



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA

Larissa Thabata Gozzer

Estudo do papel da integrina $\alpha\beta3$ de vesículas extracelulares de células tumorais de mama sobre células endoteliais em modelo de co-cultura

São Carlos – SP

2021

Larissa Thabata Gozzer

Estudo do papel da integrina $\alpha\beta3$ de vesículas extracelulares de células tumorais de mama sobre células endoteliais em modelo de co-cultura

Trabalho de Graduação 3 entre à Universidade Federal de São Carlos, como parte das exigências para formação acadêmica de Bacharel em Fisioterapia.

Orientadora: Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo

Co-orientadora: Dra. Wanessa Fernanda Altei

São Carlos – SP

2021

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por me fortalecer e capacitar em mais essa etapa da minha vida.

Aos meus pais que sempre me apoiaram nas minhas escolhas e acreditaram em mim em todos os momentos. Por terem feito tudo por mim, sem medir esforços.

À minha família, não só a sanguínea, mas também aqueles que considero como fosse, por toda paciência, apoio e dedicação. Em especial a minha avó que não está mais aqui, mas sei que sempre torce por mim, me protege e me ampara, meu avô que é um exemplo de bondade e inspiração e minha irmã que teve que ceder certos espaços para eu estar aqui hoje.

Ao meu namorado que me amparou e não me deixou desistir nas inúmeras vezes que pensei nisso. Pela confiança, respeito, apoio, incentivo, ajuda e parceria.

Aos amigos, os que conheci através da vida acadêmica e aos de fora dela, que sempre estiveram ao meu lado e torcendo por mim. Por todos os momentos compartilhados, alegrias e aconchego.

À minha orientadora por me receber no laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas e me proporcionar estudar um pouco sobre câncer, temática que eu queria muito. Por me conduzir com dedicação, junto a minha co-orientadora e, assim, enriquecerem ainda mais a minha formação.

À Universidade Federal de São Carlos, essencial no meu processo de formação profissional e pessoal e por tudo que me proporcionou ao longo dos anos de curso. Por me instigar a ser um ser humano melhor, mais altruísta, empática e humana, e assim, me tornar uma profissional qualificada para lidar bem com a alteridade e com os contextos de cada paciente de maneira individualizada.

À FAPESP por me beneficiar com uma bolsa de iniciação científica para o desenvolvimento do meu trabalho.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha trajetória acadêmica, o meu muito obrigada.

Resumo

O câncer de mama é uma das doenças mais preocupantes por causa da sua alta taxa de morbidade e mortalidade. Ele pode ser causado por diferentes tipos de tumores, os quais, em sua maioria, são tratados por terapia hormonal. No entanto, o câncer de mama triplo negativo é uma exceção a tal tratamento devido ao fato de não possuir receptores para hormônios como estrógeno e progesterona, tornando-se um dos tumores mais agressivos e sem terapia específica. A alta taxa de mortalidade está correlacionada à metástase, processo no qual as células tumorais adquirem um fenótipo migratório invasivo, dissociam-se do tumor primário e invadem tecidos adjacentes ou um local distante do sítio primário. As células tumorais secretam vesículas extracelulares (EVs) capazes de alterar o microambiente em que se encontram, tornando-o adequado ao estabelecimento de um novo tumor. Essas vesículas interagem com outras células por meio de integrinas presentes em sua superfície. Integrinas são receptores heterodiméricos de adesão, e fundamentais no contexto de captação das EVs. Dessa forma, EVs reprogramam células estromais saudáveis para atuarem em função do tumor, secretando fatores de remodelamento da matriz extracelular. Na presente proposta, pretende-se verificar o papel da integrina $\alpha\beta3$ na transferência de EVs de células de tumor de mama triplo-negativo (MDA-MB-231-GFP-CD63) para células endoteliais (HUVEC) e a subsequente transformação fenotípica. Utilizamos a desintegrina DisBa-01 como uma ferramenta de bloqueio da integrina $\alpha\beta3$, visto que trabalhos anteriores do grupo mostraram a importância deste receptor no *uptake* e adesão da EVs. O diferencial deste trabalho está na estratégia experimental, que utilizará o sistema Quasi-vivo de co-cultura celular, o qual permite uma comunicação intercelular por meio do fluxo contínuo do meio de cultura. Para as análises de troca de Evs e fenótipo celular será empregado ensaios morfológicos de fluorescência.

