visualização das áreas de atividade.

Para diferenciar a expressão de metalopeptidases ou de serinoproteinasas, foram adicionados 4µl de EDTA às amostras (concentração final de 450mM), pois as metalopeptidases têm sua atividade inibida na presença de EDTA, e 4ml de EDTA (450mM) no tampão de incubação.

Foi utilizado o software “Kodak Digital Science 1D” para fotografar os géis e visualizar a atividade proteolítica das bandas. Apesar das diferenças nas intensidades das bandas de atividade proteolítica serem facilmente visualizadas no gel (Figura 20), estas bandas também foram quantificadas por meio de uma leitura da intensidade média das bandas em unidades arbitrárias (UA), com auxílio do *software Adobe Photoshop* e do Programa *GeneTools v3.06 software* (Syngene, Cambridge, UK). Para a quantificação das bandas, os géis foram confeccionados em quadruplicata (ensaios independentes) e foi calculada a intensidade média de cada banda e em cada gel, porém não foram comparadas entre si por se tratar de linhagens celulares diferentes.

### **3.7- Ensaio de Inibição da Adesão**

Para o ensaio de inibição da adesão celular, o colágeno tipo I (1µg/100µl/poço) diluído em ácido acético 0,1% foi imobilizado por 12 horas em placa de 96 poços (Falcon, Pittsburg, PA) a 4°C. Após este tempo, foi feito o bloqueio dos poços com soroalbumina bovina (solução de BSA 1% solubilizada em tampão de adesão: HEPES 20mM acrescido de NaCl 150mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM e MnCl<sub>2</sub> 0,25mM, pH 7,4 – 200µl/poço) por 2 horas. O bloqueio foi feito com o intuito de certificar que a adesão das células fosse somente à proteína imobilizada nos poços, já que sobre BSA não ocorre adesão celular. Após o bloqueio, as

células ( $5 \times 10^6$  células/ml) foram marcadas através da incubação destas com  $12,5 \mu\text{M}$  de diacetato 5-clorometilfluoresceína (CMFDA) em tampão de adesão por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Após a lavagem das células com o mesmo tampão de adesão para a retirada do excesso de CMFDA, os anticorpos anti-RP3ADAM9 (1:1000) (Abcam) ou anti-ADAM9D (1:1000) (produzido em nosso laboratório) foram adicionados às células numa concentração de  $7,14 \mu\text{g}$ ,  $17,85 \mu\text{g}$ ,  $35,71 \mu\text{g}$  e  $53,57 \mu\text{g}$  para o anticorpo anti-ADAM9D e  $1,0 \mu\text{g}$ ,  $2,5 \mu\text{g}$ ,  $5,0 \mu\text{g}$  e  $7,0 \mu\text{g}$  para o anticorpo anti-ADAM9RP3) e estas foram transferidas para a placa de 96 poços ( $1 \times 10^5$  células/poço), e incubadas por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Após a lavagem dos poços com o tampão de adesão para a retirada das células não aderidas, as células remanescentes foram lisadas com Triton X-100 ( $100 \mu\text{l/poço}$ ) 0,5% e foram novamente incubadas por mais 30 minutos em estufa e protegidas da luz. Os poços recobertos por colágeno tipo I, que só receberam as células sem os anticorpos foram chamados de controle positivo de adesão, e como controle negativo, os poços que receberam somente BSA 1% e células marcadas. O registro da fluorescência das placas foi realizado no Fluorímetro SpectraMax Gemini XS (*Molecular Devices*, Sunnyvale, CA) com filtros de excitação de 485nm e emissão de 538nm. O programa utilizado foi o SOFTmax PRO versão 3.1.2 (*Molecular Devices*, Sunnyvale, CA). Todos os experimentos foram realizados em triplicata em um mínimo de três repetições para cada experimento (três experimentos independentes em triplicata).

### **3.8- Silenciamento de RNA (RNAi)**

Para esta técnica foi utilizado um kit (*Silencer<sup>®</sup> siRNA Starter Kit* – Ambion). O protocolo escolhido diferiu consideravelmente do recomendado pela Ambion. Ele foi baseado no protocolo utilizado pelo Instituto Ludwig, São Paulo, incorporando sugestões dos pesquisadores Érico Costa e Felícia Carvalher. As quantidades calculadas foram padronizadas para placas de 6 poços, no entanto esses valores foram adaptados para a placa de 6cm de diâmetro.

No primeiro dia antes da transfecção, aproximadamente  $2,0 \times 10^5$  células foram plaqueadas em 5ml de meio de cultura DMEM por placa, suplementado com 10% de FBS (soro fetal bovino), mas sem antibiótico e fungizona. Este número de células foi baseado em estudos anteriores utilizando confluência de 30% para cada placa, porém foi encontrado que para incubações superiores a 3 dias seria necessário usar 48% dessa quantidade inicial. Para este experimento foram usadas células da linhagem MDA-MB-231 e três diferentes tipos de tratamento: (i) células controle, sem tratamento com agente de transfecção e sem



silenciamento, (ii) células tratadas somente com agente de transfecção (Lipofectamina 2000, Invitrogen), e (iii) células silenciadas, tratadas com agente de transfecção e o *primer* de silenciamento do RNA (*Silencer<sup>®</sup> siRNA Starter Kit* – Ambion).

Cálculos:

- 100% confluência =  $5 \times 10^6$  para garrafas de  $75\text{cm}^2$ , mas foram usadas placas de  $6\text{cm} = 21\text{cm}^2$ , então:

-  $100\% = 5 \times (21/75) \times 10^6 = 1,4 \times 10^6$ , portanto 30% de confluência =  $0,42 \times 10^6$  de células/placa.

- 6 placas =  $6 \times 0,42 \times 10^6 = 2,5 \times 10^6$  células (6 placas x 5ml = 30ml meio de cultura), mas foram usadas  $0,2083 \times 10^6$  células/placa, ou seja, aproximadamente 47,7% da quantidade inicial. Sendo assim:

- 6 placas =  $6 \times \underline{0,2083 \times 10^6} = 1,25 \times 10^6$  células (6 placas x 5ml = 30ml meio de cultura).

Então, foram plaqueadas 12 placas de 6cm contendo cada uma  $0,2083 \times 10^6$  de células e 5ml de meio DMEM sem antibiótico e fungizona, sendo assim, cada tipo de tratamento foi feito em quadruplicata.

No segundo dia, 24 horas após o plaqueamento das células, o meio de cultura foi retirado e trocado, mas ainda foi adicionado meio de cultura DMEM sem antibiótico e sem fungizona. As quantidades de agente de transfecção (Lipofectamina 2000, Invitrogen) e de oligonucleotídeo de silenciamento do RNA já padronizadas, foram acrescentadas às placas da seguinte forma:

- **Etapa A:** em oito *ependorfs* (microtubos) (tubos – lipofectamina) foram colocados 10 $\mu$ l de lipofectamina e misturadas gentilmente com 490 $\mu$ l de OPTIMEM (Invitrogen) e incubados em temperatura ambiente por 5 minutos.

- **Etapa B:** em quatro outros *ependorfs* (tubos – siRNA/ADAM9) foram colocados a quantidade otimizada, 2,5 $\mu$ l (10nM), do oligonucleotídeo de silenciamento de RNA juntamente com 497,5 $\mu$ l do meio OPTIMEM.

- **Etapa C:** nesta etapa, quatro dos oito *ependorfs* da **etapa A** foram misturados gentilmente com os quatro da **etapa B**, ou seja, foi misturado o volume do *ependorf A* com o volume do **B**, completando um volume final de 1ml em cada *ependorf* (tubos – lipofectamina + siRNA). Nos quatro *ependorfs* restantes da **etapa A** apenas foi adicionado 500 $\mu$ l do meio OPTIMEM em cada um deles, com a finalidade de ficarem com o mesmo volume da mistura feita na **etapa C**, ou seja, 1ml. Finalizada as diluições, os oito *ependorfs* foram incubados por 20 minutos em temperatura ambiente.

- **Etapa D:** transcorrido o tempo de incubação esta mistura foi adicionada gentilmente às placas devidamente identificadas (com as células MDA-MB-231), completando um volume final de 5ml. Sendo assim, **(i)** nas células controle, sem tratamento com agente de transfecção e sem *primer* de silenciamento (siRNA/ADAM9), apenas foi adicionado **1ml de OPTIMEM** + 4ml de meio de cultura sem antibiótico e fungizona; **(ii)** nas células tratadas somente com agente de transfecção (Lipofectamina 2000, Invitrogen) foi adicionado a mistura contida nos **tubos – lipofectamina** + 4ml de meio de cultura sem antibiótico e fungizona; **(iii)** e células silenciadas, tratadas com agente de transfecção e o *primer* de silenciamento do RNA (siRNA/ADAM9) (*Silencer<sup>®</sup> siRNA Starter Kit* – Ambion) foi adicionado a mistura contida nos **tubos lipofectamina + siRNA** + 4ml de meio de cultura sem antibiótico e fungizona.

No terceiro dia, 24 horas após a transfecção e silenciamento, o meio de cultura foi removido e trocado, ou seja, foram adicionados a cada placa 5ml de meio, sendo que neste momento já foi possível utilizar meio de cultura DMEM com antibiótico e fungizona. No quarto dia, 48 horas após a transfecção, o meio de cultura foi removido e trocado novamente. E, 72 horas após a transfecção as células foram lavadas com PBS (1X) e retiradas das placas utilizando o reagente TRizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.8.1- Desenho dos primers de silenciamento do RNA**

Para evitar as dificuldades inerentes do desenho de *primers*, resolvemos utilizar *primers* pré-desenhados disponíveis comercialmente, pois teoricamente esses *primers* estão bem padronizados e são eficientes. Entretanto, por serem *primers* comerciais, as suas seqüências não são disponibilizadas, são protegidas pelas companhias. A única informação disponibilizada pela empresa é que os *primers* do domínio metaloprotease (#104055) foram desenhados para ligação nos éxons 7 e 8, e os *primers* do domínio desintegrina (#104056) ligaram-se ao éxon 13 (*Silencer<sup>®</sup> Pre-designed siRNA*, Ambion). Abaixo se observa as seqüências dos *primers*, porém neste trabalho somente foi utilizado os *primers* para o domínio desintegrina.

#### **Desintegrina:**

Seqüência senso:

5'-rCrCrArGrArGrUrArCrUrGrCrArArUrGrGrUrUrCrUrUrCTC-3'

Seqüência antisenso:

5'-rGrArGrArArGrArArCrCrArUrUrGrCrArGrUrArCrUrCrUrGrGrArA-3'

A especificidade do *primer* de silenciamento da ADAM9 em relação a outras ADAMs foi confirmado pelo multialinhamento utilizando o programa Multalin version 5.4.1 (CORPET, 1988) das ADAMs humanas juntamente com a sequência do *primer* utilizado (ANEXO I).

### **3.8.2- Extração de RNA total**

Para a extração de RNA total das células MDA-MB-231 foram utilizadas placas de Petri com 6cm de diâmetro e os três diferentes tipos de tratamento citado acima (item 3.8): (i) células controle; (ii) células tratadas somente com agente de transfecção; e (iii) células silenciadas.

Após a incubação, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS 1X (2ml/placa de 6cm de diâmetro) e em seguida foram lisadas utilizando o reagente TRizol (Invitrogen) para iniciar o isolamento do RNA total. Um dia antes do início da extração foram necessários alguns cuidados e procedimentos, como por exemplo: tratar ponteiros e microtubos (*eppendorfs*) com água DEPC 0,01%, deixando-os de um dia para o outro (*overnight*) e autoclavá-los em seguida.

Para a homogeneização das amostras, 1ml de TRizol foi adicionado às placas contendo as células. Esta solução foi passada repetida vezes sobre a placa, na tentativa de lavar a placa e com auxílio de pipeta, para a completa homogeneização e lise das células. Na sequência, foi realizada a centrifugação das amostras a 12000 x g por 10 minutos (4°C), transferência do sobrenadante para um novo microtubo, e incubação por 5 minutos em temperatura ambiente. Transcorrido o tempo, foram adicionados 200µl de clorofórmio (para cada ml de TRizol utilizado) para separação das diferentes frações (DNA, RNA e proteína) seguido de agitação vigorosa e incubação por 3 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, foi realizada uma centrifugação por 15 minutos a 12000 x g (4°C) e transferência da fase aquosa superior (contendo a fração de RNA) para um novo microtubo. Por fim, foram adicionados 500µl de isopropanol para precipitação do RNA total e o material foi incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000 x g (4°C) e os precipitados foram lavados com 1000µl de etanol 75%. Para ressuspender o RNA total precipitado foi utilizada água livre de RNase e as amostras foram armazenadas a -80 °C.

Para verificar o sucesso do procedimento de extração, as amostras de RNA total foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1%.

### **3.8.3- Gel de agarose-formaldeído 1%**

Para a preparação do gel foram utilizados: agarose 3% (Sigma), Tampão MOPS 10X (MOPS 0,2M, acetato de sódio 0,05M e EDTA 0,01M). A agarose foi fundida na solução através de aquecimento em microondas e em seguida deixou que esfriasse até aproximadamente 50°C, após o resfriamento foram adicionados 1,62ml de formaldeído 37% (concentração final 2%) à solução, e essa foi levada a cuba de eletroforese de RNA (Gibco) também tratada previamente para evitar contaminação com RNase. Como tampão de corrida foi utilizado o tampão MOPS 1X. Antes das amostras de RNA total serem aplicadas no gel, elas foram diluídas em tampão de amostra (formamida 48%, tampão MOPS10X, formaldeído 4%, glicerol 5%, azul de bromofenol saturado 5%, brometo de etídeo 1,5mg/ml e água). As amostras foram submetidas à eletroforese, utilizando uma voltagem de aproximadamente 80–90V por aproximadamente de 1 hora e em temperatura de 4°C. Antes da confirmação da integridade do RNA total no gel, o RNA total foi quantificado por espectrometria em comprimento de onda de 260nm e 280nm.

Todas as amostras foram tratadas com DNase I (*Deoxyribonuclease I, Amplification Grade* – Invitrogen) para evitar contaminação com DNA genômico. Para este tratamento foi adicionado 1µl de tampão (10X DNase I *Reaction Buffer*), 1µl da enzima DNase I, quantidade suficiente para 10µl de água tratada com DEPC e 1µg RNA total. As amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. Logo após foi adicionado 1µl de EDTA e as amostras permaneceram no banho seco a 65° C durante 10 minutos.

Todas as soluções utilizadas para os procedimentos descritos foram preparadas com água livre de RNase tratada com 0,01% de DEPC e, além disso, os materiais plásticos e vidraria também receberam tratamento contra RNase, sendo assim, foram tratados com peróxido de hidrogênio 0,1% e em seguida com água livre de RNase.

### **3.8.4- Desenho dos *primers* para o RT-PCR**

Os oligonucleotídeos para a análise da expressão gênica da ADAM9 utilizando a técnica do RT-PCR foram desenhados utilizando o *software Primer 3 Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Os *primers* foram desenhados para cada um dos domínios da ADAM9, sendo eles: metaloprotease (ADAM9M), desintegrina (ADAM9D) e rico em cisteína (ADAM9C). Os *primers* para amplificação da

ADAM9 foram desenhados abrangendo a junção de diferentes éxons, a fim de que a amplificação ocorresse apenas a partir de moldes de cDNA e não de possível DNA genômico contaminante. As seqüências dos *primers* foram checadas pelo Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para assegurar a especificidade. Os *primers* foram:

<p><b>ADAM9DF1 - CTTGCTGCGAAGGAAGTACC</b>  <b>ADAM9DR1 - AACATCTGGCTGACAGAACTGA</b>  <b>ADAM9CF1 - TCCTTGCCAGAATAACAAAGC</b>  <b>ADAM9CR1 - TCATTGCCAGAGAAACCACA</b>  <b>ADAM9MF1 - TGGGAAGAAATCAGACTGCTG</b>  <b>ADAM9MR1 - AAGAACTTTTCCCGCCACT</b></p>
--

Os *primers* foram checados pela Análise da Curva de Melt no Corbett Rotor Gene, sendo assim, os *primers* ADAM9MF1 e ADAM9MR1 foram descartados e substituídos pelos:

<p><b>ADAM9MF2 - CATTGCTTCCATTGTTGCT</b>  <b>ADAM9MR2 - AGTCCTCTGCACTGCAACTG</b></p>
--

Os *primers* utilizados na técnica de RT-PCR neste trabalho foram àqueles desenvolvidos para o domínio desintegrina, e estão representados acima nomeados como ADAM9DF1 e ADAM9DR1. Estes *primers* mostraram ser muito mais eficientes quando utilizado os *primers* de silenciamento para o domínio desintegrina (# 104056) (dados não mostrados – BUS, 2008).

O uso de um gene constitutivo é um assunto de muita discussão na literatura, mas é consenso o uso de pelo menos dois genes constitutivos de referência, porém neste trabalho só foi possível a utilização de apenas um, por conta do tempo um pouco restrito. Uma pesquisa literária foi realizada para encontrar genes que não se alteravam em condições nas quais a expressão da ADAM9 era ativada ou reprimida. Um dos genes mais populares em estudos de expressão é o da Gliceraldeido 3 Fosfato Desidrogenase (GAPDH) (DJOUAD *et al.*, 2007). Adicionalmente vários estudos que comparam diferentes genes de referência (OHL *et al.*, 2005, FISCHER *et al.*, 2005) tem mostrado a Hipoxantina Guanina

Fosforibosiltransferase 1 (HPRT1) como um dos genes mais estáveis. Portanto, o gene escolhido foi:

**HPRT1F** - TGACACTGGCAAAACAATGCA

**HPRT1R** - GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT

### **3.8.5- Produção do cDNA e PCR (reação em cadeia da polimerase) quantitativo**

O RNA total das células da linhagem MDA-MB-231 foi submetido à reação com a enzima transcriptase reversa M-MLV (Promega) para a obtenção do cDNA.

Para este procedimento 1µg de RNA total foi misturado com 0,5µl de *primer* oligo-DT (0,5µg/µl, Promega) e água livre de nucleases para um volume de 7µl. As amostras foram incubadas a 70°C por 5 minutos, seguido de um resfriamento rápido em gelo de 5 minutos, e após, a adição dos demais componentes da reação: 0,5µl de *Moloney Monkey Leukemia vírus reverse transcriptase* – M-MLV 5X (200U/µl, concentração final 1X) (M-MLV, Promega); 2,5µl de tampão MMLV 5X (concentração final 1X, Promega), 2,5µl de dNTPs (concentração inicial 10nM) e água para completar 25µl. Esta mistura foi incubada por 60 minutos a 37°C.

O cDNA obtido foi então utilizado para a reação de PCR em tempo real por meio do SYBR® *Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Para este procedimento as amostras foram feitas em duplicata. O *software* usado foi o *Rotor Gene* - 6 em um equipamento chamado de *Rotor-Gene* RG 3000 (Corbett Research). A seguir estão os componentes que foram utilizados para a reação:

- cDNA = 0,5µl
- *Primer* ADAM9 ou HPRT senso (5µM) = 1,25µl
- *Primer* ADAM9 ou HPRT antisenso (5µM) = 1,25µl
- SYBR® *Green* (Applied Biosystems) = 12,5µl
- Água livre de RNase: completar para 10,5µl

O programa utilizado no termociclador para a realização de RT-PCR consistiu de:

➡ 1 ciclo de 95°C por 10 minutos (“hold”), seguidos de 40 ciclos compostos de:

- ➡ 95°C por 15 segundos,
- ➡ 55°C por 5 segundos e
- ➡ 72°C por 20 segundos.

Para normalizar os dados entre os três diferentes tipos de tratamento, unidades arbitrárias foram calculadas da seguinte forma:

$$\text{Unidade Arbitrária} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Sendo  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct amostra} - \Delta\text{Ct controle}$ .

(Ct: “threshold cycle”).

Os dados foram analisados usando a equação de Livak e Schmittgen, onde a variação na expressão de cada gene é igual a  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . O ciclo limiar (Ct) indica o número dos ciclos onde a quantidade de gene amplificado atinge o limiar fixado.  $\Delta\text{Ct}$  é o  $\text{Ct}_{\text{gene alvo}} - \text{Ct}_{\text{controle}}$  e  $\Delta\Delta\text{Ct}$  é o  $\Delta\text{Ct} - \text{Média } \Delta\text{Ct}_{\text{grupo controle}}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

### **3.9- Cinética de Silenciamento do gene que codifica para a ADAM9**

O silenciamento das células MDA-MB-231 com siRNA para a ADAM9 é transitório, ou seja, qualquer silenciamento gênico realizado com duplexes sintéticos sempre será transitório, uma vez que assim que o duplex é degradado no interior da célula, ele não terá mais efeito, isto independe da linhagem celular utilizada ou do gene silenciado. Já o tempo no qual todos os duplex serão eficientes em inibir um gene, é totalmente dependente do tipo celular e do gene em estudo, uma vez que cada gene/proteína tem uma taxa de renovação diferente.

Sendo assim, foi necessário fazer uma cinética de silenciamento do gene que codifica para a ADAM9 antes de iniciar os ensaios com as células silenciadas, para assim verificar o tempo de eficiência da inibição. Para isto foi feito um ensaio em que a mesma quantidade de células (ver item 3.8) foi plaqueada em várias placas e todas foram transfectadas com a mesma quantidade de siRNA. Então, aleatoriamente, uma placa foi retirada em cada dia (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 dias após a transfecção das células com siRNA) para analisar o silenciamento gênico. Foi extraído o RNA total (item 3.8.1) das células e após a retirada da última placa, foi feito o gel de agarose-formaldeído 1% (item 3.8.2). Em seguida, os cDNAs foram sintetizados e analisados por PCR em tempo real (item 3.8.4).

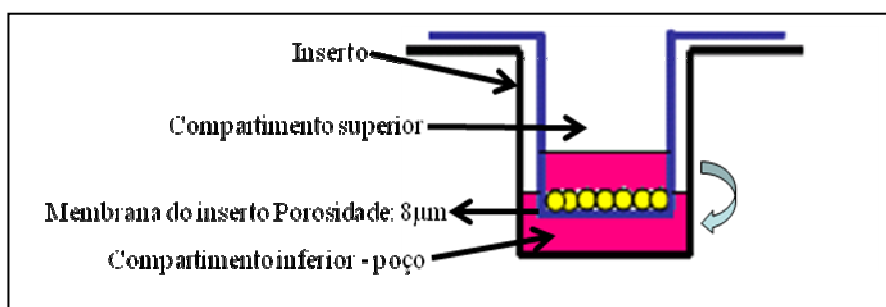
### **3.10- Ensaio de Proliferação Celular**

Para este experimento foram usadas células da linhagem MDA-MB-231 e novamente os três diferentes tipos de tratamento: **(i)** células controle, sem tratamento com agente de transfecção e sem silenciamento, **(ii)** células tratadas somente com agente de transfecção (Lipofectamina 2000, Invitrogen), e **(iii)** células silenciadas, tratadas com agente de transfecção e o *primer* de silenciamento do RNA (*Silencer<sup>®</sup> siRNA Starter Kit* – Ambion) (como descrito no item 3.8). Sendo que, 72 horas após a transfecção as células foram lavadas com PBS (1X) e retiradas das placas, ou seja, foram tripsinizadas e contadas para a utilização no ensaio de proliferação celular.

As células foram plaqueadas em placa de 96 poços em uma concentração de  $5 \times 10^4$  células/200 $\mu$ l e incubadas por 24 ou 48 horas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. No dia da revelação foram adicionados 50 $\mu$ l/poço da solução estoque de MTT (2,5mg/ml) [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difenil tetrazólio] (concentração final 0,5mg/ml), diluído em água destilada. A placa foi incubada por 4 horas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após o tempo de incubação, foi retirado todo o volume dos poços sem a lavagem dos mesmos e foram adicionados 100 $\mu$ l/poço de isopropanol. Em seguida a solução foi misturada com auxílio de pipeta, sendo então realizada a leitura no leitor de placa (*Dynex Revelation 4.02 - software*) com comprimento de onda de 595nm.

### **3.11- Ensaio de Invasão em Matrigel**

**Representação esquemática do sistema de cultura sobre o inserto:**



Para a realização do Ensaio de Invasão em Matrigel foi utilizado o sistema *BioCoat Matrigel Invasion Chambers* (BD Biosciences) com placas de 24 poços e poros de 8 $\mu$ m e células da linhagem MDA-MB-231 transfectadas e silenciadas. Desta forma, para este experimento foram usadas células da linhagem MDA-MB-231 e novamente os três diferentes

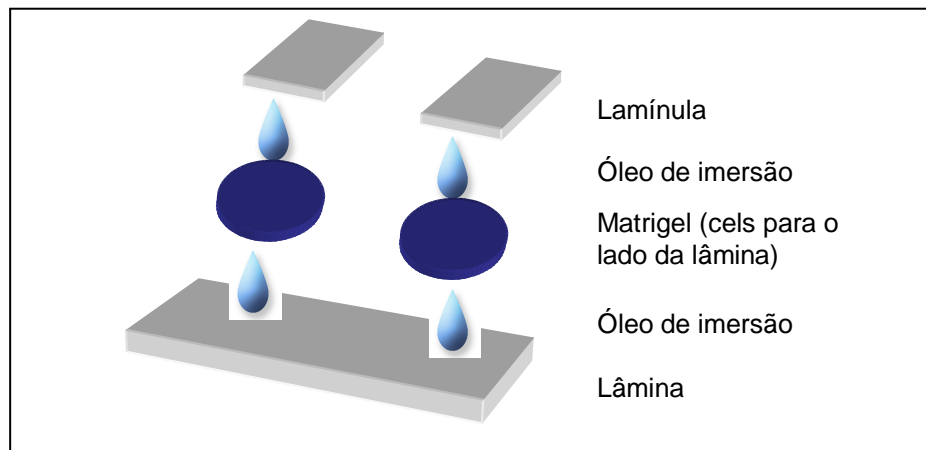


tipos de tratamento: **(i)** células controle, sem tratamento com agente de transfecção e sem silenciamento, **(ii)** células tratadas somente com agente de transfecção (Lipofectamina 2000, Invitrogen), e **(iii)** células silenciadas, tratadas com agente de transfecção e o *primer* de silenciamento do RNA (*Silencer<sup>®</sup> siRNA Starter Kit* – Ambion) (como descrito no item 3.8). Sendo que, 72 horas após a transfecção as células foram lavadas com PBS (1X) e retiradas das placas, ou seja, foram tripsinizadas e contadas para a utilização no ensaio de invasão em matrigel.