Palavras-chave: câncer de mama, metástase, integrina $\alpha\beta3$, desintegrina, microambiente tumoral, migração celular, vesículas extracelulares, matriz extracelular.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
2	JUSTIFICATIVA	10
3	OBJETIVO	10
4	MÉTODOS	11
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	13
6	CONCLUSÃO	21
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das doenças humanas mais sérias devido às suas elevadas taxas de morbidade e mortalidade, precedida apenas pelas doenças cardiovasculares. O câncer de mama representa aproximadamente 25% dos casos de câncer em mulheres (Fitzmaurice *et al.*, 2017). Apesar dos enormes avanços terapêuticos no setor, foram diagnosticados cerca de 2,1 milhões de novos casos de câncer de mama em mulheres em 2018 no mundo (Bray *et al.*, 2018).

O câncer de mama pode ser causado por diversos tipos de tumores com elevada heterogeneidade biológica e clínica, resultando em grande diversidade de respostas a agentes terapêuticos e em prognósticos distintos (Cianfrocca *et al.*, 2009; Stricker *et al.*, 2017). Estes tumores podem ser classificados por diferentes critérios, mas o mais comum baseia-se na presença de receptores hormonais, tais como, receptores de estrógeno (ER), receptores de progesterona (PR) e o oncogene HER2 (Koboldt *et al.*, 2012; Cominetti *et al.*, 2019). A maioria destes tumores pode ser tratada por terapia hormonal. Já o câncer de mama triplo negativo (TN) (ER-/PR-/HER2-) corresponde a 15-20% dos casos e representa um dos tipos mais agressivos de tumor, e para este tipo ainda não existe uma terapia específica. Pacientes com tumores TN são geralmente tratados com terapia citotóxica, que embora seja eficaz, apresenta efeitos colaterais indesejáveis, tendo um efeito direto na qualidade de vida dos pacientes (Sharma, 2016).

No entanto, no câncer de mama o maior desafio clínico ainda é a prevenção e o tratamento de metástases, a principal causa de morte de pacientes com a doença. Infelizmente, para esta condição, existem poucas opções terapêuticas. Inicialmente acreditava-se que a metástase se desenvolvia a partir de tumores avançados, no entanto, estudos mostraram que as células tumorais podem se disseminar na corrente sanguínea mesmo antes dos tumores serem detectáveis pelos métodos diagnósticos atuais (Dasgupta *et al.*, 2017; Grzelak e Ghajar, 2017, Hosseini *et al.*, 2016). Desta forma, compreender os mecanismos moleculares que envolvem todas as fases da cascata metastática é uma estratégia importante para o desenvolvimento de terapias mais eficientes.

A cascata metastática compreende diversas fases que podem ser resumidas nos seguintes passos principais: i) a dissociação de células tumorais do tumor primário, ii) intravasamento e extravasamento da corrente sanguínea ou linfática, e iii) subsequente adesão e crescimento em um novo local, geralmente distante do sítio primário (Cominetti *et al.*, 2019). A primeira fase

envolve a perda de adesão célula-célula e célula-matriz e aquisição de um fenótipo migratório invasivo em um processo denominado de transição epitélio-mesenquimal, auxiliado pela secreção e ativação de proteases que degradam a matriz extracelular (MEC) (Labelle e Hynes, 2012; Yeung e Yang, 2017). As células tumorais alteram o microambiente em que se encontram por meio da secreção de fatores de crescimento e de vesículas extracelulares (EVs), modificando o comportamento de células estromais residentes, tais como, fibroblastos e adipócitos, criando um ambiente pró-inflamatório (Rankin *et al.*, 2016). Este ambiente tumoral, associado a hipóxia causada pelo crescimento da massa tumoral, resulta em ativação de células endoteliais para a produção de novos vasos sanguíneos que possam alimentar o tumor. A angiogênese tumoral por sua vez, facilita o intravasamento de células e de suas EVs na corrente circulatória, auxiliando na propagação da sinalização tumoral (Jain, 2001; Ferrara, 2010).

Diversos estudos demonstraram que as células produzem vesículas extracelulares que carregam moléculas sinalizadoras capazes de dar suporte à criação do nicho pré-metastático levando à alteração da MEC local, mesmo antes da chegada das células tumorais (Fidler, 2003). Estas vesículas também carregam integrinas em sua membrana externa, as quais têm sido objetos de estudos de inibição farmacológica (Hoshino *et al.*, 2015).

Desta forma, a cascata metastática, apesar de oferecer um conjunto de alvos passíveis de inibição farmacológica, envolve um grau de complexidade bastante elevado. Neste contexto, as integrinas surgiram como alvos interessantes, pois a sua inibição bloqueia etapas críticas da progressão tumoral, como a adesão e a migração celulares. No entanto, este conjunto de receptores de superfície celular também representa um grau adicional de complexidade. A sua relativa falta de seletividade aos ligantes, capacidade de expressão compensatória e o *cross-talk* entre as vias de sinalização de integrinas e de fatores de crescimento são desafios a serem enfrentados no desenvolvimento de fármacos dirigidos à essas moléculas.

As integrinas são receptores heterodiméricos, formados pela associação de diferentes tipos de subunidades α e β , e que reconhecem componentes da MEC, tais como o colágeno, fibronectina e laminina (Hynes, 2002). A ativação das integrinas pela presença dos ligantes promove a sua clusterização e ativação de cascatas intracelulares de sinalização, incluindo a ativação de diversas quinases, principalmente FAK (quinase de adesão focal), MAPK (quinase ativada por mitógeno) e ERK (quinase regulada por sinal extracelular) (Provenzano e Keely, 2009). Em células endoteliais, a ativação das integrinas está intimamente associada com a ativação do eixo VEGF/VEGFR2 (fator de crescimento vascular endotelial/receptor do fator de crescimento endotelial vascular) que modula a angiogênese vascular (Comoglio *et al.*, 2003,

Danilucci *et al.*, 2019). Por outro lado, a correlação entre os níveis de expressão de determinadas integrinas, o desenvolvimento de metástases e mau prognóstico está bem documentada (Longmate e DiPersio, 2017; Ata e Antonescu, 2017). A perda de adesão celular por bloqueio da interação de integrinas com a MEC inicialmente leva a produção de sinais antiapoptóticos, um mecanismo de defesa celular contra a morte celular até que a célula encontre um novo sítio de adesão (Vlahakis e Debnath, 2017). Para sobreviver neste período, muitas células ativam o processo de autofagia, onde organelas e proteínas são degradadas para sustentar a atividade celular (Kenific *et al.*, 2016; Lino RLB *et al.*, 2019). No entanto, a perda prolongada de adesão mediada por integrinas pode resultar em anoikis (morte celular devido à perda de adesão).

A integrina $\alpha\beta3$, receptor de vitronectina que reconhece o motivo adesivo RGD é essencial para manutenção de adesões estáveis e pela direcionalidade da migração celular (Montenegro *et al.*, 2017). Os estudos com a integrina $\alpha\beta3$ em nosso laboratório iniciaram-se em 2008 com a produção de uma proteína recombinante denominada DisBa-01 (desintegrina de *Bothrops alternatus*), produzida em fusão N-terminal com um peptídeo *His-tag* (Ramos *et al.*, 2008). Nós demonstramos, por meio de ressonância plasmônica de superfície, que essa desintegrina liga-se à integrina $\alpha\beta3$ com elevada afinidade (KD 1.6×10^{-7} M), cerca de 100 vezes maior que a sua afinidade para a integrina $\alpha5\beta1$ (KD 7.62×10^{-5} M), receptor de fibronectina que também reconhece o motivo de ligação RGD. Desta forma, temos utilizado esta proteína como ferramenta no estudo do papel da integrina $\alpha\beta3$ na metástase.