Antes de iniciar o protocolo de invasão em matrigel a placa foi retirada freezer da geladeira e reservada em temperatura ambiente. Decorrido um tempo, foi realizada a rehidratação da matrigel adicionado o volume, indicado na tabela do manual e seguindo as instruções do fabricante, de meio DMEM **SEM** soro no poço e no inserto, pipetando na parede. Para uma rehidratação eficiente do matrigel, a placa foi incubada por duas horas na estufa a 37°C.

Antes do término do tempo de rehidratação as células foram preparadas, ou seja, tripsinizadas e contadas para uma concentração também indicada no manual do matrigel ( $5 \times 10^4$  células/ml para placa de 24 poços ou  $1,25 \times 10^5$  células/ml para placa de 6 poços). O meio DMEM **SEM** soro foi retirado da placa, tanto em cima como embaixo da matrigel e foi adicionado em cima da matrigel o volume de células indicado para cada tipo de placa em meio **SEM** soro. E, embaixo foi adicionado meio com ou sem soro. A placa foi incubada por 22 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Depois de transcorrido o tempo de incubação, os insertos foram retirados e o meio foi descartado, a parte superior do inserto foi limpa com o auxílio de um cotonete, com a finalidade de retirar as células que não invadiram. Foi preparada outra placa contendo: metanol 100% e azul de toluidina (o volume é dependente da placa usada, ou seja, placa de 6 poços – 2ml).

O inserto foi colocado com auxílio de uma pinça no metanol por 5 minutos, retirado e colocado 5 minutos no corante. Em seguida, o inserto foi bem lavado em água, até a retirada total do corante. Os insertos foram secos em um papel com o matrigel para cima e depois de seco foi montado à lâmina na seguinte ordem:



Oito imagens de campos distintos de cada inserto foram fotografadas com o auxílio de uma câmera *Cool Snap-Pro Color* integrada ao microscópio e usando o software *Image - Pro Plus*. As células invasoras fotografadas em cada campo foram contadas com o auxílio do programa *Adobe Photoshop CS4* e as médias dos oito campos fotografados foram calculadas, sendo que cada tipo de tratamento (controle, lipofectamina e siRNA) foi feito em triplicata.

## **4. ANÁLISE DOS RESULTADOS**

As membranas de nitrocelulose com a expressão da ADAM9 foram digitalizadas no *Scanner Image* (GE – *General Electric*).

Para o ensaio de zimografia os géis foram confeccionados em quadruplicata (ensaio independente) e foi calculada a intensidade média de cada banda e em cada gel, com auxílio do *software Adobe Photoshop* e do Programa *GeneTools v3.06 software* (Syngene, Cambridge, UK). Os valores encontrados foram colocados em um programa de estatística (*GraphPad Prism 4*).

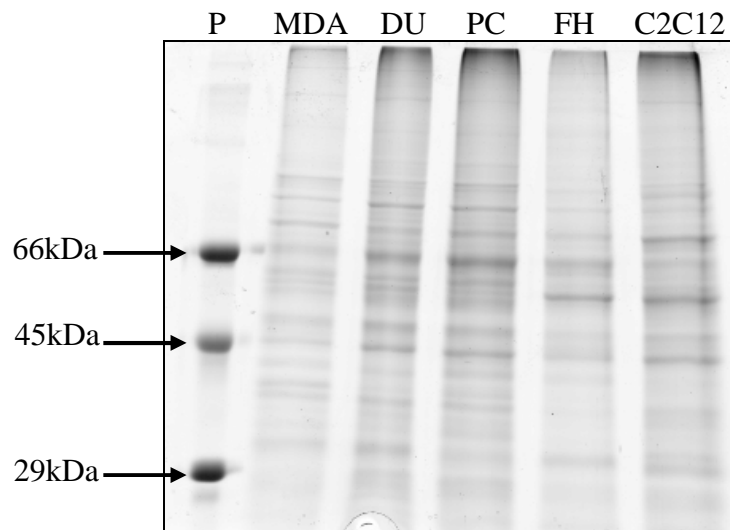
Os demais ensaios também foram analisados quanto a sua significância estatística utilizando o *GraphPad Prism 4* – (programa de estatística). Cada experimento foi repetido três vezes em triplicata (ensaio independente) e todos os valores apresentaram distribuição normal, por isso foi utilizado à análise de variância ANOVA one-way e o teste Tukey foi aplicado para múltiplas comparações. Em todos os cálculos foi fixado o nível crítico 5% ( $p \leq 0,05$ ), ou seja, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  foram utilizados como critério de significância.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1- Análises das proteínas celulares totais em SDS-PAGE**

As amostras de proteínas de diferentes linhagens celulares: tumorais (MDA-MB-231, DU-145 e PC-3) e não tumorais (FH e C2C12) foram preparadas como previamente descrito (item 3.2), e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) (Figura 15). A duração da mesma foi de aproximadamente 1 hora e 30 minutos a uma voltagem aproximadamente de 70V no gel de empilhamento e 100V no gel de separação.

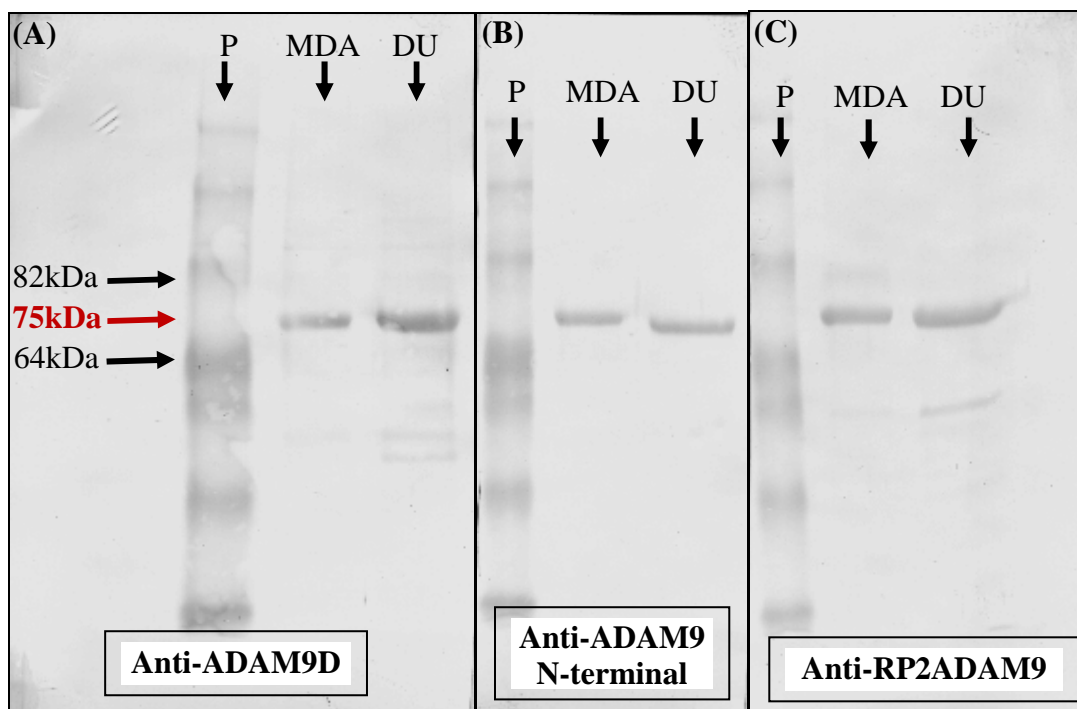
As linhagens tumorais MDA-MB-231, DU-145 e PC-3 apresentaram um perfil eletroforético semelhante, com bandas protéicas majoritárias nas faixas de 66 e 45kDa. Ainda observando o padrão protéico das duas linhagens de câncer de próstata, DU-145 e PC-3, é possível identificar uma grande semelhança nas bandas protéicas dessas duas linhagens, pois se tratam de linhagens derivadas do mesmo tecido. As células de linhagens não tumorais por sua vez, apresentaram um perfil eletroforético diferente daquele das células tumorais e com alguma semelhança entre si.



**Figura 15** - Proteínas totais extraídas das seguintes linhagens celulares: tumorais (MDA-MB-231, DU-145 e PC-3) e não tumorais (FH e C2C12), resolvido em gel de poliacrilamida 10%, sendo P = padrão de proteína.

## 5.2- Western Blotting

Através da realização da técnica de *Western Blotting* utilizando os lisados das células tumorais, MDA-MB-231 e DU-145, foi possível verificar que em todas as amostras testadas houve reconhecimento da glicoproteína ADAM9, de massa molecular de aproximadamente 75kDa, pelos três anticorpos utilizados. Desta forma, é possível observar que os três anticorpos testados reagiram intensamente com a banda de 75kDa (Figura 16).



**Figura 16** - Expressão da ADAM9 humana extraída das linhagens celulares, MDA-MB-231 e DU-145, resolvido em gel de poliacrilamida 10% e transferido para membrana de nitrocelulose. A expressão da ADAM9 foi analisada por *Western Blotting*, usando os seguintes anticorpos: (A) anticorpo primário anti-ADAM9D (1:1000); (B) anticorpo primário anti-ADAM9 N-terminal (1:1000) e (C) anticorpo primário anti- RP2ADAM9 (1:1000). P = padrão de proteína pré-corado.

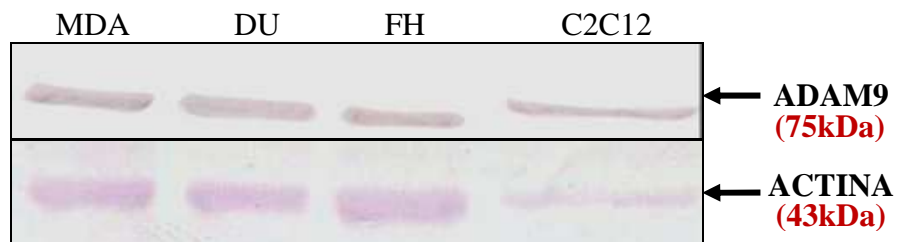
Na porção superior das figuras 17 e 19 abaixo, esta representada a expressão da glicoproteína ADAM9 em células tumorais (à esquerda) e não tumorais (à direita) utilizando a de técnica de *Western Blotting*. Nestas figuras, observa-se que em todas as amostras analisadas houve o reconhecimento da proteína ADAM9 (massa molecular de aproximadamente 75kDa) pelo anticorpo anti-ADAM9 N-terminal e anti-RP3ADAM9, respectivamente. E, nestas mesmas figuras na porção inferior, estão representadas as partes das membranas de nitrocelulose que foram recortadas e incubadas com o anticorpo anti-actina. É possível observar que em todas as amostras celulares tumorais (à esquerda) e não tumorais (à direita), houve o reconhecimento da actina (massa molecular de aproximadamente

43kDa) pelo anticorpo utilizado. O anticorpo anti-actina foi utilizado como controle interno, pois a proteína Actina é expressa em todas as células de eucariotos e na maioria das vezes representa mais de 50% das proteínas celulares totais (Santa Cruz *Biotechnology*).

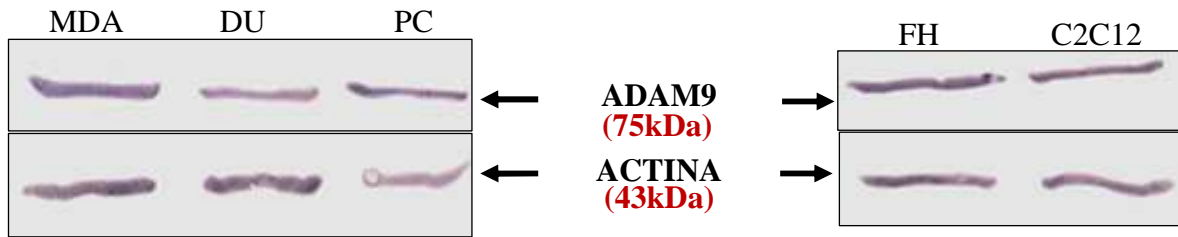


**Figura 17** - Expressão da ADAM9 e da Actina extraídas das linhagens celulares tumorais: MDA-MB-231, PC-3 e DU-145 e não tumorais: FH e C2C12. As amostras foram resolvidas em gel de poliacrilamida 10% e transferidas para a membrana de nitrocelulose. A expressão da ADAM9 e da Actina foi observada utilizando os seguintes anticorpos: anticorpo primário anti-ADAM9 N-terminal (1:1000) e anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em cabra conjugado com fosfatase alcalina (1:5000), e para a detecção da Actina foram usados o anticorpo primário anti-Actina (1:1000) e anticorpo anti-IgG de cabra conjugado com fosfatase alcalina (1:5000).

Na figura 18 abaixo (porção superior), é possível verificar que em todas as amostras celulares testadas, tumorais e não tumorais, houve o reconhecimento da ADAM9 (massa molecular de aproximadamente 75kDa) pelo anticorpo anti-RP2ADAM9. A outra parte da membrana (porção inferior da figura) foi incubada com o anticorpo anti-actina, e o mesmo resultado obtido na figura 17 também foi verificado para estas amostras, ou seja, em todas as amostras celulares tumorais e não tumorais houve o reconhecimento da actina (massa molecular de aproximadamente 43kDa) pelo anticorpo utilizado.



**Figura 18** - Expressão da ADAM9 e da Actina extraídas das linhagens celulares tumorais: MDA-MB-231, PC-3 e DU-145 e não tumorais FH e C2C12. As amostras foram resolvidas em gel de poliacrilamida 10% e transferidas para a membrana de nitrocelulose. A expressão da ADAM9 e da Actina foi analisada utilizando os seguintes anticorpos: anticorpo primário anti-RP2ADAM9 (1:1000) e anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em cabra (1:5000), e para a detecção da Actina foram utilizados o anticorpo primário anti-Actina (1:1000) e anticorpo anti-IgG de cabra conjugado com fosfatase alcalina (1:5000).



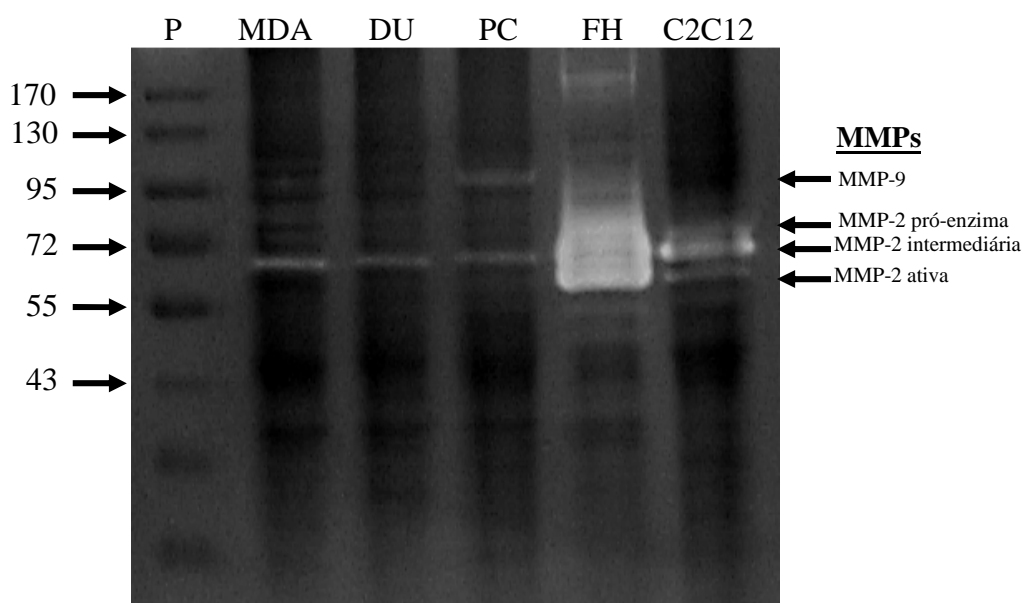
**Figura 19** - Expressão da ADAM9 e da Actina extraídas das linhagens celulares tumorais: MDA-MB-231, PC-3 e DU-145 e não tumorais FH e C2C12. A expressão da ADAM9 e da Actina foi analisada utilizando os seguintes anticorpos: anticorpo primário anti-RP3ADAM9 (1:1000) e anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em cabra conjugado com fosfatase alcalina (1:5000), e para a detecção da Actina foram utilizados o anticorpo primário anti-Actina (1:1000) e anticorpo anti-IgG de cabra conjugado com fosfatase alcalina (1:5000).

### 5.3- Zimografia

A atividade proteolítica dos lisados celulares foi investigada por meio de zimografia em géis de poliacrilamida contendo gelatina 2%. Foi possível observar que esses lisados celulares tumorais (MDA-MB-231, DU-145 e PC-3) e não tumorais (FH e C2C12) possuem atividade de gelatinase. A expressão de metalopeptidases pelas células é um dado muito importante, pois está relacionada com a capacidade invasiva das células, ou seja, níveis MMP2 e MMP9 são indicadores do potencial de invasão para células tumorais (DI NEZZA *et al.*, 2002; SATO *et al.*, 2004). Porém, o objetivo principal deste ensaio foi investigar se a glicoproteína ADAM9 (uma desintegrina e metaloprotease) apresenta atividade proteolítica em gel de gelatina 2%, ou seja, se ela possui atividade de gelatinase, já que esta proteína apresenta função de digerir gelatina (MOCHIZUKI & OKADA, 2007).

A técnica de zimografia mostrou haver diferenças nas atividades das metalopeptidases entre as diferentes linhagens celulares (Figura 20), sendo que este resultado já era esperado por se tratar de diferentes tipos celulares, extraído de tecidos distintos.

A metalopeptidase 2 intermediária (MMP-2 intermediária) está presente em todas as linhagens celulares em estudo, tumorais e não tumorais. Já a pró-enzima MMP-2 e a MMP-2 ativa somente estão presentes nas linhagens celulares FH e C2C12. Por último, a MMP-9, uma gelatinase-B de 92/85kDa, foi detectada somente nas linhagens celulares PC-3 e FH.

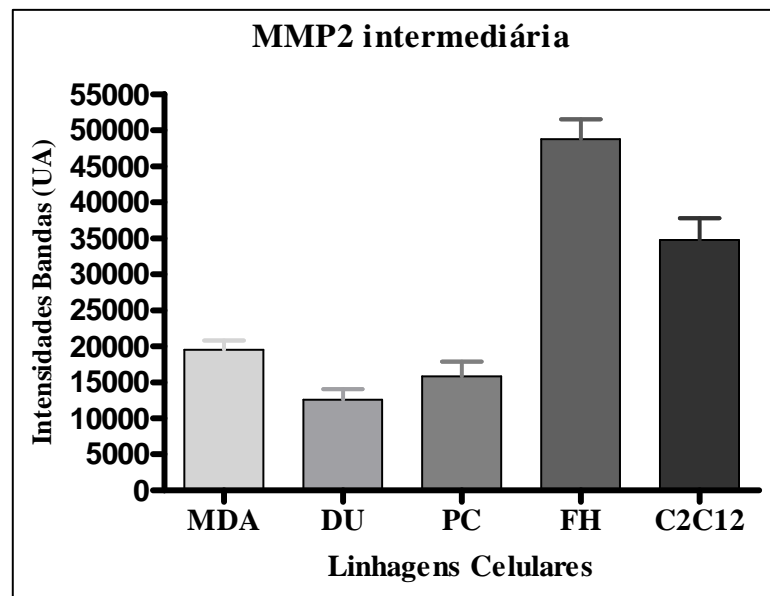


**Figura 20** - Análise da atividade proteolítica dos lisados celulares por zimografia das linhagens tumorais (MDA-MB-231, DU-145 e PC-3) e não tumorais (FH e C2C12). P = Padrão de zimografia (PageRuler™ Prestained Protein Ladder – Fermentas).



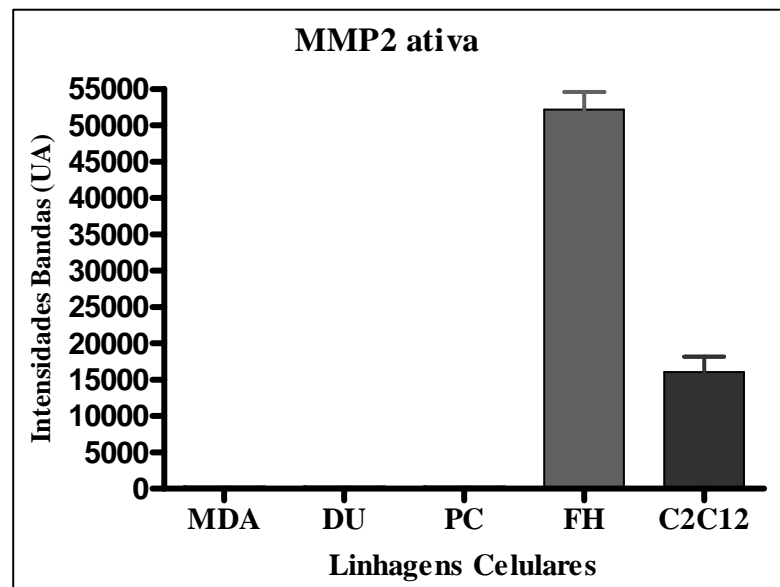
Apesar das diferenças nas intensidades das bandas de atividade proteolítica serem facilmente visualizadas no gel (Figura 20), estas bandas também foram quantificadas (Figuras 21, 22, 23 e 24), através da leitura da intensidade média das bandas em unidades arbitrárias (UA) com auxílio do *software Adobe Photoshop* e do Programa *GeneTools v3.06 software* (Syngene, Cambridge, UK). Para tal, os géis foram confeccionados em quadruplicata (ensaios independentes) e foi calculada a intensidade média de cada banda e em cada gel.

O gráfico abaixo (Figura 21) representa a intensidade média das bandas de zimografia da MMP-2 intermediária, nas diferentes linhagens celulares. É possível observar que a metalopeptidase 2 (MMP-2) intermediária está claramente aumentada em fibroblastos e na linhagem celular C2C12.



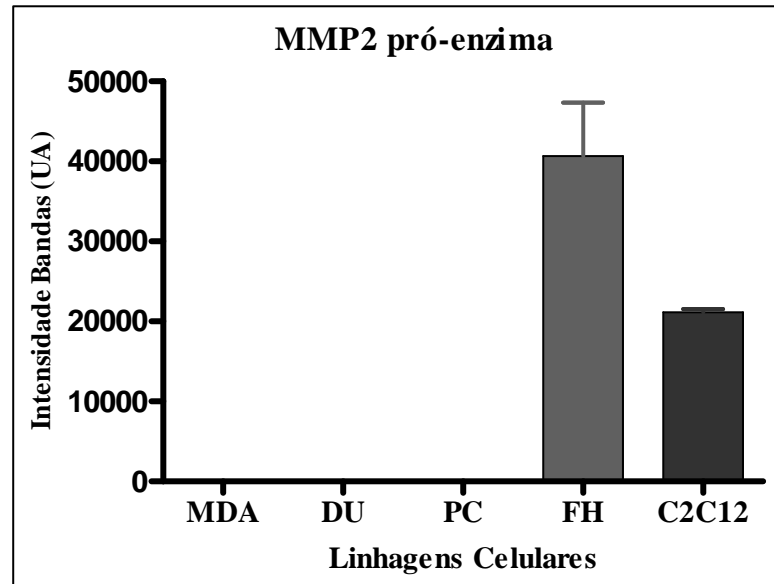
**Figura 21** - Representação gráfica da intensidade média das bandas de zimografia em unidade arbitrária (UA) da MMP2 intermediária. MDA-MB-231, DU-145, PC-3, FH e C2C12.

O gráfico abaixo (Figura 22) representa a intensidade média das bandas de zimografia correspondentes à MMP2 ativa, a qual foi detectada somente nas linhagens celulares de FH e C2C12. Podemos observar também que a atividade proteolítica desta metalopeptidase é muito mais intensa em fibroblastos.



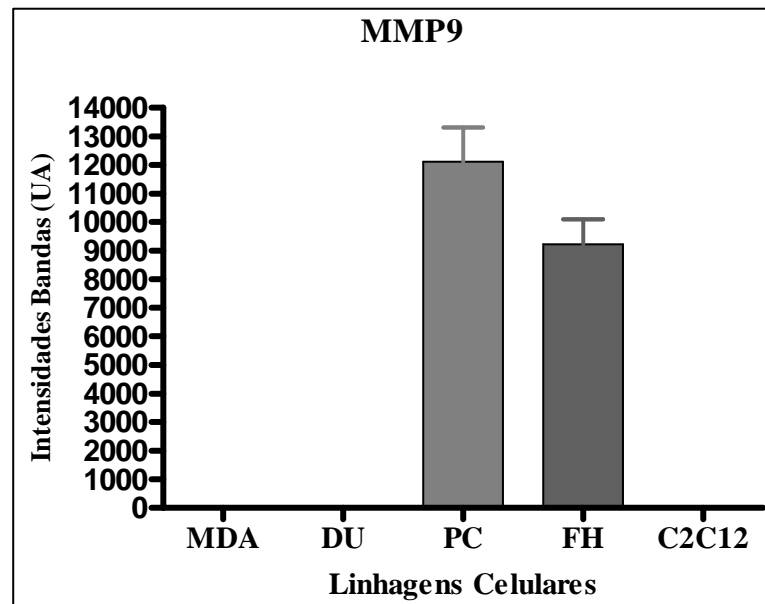
**Figura 22** - Representação gráfica da intensidade média das bandas de zimografia em unidades arbitrárias (UA) da MMP2 ativa. MDA-MB-231, DU-145, PC-3, FH e C2C12.

A figura 23 é a representação gráfica da intensidade média das bandas de zimografia da pró-enzima MMP2, detectada somente nas linhagens celulares FH e C2C12.