Resumidamente, nossos estudos contribuíram para o conhecimento do papel biológico deste receptor nos seguintes aspectos: i) a inibição da integrina $\alpha\beta3$ bloqueia concomitantemente a ativação de MMP-2 (enzima, da classe das gelatinases, de processamento da MEC com alta expressão na carcinogênese) na superfície celular, e com isso a migração é prejudicada (Montenegro *et al.*, 2012); ii) células com bloqueio de integrina $\alpha\beta3$ perdem a direcionalidade do movimento celular, por meio da formação de adesões mais estáveis (Montenegro *et al.*, 2017). As células não desaderem completamente da matriz e nem morrem por perda de adesão; ao contrário, ativam o programa de autofagia (Lino *et al.*, 2019); iii) a integrina $\alpha\beta3$ controla, de forma negativa, a sinalização intracelular induzida pela ativação do eixo VEGF/VEGFR2, inibindo a proliferação e migração de células endoteliais, impedindo a angiogênese (Montenegro *et al.*, 2012; Danilucci *et al.*, 2019); iv) A inibição da integrina $\alpha\beta3$ reduz a comunicação da célula tumoral de mama (MDA-MB-231) com a célula não maligna de epitélio mamário (MCF10 A), levando à uma visível redução de EVs presentes no meio

extracelular; v) A inibição da integrina $\alpha\beta3$ de vesículas extracelulares pequenas (sEVs, exossomos) inibe a via endossomal de síntese de exossomos (Altei *et al.*, 2020).

As vesículas extracelulares (EVs) são estruturas membranosas constituídas de uma bicamada lipídica. Elas permitem uma comunicação intercelular, já que são capazes de carregar biomoléculas e permitir que as células de outros compartimentos troquem material genético, lipídios e proteínas (Van Niel, D'Angelo, Raposo, 2018). Essa interação das EVs com as células acontece por meio de integrinas vesiculares presentes na superfície para fazer a adesão (Xu *et al.*, 2018).

As EVs são um grupo heterogêneo (Van Niel, D'Angelo, Raposo, 2018) que pode se originar a partir do brotamento da membrana plasmática [large-EVs (lEVs)] ou do sistema endossômico [small-EVs (sEVs)]. As lEVs e sEVs também se diferenciam entre si pela densidade, composição bioquímica, tamanho e tipo de biossíntese (Théry *et al.*, 2019).

Essas estruturas abrangem vários processos fisiológicos e patológicos, estão presentes em todos os fluídos biológicos e encontram-se em maior abundância em certas doenças, sendo o câncer um exemplo (Van Niel, D'Angelo, Raposo, 2018; Shimoda, 2018; Théry *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2018). Diante disso, as EVs desempenham papel importante na tumorigênese, pois são capazes de alterar o microambiente em que se encontram, tornando-o adequado ao estabelecimento de um novo tumor. Elas reprogramam células estromais saudáveis para atuarem em função do tumor, secretando fatores de remodelamento da matriz extracelular e desenvolvendo um ambiente pré-metastático (Shimoda, 2018; Xu *et al.*, 2018).

A proposta deste projeto foi de trabalhar com um modelo de co-cultura em condições de fluxo, denominado *Quasi-vivo*. Esse modelo permite o estabelecimento de uma co-cultura interconectada por um sistema de fluxo, no qual as células ficam em câmaras separadas e com perfusão contínua do meio de cultura. Desta forma, avaliou-se os efeitos de vesículas extracelulares liberadas de células tumorais, em células endoteliais. Como temos dados de trabalhos anteriores sobre a importância da integrina $\alpha\beta3$ no uptake das EVs, avaliamos também o efeito da desintegrina DisBa-01 em um sistema mais próximo do que ocorre no organismo, envolvendo mais de uma linhagem celular. Com isso, espero contribuir para o conhecimento sobre a comunicação intercelular através de EVs.

2 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento e progressão tumoral é um processo complexo, que exige uma atuação orquestrada de diversos componentes celulares e do microambiente tumoral. Neste contexto, destaca-se a importante contribuição da matriz extracelular (MEC), funcionando como um arcabouço que irá sustentar o tumor e as vesículas extracelulares (EVs) liberadas pelas células tumorais, relacionadas aos processos tanto de modificação da MEC em prol do desenvolvimento do tumor, até a comunicação intercelular.

Nosso grupo vem desenvolvendo estudos sobre EVs derivadas de células de câncer de mama triplo negativo há 5 anos. Nós avaliamos a importância do receptor de adesão $\alpha\beta3$ em EVs isoladas, e verificamos uma importante contribuição deste receptor em processos de adesão, *uptake* e biogênese das EVs (Processo Fapesp 2014/18747-8, artigo “Inhibition of $\alpha\beta3$ integrin impairs adhesion and uptake of tumor-derived small extracellular vesicles” Altei *et al.*, 2020). Além disso, trabalhos em andamento no nosso laboratório mostraram que a inibição desta integrina afeta a adesão de EVs na matriz extracelular. Além dos projetos acima citados, também estamos desenvolvendo estudos das EVs na invasão celular (2019/05149-9; 2021/01983-4).

Com este estudo, pretende-se compreender melhor o papel da integrina $\alpha\beta3$ presente em EVs na progressão metastática utilizando um modelo *in vitro* de co-cultura de células endoteliais e tumorais. Os modelos de testes pré-clínicos e clínicos baseiam-se principalmente na inibição das integrinas tumorais, no entanto, integrinas endoteliais, plaquetárias, estromais e de EVs são fatores importantes de interferência na ação dos inibidores. A utilização de modelos inovadores de comunicação intercelular pode auxiliar para uma melhor compreensão de como as células tumorais podem afetar as células normais por meio da liberação e distribuição de vesículas extracelulares, e como este processo pode ser afetado mediante a inibição dos receptores de adesão presentes nas EVs.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi de estudar a transferência de EVs de células de tumor de mama triplo negativo para células endoteliais e a sua possível transformação fenotípica para uma melhor compreensão dos efeitos das células tumorais sobre o endotélio.

4 MÉTODOS

4.1 Cultivo celular

As células utilizadas no trabalho foram as endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) e as células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231-GFP-CD63 (Altei *et al.*, 2020), disponíveis no laboratório. Essas células foram cultivadas em DMEM (alta glicose) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), piruvato (100 mM) e penicilina/estreptomicina 1%, sendo mantidas em incubadora a 37 °C e 5% CO₂ (*Modelo 3110 Spectrum Series II Water Jacket CO₂ Incubator, Thermo Scientific*). Para prosseguimento dos experimentos e subcultivo, utilizou-se solução de 0,1% tripsina/EDTA para clivar as ligações formadas entre as células e a placa de cultivo, mantidas com essa solução por aproximadamente 3 minutos na incubadora. Em seguida, utilizou-se o meio de cultivo DMEM suplementado com SFB para inativar a ação da tripsina e imediatamente as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos (Centrífuga Excelsa, FANEM). A contagem das células, bem como a sua viabilidade, foi verificada em contador automático (*TC10 Automated Cell Counter, BioRad*) utilizando solução de Trypan Blue 0,4%.

4.2 Ensaio de co-cultura sob fluxo - Coating das lamínulas

Uma placa de Petri de 10 cm foi forrada com papel toalha umedecido com água deionizada coberta por parafilme, para abrigar as lamínulas durante incubação. Estas foram recobertas com solução de fibronectina (FN) diluída em PBS (1 mg/ml, 5,65 µg/lamínula). O *coating* foi deixado *overnight* em 4 °C. No dia seguinte, esterilizou-se as lamínulas tratadas em placas de 24 poços, primeiramente colocando 600 µl de etanol 70% estéril em cada poço e em seguida, colocando as lamínulas nos poços, com a superfície submetida ao tratamento com FN para cima. A lavagem com etanol durou cerca de 10 minutos, o etanol foi retirado e foi realizada a lavagem com PBS (1 ml por poço) por três vezes consecutivas com duração de 10 minutos cada lavagem.