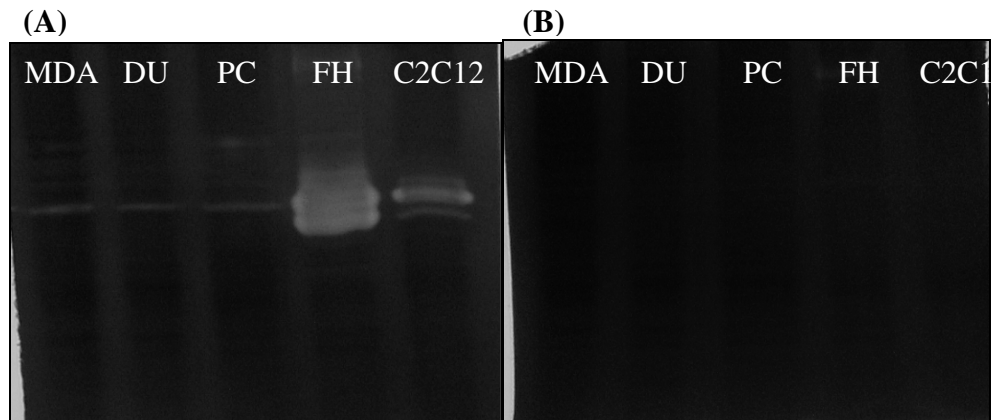
**Figura 23** - Representação gráfica da intensidade média das bandas de zimografia em unidades arbitrárias (UA) da MMP2 pró-enzima. MDA-MB-231, DU-145, PC-3, FH e C2C12.

A figura 24 é referente à intensidade média das bandas de zimografia correspondente à atividade proteolítica da MMP9. As linhagens celulares PC-3 e FH apresentam uma intensa atividade desta metalopeptidase, que não foi detectada nas outras linhagens testadas.



**Figura 24** - Representação gráfica da intensidade média das bandas de zimografia em unidades arbitrárias (UA) da MMP9. MDA-MB-231, DU-145, PC-3, FH e C2C12.

Os lisados celulares foram tratados com EDTA (450mM) e confirmaram somente a presença de metalopeptidases nas linhagens celulares testadas (Figura 25).



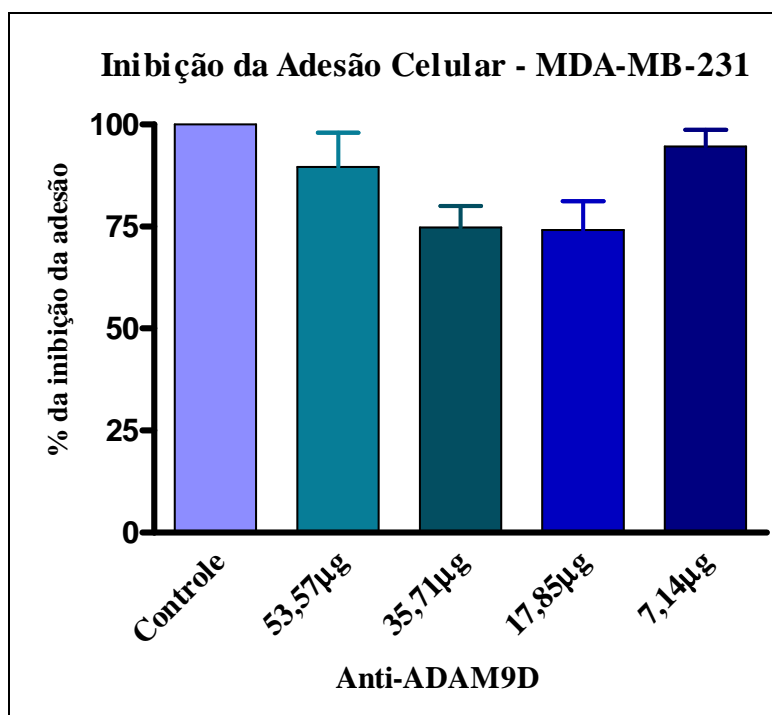
**Figura 25** - Análise da atividade proteolítica das lises celulares por zimografia em células, tumorais (MDA-MB-231, DU-145 e PC-3) e não tumorais (FH e C2C12). (A) representa o gel de zimografia sem EDTA e (B) representa o gel de zimografia com EDTA (450mM).

Apesar da técnica de zimografia indicar que houve a atividade de metalopeptidases, MMP-2 (Gelatinase-A) de 72/66 kDa (pró, intermediária e ativa) e MMP-9 (Gelatinase-B) de 92/85 kDa, não foi possível determinar a atividade proteolítica do domínio metaloprotease da glicoproteína ADAM9 através da técnica de zimografia.

#### **5.4- Ensaio de Inibição da Adesão**

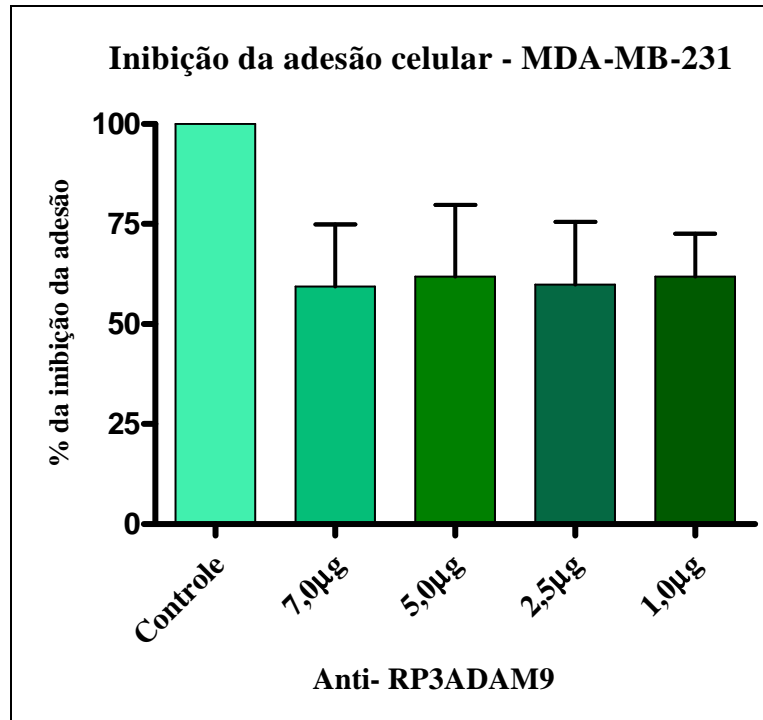
Para o ensaio de inibição de adesão foram utilizadas duas linhagens celulares, MDA-MB-231 e FH. Também foram utilizados dois tipos de anticorpos, sendo eles, o anticorpo anti-RP3ADAM9 e o anticorpo anti-ADAM9D. Esses anticorpos foram adicionados às células numa concentração: de 7,14 $\mu$ g, 17,85 $\mu$ g, 35,71 $\mu$ g e 53,57 $\mu$ g (anticorpo anti-ADAM9D) e 1,0 $\mu$ g, 2,5 $\mu$ g, 5,0 $\mu$ g e 7,0 $\mu$ g (anticorpo anti- RP3ADAM9), e nas células MDA-MB-231 e FH controles não foram adicionados nenhum anticorpo. O objetivo deste ensaio foi verificar o papel da ADAM9 na promoção da adesão destas células ao colágeno tipo I, usando para tanto anticorpos contra algumas regiões da ADAM9.

A figura 26 representa o efeito do anticorpo anti-ADAM9D sobre a inibição da adesão celular nas células de câncer de mama (MDA-MB-231). Tal anticorpo não inibiu a adesão destas células ao colágeno tipo I, em nenhuma das concentrações testadas (7,14 $\mu$ g, 17,85 $\mu$ g, 35,71 $\mu$ g e 53,57 $\mu$ g), quando comparado com as células controle, nas quais a adesão foi considerada 100%.



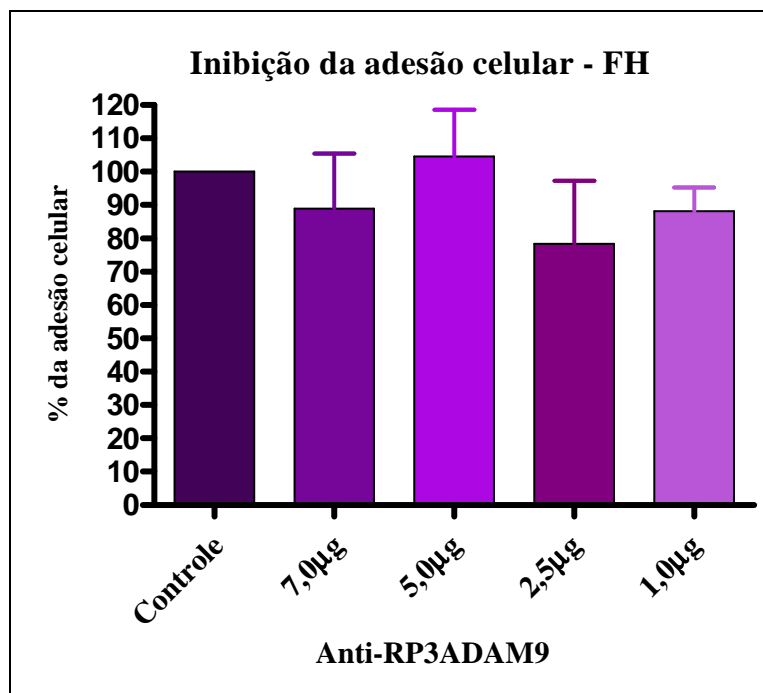
**Figura 26** - Efeito do anticorpo anti-ADAM9D sobre a inibição da adesão celular. Foi usado para este ensaio a linhagem celular MDA-MB-231 e o Anticorpo Anti-ADAM9D. Colágeno tipo I (1 $\mu$ g/poço) foi imobilizado por 12 horas a 4°C em placa de 96 poços. Após bloqueio com BSA 1%, as células marcadas com CMFDA, em seguida foram lavadas com tampão de adesão e incubadas com o anticorpo anti-ADAM9D em diferentes concentrações (7,14 $\mu$ g, 17,85 $\mu$ g, 35,71 $\mu$ g e 53,57 $\mu$ g) e foram plaqueadas nos poços. A placa foi incubada a 37°C por 30 minutos, as células foram lisadas e quantificadas. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

O mesmo foi verificado quando as células foram previamente incubadas com o anticorpo anti-RP3ADAM9, e utilizando diferentes concentrações: 1µg, 2,5µg, 5,0µg e 7,0µg (Figura 27).



**Figura 27** - Efeito do anticorpo anti- RP3ADAM9 sobre a inibição da adesão celular. Foi usado para este ensaio a linhagem celular MDA-MB-231 e o anticorpo Anti-RP3ADAM9. Colágeno tipo I (1µg/poço) foi imobilizado por 12 horas a 4°C em placa de 96 poços. Após bloqueio com BSA 1%, as células marcadas com CMFDA, em seguida foram lavadas com tampão de adesão e incubadas com o anticorpo anti- RP3ADAM9, usando diferentes concentrações (1,0µg, 2,5µg, 5,0µg e 7,0µg) e foram plaqueadas nos poços. A placa foi incubada a 37°C por 30 minutos, as células foram lisadas e quantificadas. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

Os ensaios foram repetidos utilizando fibroblastos humanos e novamente, a incubação previa das células com o anticorpo anti-RP3ADAM9, não inibiu a adesão das mesmas ao colágeno tipo I (Figura 28).



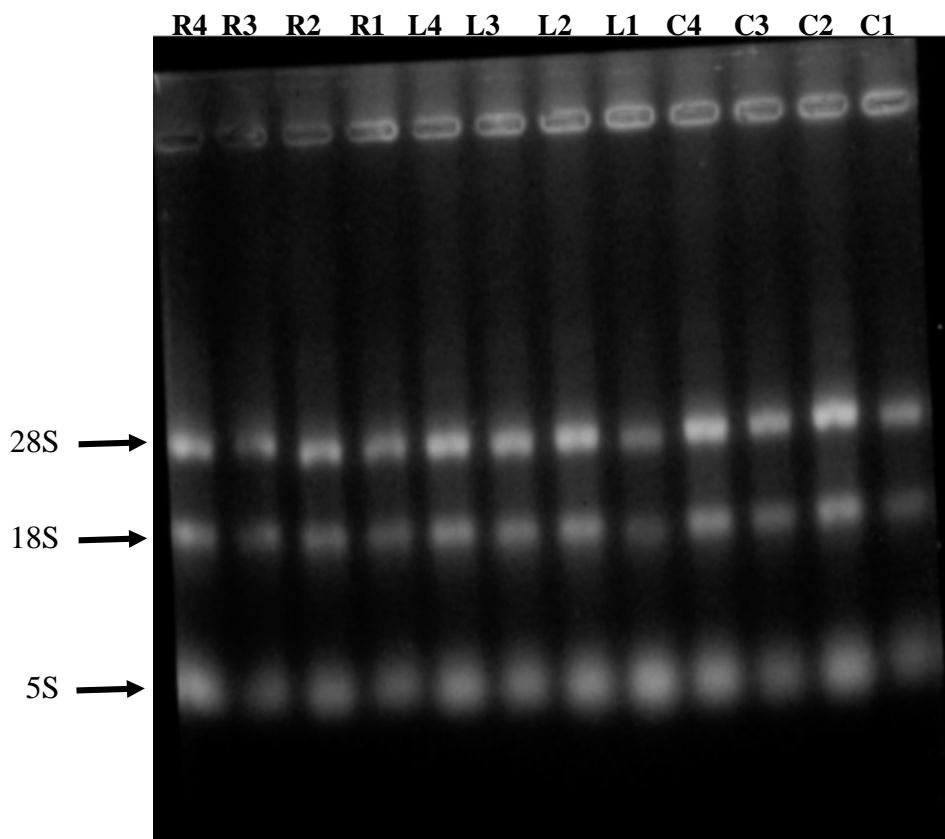
**Figura 28** - Efeito do anticorpo anti-RP3ADAM9 sobre a inibição da adesão celular. Foi usado para este ensaio a linhagem celular FH e o Anticorpo Anti-RP3ADAM9. Colágeno tipo I (1µg/poço) foi imobilizado por 12 horas a 4°C em placa de 96 poços. Após bloqueio com BSA 1%, as células marcadas com CMFDA e em seguida foram lavadas com tampão de adesão e incubadas com o anticorpo anti-RP3ADAM9, usando diferentes concentrações (1,0µg, 2,5µg, 5,0µg e 7,0µg) e foram plaqueadas nos poços. A placa foi incubada a 37°C por 30 minutos, as células foram lisadas e quantificadas. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.



Para determinar o efeito do silenciamento do gene que codifica para a ADAM9 em ensaios biológicos, entre eles proliferação celular e invasão em matrigel, as células MDA-MB-231 foram silenciadas com siRNA/ADAM9, e em seguida testadas. Os resultados obtidos com o emprego desta técnica estão representados abaixo (item 5.5-5.9).

### **5.5- Extração de RNA total**

Através do gel de agarose-formaldeído 1%, foi possível verificar a eficiência da técnica de extração de RNA total pelo aparecimento das bandas correspondentes ao RNA ribossômico 28S, 18S e 5S, observando assim a integridade do RNA extraído, e um arraste característico representando os demais RNAs de tamanhos variados. A figura 29 também mostra a ocorrência de contaminação das amostras com DNA genômico, sendo assim, antes da produção dos cDNAs as amostras de RNAs foram tratadas com DNase (descrito no item 3.8.3).



**Figura 29** - Amostras dos RNAs total extraído da linhagem celular MDA-MB-231, resolvido em gel de agarose-formaldeído 1%. C = células MDA-MB-231 Controle, L = células MDA-MB-231 com Lipofectamina e R = células MDA-MB-231 silenciadas.

## **5.6- PCR quantitativo (RT-PCR)**

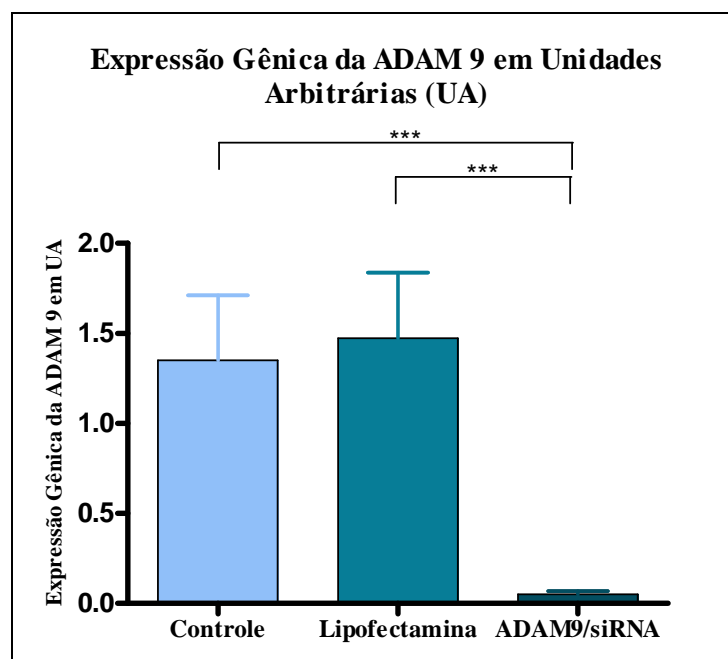
Após as extrações dos RNAs e tratamento destes com DNase, foram produzidos os cDNAs a partir destes, pois o cDNA é uma molécula mais estável facilitando a manipulação nos experimentos seguintes. Com os cDNAs foi realizado o experimento de RT-PCR utilizando *primers* específicos para o gene de interesse (ADAM9) e para o gene controle (HPRT).

Desta forma, foi realizado o PCR em tempo real para a quantificação da expressão do mRNA da ADAM9. Com este experimento foram obtidos os valores de  $C_t$  em duplicata para cada amostra e foi calculada a média desses valores, como mostrado na tabela 6 abaixo. A tabela traz as médias dos  $C_{ts}$  da expressão do gene normalizador HPRT e do gene alvo ADAM9. Em seguida são apresentados os valores do  $\Delta C_t$ , que representa a média do  $C_t$  da ADAM9 subtraída da média do  $C_t$  do HPRT. A média  $S$  representa a média dos  $\Delta C_t$  de cada tipo de tratamento. Os  $\Delta\Delta C_{ts}$  dos três grupos foram calculados da seguinte forma: do grupo Controle é  $\Delta C_t - \text{Média}S\Delta C_t \text{ grupo controle}$ ; grupo Lipo é  $\Delta C_t - \text{Média}S\Delta C_t \text{ grupo controle}$ ; e grupo siRNA é  $\Delta C_t - \text{Média}S\Delta C_t \text{ grupo lipo}$ . Por fim, são mostrados os valores de expressão de cada tratamento representado em unidades arbitrárias (UA). Os níveis de expressão de mRNA da ADAM9 foram normalizados pelos níveis de mRNA para HPRT.

**Tabela 6.** Cálculo da expressão do mRNA da ADAM9 obtido pela PCR em tempo real.

Grupo	HPRT Média C <sub>ts</sub>	ADAM9 Média C <sub>ts</sub>	$\Delta C_t$	Média S	$\Delta\Delta C_t$	UA	Média UA
Controle 1	21,645	22,875	1,23	<b>1,96</b>	-0,73	1,7	<b>1,4</b>
Controle 2	20,04	20,845	0,805		-1,16	2,2	
Controle 3	20,265	21,13	0,865		-1,10	2,1	
Controle 4	19,72	20,975	1,255		-0,70	1,6	
Controle 5	21,59	25,745	4,155		2,20	0,2	
Controle 6	21,395	24,87	3,475		1,52	0,3	
Lipo 1	21,295	22,035	0,74	<b>1,81</b>	-1,22	2,34	<b>1,46</b>
Lipo 2	20,23	21,005	0,775		-1,19	2,38	
Lipo 3	19,82	21,04	1,22		-0,74	1,68	
Lipo 4	19,95	21,215	1,265		-0,70	1,62	
Lipo 5	23,685	27,895	4,21		2,25	0,21	
Lipo 6	24,25	26,935	2,685		0,72	0,61	
siRNA 1	20,53	26,43	5,9	<b>7,18</b>	4,08	0,06	<b>0,05</b>
siRNA 2	20,595	25,535	4,94		3,12	0,11	
siRNA 3	20,595	32,84	12,24		10,43	0,0	
siRNA 4	20,035	25,82	5,785		3,97	0,06	
siRNA 5	24,48	30,06	5,58		3,76	0,07	
siRNA 6	19,43	28,05	8,62		6,80	0,01	

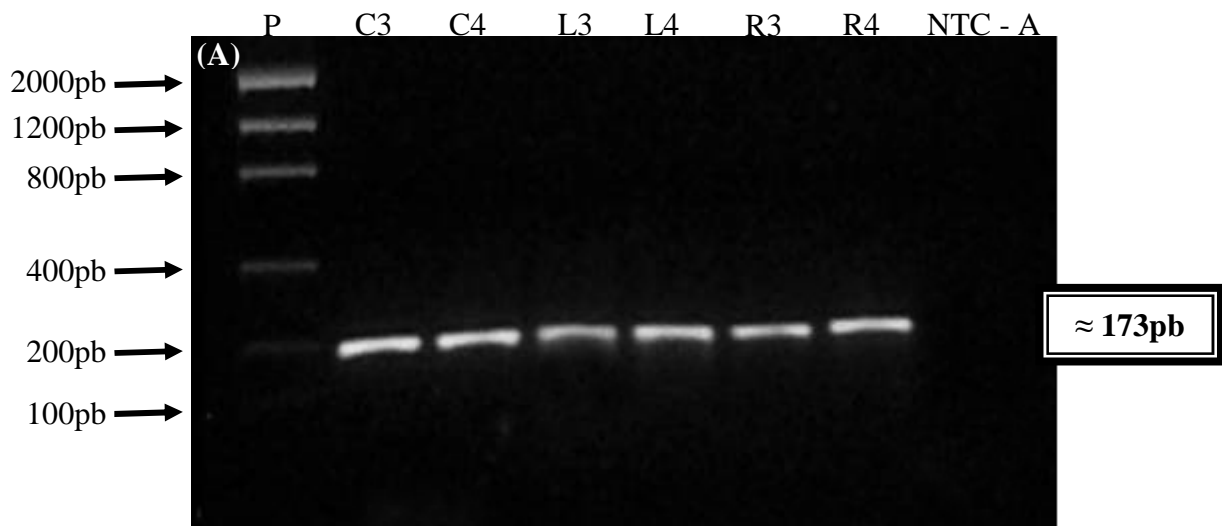
Com os valores em UA foi realizado teste estatístico utilizando o *software* GraphPad Prism4. A figura 30 abaixo contém a representação gráfica dos valores da expressão da proteína ADAM9 em UA.

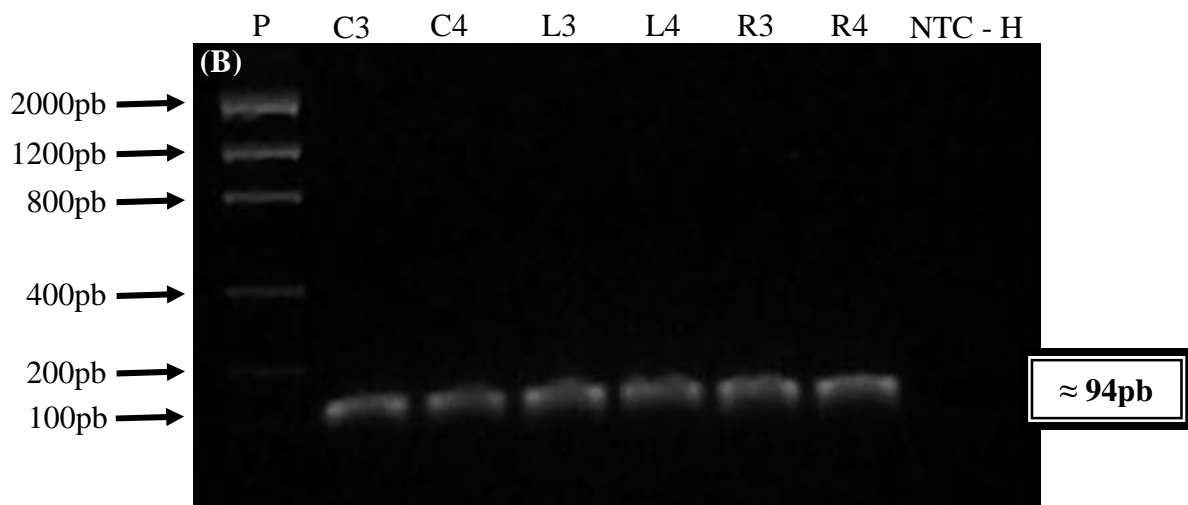


**Figura 30** - Representação gráfica da expressão da ADAM9 em unidades arbitrárias (UA). Os valores com significância estatística foram atribuídos para  $p < 0,05$ , sendo  $***p < 0,001$ . (ANOVA/TURKEY).

Observa-se na figura 30 que a expressão da proteína ADAM9 ficou drasticamente diminuída nas células MDA-MB-231 tratadas com RNAi, ou seja, o silenciamento do gene que codifica para a ADAM9 inibiu completamente a expressão desta proteína quando comparado com o controle (células MDA-MB-231 sem nenhum tipo de tratamento) e também em relação as células tratadas com lipofectamina, descartando assim qualquer hipótese de que o agente transfectante – lipofectamina – pudesse causar alteração na expressão da proteína em questão.

Os produtos da RT-PCR foram resolvidos em gel de agarose 2%, e os resultados obtidos estão apresentados na figura abaixo. A figura 31 são fotos representativas dos géis de agarose (2%) com os produtos de RT-PCR, a partir das células MDA-MB-231, para todos os tipos de tratamento: controle, lipofectamina e siRNA/ADAM9. Usando *primers* para a amplificação de uma região específica da proteína ADAM9 (domínio desintegrina) (Figura 31A) e também *primers* para o HPRT (gene controle - hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase) (Figura 31B), foi possível verificar a amplificação dos fragmentos desejados. Os produtos de RT-PCR neste caso estão em torno de 173pb para a ADAM9 e 94pb para o gene controle HPRT.