Em uma nova placa de 24 poços, colocou-se 1 ml de meio DMEM em cada poço e em seguida as lamínulas. Foi padronizado 3×10^4 células por poço de HUVEC e 5×10^4 de MDA-MB-231-CD63-GFP por poço, para aderência nas lamínulas.

4.3 Sistema Quasi-vivo (QV500)

O equipamento *Quasi-vivo*[®]*QV500* (Kirkstall) é um sistema de perfusão que devido a presença de uma bomba peristáltica, permite o fluxo de meio líquido entre as diferentes câmaras e um reservatório conectados entre si. Primeiramente, o sistema foi montado dentro do fluxo laminar e utilizou-se 15 ml de etanol 70% para a primeira lavagem na potência máxima do fluxo durante 20 minutos. Em seguida, o etanol foi substituído por 15 ml de PBS estéril no reservatório do sistema para a lavagem com duração de 20 minutos e para calibrar o fluxo para 100 μ l/minuto. Feito isso, colocou-se 15 ml de meio de cultivo no reservatório e 1 ml de meio em cada câmara. Inserimos uma lamínula tratada contendo células MDA-MB-231-CD63-GFP em uma câmara e outra lamínula tratada contendo HUVEC em outra câmara, sendo essas conectadas entre si, fazendo com que um fluxo de meio de cultivo (DMEM alta glicose) fluísse primeiramente pela câmara contendo células MDA-MB-231-CD63-GFP e posteriormente para a que continha HUVEC, permitindo assim, a verificação de transferência de vesículas. Outro sistema foi montado em paralelo contendo apenas o reservatório de meio juntamente com uma câmara contendo HUVEC controle. O sistema QV foi mantido em incubadora a 37 °C e 5% CO₂ durante 24 h.

4.4 Sistema estático para controle experimental

As mesmas linhagens de MDA-MB-231-CD63-GFP e HUVEC foram cultivadas em lamínulas separadamente em poços numa placa de 24 poços contendo 1 ml de meio de cultivo DMEM, sem que houvesse um fluxo perpassando entre elas, sendo denominado como experimento controle estático. Foi realizado paralelamente com o experimento do sistema QV, e mantido a 37 °C e 5% CO₂ durante 24 h.

4.5 Marcação nuclear com DAPI

As lamínulas foram retiradas do sistema QV e transferidas para placa de 24 poços, sendo submetidas à três lavagens com PBS (1 ml por vez), fixadas com 2 ml de paraformaldeído 4% em cada poço durante 10 minutos, seguido por três lavagens com PBS (1 ml/lavagem). A solução de DAPI 0,7 ng/ μ l contendo 1 μ l de DAPI para cada 7 ml de PBS foi adicionada (2 ml) em cada poço por 10 minutos. A solução de DAPI foi descartada e os poços foram lavados mais uma vez com PBS para retirar o excesso da solução. A montagem da lâmina foi realizada com meio de montagem para fixação das lamínulas e as imagens foram obtidas no sistema ImageExpress.

4.6 Marcação com faloidina e DAPI para análise de morfologia celular

Após a incubação das células no sistema *Quasi-vivo*, retirou-se as lamínulas do equipamento e elas foram colocadas em uma placa de 24 poços. O meio de cultivo foi retirado e ocorreu a lavagem dos poços com PBS duas vezes. Depois, as células foram fixadas por 10 minutos com 500 μ l de paraformaldeído 4% por poço, lavou-se duas vezes com PBS 1x e, depois de retirado, adicionou-se 500 μ l de Triton X-100 (0,3%) por poço por 5 minutos, seguido de outra lavagem. Após isso, foi feita a marcação com DAPI 0,7 ng/ μ l e faloidina 2,5% (500 μ l/poço) por 10 minutos, usando a diluição do DAPI de 2 μ l de DAPI em 13 ml de PBS e a da faloidina 2,5 μ l de faloidina a cada 100 μ l de DAPI. Após duas lavagens com PBS, foi feita a montagem de lâminas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Padronização do plaqueamento das células

A primeira etapa do trabalho foi a padronização do número de células conveniente para o experimento de co-cultivo. Considerando-se o tamanho da lamínula (13 mm), iniciamos a padronização com $1,0 \times 10^5$ células plaqueadas para as duas linhagens (MDA-MB-231-GFP-CD63 e HUVEC). Contudo, após uma análise visual por microscópio óptico, percebeu-se uma quantidade muito grande de células, em uma condição quase confluenta. Esta condição não é adequada para experimentos de análise de morfologia por fluorescência, visto que dificulta a

visualização de células isoladas. Diante disso, a quantidade de células foi reduzida para 5×10^4 células da MDA-MB-231-GFP-CD63 e 3×10^4 células da HUVEC, e esta quantidade mostrou-se satisfatória no que diz respeito à análise de células individuais.

Outro aspecto analisado inicialmente foi a funcionalização das lamínulas. A adesão celular das duas linhagens deste estudo foi baixa na lamínula de vidro. Foi feita uma funcionalização com ácido clorídrico e posterior *coating* com fibronectina, porém o ácido provocou uma sensibilização das lamínulas, nos levando à decisão de utilizar somente *coating* de fibronectina para os experimentos.

5.2 Padronização do fluxo do sistema Quasi-vivo

Outra dificuldade encontrada foi a velocidade de fluxo do meio de cultura do sistema *Quasi-vivo*. A empresa e alguns artigos sugeriam 200 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, no entanto, nessa velocidade o estresse de cisalhamento levou à desadesão das células, principalmente da linhagem MDA-MB-231-GFP-CD63, não sendo possível realizar o imageamento destas células com estas condições. Para resolver tal problema, diminuiu-se o fluxo para a metade (100 $\mu\text{l}/\text{minuto}$), assim, as células MDA-MB-231- GFP-CD63 permaneceram nas lamínulas, o que é a condição ideal para a análise. A Figura 1 representa o efeito da força de cisalhamento nas células HUVEC. Pode-se observar que o fluxo de 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ provocou estresse nas células, como pode ser observado pela sua morfologia e também pela baixa densidade de células (Figura 1 A). A redução do fluxo pela metade permitiu a visualização de células endoteliais com morfologia normal, além de provocar menos desadesão celular, tanto nas HUVECs co-cultivadas quanto nos controles (Figura 1 B).