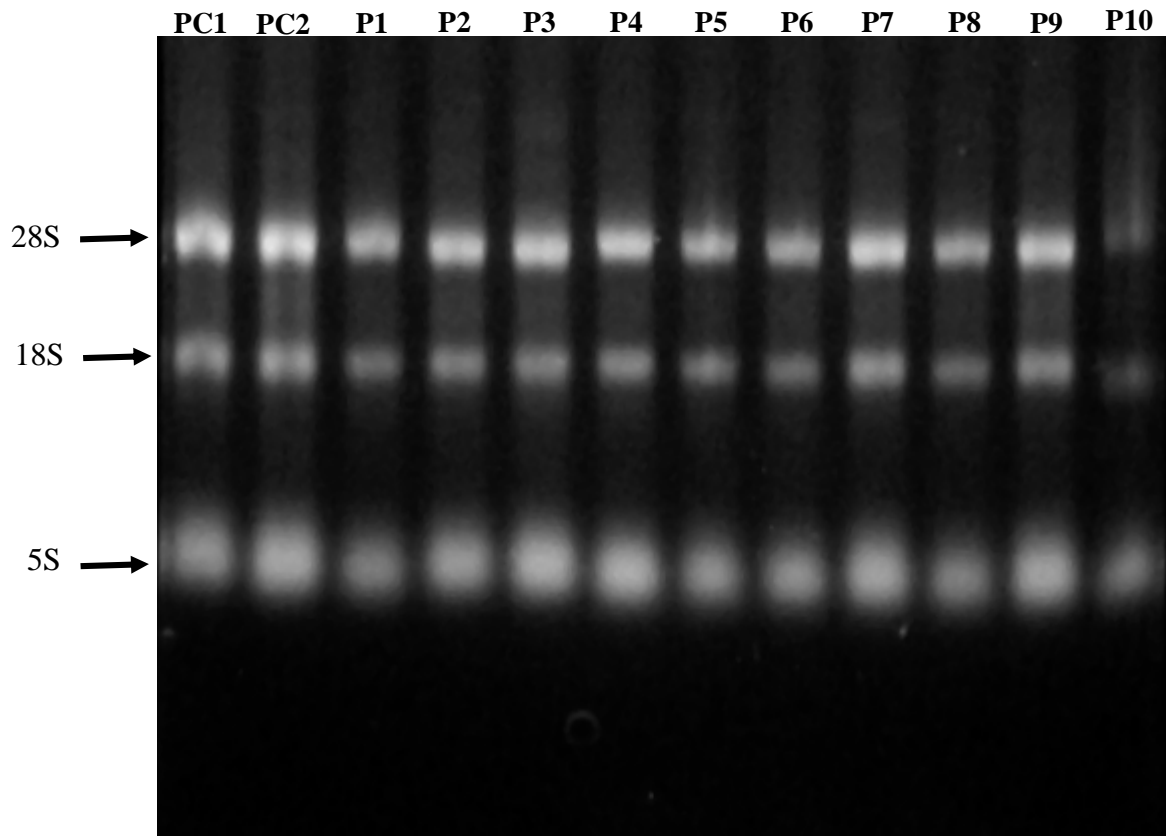


**Figura 31** - Fotos representativas dos produtos de RT-PCR da proteína ADAM9 (A) e HPRT (B) em células MDA-MB-231 e com os três tipos de tratamento: C = células MDA-MB-231 Controle; L = células MDA-MB-231 com Lipofectamina; e R = células MDA-MB-231 silenciadas. Padrão de DNA de baixo peso molecular.

### **5.7- Cinética de Silenciamento do gene que codifica para a ADAM9**

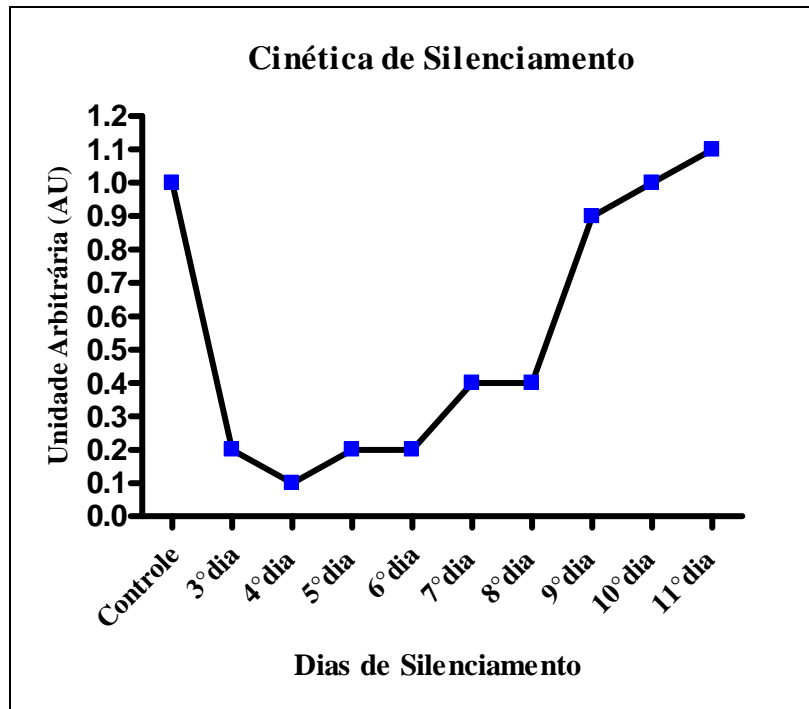
Foi necessário realizar uma cinética de silenciamento do gene que codifica para a ADAM9 para verificar o tempo de eficiência desta técnica de silenciamento nesta linhagem celular, ou seja, na linhagem MDA-MB-231. Para tal, foi realizado um ensaio em que a mesma quantidade de células foi adicionada em várias placas e todas foram transfectadas com a mesma quantidade de siRNA. Desta forma, foram feitas 12 placas de 6cm contendo, cada uma  $0,2083 \times 10^6$  células e 5ml de meio DMEM sem antibiótico e fungizona. Porém, dessas 12 placas: (i) duas representaram as células controle, ou seja, sem tratamento com agente de transfecção e sem *primer* de silenciamento; (iii) e as placas restantes, ou seja, as outras 10 placas representaram as células silenciadas, tratadas com agente de transfecção e o *primer* de silenciamento do RNA que codifica para a ADAM9 (ver item 3.9).

O RNA total foi extraído com auxílio do reagente TRizol (Invitrogen) seguindo as orientações do fabricante. Através do gel foi possível verificar a eficiência técnica de extração de RNA pelo surgimento das bandas correspondentes ao RNA ribossômico 28S, 18S e 5S (Figura 32), observando assim a integridade do RNA extraído, e um arraste característico representando os demais RNA de tamanhos variados. Os RNAs das amostras representadas na figura 32 abaixo, também foi tratado com DNase para evitar possível contaminação das amostras com DNA genômico, sendo assim, antes da produção dos cDNAs as amostras de RNAs foram tratadas com DNase (ver itens 3.8-3.9).



**Figura 32** - Amostras do RNA total extraído da linhagem celular MDA-MB-231, resolvido em gel de agarose-formaldeído 1%. PC1 e PC2 = células MDA-MB-231 controles, sem tratamento com agente de transfecção e sem silenciamento e de P1-P10 = células MDA-MB-231 silenciadas, tratadas com Lipofectamina 2000 e o *primer* de silenciamento do RNA. P1 = 3<sup>o</sup> dia de silenciamento e assim sucessivamente até P10 = 12<sup>o</sup> dia de silenciamento.

A figura 33 representa o gráfico da cinética de silenciamento do gene que codifica para a ADAM9 em células MDA-MB-231. É possível observar uma maior eficiência do silenciamento do gene que codifica para a ADAM9 do 3<sup>o</sup> ao 6<sup>o</sup> dia, sendo que no 7<sup>o</sup> e 8<sup>o</sup> dia a expressão gênica dessa proteína ainda se mantém baixa, porém após o 8<sup>o</sup> dia de silenciamento a expressão aumenta de forma exponencial atingindo valores semelhantes aos obtidos pelas células controle. Desta forma, conclui-se que o silenciamento perdeu sua eficiência após o 8<sup>o</sup> dia.

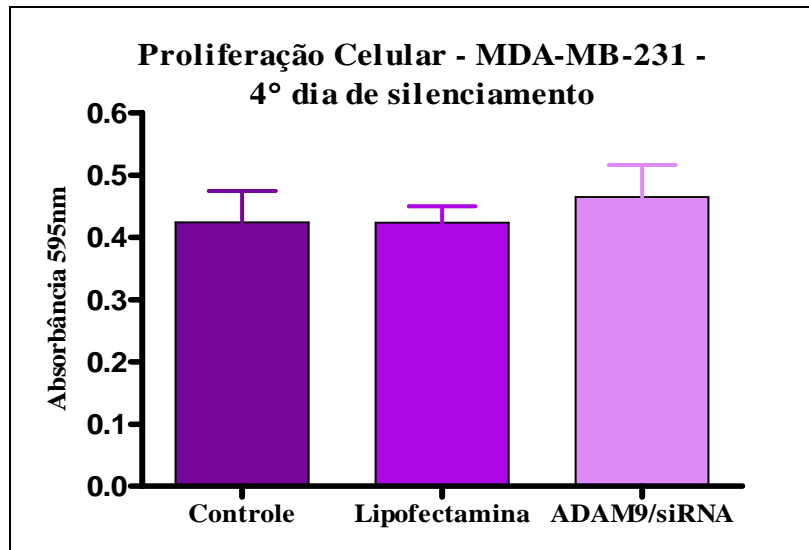


**Figura 33** - Cinética de Silenciamento do gene que codifica para a ADAM9 em células MDA-MB-231. As células tumorais, controle ou transfectadas e silenciadas foram plaqueadas conforme descrito nos materiais e métodos (item 3.8). Após três dias do silenciamento, as placas foram sendo retiradas uma a uma aleatoriamente em cada dia para extração do RNA total e análise por RT-PCR.

### 5.8- Ensaio de Proliferação Celular

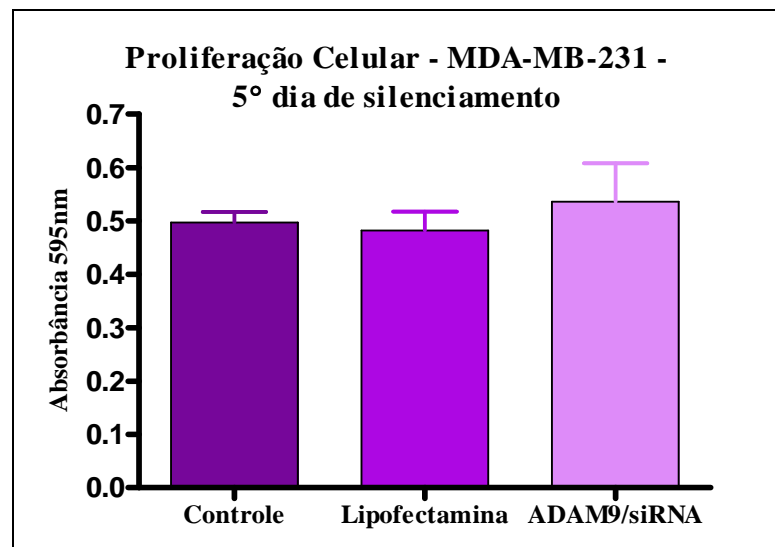
Para estudar o efeito da proteína ADAM9 na proliferação celular, as células MDA-MB-231 foram transfectadas e silenciadas. Para tal, as células foram divididas em três tipos de tratamento: (i) células controle, sem tratamento com agente de transfecção e sem silenciamento; (ii) células tratadas somente com agente de transfecção; e (iii) células silenciadas, tratadas com agente de transfecção e o *primer* de silenciamento siRNA/ADAM9 (ver item 3.8).

Como podemos observar na figura 34 o silenciamento do gene que codifica para a proteína ADAM9 não afetou a proliferação das células MDA-MB-231, 4 dias após o silenciamento e após 24 horas de incubação.



**Figura 34** - Efeito do silenciamento da proteína ADAM9 sobre a proliferação das células MDA-MB-231, 4 dias após o silenciamento e 24 horas após a incubação. As células foram plaqueadas 3 dias após o silenciamento e incubadas por 24 horas em estufa. Após o tempo de incubação, foi adicionado o agente MTT e incubado por 4 horas. A leitura das absorbâncias foi realizada (595nm). Tipos de tratamento: células MDA-MB-231 – controle, células MDA-MB-231 com lipofectamina e células MDA-MB-231 com administração de siRNA/ADAM9.

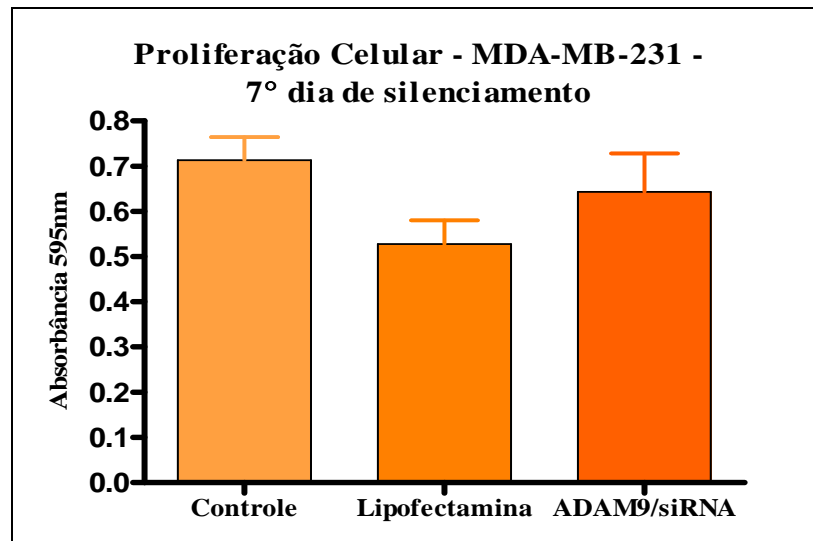
Resultados semelhantes foram encontrados quando o teste foi realizado 5 dias após o silenciamento e após 48 horas de incubação (Figura 35).



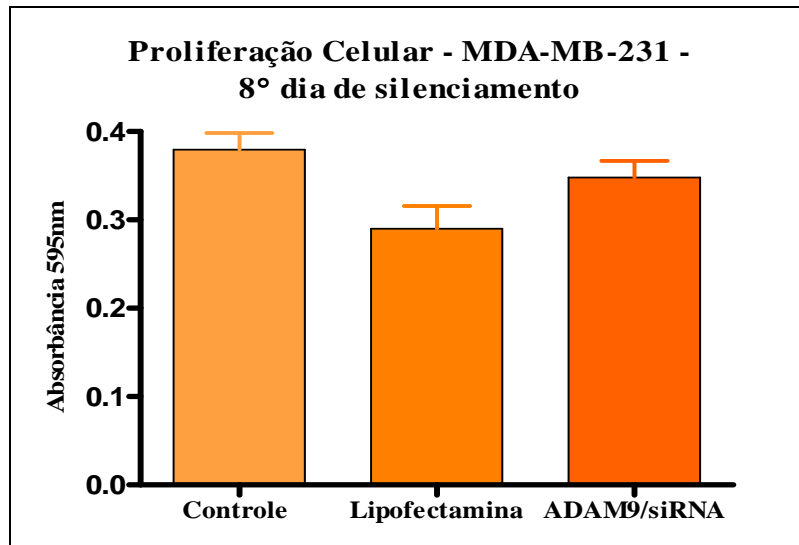
**Figura 35** - Efeito do silenciamento da proteína ADAM9 sobre a proliferação das células MDA-MB-231, 5 dias após o silenciamento e 48 horas após a incubação. As células foram plaqueadas 3 dias após o silenciamento e incubadas por 48 horas em estufa. Após o tempo de incubação, foi adicionado o agente MTT e incubado por 4 horas. A leitura das absorbâncias foi realizada (595nm). Tipos de tratamento: células MDA-MB-231 – controle, células MDA-MB-231 com lipofectamina e células MDA-MB-231 com administração de siRNA/ADAM9.



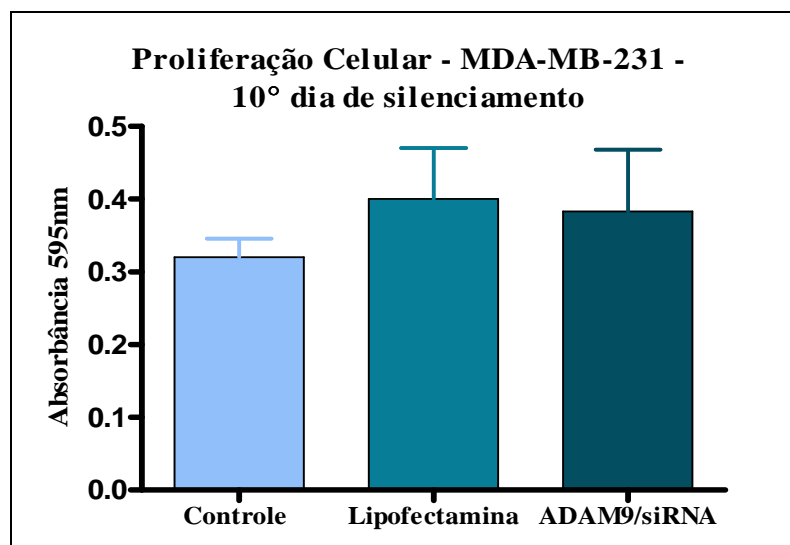
O mesmo pode ser observado quando analisadas as figuras 36, 37 e 38. O silenciamento do gene que codifica para a proteína ADAM9 nas células MDA-MB-231 não produziu efeito algum sobre a proliferação desta linhagem celular, 7, 8 e 10 dias após o silenciamento, respectivamente.



**Figura 36** - Efeito do silenciamento da proteína ADAM9 sobre a proliferação das células MDA-MB-231, 7 dias após o silenciamento e 24 horas de incubação. As células foram plaqueadas 6 dias após o silenciamento e incubadas por 24 horas em estufa. Após o tempo de incubação, foi adicionado o agente MTT e incubado por 4 horas. Transcorrido este tempo os cristais formados foram solubilizados e a leitura das absorbâncias foi realizada (595nm). Tipos de tratamento: células MDA-MB-231 – controle, células MDA-MB-231 com lipofectamina e células MDA-MB-231 com administração de siRNA/ADAM9.

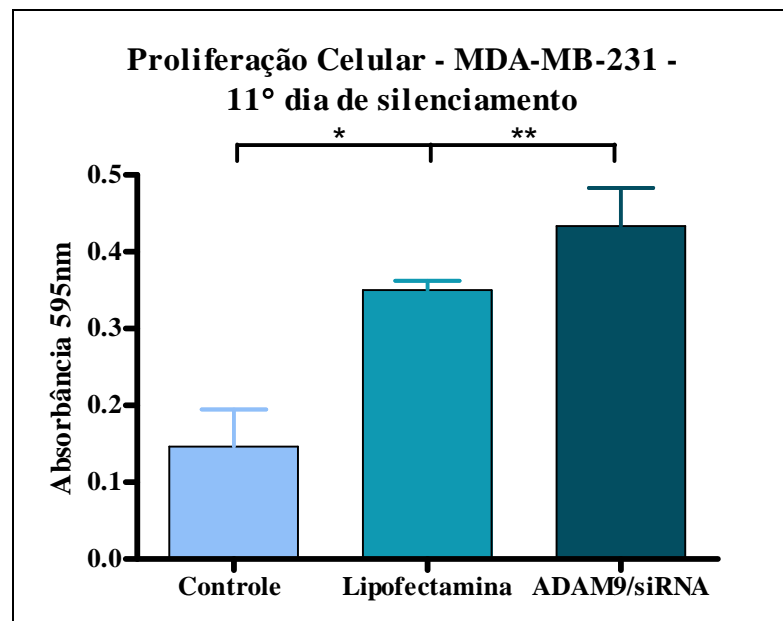


**Figura 37** - Efeito do silenciamento da proteína ADAM9 sobre a proliferação das células MDA-MB-231, 8 dias após o silenciamento e 48 horas de incubação. As células foram plaqueadas 7 dias após o silenciamento e incubadas por 48 horas em estufa. Após o tempo de incubação, foi adicionado o agente MTT e incubado por 4 horas. Transcorrido este tempo os cristais formados foram solubilizados e a leitura das absorbâncias foi realizada (595nm). Tipos de tratamento: células MDA-MB-231 – controle, células MDA-MB-231 com lipofectamina e células MDA-MB-231 com administração de siRNA/ADAM9.



**Figura 38** - Efeito do silenciamento da proteína ADAM9 sobre a proliferação das células MDA-MB-231, 10 dias após o silenciamento e 24 horas de incubação. As células foram plaqueadas 9 dias após o silenciamento e incubadas por 24 horas em estufa. Após o tempo de incubação, foi adicionado o agente MTT e incubado por 4 horas. Transcorrido este tempo os cristais formados foram solubilizados e a leitura das absorbâncias foi realizada (595nm). Tipos de tratamento: células MDA-MB-231 – controle, células MDA-MB-231 com lipofectamina e células MDA-MB-231 com administração de siRNA/ADAM9.

No entanto, 11 dias após o silenciamento e 48 horas após a incubação houve um aumento significativo na proliferação celular da linhagem MDA-MB-231 quando somente transfectadas (2,39x) ou transfectadas e silenciadas (2,96x) comparadas com as células controles. Entretanto, através da cinética de silenciamento (Figura 33) podemos observar que a partir do 8º dia de silenciamento houve um aumento da expressão gênica da proteína ADAM9, sendo assim, podemos concluir que o silenciamento perdeu sua eficiência (Figura 39).



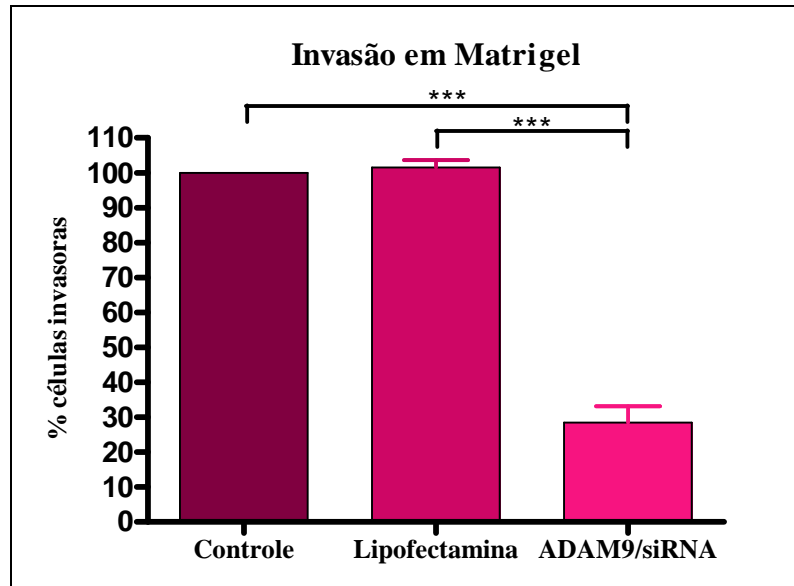
**Figura 39** - Efeito do silenciamento da proteína ADAM9 sobre a proliferação das células MDA-MB-231, 11 dias após o silenciamento e 24 horas de incubação. As células foram plaqueadas 9 dias após o silenciamento e incubadas por 48 horas em estufa. Após o tempo de incubação, foi adicionado o agente MTT e incubado por 4 horas. A leitura das absorbâncias foi realizada (595nm). Tipos de tratamento: células MDA-MB-231 – controle, células MDA-MB-231 com lipofectamina e células MDA-MB-231 com administração de siRNA para ADAM9. Os valores com significância estatística foram atribuídos para  $p < 0,05$ , sendo \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  (ANOVA/TURKEY).

### **5.9- Ensaio de Invasão em Matrigel**

Neste experimento, as células MDA-MB-231 foram divididas nos três tipos de tratamento, conforme descrito anteriormente. As células foram tripsinizadas, contadas e ressuspensas em DMEM sem soro e adicionadas sobre o matrigel em placa de 24 poços, conforme descrito nos materiais e métodos (ver item 3.11).

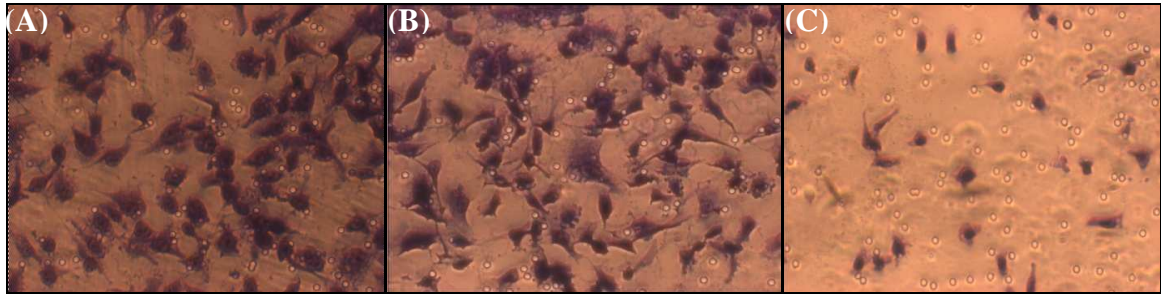
Os resultados observados na figura 40 indicam que o silenciamento do gene que codifica para a ADAM9 humana inibiu significativamente a invasão das células MDA-

MB-231 em matrigel ( $71,51 \pm 8,02\%$ ). Os valores obtidos no controle foram assumidos como 100% de invasão e os demais valores foram calculados proporcionalmente. O tratamento das células com lipofectamina não provocou diferenças estatísticas significativas nas características invasivas das células em relação ao controle.



**Figura 40** - Efeito do silenciamento do gene que codifica a ADAM9 humana sobre a invasão em matrigel das células MDA-MB-231. As células tumorais foram ressuspensas em DMEM sem soro e adicionadas sobre o matrigel em placa de 24 poços. No compartimento inferior foi adicionado meio com soro como agente quimioatraente. As células invasoras foram fixadas e coradas. As médias dos oito campos fotografados em cada tratamento (controle, lipofectamina e siRNA) em triplicata foram calculadas. Os valores com significância estatística foram atribuídos (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; ANOVA/TURKEY).

A figura 41 representa um dos oito campos fotografados em cada tipo de tratamento (controle, lipofectamina e siRNA/ADAM9). O primeiro campo (Figura 41A) representa as células MDA-MB-231 controle, ou seja, sem tratamento com agente de transfecção e sem silenciamento, que invadiram o matrigel. No segundo campo (Figura 41B) estão representadas as células MDA-MB-231 tratadas somente com agente de transfecção e que invadiram o matrigel, e no último campo (Figura 41C) as células MDA-MB-231 silenciadas. Nestas figuras ficam nítidos os resultados apresentados na figura 40 acima, ou seja, as células silenciadas apresentam menor capacidade de invasão em matrigel, quando comparadas com as células controle ou com lipofectamina.



**Figura 41** - Efeito do silenciamento do gene que codifica a ADAM9 humana sobre a invasão em matrigel das células MDA-MB-231. As células tumorais foram ressuspensas em DMEM sem soro e adicionadas sobre o matrigel em placa de 24 poços. No compartimento inferior foi adicionado meio com soro como agente quimioatraente. As células invasoras foram fixadas e coradas. **(A)** células MDA-MB-231 controle, **(B)** células MDA-MB-231 tratadas somente com lipofectamina e **(C)** células MDA-MB-231 silenciadas. Oito imagens de campos distintos de cada inserto foram fotografadas com o auxílio de uma câmera *Cool Snap-Pro Color* integrada ao microscópio e do *software Image - Pro Plus* (aumento 100X).

## **6. DISCUSSÃO**

Invasão e metástase de tumores humanos são processos compostos por muitas etapas e que exigem interações célula-célula e célula-matriz dentro do tecido hospedeiro. Os resultados dessas interações levam a produção, liberação e ativação de uma variedade de citocinas e fatores de crescimento, desta forma gerando sinais que diretamente ou indiretamente promovem o crescimento e sobrevivência tumoral (ZIGRINO *et al.*, 2005). Essas etapas podem ser resumidas da seguinte forma: separação de algumas células do tumor primário, penetração destas através da membrana basal, migração das células para dentro da MEC, extravasamento para os vasos sanguíneos ou linfáticos, sobrevivência dentro dos vasos, adesão das células tumorais ao endotélio dos vasos, extravasamento das células pelos capilares de órgãos ou tecidos alvos, adesão ao novo sítio e, formação dos tumores secundários. Uma vez no tecido secundário essas células podem morrer, tornarem-se células dormentes ou iniciar a proliferação em focos avasculares ou micrometástases. Esses focos podem ficar durante um período em latência e em estado indetectável, até que consigam o recrutamento adequado de fatores angiogênicos (HOOD & CHERESH, 2002; PONTIER & MULLER, 2008).

Modulação do microambiente tecidual através da degradação da MEC, o processamento de fatores de crescimento e ativação de moléculas de adesão celular são essenciais para a proliferação e progressão das células de câncer (MOCHIZUKI & OKADA, 2007). Além disso, a degradação da matriz extracelular é um pré-requisito para o reparo tecidual, migração celular e para liberação de fatores de crescimento e peptídeos bioativos (ZIGRINO *et al.*, 2007). Diferentes proteases têm sido implicadas nesses processos, tais como metalopeptidases de matriz (MMPs), outras famílias de proteases (serino, cisteína e aspártica), as ADAMs e as ADAMTSs (que apresentam o domínio trombospondina adicional) (MOCHIZUKI & OKADA, 2007; ROCKS *et al.*, 2008; ZIGRINO *et al.*, 2007).

A ADAM9 está envolvida em processos celulares, tais como adesão celular, migração e sinalização (ZUBEL *et al.*, 2009), e também pode estar essencialmente envolvida na carcinogênese e progressão tumoral (FRITZSCHE *et al.*, 2008<sup>b</sup>). Desta forma, as habilidades que esta proteína apresenta de degradar substratos específicos da matriz extracelular, liberação de fatores de crescimento ativos, interação com fatores regulatórios-chaves e promoção da invasão em diversas metástases de tumores, sugerem que a ADAM9 promova o crescimento da célula tumoral, além de invasão e metástase (SUNG *et al.*, 2006).

O aumento da expressão desta proteína tem sido reportado em diversos carcinomas humanos, tais como carcinomas de próstata (FRITZSCHE *et al.*, 2008<sup>b</sup>) e de mama (O'SHEA *et al.*, 2003).

Devido ao grande envolvimento da ADAM9 em diversos carcinomas humanos, o presente trabalho buscou analisar a expressão e a função da proteína ADAM9 na invasão de células tumorais.

Observando os resultados encontrados na realização de *Western Blotting* (Figura 16) utilizando as lises das células tumorais, MDA-MB-231 e DU-145, foi possível verificar que em todas as amostras houve reconhecimento da glicoproteína ADAM9 pelos anticorpos anti-ADAM9 usados [anti-ADAM9D (reconhece especificamente o domínio desintegrina), anti-ADAM9 N-terminal (reconhece a extremidade N-terminal e a ADAM9 ativa), e o anticorpo anti-RP2ADAM9 (reconhece a extremidade C-terminal)]. Entretanto, aqui se faz necessário uma discussão sobre os resultados encontrados nesta técnica, pois a detecção da proteína ADAM9 nas linhagens de câncer de mama ou próstata não apareceram no tamanho predito de 90,5kDa, ou ainda devido as regiões de glicosilação e do domínio rico em cisteína, a proteína migra para 114kDa (forma não processada) e 84kDa (forma processada) (de acordo com as instruções dos fabricantes), mas apareceram bandas de aproximadamente 75kDa nas três membranas de nitrocelulose testadas e incubadas com os três diferentes anticorpos anti-ADAM9. Porém, segundo as instruções do fabricante, é possível a detecção de uma banda de 75kDa em amostras reduzidas de lisados celulares.

Os resultados encontrados por ROGHANI *et al.* (1999) e SHINTANI *et al.* (2004) em seus experimentos utilizando a técnica de *Western Blotting* vão ao encontro do tamanho predito da proteína ADAM9 descrito acima, ou seja, ambos trabalhos detectaram a forma processada (84kDa) desta proteína, porém, estes autores não utilizaram os mesmos anticorpos usados em nossos experimentos, eles utilizaram o anticorpo policlonal anti-ADAM9 (contra o domínio citoplasmático) e o anticorpo policlonal anti-ADAM9 (Chemicon, Temecula, CA), respectivamente. Entretanto FRITZSCHE *et al.* (2008<sup>b</sup>), também utilizando esta técnica e analisando amostras de tecidos da próstata normal ou com tumor, detectaram duas formas desta proteína com massa molecular de 80kDa e 70kDa, sendo que os níveis relativos da proteína de 80kDa estavam aumentados no câncer de próstata quando comparado com o tecido normal. ZIGRINO *et al.* (2007), detectaram por *Western Blotting* as formas pró (115kDa) e ativa (80kDa) da ADAM9 na lise total das células HaCaT (queratinócitos imortalizados). Já SUNG *et al.* (2006), avaliando a superexpressão da proteína ADAM9 sob condições de estresse, tais como confluência de 100% e hipóxia, observaram que além do

aumento da expressão da proteína ADAM9 (proteína com aproximadamente 80kDa), uma proteína imunorreativa de menor tamanho, definida como uma proteína ADAM9-like de massa molecular na faixa de 60 a 65 kDa, reagiu positivamente com o anticorpo anti-ADAM9 usado e foi induzida sob condições de estresse e com peróxido de hidrogênio. Desta forma, estes três experimentos também observaram diferentes tamanhos da proteína ADAM9 em diferentes linhagens celulares. E por último, WESKAMP *et al.* (1996), utilizando esta mesma técnica para avaliar a presença e/ou ausência da glicoproteína ADAM9 em amostras de diferentes tecidos de camundongos e em linhagens celulares, NIH 3T3 (fibroblasto de camundongo) e C2C12 (mioblasto de camundongo), e com o auxílio do anticorpo anti-ADAM9-cito IgG (cauda citoplasmática da proteína ADAM9 de camundongo), detectaram esta proteína (aproximadamente 84kDa) em todos os tecidos examinados e nas linhagens celulares acima descritas. Este anticorpo também detectou uma banda de 76kDa em uma amostra não reduzida de tecido do pulmão de camundongo. Desta forma, essas disparidades encontradas na detecção da proteína ADAM9 podem ser provavelmente devido à forma com que as amostras são tratadas para a realização da técnica de *Western Blotting*, os diferentes anticorpos usados e confeccionados para diferentes domínios, e também devido à diferença na glicosilação da proteína madura.

Ainda discutindo os resultados encontrados com a técnica de *Western Blotting* (Figuras 17, 18 e 19 porção superior), porém utilizando além dos lisados celulares tumorais já testados e acima mencionados, também o lisado extraído da linhagem celular tumoral: PC-3 e não tumorais: FH e C2C12. Também foi possível observar que os três anticorpos testados reagiram intensamente com a banda de 75kDa, em todas as amostras testadas. A presença da proteína ADAM9 em linhagens celulares, tais como NIH 3T3 e C2C12, já foi observada por WESKAMP *et al.* (1996), por *Western Blotting*. Muitos trabalhos sobre câncer de próstata têm utilizado em seus experimentos a linhagem celular PC-3, entre eles, os experimentos realizados por ENGL *et al.* (2006), cujos resultados encontrados no crescimento e capacidade de adesão das células PC-3 e DU-145, identificaram essas duas linhagens como células tumorais altamente agressivas, sendo PC-3>DU-145. Além deste, os experimentos realizados por SUNG *et al.* (2006), demonstraram um aumento da expressão da ADAM9 (2,0 e 2,6 vezes) nas células DU-145 e PC-3 (andrógeno-independente) respectivamente, quando induzidas ao estresse (100% de confluência).

Utilizando ainda a técnica de *Western Blotting* as mesmas amostras foram testadas com o anticorpo anti-actina (Figuras 17, 18 e 19 porção inferior), o qual segundo as instruções do fabricante, reconhece uma banda de 43kDa, e em todas as amostras, tumorais e



não tumorais, houve a detecção da proteína Actina (massa molecular de 43kDa) por este anticorpo. Este anticorpo foi usado como controle positivo, ou seja, trata-se de uma normalização da expressão de proteínas, pois a proteína Actina é expressa em todas as células de eucariotos e na maioria das vezes representa mais de 50% das proteínas celulares totais, e, além disso, esta proteína não se altera com a condição experimental e a intensidade de sua banda se mantém constante em todas as amostras testadas, mostrando desta forma, que realmente foi aplicado à mesma quantidade de proteína total em cada poço.

Para determinar se o domínio metaloprotease da proteína ADAM9 apresenta atividade proteolítica em gel de gelatina, foi utilizada a técnica de zimografia. Foi possível identificar a presença de duas metalopeptidases, sendo elas, a MMP-2 e a MMP-9. Em todas as linhagens celulares testadas (MDA-MB-231, DU-145, PC-3, FH e C2C12) foi possível observar a presença da MMP-2 intermediária, porém, esta MMP apresenta-se aumentada nos fibroblastos e na linhagem celular C2C12. Além disso, também foi possível observar a presença da MMP-2 na forma de pró-enzima e ativa, porém detectada somente nas linhagens celulares FH e C2C12. A MMP-2 (gelatinase A) pode ser encontrada numa variedade de células normais, bem como em algumas células que sofrem transformações, incluindo fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e condrócitos (CARPENA *et al.*, 2008; JOBIM *et al.*, 2008). Essa MMP é uma enzima que degrada componentes da MEC, e supostamente desempenha um papel importante na invasão à membrana basal e na migração celular durante processos fisiológicos e patológicos (JEZIERSKA & MOTYL, 2009), sendo que os processos fisiológicos nos quais estas enzimas, de maneira especial a MMP-2 pode estar envolvida, vão desde a proliferação celular, diferenciação, apoptose, cicatrização de feridas e remodelamento da MEC para a vascularização (angiogênese) e migração celular. A expressão aumentada desta MMP na forma ativa em tecidos tumorais demonstra alto risco de metástase. Desta forma, a taxa de ativação de pró-MMP-2 para MMP-2 ativa é usado como um indicador de metástase tumoral (JEZIERSKA & MOTYL, 2009).

A atividade proteolítica da MMP-9 também foi observada através da realização da zimografia, porém, as linhagens celulares PC-3 e FH apresentam uma intensa atividade desta metalopeptidase, a qual não foi detectada nas outras linhagens testadas. Segundo CARPENA *et al.* (2008), a MMP-9 (gelatinase B) é produzida apenas em situações patológicas, tais como queratinócitos e macrófagos alterados e também por muitas células tumorais, entretanto os resultados encontrados neste experimento mostram que os FH também apresentaram atividade desta MMP, o que está de acordo com SOLINI *et al.* (2006), pois os fibroblastos não são apenas os grandes contribuintes para biossíntese de colágeno, mas

também participam do remodelamento da placa via expressão e liberação de MMP-2 e MMP-9.

A expressão de metalopeptidases pelas células é um dado muito importante, pois está relacionada com a capacidade invasiva das células, sendo que os níveis de MMP-2 e MMP-9 são fortes indicadores do potencial de invasão para células tumorais (DI NEZZA *et al.*, 2002; SATO *et al.*, 2004), pois são enzimas críticas na degradação de componentes da MEC durante a invasão e metástase tumoral (SHON *et al.*, 2009). Essas duas MMPs estão envolvidas na progressão de diversos carcinomas humanos, tais como, boca (oral), esôfago, laringe, estômago, endométrio, pele, pâncreas, próstata e mama (CARPENA *et al.*, 2008; JEZIERSKA & MOTYL, 2009). No entanto observando os resultados encontrados (Figura 20), verifica-se que as células MDA-MB-231 e DU-145 não apresentaram atividade da MMP-9. Aqui se faz necessário uma discussão, pois diversas publicações mostram que as células MDA-MB-231 (metastática) apresentam altos níveis de atividade da MMP-9, e esta atividade aumentada tem sido implicada na invasão e metástase tumoral (FARINA *et al.*, 1998; OLMEDA *et al.*, 2007; PRATAP *et al.*, 2005). Além disso, os resultados de HEGEDŰS *et al.* (2008), mostraram que 26 diferentes mRNAs de MMPs foram expressos nestas células, em níveis muito diferentes. E estes mesmos autores utilizando ensaio de invasão celular demonstraram que a MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-13 e MMP-14 foram reportadas por melhorar a capacidade de invasão das células MDA-MB-231. Desta forma, o resultado encontrado neste trabalho não está de acordo com o encontrado nas publicações, isto talvez se deva pelo fato que a linhagem usada neste trabalho estava com uma passagem muito alta (>100), e estas células podem ter perdido algumas características, entre elas a expressão da MMP-9.

A linhagem celular de câncer de próstata, DU-145, também foi utilizada neste trabalho, e como pode ser visto nos resultados com a técnica de zimografia (Figura 20), estas células não apresentaram atividade da MMP-9. As linhagens DU-145 e PC-3 são células tumorais epiteliais da próstata (andrógeno-independente) (BIDOSEE *et al.*, 2009), sendo que essas células são moderadas e altamente metastáticas, respectivamente (AALINKEEL *et al.*, 2004; ATTIGA *et al.*, 2000). Sendo assim, talvez este seja um dos motivos da não detecção da atividade da MMP-9, ou seja, por apresentar moderada capacidade de metástase. Entretanto, vários trabalhos têm detectado a atividade desta MMP na linhagem DU-145, ATTIGA *et al.* (2000) detectou em gel de zimografia bandas que correspondem a proMMP-9, proMMP-2, e MMP-2. Já MANĚS *et al.* (1999), detectaram a presença de uma banda de 92kDa com atividade gelatinolítica nas células DU-145, que corresponde a MMP-9.

Entretanto, assim como encontrado neste trabalho, MEYER-SIEGLER (2000), pode detectar apenas uma espécie gelatinolítica em gel de zimografia nas células DU-145, ou seja, a forma ativa (66kDa) e latente (72kDa) da MMP-2. Diferentemente de MEYER-SIEGLER (2000), neste trabalho foi possível detectar somente a MMP-2 intermediária nas células DU-145.

Apesar dos diferentes resultados encontrados, o objetivo maior ao empregar a técnica de zimografia foi para determinar se o domínio metaloprotease da proteína ADAM9 apresenta atividade proteolítica em gel de gelatina, porém concluímos que esta proteína não apresentou atividade quando utilizada esta técnica. Entretanto, este resultado negativo, ou seja, a não atividade desta proteína de interesse, pode talvez estar ligada a diferentes fatores, tais como a quantidade de proteína aplicada no gel ter sido pequena, além disso, ela pode ter ficado na fração insolúvel no precipitado ligada a fragmentos de membrana, e também pode ter sido desnaturada pelo TRITON-X100 no momento da lise celular.

A ADAM9 é uma molécula de adesão que interage com diferentes integrinas, entre elas, a integrina  $\alpha_v\beta_5$ , em células de mieloma e em osteoblastos (KARADAG *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2001), ou ainda esta interação está envolvida no processamento proteolítico do HB-EGF (FRITZSCHE *et al.*, 2008<sup>b</sup>; FRITZSCHE *et al.*, 2008<sup>a</sup>; GRÜTZMANN *et al.*, 2004). O domínio desintegrina da ADAM9 que contém o motivo ECD demonstrou ligar-se diretamente com as integrinas  $\alpha_6\beta_4$  e  $\alpha_2\beta_1$  em células de câncer de cólon (MAZZOCCA *et al.*, 2005), NATH *et al.* (2000) também demonstraram que o domínio desintegrina da ADAM9 se liga à integrina  $\alpha_6\beta_4$  em fibroblastos. Recentes estudos de COMINETTI *et al.* (2009) demonstraram que a integrina  $\alpha_v\beta_3$  é uma nova companheira de interação da ADAM9D (domínio desintegrina produzido em sistema bacteriano).

Foi descrito o envolvimento desta proteína em processos celulares, tais como adesão celular, migração e sinalização (ZUBEL *et al.*, 2009). Porém, para verificar se a ADAM9 promove adesão das células MDA-MB-231 e FH ao colágeno tipo I, foram usados anticorpos contra duas regiões desta proteína. Foi possível observar em todos os ensaios realizados não houve inibição da adesão, ou seja, os anticorpos anti-ADAM9D e anti-RP3ADAM9 (em diferentes concentrações) não inibiram a adesão das células MDA-MB-231 ao colágeno tipo I, e o anticorpo RP3ADAM9 (em diferentes concentrações) também não inibiu a adesão dos FH ao colágeno tipo I. Desta forma, apesar da ADAM9 ser uma molécula de adesão, existem outras moléculas que participam de interações adesivas, tais como os membros da super família das imunoglobulinas, as caderinas, as integrinas, as selectinas e as proteoglicanas da superfície celular (WOLFSBERG & WHITE, 1996).

Estudo recente, realizado por COMINETTI *et al.* (2009) utilizando a ADAM9D (domínio desintegrina produzido em sistema bacteriano), inibiu a adesão das células MDA-MB-231 ao colágeno tipo I em  $37.43 \pm 1.4\%$ , na concentração de 1000nM. Porém, neste estudo observou-se que a inibição da adesão celular pela ADAM9D foi apenas parcial, provavelmente pela presença de outros receptores presentes nas células MDA-MB-231 que se ligam ao colágeno, como a integrina  $\alpha_1\beta_1$ . Neste mesmo trabalho, foi realizado ensaio de competição de anticorpos, e os autores demonstraram que a interação da ADAM9D com as células MDA-MB-231 foi mediada principalmente pela integrina  $\beta_1$ . Desta forma, este trabalho de COMINETTI *et al.* (2009) demonstrou que a interação das células tumorais (MDA-MB-231) com ADAM9D foi mediada principalmente pela integrina  $\beta_1$ . No entanto, este resultado foi anteriormente demonstrado por ZIGRINO *et al.* (2007) e MAHIMKAR *et al.* (2005), os quais mostraram que os domínios desintegrina e rico em cisteína recombinantes da ADAM9 humana participam da adesão celular via integrina  $\beta_1$ .

Além disso, ensaios de citometria de fluxo realizados em nosso laboratório e utilizando as mesmas linhagens celulares utilizadas no ensaio de inibição de adesão deste trabalho (MDA-MB-231 e FH), mostraram que os FH apresentaram em sua superfície as subunidades  $\beta_1$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_V$  e  $\alpha_6$  de integrinas, e a integrina  $\alpha_V\beta_5$ , e as células MDA-MB-231 apresentam somente subunidades  $\beta_1$  e  $\alpha_5$  em sua superfície, entretanto, para esta última linhagem mencionada somente foram testadas as subunidades  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  e  $\alpha_5$  e a integrina  $\alpha_V\beta_3$  (dados não mostrados).

Portanto, a não inibição da adesão das células MDA-MB-231 e FH ao colágeno tipo I pelos anticorpos anti-ADAM9, pode estar ligado à presença de outras importantes moléculas de adesão na superfície celular dessas linhagens, pois observando os dados de nosso laboratório sobre a citometria de fluxo, a subunidade de integrina  $\beta_1$  presente na superfície celular dos FH e também presente na superfície das células MDA-MB-231, é um dos principais ligantes de colágeno tipo I, e, desta forma, mesmo utilizando anticorpos que bloqueiam a função adesiva da ADAM9, outras moléculas presente na superfície celular estariam fazendo esta função, entre elas as integrinas.

O tecnologia do RNAi surgiu como uma potente ferramenta de silenciamento gênico (XIAO-WEN *et al.*, 2008). A descoberta desta técnica é muito recente e foi primeiramente descrita por Napoli e Jorgensen em 1990 (BARBOSA & LIN, 2004; SHREY *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2007), porém, essa descoberta só ganhou atenção a partir de 1998 com os pesquisadores Fire, Mello e colaboradores (FIRE *et al.*, 1998; SHREY *et al.*, 2009). Após sua descoberta muitos trabalhos em diferentes áreas têm utilizado esta técnica como

uma das principais ferramentas de pesquisa biológica, principalmente em trabalhos ligados a terapia gênica do câncer. Apesar da existência de inúmeras publicações referentes à família das ADAMs, as informações sobre as funções das ADAMs no câncer ainda são limitadas, e se tornam ainda mais restritas quando se busca determinar o efeito da siRNA/ADAM9 no câncer de mama.

Desta forma, para determinar o efeito da siRNA/ADAM9 em ensaios biológicos, sendo eles, proliferação celular e invasão em matrigel, as células MDA-MB-231 foram silenciadas com siRNA/ADAM9, e em seguida testadas. Um dos motivos que nos levaram a testar o efeito desta proteína silenciada em células de câncer de mama, é que essa proteína esta envolvida em diversos processos celulares, tais como adesão celular, migração e sinalização (ZUBEL *et al.*, 2009). Além disso, as habilidades que a ADAM9 apresenta de degradar substratos específicos da matriz extracelular, liberação de fatores de crescimento ativos, interação com fatores regulatórios chaves e a promoção da invasão em diversas metástases tumorais, sugerem que a ADAM9 promova o crescimento do câncer, invasão e metástase (SUNG *et al.*, 2006), e sua expressão aumentada tem sido reportada em diversos carcinomas humanos, tais como carcinomas de próstata (FRITZSCHE *et al.*, 2008<sup>b</sup>) e mama (O'SHEA *et al.*, 2003).

Antes de iniciar a extração de RNA total para a realização do PCR em tempo real foi necessária a realização da cinética de silenciamento do gene que codifica para a ADAM9 em células MDA-MB-231, para verificar a eficiência da técnica do RNAi. Foi possível observar que a maior eficiência do silenciamento do gene que codifica para a ADAM9 acontece do 3° ao 6° dia, sendo que no 7° e no 8° dia a expressão gênica dessa proteína ainda se mantém baixa, porém após o 8° dia de silenciamento a expressão aumenta de forma exponencial atingindo valores semelhantes aos obtidos pelas células controle (Figura 33). Desta forma, conclui-se que o silenciamento perdeu sua eficiência após o 8° dia. Em células MDA-MB-435, semelhantes às utilizadas neste trabalho, o silenciamento do gene que codifica para a ADAM23, apresentou uma cinética muito similar mantendo-se silenciado até o 7° dia, quando usado duplexes sintéticos (Dra. Felícia Carvalher, Instituto Ludwig, comunicação pessoal). Como a maior eficiência do silenciamento do gene ADAM9 aconteceu do 3° ao 6° dia, optou-se realizar o RT-PCR e os dois experimentos acima mencionados no 3° dia de silenciamento.

A confirmação do silenciamento foi realizada por PCR em tempo real, e observando os valores de expressão de cada tratamento é possível verificar que as células MDA-MB-231 foram facilmente silenciadas usando uma concentração relativamente pequena

de siRNAs/ADAM9 (10nM). Conclui-se, que a expressão da proteína ADAM9 foi completamente inibida nas células MDA-MB-231 tratadas com siRNA quando comparado com as células controle e também com as tratadas com lipofectamina, desta forma, descarta-se qualquer hipótese do agente transfectante causar alterações na expressão da proteína em questão (Figura 30). Silenciamento eficiente e com concentração relativamente pequena de siRNAs (25nM), também foi realizado por ZENG *et al.* (2005), os quais também utilizaram lipofectamina como agente de transfecção, porém trabalharam com células HeyC2 (linhagem celular de câncer de ovário epitelial) e KGN (derivadas de células granulosa ovariana recorrentes de tumor) e silenciaram nessas células a ERK2 (importante regulador do crescimento, diferenciação e sobrevivência celular). Entretanto, o efeito do siRNA/ERK2 foi diferente entre as duas linhagens celulares testadas. As células KGN responderam bem ao siRNA/ERK2, enquanto as células HeyC2 pareciam mais refratárias ao silenciamento da ERK2. SUN *et al.* (2008), utilizando também a técnica de RNAi, demonstraram que a diminuição da expressão do VEGF-C em células de câncer de mama linhagem MCF-7 através do siRNA, suprime a formação de vasos linfáticos e aumenta a suscetibilidade a quimioterapia. Essas publicações citadas são apenas dois exemplos de utilização da técnica RNAi, porém pesquisando no *pubmed* é possível encontrar mais de 20.000 publicações, porém, quando essa pesquisa se torna mais específica, ou seja, quando se busca ADAM9 e RNAi é possível observar apenas 8 publicações. Desta forma, muito ainda deve ser feito quando se trata de pesquisa que englobe ADAM9, siRNA e câncer. Recente publicação de KLESSNER *et al.* (2009) engloba esses três itens, porém esses pesquisadores utilizaram as células SCC68 (células de carcinoma altamente invasivo de células escamosas), as quais foram cultivadas até 30% de confluência e posteriormente foram transfectadas com pequenos RNAs de interferência (siRNA) para ADAM9, 10, 15 e 17, Dsg2 (Caderina desmossomal desmogleina 2), E-caderina ou GAPDH humanos.

A degradação da matriz extracelular é um pré-requisito para reparo tecidual, migração celular e para liberação peptídeos bioativos. Diferentes proteases têm sido implicadas nestes processos, como as metalopeptidases de matriz (MMPs) e as famílias de proteases (serino, cisteína e aspártica), e as ADAMs (MOCHIZUKI & OKADA, 2007; ZIGRINO *et al.*, 2007). Desta forma, a disponibilidade de fatores de crescimento e seus receptores, bem como as interações célula-célula e célula-MEC são importantes nos processos de proliferação celular, adesão e migração, e esses processos estão diretamente relacionados com processos de formação e progressão tumoral, bem como com a formação de metástases (GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999; SUNG *et al.*, 2006).

Para estudar o efeito da ADAM9 na proliferação das células MDA-MB-231, foram utilizados três tipos de tratamentos: células controle, células com agente de transfecção e silenciadas (siRNA/ADAM9). É possível observar que o silenciamento do gene que codifica para a proteína ADAM9 não afetou a proliferação das células MDA-MB-231 (Figuras 34, 35, 36, 37 e 38). Entretanto, 11 dias após o silenciamento, houve um aumento significativo na proliferação das células MDA-MB-231 quando tratadas com agente de transfecção e quando transfectadas e silenciadas comparadas com as células controles, porém através da cinética de silenciamento (Figura 33) observa-se que no 11º dia de silenciamento esta técnica perdeu sua eficiência e a proteína ADAM9 voltou a ser expressa. Este aumento na proliferação das células silenciadas pode ser que após a normalização da expressão gênica, tenha havido alguma compensação, porém isto deve ser mais bem investigado (Figura 39).

Segundo ROCKS *et al.* (2008), as ADAMs e ADAMTSs controlam diversas funções celulares, tais como adesão, fusão, migração e proliferação. No entanto, foi possível observar que o silenciamento da ADAM9 não alterou a proliferação das células MDA-MB-231, desta forma, sugere-se que a ADAM9 não esteja envolvida na proliferação destas células. Entretanto, outras ADAMs podem desempenhar um papel fundamental neste processo, entre elas a ADAM17 (SCHAFER *et al.*, 2004; SANDERSON *et al.*, 2006), pois a clivagem da Anfiregulina liberada pela ADAM17 aumenta a proliferação das células de câncer (GSCHWIND *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2006). ADAM10 também contribui para proliferação celular, pois modula a sinalização da  $\beta$ -catenina através da liberação de E-caderina e aumento dos níveis do gene ciclina D1 (SHTUTMAN *et al.*, 1999). Outra ADAM envolvida neste processo é a ADAM12, KODAMA *et al.* (2007) encontraram que a ADAM12m (ancorada na membrana) é predominantemente expressa na forma ativa em glioblastomas, além disso estes autores sugeriram neste mesmo trabalho que a ADAM12m desempenha um papel fundamental na proliferação das células glioblastomas através da liberação de HB-EGF. Já CARL-McGRATH *et al.* (2005) e LENDECKEL *et al.* (2005) sugerem o envolvimento da ADAM15 no processo de proliferação de células tumorais, pois o tratamento de linhagens celulares de carcinoma com anticorpos anti-ADAM15 reduz a proliferação celular. Por último, OHTSUKA *et al.* (2006) demonstraram em seus experimentos com células de carcinoma de pulmão e ADAM28s (secretada) e ADAM28m (ancorada na membrana), uma correlação positiva com a proliferação das células de câncer e metástase do nodo linfático. ADAM28 tem sua expressão aumentada em células tumorais de mama, contribui para regulação da proliferação celular através da clivagem de IGFBP-3, intensificando a biodisponibilidade de IGF-1 (ROCKS *et al.*, 2008).

No ensaio de invasão em matrigel, também foram utilizados os três tipos de tratamento. Os resultados apresentados indicam que o silenciamento do gene que codifica para a ADAM9 inibiu significativamente a invasão das células MDA-MB-231 em matrigel (Figura 40), quando comparado com as células controle. Estes resultados demonstram o envolvimento da proteína ADAM9 no processo de invasão celular, sugerindo assim que esta proteína tenha um importante papel na invasão das células de câncer de mama (MDA-MB-231). Esta conclusão fica ainda mais alicerçada quando se observa os resultados de PEDUTO *et al.* (2005) utilizando camundongos com a expressão gênica da ADAM9 diminuída (*knockdown* ADAM9), quando cruzaram com camundongos transgênicos (contendo carcinoma de próstata) exibiram reduzido crescimento tumoral e invasão local. Recente publicação de COMINETTI *et al.* (2009) também nos ajuda a alicerçar o resultado encontrado, porém neste trabalho os autores utilizaram o domínio desintegrina da ADAM9 produzida em sistema bacteriano. As células MDA-MB-231 foram plaqueadas nos poços superiores das câmaras de invasão com a presença ou ausência da ADAM9D (1 $\mu$ M), e como resultado a ADAM9D inibiu a invasão dessas células através da matrigel (*in vitro*) em aproximadamente 60%.

Portanto, cada vez mais evidências mostram o envolvimento de membros desta família de proteínas, as ADAMs, em importantes processos fisiológicos e patológicos, e de maneira especial no desenvolvimento e progressão tumoral. Essas recentes evidências levam a um aumento de produções e publicações científicas correlacionando à participação desses membros, em especial a ADAM9 na tumorigênese, invasão e metástase. Apesar disso, até o momento poucos estudos têm utilizado membros desta família de proteases como objeto de estudo no Brasil. Ao nosso conhecimento existem apenas três ADAMs sendo pesquisadas no Brasil; ADAM9 (Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular – UFSCar), ADAM23 (Laboratório de Biologia Molecular e Genômica - Instituto Ludwig – São Paulo) e ADAM33 (Universidade Federal do Paraná em parceria com Instituto Ludwig – São Paulo). Desta forma, observa-se que pesquisas no Brasil a respeito das ADAMs ainda estão “engatinhando” quando comparado com trabalhos internacionais, porém como as ADAMs estão cada vez mais ganhando destaque, e pelo envolvimento em importantes processos fisiológicos e patológicos, entre eles câncer, espera-se que as pesquisas com as ADAMs, de maneira especial a ADAM9, seja intensificada nos próximos anos.

Ensaio adicionais envolvendo sinalização celular mediada pela ADAM9 utilizando-se a técnica de silenciamento apresentada neste trabalho poderão propiciar uma maior compreensão do papel dessa proteína na progressão tumoral. Desta forma, os resultados



apresentados neste trabalho reforçam a importância do papel da ADAM9 na migração de células tumorais de mama. Considerando-se a importância da migração celular na progressão metastática, a ADAM9 se confirma como um alvo interessante para o desenho de fármacos envolvidos no tratamento de pacientes com câncer.

## **7. CONCLUSÕES**

Com os dados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- Todas as linhagens celulares estudadas expressam a ADAM9.
- Não foi possível determinar a atividade proteolítica do domínio metaloprotease da glicoproteína ADAM9 através da técnica de zimografia.
- A ADAM9 não está envolvida na adesão das células MDA-MB-231 e FH ao colágeno tipo I.
- A ADAM9 não está envolvida na proliferação de células MDA-MB-231.
- A ADAM9 é essencial para a invasão das células MDA-MB-231 em matrigel.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALINKEEL, R.; NAIR, M. P. N.; SUFRIN, G.; MAHAJAN, S. D.; CHADHA, K. C.; CHAWDA, R. P.; SCHWARTZ, S. A. Gene expression of angiogenic factors correlates with metastatic potential of prostate cancer cells. *Cancer Research*, **64**: 5311–5321, 2004.
- ABRAM, C. L.; LOWELL, C. A. The Ins and Outs of Leukocyte Integrin Signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **27**: 339–362, 2009.
- ADELSMAN, M. A.; MCCARTHY, J. B.; SHIMIZU, Y. Stimulation of  $\beta$ 1-integrin function by epidermal growth factor and heregulin- $\beta$  has distinct requirements for ErbB2 but a similar dependence on phosphoinositide 3-OH kinase. *Mol. Biol. Cell*, **10**: 2861–2878, 1999.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER., P. *Biologia molecular da célula*. 4<sup>o</sup>ed. Porto Alegre: Artmed, 1090-1091, 2004.
- ARNAOUT, M. A.; MAHALINGAM, B.; XIONG, J. P. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **21**: 381-410, 2005.
- ASAI, M.; HATTORI, C.; SZABO, B.; SASAGAWA, N.; MURUYAMA, K.; TANUMA, S.; ISHIURA, S. Putative function of ADAM 9, ADAM 10 and ADAM 17 as APP  $\alpha$ -secretase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **301**: 231-235, 2003.
- ATCHLEY, D. P.; ALBARRACIN, C. T.; LOPEZ, A.; VALERO, V.; AMOS, C. I.; GONZALEZ-ÂNGULO, A. M.; HORTOBAGYI, G. N.; ARUN, B. K. Clinical and pathologic characteristics of patients with *BRCA*-positive and *BRCA*-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **26** (26): 138-150, 2008.
- ATTIGA, F. A.; FERNANDEZ, P. M.; WEERARATNA, A. T.; MANYAK, M. J.; PATIERNO, S. R. Inhibitors of prostaglandin synthesis inhibit human prostate tumor cell invasiveness and reduce the release of matrix metalloproteinases. *Cancer Research*, **60**: 4629–4637, 2000.
- AZARE, J.; LESLIE, K.; AL-AHMADIE, H.; GERALD, W.; WEINREB, P. H.; VIOLETTE, S. M.; BROMBERG, J. Constitutively activated Stat3 induces tumorigenesis and enhances cell motility of prostate epithelial cells through integrin  $\beta_6$ . *Molecular and Cellular Biology*, **27** (2): 4444–4453, 2007.
- BARBOSA, A. S.; LIN, C. J. Gene silencing with RNA interference: a novel tool for the study of physiology and pathophysiology of adrenal cortex. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, **48** (5): 612-619, 2004.
- BARTSCH, J. E.; STAREN, E. D.; APPERT, H. E. Adhesion and migration of extracellular matrix-stimulated breast cancer. *Journal of Surgical Research*, **110**: 287–294, 2003.
- BAU, DA-T.; MAUA, YI-C.; SHEN, C.-Y. The role of *BRCA1* in non-homologous end-joining. *Cancer Letters*, **240**: 1–8, 2006.
- BAULCOMBE, D. C. Amplified Silencing. *Science*, **315**: 199-200, 2007.
- BECKER, J. M.; MARCY, A. I.; ROKOSZ, L. L.; AXEL, M. G.; BURBAUM, J. J.; FITZGERALD, P. M.; CAMERON, P. M.; ESSER, C. K.; HAGMANN, W. K.; HERMES, J. D.; *et al.* Stromelysin-1: three-dimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme. *Protein Sci.*, **4** (10): 1966-1976, 1995.
- BERMAN, A. E.; KOZLOVA, N. I. Integrins: structure and functions. *Membr. Cell Biol.*, **13**, 207-244, 2000.
- BERMAN, A. E.; KOZLOVA, N. I.; MOROZEVICH, G. E. Integrins: structure and signaling. *Biochemistry*, **68** (12): 1284-99, 2003.
- BERRIER, A.L.; YAMADA, K. M. Cell–Matrix Adhesion. *J. Cell. Physiol.*, **213**: 565–573, 2007.

- BERRY, R.; SCHROEDER, J. J.; FRENCH, A. J.; MCDONNELL, S. K.; PETERSON, B.J.; CUNNINGHAM, J. M.; THIBODEAU, S. N.; SCHAID, D. J. Evidence for a Prostate Cancer-Susceptibility Locus on Chromosome 20. *Am. J. Hum. Genet.*, **67**: 82–91, 2000.
- BERTHON, P.; VALERI, A.; COHEN-AKENINE, A.; DRELON, E.; PAISS, T.; WÖHR, G.; LATIL, A.; MILLASSEAU, P.; MELLAH, I.; COHEN, N.; BLANCHÉ, H.; BELLANÉ-CHANTELOT, C.; DEMENAIS, F.; TEILLAC, P.; LE, D. U. C.; A, DE PETRICONI R, HAUTMANN R, CHUMAKOV I, BACHNER L, MAITLAND NJ, LIDEREAU R, VOGEL W, FOURNIER G, MANGIN P, COHEN D, CUSSENOT O. Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2–43. *Am. J. Hum. Genet.*, **62** (6): 1416–1424, 1998.
- BIDOSEE, M.; KARRYA, R.; WEISS-MESSERA, E.; BARKEY, R. J. Regulation of growth hormone receptors in human prostate cancer cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **309** (1-2): 82-92, 2009.
- BLACK, R. A.; RAUCH, C. T.; KOZLOSKY, C. J.; PESCHON, J. J.; SLACK, J. L.; WOLFSON, M. F.; CASTNER, B. J.; STOCKING, K. L.; REDDY, P.; SRINIVASAN, S.; *et al.* A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature*, **385** (6618): 729-733, 1997.
- BLACK, R. A.; WHITE, J. M. ADAMs: focus on the protease domain. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**: 654-659, 1998.
- BLOBEL, C. P. Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF $\alpha$  and Notch. *Cell*, **90**: 589-592, 1997.
- BLOBEL, C. P.; WHITE, J. M. Structure, function and evolutionary relationship of proteins containing a disintegrin domain. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **4** (5): 760-765, 1992.
- BLOBEL, C. P.; WOLFSBERG, T. G.; TURCK, C. W.; MYLES, D. M.; PRIMAKOFF, P.; WHITE, J. M. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature*, **356** (6366): 248-252, 1992.
- BODE, A.; W.; FERNANDEZ-CATALANA, C.; TSCHESCHEB, H.; GRAMS, F.; NAGASEC, H.; MASKOS, K. Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell. Mol. Life Sci.*, **55**: 640-652, 1999.
- BONKHOFF, H.; STEIN U.; REMBERGER, K. Differential expression of  $\alpha 6$  and  $\alpha 2$  very late antigen integrins in the normal, hyperplastic, and neoplastic prostate: simultaneous demonstration of cell surface receptors and their extracellular ligands. *Human Pathology*, **24**: 243–248, 1993.
- BRIDGES, L. C.; BOWDITCH, R. D. ADAM-Integrin Interactions: potential integrin regulated ectodomain shedding activity. *Curr. Pharm. Des.*, **11**: 837, 2005.
- BROWN, E. J. Adhesive interactions in the immune system. *TRENDS in Cell Biology*, **7**: 289-295, 1997.
- BRUNER, D. W.; MOORE, D.; PARLANTI, A.; DORGAN, J.; ENGSTROM, P. Relative risk of prostate cancer for men with affected relatives: systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cancer*, **107** (5): 797–803, 2003.
- CALDERWOOD, D. A.; SHATTIL, S. J.; GINSBERG, M. H. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J. Biol. Chem.*, **275**: 22607-22610, 2000.
- CALDERWOOD, D. A. Integrin activation. *J. Cell Sci.*, **117**: 657-666, 2004.
- CARL-McGRATH, S.; LENDECKEL, U.; EBERT, M.; ROESSNER, A.; ROCKEN, C. The disintegrin and metalloproteinases ADAM9, ADAM12, and ADAM15 are upregulated in gastric cancer. *Int. J. Oncol.*, **26**: 17–24, 2005.
- CARPENA, A. B. P.; FRANCISCO, A. A. M.; BONAMIGO, R. R. As metaloproteinases-2 e -9 da matriz e o carcinoma espinocelular: uma análise da literatura. *Med. Cutan. Iber. Lat. Am.*, **36** (6): 285-290, 2008.
- CHABOTTAUX, V.; NOEL, A. Breast cancer progression: insights into multifaceted matrix metalloproteinases. *Clin. Exp. Metastasis*, **24**: 647–656, 2007.

- CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *TRENDS in Cell Biology*, **11** (11): S37-S43, 2001.
- CHENG, J. C.; MOORE, T. B.; SAKAMOTO, K. M. RNA interference and human disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, **80**: 121–128, 2003.
- CHO, C.; BUNCH, D. O.; FAURE, J. E.; GOULDING, E. H.; EDDY, E. M.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin  $\beta$ . *Science*, **281**: 1857-1859, 1998.
- CLARK, I. M.; SWINGLER, T. E.; SAMPIERI, C. L.; EDWARDS, D. R. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **40**: 1362–1378, 2008.
- CLEUTJENS, J. P. M.; KANDALA, J. C.; GUARDA, E.; GUNTAKA, R. V.; WEBER, K. T. Regulation of collagen degradation in rat myocardium after infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **27**: 1281–1292, 1995.
- COCCO, P. On the rumors about the silent spring. Review of the scientific evidence linking occupational and environmental pesticide exposure to endocrine disruption health effects. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro*, **18** (2): 379-402, 2002.
- COMINETTI, M. R.; MARTIN, A. C.; RIBEIRO, J. U.; DJAAFRI, I.; FAUVEL-LAFÈVE, F.; CRÉPIN, M.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Inhibition of platelets and tumor cell adhesion by the disintegrin domain of human ADAM9 to collagen I under dynamic flow conditions. *Biochimie.*, **91** (8): 1045-1052, 2009.
- COPPOLINO, M. G.; DEDHAR, S. Bi-directional signal transduction by integrin receptors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **32**: 171-188, 2000.
- CORPET, F. *Nucl. Acids Res.* **16** (22): 10881-10890, 1988.
- DE MATOS, L. L.; MACHADO, L. N.; SUGIYAMA, M. M.; BOZZETTI, R. M.; DA SILVA PINHAL, M. A. Technology applied in the detection of tumor markers. *Arq. Med. ABC*, **30** (1): 19-25, 2005.
- DE MOURA, C. V. G.; AZEVEDO E SILVA MENDONÇA, G.; DE MORAES, E.; OLIVIER, M.; HAINAUT, P. TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: Current knowledge and perspectives. *Mutation Research*, **589** (3): 192–207, 2005.
- DESJARDINS, S.; BEAUPARLANT, J. C.; LABRIE, Y.; OUELLETTE, G.; INHERIT BRCA<sub>s</sub>; DUROCHER, F. Variations in the *NBN/NBS1* gene and the risk of breast cancer in non-*BRCA1/2* French Canadian families with high risk of breast cancer. *BMC Cancer*, **9** (181): 1-17, 2009.
- DI NEZZA, L. A.; MISAJON, A.; ZHANG, J.; JOBLING, T.; QUINN, M. A.; OSTOR, A. G.; NIE, G.; LOPATA, A.; SALAMONSEN, L. A. Presence of active gelatinases in endometrial carcinoma and correlation of matrix metalloprotease expression with increasing tumor grade and invasion. *Cancer*, **94**: 1466–1475, 2002.
- DJOUAD, F.; DELORME, B.; MAURICE, M.; BONY, C.; APPARAILLY, F.; LOUIS-PLENCE, P.; CANOVAS, F.; CHARBORD, P.; NOËL, D.; JORGENSEN, C. Mesenchymal stem cell differentiation to chondrocyte is associated with the change of the cartilage environment. *Arthritis Res. Ther.*, **9** (2) R33, 2007.
- DOMCHEK, S. M.; WEBER, B.L. Clinical management of BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Oncogene*, **25** (43): 5825-5831, 2006.
- DUFFY, M. J.; LYNN, D. J.; LLOYD, A. T.; O'SHEA, C. M. The ADAMs family of proteins: from basic studies to potential clinical applications. *Thromb. Haemost.*, **89**: 622-631, 2003.
- EDLUND, M.; SUNG, S. Y.; CHUNG, L. W. Modulation of prostate cancer growth in bone microenvironments. *Journal of Cellular Biochemistry*, **91**: 686–705, 2004.
- ELBASHIR, S. M.; HARBORTH, J.; LENDECKEL, W.; YALCIN, A.; WEBER, K.; TUSCHL, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**: 494–498, 2001<sup>a</sup>.

ELBASHIR, S. M.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs. *Genes & development*, **15**: 188–200, 2001<sup>b</sup>.

ELBASHIR, S. M.; HARBORTH, J.; WEBER, K.; TUSCHL, T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*, **26**: 199–213, 2002.

EMI, M.; KATAGIRI, T.; HARADA, Y.; SAITO, H.; INAZAWA, J.; ITO, I.; KASUMI, F.; NAKAMURA, Y. A novel metalloprotease/disintegrin-like gene at 17q21.3 is somatically rearranged in two primary breast cancers. *Nat. Genet.*, **5**: 151-157, 1993.

ENGL, T.; RELJA, B.; BLUMENBERG, C.; MÜLLER, I.; RINGEL, E. M.; BEECKEN, W. D.; JONAS, D.; BLAHETA, R.A. Prostate tumor CXC-chemokine profile correlates with cell adhesion to endothelium and extracellular matrix. *Life Sciences*, **78** (16): 1784–1793, 2006.

ESTEVEZ, V. F.; THULER, L. C. S.; AMÊNDOLA, L. C.; KOIFMAN, R. J.; KOIFMAN, S.; FRANKEL, P. P.; VIEIRA, R. J. S.; The Brazilian Network of Breast and Ovarian Familial Cancer Aggregation. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in families with medium and high risk of breast and ovarian cancer in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **42**: 453-457, 2009.

EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in câncer. *Nature*, **411**: 342-348, 2001.

EVANS, E. A.; CALDERWOOD, D. A. Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science*, **316**: 1148-1153, 2007.

FAMBROUGH, D.; PAN, D.; RUBIN, G.M.; GOODMAN, C.S. The cell surface metalloprotease/disintegrin Kuzbanian is required for axonal extension in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 13233–13238, 1996.

FARINA, A. R.; COPPA, A.; TIBERIO, A.; TACCONELLI, A.; TURCO, A.; COLLETTA, G.; GULINO, A.; MACKAY, A. R. Transforming growth factor- $\beta$ 1 enhances the invasiveness of human mda-mb-231 breast cancer cells by up-regulating urokinase activity. *Int. J. Cancer*, **75**: 721–730, 1998.

FIRE, A.; XU S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.*, **391**: 806-811, 1998.

FISCHER, M.; SKOWRON, M.; BERTHOLD, F. Reliable Transcript Quantification by Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction in Primary Neuroblastoma Using Normalization to Averaged Expression Levels of the Control Genes *HPRT1* and *SDHA*. *Journal of Molecular Diagnostics*, **7** (1): 89-96, 2005.

FORNARO, M.; MANES, T.; LANGUINO L. R. Integrins and prostate cancer metastases. *Cancer Metastasis Review*, **20**: 321–331, 2001.

FORTUNATO, A.; FRASER, A. G. Uncover Genetic Interactions in *Caenorhabditis elegans* by RNA Interference. *Bioscience Reports*, **25**: 299-307, 2005.

FREDRIKSSON, H.; IKONEN, T.; AUTIO, V.; MATIKAINEN, M. P.; HELIN, H. J.; TAMMELA, T. L.; KOIVISTO, P. A.; SCHLEUTKER, J. Identification of germline MLH1 alterations in familial prostate cancer. *European Journal of Cancer*, **42** (16): 2802–2806, 2006.

FRIEDLANDER, M.; BROOKS, P. C.; SHAFFER, R. W.; KINCAID, C. M.; VARNER, J. A.; CHERESH, D. A. Definition of two angiogenic pathways by distinct  $\alpha$ v integrins. *Science*, **270**: 1500–1502, 1995.

FRITZSCHE, F. R.; JUNG, M.; TÖLLE, A.; WILD, P.; HARTMANN, A.; WASSERMANN, K.; RABIEN, A.; LEIN, M.; DIETEL M.; PILARSKY, C.; CALVANO, D.; GRUTZMANN, R.; JUNG, K.; KRISTIENSEN, G. ADAM9 Expression is a Significant and Independent Prognostic Marker of PSA Relapse in Prostate Cancer. *European Urology*, **54**: 1097–11082, 2008<sup>a</sup>.

FRITZSCHE, F. R.; WASSERMANN, K.; JUNG, M.; TÖLLE, A.; KRISTIENSEN, I.; LEIN, M.; JOHANNSEN, M.; DIETEL, M.; JUNG, K.; KRISTIENSEN, G. ADAM9 is highly expressed in renal cell cancer and is associated with tumour progression. *BMC Cancer*, **8** (179): 1-9, 2008<sup>b</sup>.

GARCIA, M.; JEMAL, A.; WARD, E. M.; CENTER, M. M.; HAO, Y.; SIEGEL, R. L.; THUN, M. J. *Global cancer facts & figures, 2007*. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2007.

GARMY-SUSINI, B.; VARNER, J. A. Roles of Integrins in Tumor Angiogenesis and Lymphangiogenesis. *Lymphatic Research and Biology*, **6** (3–4): 154–163, 2008.

GEIGER, B.; BERSHADSKY, A.; PANKOV, R.; YAMADA, K. M. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Nat. Rev. Cell Biol.*, **2**: 793–805, 2001.

GIANCOTTI, F. G.; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. *Science*, **285**: 1028–1031, 1999.

GIBBS, M.; STANFORD, J. L.; MCINDOE, R. A.; JARVIK, G. P.; KOLB, S.; GOODE, E. L.; CHAKRABARTI, L.; SCHUSTER, E. F.; BUCKLEY, V. A.; MILLER, E. L.; BRANDZEL, S.; LI, S.; HOOD, L.; OSTRANDER, E. A. Evidence for a rare prostate cancer-susceptibility locus at chromosome 1p36. *Am. J. Hum. Genet.*, **64**: 776–787, 1999.

GINSBERG, M. H.; PARTRIDGE, A.; SHATTIL, S. J. Integrin regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**: 509–516, 2005.

GOEL, H. L.; BREEN, M.; ZHANG, J.; DAS, I.; AZNAVOORIAN-CHESHIRE, S.; GREENBERG, N. M.; ELGAVISH, A. e LANGUINO, L. R.  $\beta_1$  A integrin expression is required for type 1 insulin-like growth factor receptor mitogenic and transforming activities and localization to focal contacts. *Cancer Research*, **65**: 6692–6700, 2005.

GOEL, H. L.; LI, J.; KOGAN, S.; LANGUINO, L. R. Integrins in prostate cancer progression. *Endocr. Relat. Cancer*, **15** (3): 657–664, 2008.

GÖÖZ, P.; GÖÖZ, M.; BALDYS, A.; HOFFMAN, S. ADAM-17 regulates endothelial cell morphology, proliferation, and in vitro angiogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **380**: 33–38, 2009.

GRÜTZMANN, R.; LÜTTGES, J.; SIPOS, B.; AMMERPOHL, O.; DOBROWOLSKI, F.; ALLDINGER, I.; KERSTING, S.; OCKERT, D.; KOCH, R.; KALTHOFF, H.; SCHACKERT, H. K.; SAEGER, H. D.; KLÖPPE, G.; PILARSKY, C. ADAM9 expression in pancreatic cancer is associated with tumour type and is a prognostic factor in ductal adenocarcinoma. *Br. J. Cancer*, **90** (5): 1053–1058, 2004.

GSCHWIND, A.; HART, S.; FISCHER, O. M.; ULLRICH, A. TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *The EMBO J.*, **22** (10): 2411–2421, 2003.

GUO, W.; GIANCOTTI, F. G. Integrin signalling during tumour progression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **5**: 816–826, 2004.

GUEDERS, M. M.; FOIDART, J.-M.; NOEL, A.; CATALDO, D. D. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: Potential implications in asthma and other lung diseases. *European Journal of Pharmacology*, **533**: 133–144, 2006.

HAJERI, P. S. B.; SINGH, S. K. siRNAs:-their potential as therapeutic agents. Part I Designing of siRNAs. *Drug Discovery Today*, **0** (0): 1–22, 2009.

HARBURGER, D. S.; CALDERWOOD, D. A. Integrin signalling at a glance. *J. Cell Sci.*, **122**: 159–163, 2009.

HEDENFALK, I.; DUGGAN, D.; CHEN, Y.; RADMACHER, M.; BITTNER, M.; SIMON, R.; MELTZER, P.; GUSTERSON, B.; ESTELLER, M.; RAFFELD, M.; YAKHINI, Z.; BEN-DOR, A.; DOUGHERTY, E.; KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; FEHRLE, W.; PITTALUGA, S.; GRUVBERGER, S.; LOMAN, N.; JOHANSSON, O.; OLSSON, H.; SAUTER, G. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, **344** (8): 539–48, 2001.

HEGEDÜS, L.; CHO, H.; XIE, X.; ELICEIR, G. L. Additional MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Matrix Metalloproteinases Promote Invasiveness. *J. Cell. Physiol.*, **216**: 480–485, 2008.

- HEHLGANS, S.; HAASE, M.; CORDES, N. Signalling via integrins: Implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1775**: 163–180, 2007.
- HOLLY, S.P.; LARSON, M. K.; PARISE, L. V. Multiple Roles of Integrins in Cell Motility. *Experimental Cell Research*, **261**: 69-74, 2000.
- HONRADO, E.; BENÍTEZ, J.; PALACIOS, J. The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications. *Modern Pathology*, **18**: 1305–1320, 2005.
- HOOD, J. D.; CHERESH, D. A. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature Reviews*, **2**: 91-100, 2002.
- HOTODA, N.; KOIKE, H.; SASAGAWA, N.; ISHIURA, S. A secreted form of ADAM9 has an alpha-secretase activity for APP. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **293** (2): 800-805, 2002.
- HUANG, T. F.; HOLT, J. C.; KIRBY, E. P.; NIEWIAROWSKI, S. Trigramin: primary structure and its inhibition of von Willebrand factor binding to glycoprotein IIb/IIIa complex on human platelets. *Biochemistry*, **28** (2): 661-666, 1989.
- HUGHES, P. E.; DIAZ-GONZALEZ, F.; LEONG, L.; WU, C.; MCDONALD, J. A.; SHATTIS. J. L.; GINSBERG, M. H. Breaking the integrin hinge. *J. Biol. Chem.*, **271**: 6571-6574, 1996.
- HYNES, R. O. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, **48** (4): 549-554, 1987.
- HYNES, R.O. A reevaluations of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat. Med.*, **8**: 918-921, 2002.
- HYUN, Y. M.; LEFORT, C. T.; KIM, M. Leukocyte integrins and their ligand interactions. *Res. Immunol.*, 2009.
- IBA, K.; ALBRETCHSEN, R.; GILPIN, B. J.; LOECHEL, F.; WEWER, U. M. Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin  $\alpha$ ) supports tumor cell adhesion. *Am. J. Pathol.*, **154**: 1489-1501, 1999.
- JAIN, K. K. Commercial potential of RNAi. *Mol. Biosyst.*, **2**: 523–526, 2006.
- JEZIEŃSKA, A.; MOTYL, T. Matrix Metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: A mini-review. *Med. Sci. Monit.*, **15** (2): 32-40, 2009.
- JIA, L. G.; SHIMOKAWA, K.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. *Toxicon*, **34** (11-12): 1269-1276, 1996.
- JOBIM, F. C.; SCHWARTSMANN, G.; XAVIER, N. L.; UCHOA, D. M.; SACIOTO, M.; CHEMELLO, N. Expressão da MMP-9 e do VEGF no câncer de mama: correlação com outros indicadores de prognóstico. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, **30** (6): 287-293, 2008.
- KARADAG, A.; ZHOU, M.; CROUCHER, P. I. ADAM-9 (MDC-9/meltrin-g), A Member of the A Disintegrin and Metalloproteinase Family, Regulates Myeloma Cell Induced Interleukin-6 Production in Osteoblasts by Direct Interaction with the  $\alpha_v\beta_5$ -Integrin. *Blood*, **107** (8): 3271–3278, 2006.
- KENNERDELL, J. R.; CARTHEW, R.W. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell.*, **95**: 1017–1026, 1998.
- KERKELÄ, E.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Experimental Dermatology*, **12**: 109–125, 2003.
- KETTING, R. F.; HAVERKAMP, T. H. A.; van LUENEN, H. G. A. M.; PLASTERK, R. H. A. *mut-7* of *C. elegans*, required for transposon silencing and rna interference, is a homolog of werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell*, **99**: 133–141, 1999.



- KHWAJA, A.; RODRIGUEZ-VICIANA, P.; WENNSTROM, S.; WARNE, P. H.; DOWNWARD, J. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J.*, **16** (10): 2783-2793, 1997.
- KING, T. E.; PAWAR, S. C.; MAJUTA, L.; SROKA, I. C.; WYNN, D.; DEMETRIOU, M. C.; NAGLE, R. B.; PORRECA, F.; CRESS, A. E. The Role of  $\alpha_6$  Integrin in Prostate Cancer Migration and Bone Pain in a Novel Xenograft Model. *Preventing Cancer Bone Pain*, **3** (10): 1-8, 2008.
- KLESSNER, J. L.; DESAI, B. V.; AMARGO, E. V.; GETSIOS, S.; GREEN, K. J. EGFR and ADAMs cooperate to regulate shedding and endocytic trafficking of the desmosomal cadherin desmoglein 2. *Mol. Biol. Cell*, **20** (1): 328-337, 2009.
- KNUDSEN, B. S.; MIRANTI, C. K. The impact of cell adhesion changes on proliferation and survival during prostate cancer development and progression. *Journal of Cellular Biochemistry*, **99**: 345-361, 2006.
- KODAMA, T.; IKEDA, E.; OKADA, A.; OHTSUKA, T.; SHIMODA, M.; SHIOMI, T.; YOSHIDA, K.; NAKADA, M.; OHUCHI, E.; OKADA, Y. ADAM12 is selectively overexpressed in human glioblastomas and is associated with glioblastoma cell proliferation and shedding of heparin-binding epidermal growth factor. *Am. J. Pathol.*, **165** (5): 1743-1753, 2004.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T4". *Nature*, **227**: 680-685, 1970.
- LENDECKEL, U.; KOHL, J.; ARNDT, M.; CARL-MCGRATH, S.; DONAT, H.; RÖCKEN, C. Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **131** (1): 41-48, 2005.
- LENZ, G. The RNA interference revolution. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **38**: 1749-1757, 2005.
- LEWIS, J. M.; CHERESH, D. A.; SCHWARTZ, M. A. Protein kinase C regulates  $\alpha\beta 5$ -dependent cytoskeletal associations and focal adhesion kinase phosphorylation. *J. Cell Biol.*, **134**: 1323-1332, 1996.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods*, **25** (4): 402-408, 2001.
- LIU, S.; CALDERWOOD, D. A.; GINSBERG, M. H. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J. Cell Sci.*, **113**: 3563-3571, 2000.
- LO, S.H.; CHEN, L.B. Focal adhesion as a signal transduction organelle. *Cancer Metastas. Rev.*, **13**: 9-24, 1994.
- LOPES, A. A.; OLIVEIRA, A. M.; PRADO, C. B. C. Principais genes que participam da formação de tumores. *Revista de biologia e ciências da terra*, **2** (2): 1-7, 2002.
- LUM, L.; REID, M. S.; BLOBEL, C. P. Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. *J. Biol. Chem.*, **273**: 26236-26247, 1998.
- LUO, B. H.; CARMAN, C. V.; SPRINGER, T. A. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.*, **25**: 619-647, 2007.
- MAHIMKAR, R.M.; VISAYA, O.; POLLOCK, A.S.; LOVETT, D.H. The disintegrin domain of ADAM9: a ligand for multiple  $\beta_1$  renal integrins. *Biochem. J.*, **385**: 461-468, 2005.
- MANĚS, S.; LLORENTE, M.; LACALLE, R. A.; GÓMEZ-MOUTÓN, C.; KREMER, L.; MIRA, E.; MARTÍNEZ-A, C. The Matrix Metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **274** (11): 6935-6945, 1999.
- MARTIN, M. D.; MATRISIAN, L. M. The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.*, **26** (3-4): 717-724, 2007.

MASSOVA, I.; KOTRA, L. P.; FRIDMAN, R.; MOBASHERY, S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *The FASEB Journal*, **12**: 1075–1095, 1998.

MAZZOCA, A.; COPPARI, R.; DE FRANCO, R.; CHO, JE-YOEL; LIBERMANN, T. A., PINZANI, M.; TOKER, A. A secreted form of ADAM 9 promotes carcinoma invasion through tumor-stromal interactions. *Cancer Res.*, **65** (11): 4728-4738, 2005.

MELLO, C. C.; CONTE JR, D. Revealing the world of RNA interference. *Nature*, **431**: 338-342, 2004.

MEYER-SIEGLER, K. Macrophage migration inhibitory factor increases MMP-2 activity in DU-145 prostate cells. *Cytokine*, **12** (7): 914–921, 2000.

MILLA, M. E.; LEESNITZER, M. A.; MOSS, M. L.; CLAY, W. C.; CARTER, H. L.; MILLER, A. B.; SU, J. L.; LAMBERT, M. H.; WILLARD, D. H.; SHEELEY, D. M.; *et al.* Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme (TACE). *J. Biol. Chem.*, **274** (43): 30563-30570, 1999.

MIRANTI, C. K.; BRUGGE, J. S. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat. Cell Biol.*, **4**: E83-E90, 2002.

MISQUITTA, L.; PATERSON, B.M.; Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**: 1451–1456, 1999.

MOCHIZUKI, S.; OKADA, Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci.*, **98** (5): 621-628, 2007.

MOSS, M.L.; JIN, S.-L.C.; MILLA, M.E.; BURKHART, W.; CARTNER, H.L.; CHEN, W.-J.; CLAY, W.C.; DIDSBURY, J.R.; HASSLER, D.; HOFFMAN, C.R.; *et al.* Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature*, **385**: 733–736, 1997.

MOULD, P. A. Getting integrins into shape: recent insights into how integrin activity is regulated by conformational changes. *Journal of Cell Science*, **109**: 2613-2618, 1996.

MUKHOPADHYAY, R.; THERIAULT, R. L.; PRICE, J. E. Increased levels of  $\alpha_6$  integrins are associated with the metastatic phenotype of human breast cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis*, **17**: 325-332, 1999.

MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Molecular Aspects of Medicine*, **29**: 290–308, 2008.

NAKAMURA, H.; UENO, H.; YAMASHITA, K.; SHIMADA T.; YAMAMOTO, E.; NOGUCHI, M.; FUJIMOTO, N.; SATO, H.; SEIKI, M.; OKADA, Y. Enhanced Production and Activation of Progelatinase A Mediated by Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase in Human Papillary Thyroid Carcinomas. *Cancer Research*, **59**: 467–473, 1999.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell.*, **2**: 279–289, 1990.

NEWHAM, P.; CRAIG, S. E.; SEDDON, G. N.; SCHOFIELD, N. R.; REES, A.; EDWARDSI, R. M.; JONES, E. Y.; HUMPHRIESA, M. J. Integrin Binding Interfaces on VCAM-1 and MAdCAM-1. *The Journal of Biological Chemistry*, **272** (31): 19429–19440, 1997.

NATH, D.; SLOCOMBE, P. M.; WEBSTER, A.; STEPHENS, P. E.; DOCHERTY, A. J.; MURPHY, G. Meltrin gamma(ADAM-9) mediates cellular adhesion through  $\alpha_6\beta_1$ -integrin, leading to a marked induction of fibroblast cell motility. *J. Cell Sci.*, **113** (Pt 12): 2319–2328, 2000.

NGUYEN, M.; ARKELL, J.; JACKSON, C. J. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int. J. Biochem. Cell B.*, **33**: 960 – 970, 2001.

- NOE, M.; SCHROY, P.; DEMIERRE, M. F.; BABAYAN, R.; GELLER, A. C. Increased cancer risk for individuals with a family history of prostate cancer, colorectal cancer, and melanoma and their associated screening recommendations and practices. *Cancer Causes Control*, **19** (1): 1-12, 2008.
- OHL, F.; JUNG, M.; XU, C.; STEPHAN, C.; RABIEN, A.; BURKHARDT, M.; NITSCHKE, A.; RISTIENSEN, G.; LOENING, S.A.; RADONIĆ, A.; JUNG, K. Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization. *Mol. Med.*, **83**: 1014-1024, 2005.
- OHTSUKA, T.; SHIOMI, T.; SHIMODA, M.; KODAMA, T.; AMOUR, A.; MURPHY, G.; OHUCHI, E.; KOBAYASHI, K.; OKADA, Y.; ADAM28 is overexpressed in human non-small cell lung carcinomas and correlates with cell proliferation and lymph node metastasis. *Int. J. Cancer*, **118** (2): 263–273, 2006.
- OKADA, Y. Tumor cell-matrix interaction: pericellular matrix degradation and metastasis. *Verh Dtsch Ges Pathol.*, **84**: 33-42, 2000.
- OLMEDA, D.; MORENO-BUENO, G.; FLORES, J. M.; FABRA, A.; PORTILLO, F.; CANO, A. SNAI1 Is Required for Tumor Growth and Lymph Node Metastasis of Human Breast Carcinoma MDA-MB-231 Cells. *Cancer Res.*, **67** (24): 11721-11731, 2007.
- OSBORNE, C.; WILSON, P.; TRIPATHY, D. Oncogenes and tumor suppressor genes in Breast Cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *The Oncologist*, **9**: 361-377, 2004.
- O'SHEA, C.; McKIE, N.; BUGGY, Y.; DUGGAN, C.; HILL, A.D.; McDERMOTT, E.; O'HIGGINS, N.; DUFFY, M.J. Expression of ADAM9 mRNA and protein in human breast cancer. *Int. J. Cancer.*, **105**: 754–761, 2003.
- O'TOOLE, T.E.; KATAGIRI, Y.; FAULL, R. J.; PETER, K.; TAMURA, R.; QUARANTA, V.; LOFTUS, J. C.; SHATTIL, S. J.; GINSBERG, M. H. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J. Cell Biol.*, **124** (6): 1047-1059, 1994.
- OWENS, L. V.; XU, L.; CRAVEN, R. J.; DENT, G. A.; WEINER, T. M.; KORNBERG, L.; LIU, E. T.; CANCE, W. G. Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res.*, **55**: 2752–2755, 1995.
- PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Molecular cell biology, Nature reviews*, **8**: 221-233, 2007.
- PARNAUD, G.; HAMMAR, E.; RIBAU, P.; DONATH, M. Y.; BERNEY, T.; HALBAN, P. A. Signaling pathways implicated in the stimulation of beta-cell proliferation by extracellular matrix. *Molecular Endocrinology*, **23** (8): 1264-1271, 2009.
- PEDUTO, L.; REUTER, V. E.; SHAFFER, D. R.; SCHER, H. I.; BLOBEL, C. P. Critical Function for ADAM9 in Mouse Prostate Cancer. *Cancer Research*, **65**: 9312-9319, 2005.
- PENDER, S. L. F.; MacDONALD, T. T. Matrix metalloproteinases and gut: new roles for old enzymes. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **4**: 546 -550, 2004.
- PEREIRA, A. C.; DO CARMO, E. D.; SILVEIRA, V. A. S.; AMADEI, S. U.; ROSA, L. E. B. O papel das MMP-2 e -9 no desenvolvimento do carcinoma epidermóide. *Revista Brasileira de Cancerologia*, **52** (3): 257-262, 2006.
- PERSENGIEV, S. P.; ZHU, X.; GREEN, M. R. Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *Journal RNA*, **10** (1): 12-18, 2004.
- PETRUZZELLI, L.; TAKAMI, M.; HUMES, H. D. Structure and function of cell adhesion molecules. *Am. J. Med.*, **106** (4): 67-476, 1999.
- PIVETA, M. Câncer, esperanças divididas. Pesquisa *FAPESP*, **99**: 58-63, 2004.

- PLOW, E. F.; HAAS, T. A.; ZHANG, L.; LOFTUSI, J.; SMITH, J. W. Ligand Binding to Integrins. *The Journal of Biological Chemistry*, **275** (29): 21785–21788, 2000.
- PONTIER, S. M.; MULLER, W. J. Integrins in breast cancer dormancy. *APMIS*, **116**: 677–694, 2008.
- PRATAP, J.; JAVED, A.; LANGUINO, L. R.; VAN WIJNEN, A. J.; STEIN, J. L.; STEIN, G. S.; LIAN, J. B. The Runx2 Osteogenic Transcription Factor Regulates Matrix Metalloproteinase 9 in Bone Metastatic Cancer Cells and Controls Cell Invasion. *Molecular and Cellular Biology*, **25** (19): 8581–8591, 2005.
- PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet.*, **16**: 82-87, 2000.
- RAMUS, S. J.; GAYTHER, S. A. The contribution of BRCA1 and BRCA2 to ovarian cancer. *Molecular Oncology*, **3**: 138-150, 2009.
- REDDY, P.; SLACK, J. L.; DAVIS, R.; CERRETTI, D. P.; KOZLOSKY, C. J.; BLANTON, R. A.; SHOWS, D.; PESCHON, J. J.; BLACK, R. A. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme. *J. Biol. Chem.*, **275** (19): 14608-14614, 2000.
- REINHART, B. J.; WEINSTEIN, E. G.; RHOADES, M. W.; BARTEL, B.; BARTEL, D. P. MicroRNAs in plants. *Genes & development*, **16**: 1616–1626, 2002.
- RICHARDSON, A.; MALIK, R. K.; HILDEBRAND, J. D.; PARSONS, J. T. Inhibition of cell spreading by expression of the C-terminal domain of focal adhesion kinase (FAK) is rescued by coexpression of Src or catalytically inactive FAK: a role for paxillin tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell Biol.*, **17**: 6906–6914, 1997.
- RUNDHAUG, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J. Cell. Mol. Med.*, **9** (2): 267-285, 2005.
- ROGHANI, M.; BECHERER, J. D.; MOSS, M. L.; ATHERTHON, R. E.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; ARRIBAS, J.; BLACKBURN, R. K.; WESKAMP, G.; TEMPST, P.; BLOBEL, C. P. Metalloprotease-Disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J. Biol. Chem.*, **274**: 3531-3540, 1999.
- ROCKS, N.; PAULISSEN, G.; EL HOUR, M.; QUESADA, F.; CRAHAY, C.; GUEDERS, M.; FOIDART, J. M.; NOEL, A.; CATALDO, D. Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer. *Biochimie*, **90** (2): 369-79, 2008.
- ROMANO, N.; MACINO, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.*, **6**: 3343–3353, 1992.
- ROOKE, J.; PAN, D.; XU, T.; RUBIN, G.M. KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in *Drosophila* neurogenesis. *Science*, **273** (5279): 1227–1231, 1996.
- SANCHEZ ALVARADO, A.; NEWMARK, P.A. Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**: 5049–5054, 1999.
- SANDERSON, M. P.; DEMPSEY, P. J.; DUNBAR, A. J. Control of ErbB signaling through metalloprotease mediated ectodomain shedding of EGF-like factors. *Growth Factors*, **24** (2): 121-136, 2006.
- SATO, T.; SAKAI, T.; NOGUCHI, Y.; TAKITA, M.; HIRAKAWA, S.; ITO, A. Tumor-stromal cell contact promotes invasion of uterine cervical carcinoma cells by augmenting the expression and activation of stromal matrix metalloproteinases. *Gynecologic Oncology*, **92**: 47-56, 2004.
- SCHAFER, B.; MARG, B.; GSCHWIND, A.; ULLRICH, A. Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival. *J. Biol. Chem.*, **279**: 47929-47938, 2004.
- SCHLAEPFER, D. D.; HAUCK, C. R.; SIEG, D. J. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **71**: 435–478, 1999.
- SEALS, D. F.; COURTNEIDGE, S. S. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Gen. Dev.*, **17**: 7-30, 2003.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; COMINETTI, M. R.; TERRUGGI, C. H. B.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; FREITAS, M. S.; CREPIN, M.; FIQUEIREDO, C. C.; MORANDI, V. Alternagin-C a disintegrin-like protein from the venom of *Bothrops alternatus*, modulates  $\alpha 2\beta 1$  integrin-mediated cell adhesion, migration and proliferation. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **38** (10): 1505-1511, 2005.

SHATTIL, S. J.; GINSBERG, M. H. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Integrin signaling in vascular biology. *J. Clin. Invest.*, **100**: 1-5, 1997.

SHATTIL, S. J. Integrins and Src: dynamic duo of adhesion signaling. *Trends Cell Biol.*, **15**: 399-403, 2005.

SHAW, L. M.; RABINOVITZ, I.; WANG, H. H.; TOKER, A.; MERCURIO, A. M. Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the  $\alpha 6\beta 4$  integrin promotes carcinoma invasion. *Cell*, **91**: 949-960, 1997.

SHI, Z.; XU, W.; LOECHEL, F.; WEWER, U. M.; MURPHY, L. J. ADAM 12, a disintegrin metalloprotease, interacts with insulin-like growth factor-binding protein-3. *J. Biol. Chem.*, **275** (24): 18574-18580, 2000.

SHINTANI, Y.; HIGASHIYAMA, S.; OHTA, M.; HIRABAYASHI, H.; YAMAMOTO, S.; YOSHIMASU, T.; MATSUDA, H.; MATSUURA, N. Overexpression of ADAM9 in Non-Small Cell Lung Cancer Correlates with Brain Metastasis. *Cancer Research*, **64**: 4190-4196, 2004.

SHIOMI, T.; OKADA, Y. MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers. *Cancer and Metastasis Reviews*, **22**: 145-152, 2003.

SHON, S.-K.; KIM, A.; KIM, J. Y.; KIM, K. I.; YANG, Y.; LIM, J.-S. Bone morphogenetic protein-4 induced by NDRG2 expression inhibits MMP-9 activity in breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **385**: 198-203, 2009.

SHOOK, S.; BEUTEN, J.; TORKKO, K. C.; JOHNSON-PAIS, T. L.; TROYER, D. A.; THOMPSON, I. M.; LEACH, R. J. Association of RNASEL Variants with Prostate Cancer Risk in Hispanic Caucasians and African Americans. *Clin. Cancer Res.*, **13** (19): 5959-5964, 2007.

SHREY, K.; SUCHIT, A.; NISHANT, M.; VIBHA, R. RNA interference: Emerging diagnostics and therapeutics tool. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009.

SHTUTMAN, M.; ZHURINSKY, J.; SIMCHA, I.; ALBANESE, C.; D'AMICO, M.; PESTELL, R.; BEN-ZE'EV, A. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96** (10): 5522-5527, 1999.

SIEG, D. J.; HAUCK, C. R.; SCHLAEPFER, D. D. Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J. Cell Sci.*, **112**: 2677-2691, 1999.

SIMARD, J.; DUMONT, M.; SOUCY, P.; LABRIE, F. Perspective: Prostate Cancer Susceptibility Genes. *Endocrinology*, **143** (6): 2029-2040, 2002.

SMITH, J. R.; FREIJE, D.; CARPTEN, J. D.; GRONBERG, H.; XU, J.; ISAACS, S. D.; BROWNSTEIN, M. J.; BOVA, G. S.; GUO, H.; BUJNOVSZKY, P.; NUSSKERN, D. R.; DAMBER, J. E.; BERGH, A.; EMANUELSSON, M.; KALLIONIEMI, O. P.; WALKER-DANIELS, J.; BAILEY-WILSON, J. E.; BEATY T. H.; MEYERS, D. A.; WALSH, P. C.; COLLINS, F. S.; TRENT, J. M.; ISAACS, W. B. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genomewide search. *Science*, **274**: 1371-1374, 1996.

SOLINI, A.; SANTINI, E.; NANNIPIERI, M.; FERRANNINI, E. High glucose and homocysteine synergistically affect the metalloproteinases-tissue inhibitors of metalloproteinases pattern, but not TGF $\beta$  expression, in human fibroblasts. *Diabetologia*, **49**: 2499-2506, 2006.

SOUZA, A. J. DE; MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. DE A. A. GENE SILENCING: CONCEPTS, APPLICATIONS, AND PERSPECTIVES IN WOODY PLANTS. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, **64** (6): 645-656, 2007.

SPRINGER, T. A.; WANG, J. H. The three-dimensional structure of integrins and their ligands, and conformational regulation of cell adhesion. *Adv. Protein. Chem.*, **68**: 29-63, 2004.

- STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **17**: 463–516, 2001.
- STONE, A. L.; KROEGER, M.; SANG, Q. X. Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing Proteins (Review). *J. Protein Chem.*, **18**: 447-465, 1999.
- SUN, P.; GAO, J.; LIU, Y-L.; WEI, L-W.; WU, L-P.; LIU, Z-Y. RNA interference (RNAi)-mediated vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) reduction interferes with lymphangiogenesis and enhances Epirubicin sensitivity of breast cancer cells. *Mol. Cell Biochem.*, **308**: 161–168, 2008.
- SUNG, S.Y.; KUBO, H.; SHIGEMURA, K.; ARNOLD, R. S.; LOGANI, S.; WANG, R.; KONAKA, H.; NAKAGAWA, M.; MOUSSES, S.; AMIN, M.; ANDERSON, C.; JOHNSTONE, P.; PETROS, J.A.; MARSHALL, F.F.; ZHAU, H.E.; CHUNG, L.W. Oxidative stress induces ADAM9 protein expression in human prostate cancer cells. *Cancer Res.*, **66** (19): 9519-9526, 2006.
- SVOBODA, P.; STEIN, P.; HAYASHI, H.; SCHULTZ, R.M. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development*. **127**: 4147–4156, 2000.
- SYMINGTON, B. E.; TAKADA, Y.; CARTE, W. G. Interaction of integrins  $\alpha 3\beta 1$  and potential role keratinocyte intercellular adhesion. *J. Cell Bio.*, **120**: 523-535, 1993.
- TAKADA, Y.; YE, X.; SIMON, S. The integrins. *Genome Biology*, **8** (215): 1-9, 2007.
- TAKESHITA, F.; OCHIYA, T. Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci.*, **97** (8): 689– 696, 2006.
- TANNAPFEL, A.; ANHALT, K.; HAUSERMANN, P.; SOMMERER, F.; BENICKE, M.; UHLMANN, D.; WITZIGMANN, H.; HAUSS, J.; WITTEKIND, C. Identification of novel proteins associated with hepatocellular carcinomas using protein microarrays. *J. Pathol.*, **201**: 238–249, 2003.
- TANZER, M. L. Current concepts of extracellular matrix. *J. Orthop. Sci.*, **11**: 326-331, 2006.
- TAVTIGIAN, S. V.; SIMARD, J.; TENG, D. H.; ABTIN, V.; BAUMGARD, M.; BECK, A.; CAMP, N. J.; CARILLO, A. R.; CHEN, Y.; DAYANANTH, P.; DESROCHERS, M.; DUMONT, M.; FARNHAM, J. M.; FRANK, D.; FRYE, C.; GHAFFARI, S.; GUPTE, J. S.; HU, R.; ILIEV, D.; JANECKI, T.; KORT, E. N.; LAITY, K. E.; LEAVITT, A.; LEBLANC, G.; MCARTHUR-MORRISON, J.; PEDERSON, A.; PENN, B.; PETERSON, K. T.; REID, J. E.; RICHARDS, S.; SCHROEDER, M.; SMITH, R.; SNYDER, S. C.; SWEDLUND, B.; SWENSEN, J.; THOMAS, A.; TRANCHANT, M.; WOODLAND, A. M.; LABRIE, F.; SKOLNICK, M. H.; NEUHAUSEN, S.; ROMMENS, J.; CANNON-ALBRIGHT, L. A. A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p. *Nat. Genet.*, **27**: 172–180, 2001.
- TIJSTERMAN, M.; KETTING, R. F.; OKIHARA, K. L.; SIJEN, T.; PLASTERK, R. H. A. RNA Helicase MUT-14-dependent gene silencing triggered in *C. elegans* by short antisense RNAs. *Science*, **295**: 694-697, 2002.
- VAN DER FLIER, A.; SONNENBERG, A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.*, **305**: 285–298, 2001.
- VAN WART, H. E.; BIRKEDAL-HANSEN, H. The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87** (14): 5578-5582, 1990.
- VENKITARAMAN, A. R. Linking the Cellular Functions of *BRCA* Genes to Cancer Pathogenesis and Treatment *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, **4**: 461–487, 2009.
- VIDEIRA, R. S.; DEBONI, M. C. Z.; ARAÚJO, C. A. S.; OKAMOTO, A. C.; MELHADO, A. M.; Oncogenes e desenvolvimento do câncer. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, **6** (1): 71-76, 2002.
- VINEY, M. E.; THOMPSON, F. J. Two hypotheses to explain why RNA interference does not work in animal parasitic nematodes. *Int J Parasitol.*, **38** (1): 43-47, 2008.

VISSAC, C.; PEFFAULT, DE L. M.; COMMUNAL, Y.; BIGNON, Y. J.; BERNARD-GALLON, D. J. Expression of BRCA1 and BRCA2 in different tumor cell lines with various growth status. *Clin. Chim. Acta*, **320** (1-2): 101-110, 2002.

VOGT, P. K. Cancer genes. *West J. Med.*, **158**: 273-278, 1993.

WALL, N. R.; SHI, Y. Small RNA: can RNA interference be exploited for therapy? *The Lancet*, **362**: 1401-1403, 2003.

WAGNER, G.; WISS, D. F. Cell surface adhesion receptors. *Curr. Struct. Biol.*, **4** (6): 841-851, 1994.

WAGNER, E. F.; NEBREDA, A. R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature reviews. Cancer*, **9** (8): 537-549, 2009.

WARGELIUS, A.; ELLINGSEN, S.; FJOSE, A. Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **263**: 156-161, 1999.

WEINER, T. M.; LIU, E. T.; CRAVEN, R. J.; CANCE, W. G. Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. *Lancet*, **342**: 1024-1025, 1993.

WELCSH, P. L.; OWENS, K. N.; KING, M. C. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet.*, **16** (2): 69-74, 2000.

WESKAMP, G.; KRATZSCHMAR, J.; REID, M. S.; BLOBEL, C. P. MDC9, a Widely Expressed Cellular Disintegrin Containing Cytoplasmic SH3 Ligand Domains. *The Journal of Cell Biology*, **132** (4): 717-726, 1996.

WHITE, J. M. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Current Opinion in Cell Biology*, **15**: 598-606, 2003.

WHITE, J. M.; BRIDGES, L. C.; DESIMONE, D. W.; TOMCZUK, M.; WOLFSBERG, T. G. Introduction to the ADAMs Family. *Proteases in Biology and Disease*. NM Hooper and U Lendeckel, Editors. *Springer*, **4**: 1-28, 2005.

WHITE, D. E.; MULLER, W. J. Multifaceted roles of integrins in breast cancer metastasis. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia*, **12**: 135-142, 2007.

WIANNY, F.; ZERNICKA-GOETZ, M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat. Cell Biol.*, **2**: 70-75, 2000.

WIESNER, S.; LEGATE, K. R.; FÄSSLER, R. Integrin-actin interactions. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, **62**: 1081-1099, 2005.

WIKLUND, F.; JONSSON, B. A.; BROOKES, A. J.; STRÖMQVIST, L.; ADOLFSSON, J.; EMANUELSSON, M.; ADAMI, H. O.; AUGUSTSSON-BÄLTER, K.; GRÖNBERG, H. Genetic Analysis of the RNASEL Gene in Hereditary, Familial, and Sporadic Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.*, **10** (21): 7150-7156, 2004.

WOLFSBERG, T. G.; BAZAN, J. J.; BLOBEL, C. P.; MYLES, D. G.; PRIMAKOFF, P.; WHITE, J. M. The precursor region of a protein active in sperm-egg fusion contains a metalloprotease and a disintegrin domain: Structural, functional, and evolutionary implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90** (22): 10783-10787, 1993.

WOLFSBERG, T. G.; MYLES, D. G.; PRIMAKOFF, P.; WHITE, J. M. ADAM, a novel family of membrane protein containing a disintegrin and metalloprotease domain: multipotential functions in cell-adhesion and cell-matrix interactions. *The J. Cell Biol.*, **131**: 275-278, 1995.

WOLFSBERG, T. G.; WHITE, J. M. ADAMs in fertilization and development. *Developmental Biology*, **180**: 389-401, 1996.

[www.the-scientist.com/article/display/15706/](http://www.the-scientist.com/article/display/15706/).

XIAO-WEN, H.; XIAO, Y.; TING, L.; SHI-YI, Y.; DAO-JIN, C. Vector-based RNA interference against vascular endothelial growth factor-C inhibits tumor lymphangiogenesis and growth of colorectal cancer *in vivo* in mice. *Chinese Medical Journal*, **121** (5): 439-444, 2008.

XIONG, J. P. *et al.* Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha_v\beta_3$ . *Science*, **294**: 339-345, 2001.

XIONG, J. P. *et al.* Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha_v\beta_3$  in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science*, **296**: 151-155, 2002.

XU, J.; MEYERS, D.; FREIJE, D.; ISAACS, S.; WILEY, K.; NUSSKERN, D.; EWING, C.; WILKENS, E.; BUJNOVSZKY, P.; BOVA, G. S.; WALSH, P.; ISAACS, W.; SCHLEUTKER, J.; MATIKAINEN, M.; TAMMELA, T.; VISAKORPI, T.; KALLIONIEMI, O. P.; BERRY, R.; SCHAID, D.; FRENCH, A.; MCDONNELL, S.; SCHROEDER, J.; BLUTE, M.; THIBODEAU, S.; GRÖNBERG, H.; EMANUELSSON, M.; DAMBER, J.-E.; SMITH, J.; BAILEY-WILSON, J.; CARPTEN, J.; STEPHAN, D.; GILLANDERS, E.; AMUNDSON, I.; KAINO, T.; FREAS-LUTZ, D.; BAFFOR-BONNIE, A.; VAN AUCKEN, A.; SOOD, R.; COLLINS, F.; BROWNSTEIN, M.; TRENT, J. Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. *Nat. Genet.*, **20**: 175-179, 1998.

XU, J.; ZHENG, S. L.; CHANG, B.; SMITH, J. R.; CARPTEN, J. D.; STINE, O. C.; ISAACS, S. D.; WILEY, K. E.; HENNING, L.; EWING, C.; BUJNOVSZKY, P.; BLEEKER, E. R.; WALSH, P. C.; TRENT, J. M.; MEYERS, D. A.; ISAACS, W. B. Linkage of prostate cancer susceptibility loci to chromosome 1. *Hum. Genet.*, **108**: 335-345, 2001.

YAGAMI-HIROMASA, T.; SATO, T.; KURISAKI, T.; KAMIJO, K.; NABESHIMA, Y.; FUJISAWA-SEHARA, A. A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. *Nature*, **377** (6550): 652-656, 1995.

YAMADA, K. Adhesive recognition sequences. *J. Biol. Chem.*, **266**: 12809-12812, 1991.

YAMADA, K. M.; PANKOV, R.; CUKIERMAN, E. Dimensions and dynamics in integrin function. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **36**: 959-966, 2003.

YAO, E. S.; ZHANG, H.; CHEN, Y. Y.; LEE, B.; CHEW, K.; MOORE, D.; PARK, C. Increased  $\beta_1$  integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer. *Cancer Research*, **67**: 659-664, 2007.

YOKOSAKI, Y.; MATSUURAI, N.; HIGASHIYAMA, S.; MURAKAMI, I.; OBARA, M.; YAMAKIDO, M.; SHIGETO, N.; CHEN, J.; SHEPPARD, D. Identification of the Ligand Binding Site for the Integrin  $\alpha_9\beta_1$  in the Third Fibronectin Type III Repeat of Tenascin-C. *The Journal of Biological Chemistry*, **273** (19): 11423-11428, 1998.

YUAN, R.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G. J. A Role for the disintegrin domain of cyritestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion. *Cell Biol.*, **137** (1): 105-112, 1997.

ZAWADZKI, J. L.; PRESIDENTE, P. J. A.; MEEUSEN, E. N.; DE VEER, M. J. RNAi in *Haemonchus contortus*: a potential method for target validation. *TRENDS in Parasitology*, **22**: 495-499, 2006.

ZENG, P.; WAGONER, H. A.; PESCOVITZ, O. H.; STEINMETZ, R. RNA interference (RNAi) for extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) alone is sufficient to suppress cell viability in ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther.*, **4** (9): 961-967, 2005.

ZHANG, Q.; THOMAS, S. M.; LUI, V. W.; XI, S.; SIEGFRIED, J. M.; FAN, H.; SMITHGALL, T. E.; MILLS, G. B.; GRANDIS, J. R. Phosphorylation of TNF-alpha converting enzyme by gastrin-releasing peptide induces amphiregulin release and EGF receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103** (18): 6901-6906, 2006.

ZHENG, D. Q.; WOODARD, A. S.; FORNARO, M.; TALLINI, G.; LANGUINO, L. R. Prostatic carcinoma cell migration via  $\alpha_v\beta_3$  integrin is modulated by a focal adhesion kinase pathway. *Cancer Research*, **59**: 1655-1664, 1999.



ZHENG, S. L.; XU, J.; ISAACS, S. D.; WILEY, K.; CHANG, K.; BLEECKER, E. R.; WALSH, P. C.; TRENT, J. M.; MEYERS, D. A.; ISAACS, W. B. Evidence for a prostate cancer linkage to chromosome 20 in 159 hereditary prostate cancer families. *Hum. Genet.*, **108** (5): 430-435, 2001.

ZHENG, Y.; SAFTIG, P.; HARTMANN, D.; BLOBEL, C. Evaluation of the contribution of different ADAMs to tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) shedding and of the function of the TNF $\alpha$  ectodomain in ensuring selective stimulated shedding by the TNF $\alpha$  convertase (TACE/ADAM17). *The Journal of Biological Chemistry*, **279** (41): 42898-42906, 2004.

ZHOU, M.; GRAHAM, G. R.; CROUCHER, P. I. MDC-9 (ADAM-9/Meltrin g) Functions as an adhesion molecule by binding the  $\alpha\beta 5$  integrin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **280**: 574-580, 2001.

ZIGRINO, P.; MAUCH, C.; FOX, J. W.; NISCHT, R. ADAM-9 expression and regulation in human skin melanoma and melanoma cell lines. *Int. J. Cancer*, **116**: 853-859, 2005.

ZIGRINO, P.; STEIGER, J.; FOX, J. W.; LOFFEK, S.; SCHILD, A.; NISCHT, R.; MAUCH, C. Role of ADAM-9 Disintegrin-Cysteine-rich Domains in Human Keratinocyte Migration. *The Journal of Biological Chemistry*, **282** (42): 30785-30793, 2007.

ZUBEL, A.; FLECHTENMACHER, C.; EDLER, L.; ALONSO, A. Expression of ADAM9 in CIN3 lesions and squamous cell carcinomas of the cervix. *Gynecologic Oncology*, 2009.

ZUTTER, M. M.; MAZOUJIAN, G.; SANTORO, S. A. Decreased expression of integrin adhesive protein receptors in adenocarcinoma of the breast. *Am. J. Pathol.*, **137**: 863-870, 1990.

## 9. ANEXO I

Multalin version 5.4.1

Copyright I.N.R.A. France 1989, 1991, 1994, 1996

Published research using this software should cite

Multiple sequence alignment with hierarchical clustering

F. CORPET, 1988, Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890

Symbol comparison table: blosum62

Gap weight: 12

Gap length weight: 2

MSF:	257	Check:	0	..	
Name:	ADAM2	Len:	257	Check:	9306 Weight: 0.85
Name:	ADAM7	Len:	257	Check:	2764 Weight: 0.80
Name:	ADAM28	Len:	257	Check:	4000 Weight: 0.80
Name:	ADAM20	Len:	257	Check:	5501 Weight: 0.68
Name:	ADAM21	Len:	257	Check:	721 Weight: 0.68
Name:	ADAM9	Len:	257	Check:	955 Weight: 0.85
Name:	ADAM8	Len:	257	Check:	6121 Weight: 0.76
Name:	ADAM33	Len:	257	Check:	7877 Weight: 0.76
Name:	ADAM15	Len:	257	Check:	3335 Weight: 0.81
Name:	ADAM11	Len:	257	Check:	5801 Weight: 0.80
Name:	ADAM22	Len:	257	Check:	6165 Weight: 0.80
Name:	ADAM23	Len:	257	Check:	9934 Weight: 0.83
Name:	ADAM18	Len:	257	Check:	5364 Weight: 1.00
Name:	ADAM12	Len:	257	Check:	6786 Weight: 1.19
Name:	ADAM10	Len:	257	Check:	6214 Weight: 1.10
Name:	ADAM17	Len:	257	Check:	7965 Weight: 1.10
Name:	PRIMER	Len:	257	Check:	944 Weight: 2.07

	1				50
ADAM2	GAAGCAGGA	GAGGAGTGTG	ACTGTGGGAC	TGAACAGGAT	TGTGCCCTTA
ADAM7	GATGAGGGT	GAAGAGTGTG	ACTGTGGCCC	TGCTCAGGAG	TGTACTAATC
ADAM28	GAAATGGGA	GAGGACTGTG	ATTGTGGGAC	ATCTGAGGAA	TGTACCAATA
ADAM20	GAAGAAGGG	GAGGAATGTG	ACTGTGGAAC	CATACGGCAG	TGTGCAAAAG
ADAM21	GAAAAGAGAA	GAGCAGTGTG	ACTGTGGATC	CGTACAGCAG	TGTGAACAAG
ADAM9	GACGCTGGG	GAAGAGTGTG	ACTGTGGTAC	TCCAAAGGAA	TGTGAATTGG
ADAM8	GAGCGTGGG	GAGCAGTGCG	ACTGCGGCCC	CCCCGAGGAC	TGCCGGAACC
ADAM33	GAAGCGGGC	GAGGAGTGTG	ACTGCGGCCC	TGGCCAGGAG	TGCCCGCACC
ADAM15	GAGCCGGGC	GAGCAGTGTG	ACTGTGGCTT	CCTGGATGAC	TGCGTCGATC
ADAM11	GAGGCAGGG	GAGGAGTGCG	ACTGCGGCTC	GGTGCAGGAG	TGCAGCCGCG
ADAM22	GAAACTGGA	GAGGAGTGTG	ATTGTGGAAC	CCCGCCGAA	TGTGTCCTTG
ADAM23	GAAGCTGGG	GAGGAGTGTG	ATTGTGGTTT	TCATGTGGAA	TGCTA.....
ADAM18	GAATCCAAT	GAAGAATGTG	ACTGTGGTAA	TAAAAATGAA	TGTCAATTTA
ADAM12	.....	.....	.....	.....	.....AATC
ADAM10	GAACAAGGT	GAAGAATGTG	ATTGTGGCTA	TAGTGACCAG	TGTAAAGATG
ADAM17	.GATGAAGGA	GAAGAGTGTG	ATCCTGGCAT	CATGTATCTG	AACAACGACA
R	.....	.....	.....	.....	.....

	51				100
ADAM2	.TTGGAGAAAC	ATGCTGTGAT	ATTGCCACA	TGTAGATTTA	AAGCCGGTTC
ADAM7	CT.....	TGCTGTGAT	GCACACACA	TGTGTACTGA	AGCCAGGATT
ADAM28	.TT.....	TGCTGTGAT	GCTAAGACA	TGTAAAATCA	AAGCAACTTT
ADAM20	AT.....CC	CTGTTG..TC	TGTTAAAC.	TGTACTCTAC	ATCCTGGGGC
ADAM21	AC.....GC	CTGTTG..TC	TGTTGAAC.	TGCACTCTAA	GGCCTGGGGC
ADAM9	AC.....CC	TTGCTGCGAA	GGAAGTACC	TGTAAGCTTA	AATCATTTGC
ADAM8	GC.....	.TGCTGCAAC	TCTACCACC	TGCCAGCTGG	CTGAGGGGGC
ADAM33	TC.....	.TGCTGCTTT	GCTCACAAC	TGCTCGCTGC	GCCCCGGGGC
ADAM15	CC.....	.TGCTGTGAT	TCTTTGACC	TGCCAGCTGA	GGCCAGGTGC
ADAM11	CAGG.....	TGGCAACTGC	TGCAAGAAA	TGCACCCTGA	CTCACGACGC
ADAM23	AAGG.....	AGCAGAGTGT	TGTAAGAAA	TGCACCTTGA	CTCAAGACTC
ADAM22	.....	TGGATTATGC	TGTAAGAAA	TGTTCCCTCT	CCAACGGGGC
ADAM18	AG.....AA	GTGCTGTGAT	TATAACACA	TGTAAACTGA	AGGGCTCAGT
ADAM12	GC.....	.TGCTGCAAT	GCCACCACC	TGTACCCTGA	AGCCGGACGC
ADAM10	AA.....	.TGCTGCTTC	GATGCAAAC	AACCAGAGGG	AAGAAAATGC
ADAM17	CC.....	.TGCTGCAAC	A..GCGA.C	TGCACGTTGA	AGGAAGGTGT
PRIMER	.....	.....	.....	.....	.....
	101				150
ADAM2	AAACTGTGCT	G...AAGGAC	CATGCTGCGA	AAA.....C	TGTCTATTTA
ADAM7	TACTTGTGCA	G...AAGGAG	AATGCTGTGA	ATC.....T	TGTCAGATAA
ADAM28	TCAATGTGCA	T...TAGGAG	AATGTTGTGA	AAA.....A	TGCCAATTTA
ADAM20	TGCTTGTGCT	T...TTGGAA	TATGTTGCAA	AGA.....C	TGCAAATTTT
ADAM21	TGCCTGTGCT	T...TTGGGC	TTTGTGCAA	AGA.....C	TGCAAGTTCA
ADAM9	TGAGTGTGCA	T...ATGGTG	ACTGTTGTAA	AGA.....C	TGTCGGTTCC
ADAM8	CCAGTGTGCG	C...ACGGTA	CCTGCTGCCA	GGA.....G	TGCAAGGTGA
ADAM33	CCAGTGCGCC	C...ACGGGG	ACTGCTGCGT	GCG.....C	TGCCCTGCTGA
ADAM15	ACAGTGTGCA	TCTGACGGAC	CCTGTTGTCA	AAA.....T	TGCCAGCTGC
ADAM11	CATGTGTCAGC	G...ACGGGC	TCTGCTGTGC	CCG.....C	TGCAAGTACG
ADAM22	TCAATGCAGT	G...ACGGTC	TTTGCTGTAA	AAA.....G	TGCAAGTTTC
ADAM23	TCACTGCAGC	G...ACGGGC	CCTGCTGTAA	CAATACCTCA	TGTCTTTTTT
ADAM18	AAAATGTGGT	T...CTGGAC	CATGTTGTAC	ATCAAA...G	TGTGAGTTGT
ADAM12	TGTGTGCGCA	C...ATGGGC	TGTGCTGTGA	AGA.....C	TGCCAGCTGA
ADAM10	AAACTGAAAC	C...TGGGAA	ACAGTGCAGT	CCAAGTCAA.	GGTCCTTGTT
ADAM17	CCAGTGCAGT	G...ACAGGA	ACAGTCCTTG	CTGTAAAAAC	TGTCAGTTTG
PRIMER	.....	.....	.....	.....	.....
	151				200
ADAM2	TGTCAAAAGA	AAGAATGTGT	AGGCCTTCCT	TTGAA...GA	ATGCGACCTC
ADAM7	AAAAAGCAGG	GTCCATATGC	AGACCGGCGA	AAGAT...GA	ATGTGATTTT
ADAM28	AAAAGGCTGG	GATGGTGTGC	AGACCAGCAA	AAGAT...GA	GTGCGACCTG
ADAM20	TGCCATCAGG	AAC TTTATGT	AGACAACAAG	TTGGT...GA	ATGTGACCTT
ADAM21	TGCCATCAGG	GGAACTCTGT	AGACAAGAGG	TCAAT...GA	ATGTGACCTT
ADAM9	TTCCAGGAGG	TACTTTATGC	CGAGGAAAAA	CCAGT...GA	GTGTGATGTT
ADAM8	AGCCGGCTGG	TGAGCTGTGC	CGTCCCAAGA	AGGAC...AT	GTGTGACCTC
ADAM33	AGCCGGCTGG	AGCGCTGTGC	CGCCAGGCCA	TGGGT...GA	CTGTGACCTC
ADAM15	GCCCGTCTGG	CTGGCAGTGT	CGTCCTACCA	GAGGG...GA	TTGTGACTTG
ADAM11	AACCACGGGG	TGTGTCCTGC	CGAGAGGCCG	TGAAC...GA	GTGCGACATC
ADAM22	AGCCTATGGG	CACTGTGTGC	CGAGAAGCAG	TAAAT...GA	TTGTGATATT
ADAM23	AGCCACGAGG	GTATGAATGC	CGGGATGCTG	TGAAC...GA	GTGTGATATT
ADAM18	CAATAGCAGG	CACTCCATGT	AGAAAAGAGTA	TTGATCCAGA	GTGTGATTTT
ADAM12	AGCCTGCAGG	AACAGCGTGC	AGGGACTCCA	GCAAC...TC	CTGTGACCTC
ADAM10	GTACAGCACA	GTGTGCATTC	AAGT...CAA	AGTCTGAGAA	GTGTGCGGGAT
ADAM17	AGACTGCCCA	GAAGAAGTGC	CAGGAGGCGA	TTAATGCTAC	TTGCAAAGGC
PRIMER	.....	.....	.....	.....	TTT

```

                201
ADAM2  CCTGAATATT GC.AAT.....GGATCATCT GCATCATGCC CAGAAAACCA
ADAM7  CCTGAGATGT  GC.ACT.....GGCCACTCG CCTGCCTGTC CTAAGGACCA
ADAM28 CCTGAAATGT  GT.AAT.....GGTAAATCT GGTAATTGTC CTGATGATAG
ADAM20 CCAGAGTGGT  GC.AAT.....GGGACATCC CATCAATGCC CAGATGATGT
ADAM21 CCAGAATGGT  GC.AAT.....GGAACATCT CATCAGTGTC CAGAAGATAG
ADAM9  CCAGAGTACT  GC.AAT.....GGTTCTTCT CAGTTCTGTC AGCCAGATGT
ADAM8  GAGGAGTTCT  GTGACG.....GCCGGCACC .CTGAGTGCC CGGAAGACGC
ADAM33 CCTGAGTTTT  GC.ACG.....GGCACCTCC TCCCCTGTC CCCCAGACGT
ADAM15 CCTGAATTCT  GC.CCA.....GGAGACAGC TCCCAGTGTC CCCCTGATGT
ADAM11 GCGGAGACCT  GC.ACC.....GGGGACTCT AGCCAGTGCC CGCCTAACCT
ADAM22 CCGTAAACGT  GC.TCA.....GGAAATTC AAGCCAGTGTC CCCCTAATAT
ADAM23 ACTGAATATT  GT.ACT.....GGAGACTCT GGTCAGTGCC CACCAAATCT
ADAM18 ACAGAGTACT  GC.AAT.....GGAACCTCT AGTAATTGTG TTCCTGACAC
ADAM12 CCAGAGTTCT  GC.ACA.....GGGGCCAGC CCTCACTGCC CAGCCAACGT
ADAM10 GATTCAGACT  GTGCAAGGGA AGGAATATGT AATGGCTTCA CAGCTCTCTG
ADAM17 GTGTCCTACT  GCACA.....GGTAATAGC AGTGAGTGCC CGCCTCCAGG
PRIMER CCAGAG.ACT GC.AAT.....GGTTCTTCT C.....

```

```

                251
ADAM2  CTAT...
ADAM7  GTTCAGG
ADAM28 ATTCCAA
ADAM20 GTATGTG
ADAM21 ATATGTG
ADAM9  TTTTATT
ADAM8  CTTCCAG
ADAM33 TTACCTA
ADAM15 C.....
ADAM11 GCACAAG
ADAM22 TCATAAA
ADAM23 TCATAAG
ADAM18 TTAT...
ADAM12 GTACCTG
ADAM10 CCCA...
ADAM17 AAAT...
PRIMER .....

```

**ANEXO I** - Multialinhamento das sequências gênicas das ADAMs humanas. Em destaque a sequência do *primer* de silenciamento e sua correspondente na sequência da ADAM9.