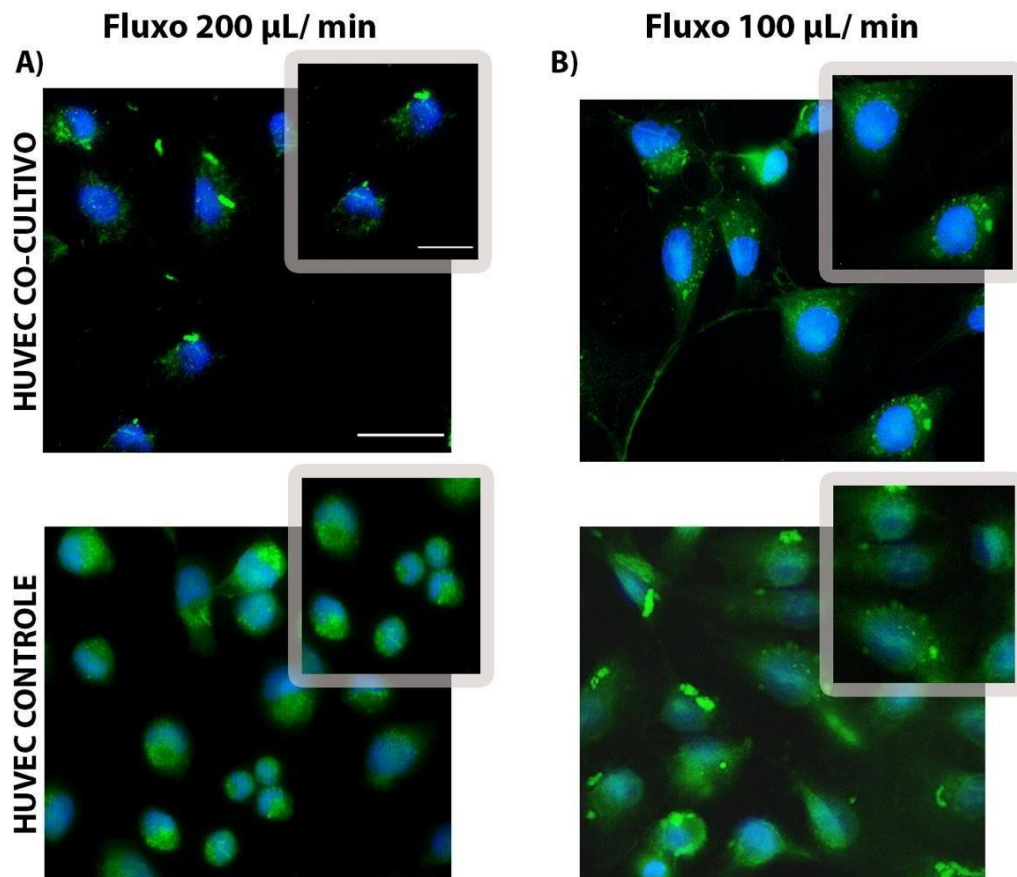


Figura 1. Efeito da força de cisalhamento sobre as células em fluxo contínuo. A) Células HUVEC submetidas a fluxo de 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. B) Células HUVEC submetidas a fluxo de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. HUVEC-CO-CULTIVO: HUVECs cultivadas em co-cultura com células MDA-MB-231-GFP-CD63 | HUVEC Controle: HUVECs cultivadas sozinhas, em sistema *Quasi-vivo* mas em meio de cultura sem contato com células MDA-MB-231. Escala: 20 μm .

Também foi padronizado a esterelização e a limpeza após o uso do equipamento.

5.3. Análise da transferência de vesículas extracelulares de células tumorais para HUVECs e efeitos na morfologia.

Como ferramenta para a análise de troca de vesículas extracelulares, utilizamos a linhagem celular MDA-MB-231-GFP-CD63. Esta linhagem, obtida pela Dra. Wanessa Fernanda Altei originalmente no Weaver Laboratory (Vanderbilt University, USA), produz a tetraspanina CD63 fusionada com a proteína fluorescente GFP. O CD63 é uma proteína específica de vesículas extracelulares, estando associada às vesículas extracelulares pequenas (antes chamadas de exossomos). Desta forma, conseguimos rastrear a liberação e distribuição das vesículas em outras linhagens celulares.

Uma dificuldade encontrada foi a autofluorescência verde das HUVECs, causando uma interferência direta na imagem também verde das vesículas ligadas à GFP. Apesar deste problema, a aparência das HUVECs co-cultivadas com as células tumorais parece diferenciada. É possível observar estruturas muito semelhantes a endossomos, com intensa fluorescência verde, o que sugere a internalização de vesículas extracelulares, com posterior direcionamento para a via endossomal. Já nas HUVECs cultivadas em meio de cultura sem contato com a MDA-MB-231-GFP-CD63, não se observa estas estruturas de forma tão clara, mas sim uma fluorescência mais distribuída, aparentando estar mais relacionada à estrutura do citoesqueleto do que internalizada em vias endossomais.

Para contornar o problema da autofluorescência das HUVECs, foi produzido no laboratório outra linhagem de células MDA-MB-231 expressando o marcador de vesículas mCherry-CD63 (MDA-MB-231-mCherry-CD63), para produção de vesículas extracelulares na cor vermelha. No entanto, nosso equipamento não detectou a expressão do mCherry pelas células e diante disso, decidimos, então, trocar a linhagem celular HUVEC pela linhagem HMEC (células endoteliais humanas). Apesar de resultados iniciais promissores, devido às dificuldades de cultivo da HMEC, optamos por retomar os experimentos com a HUVEC.

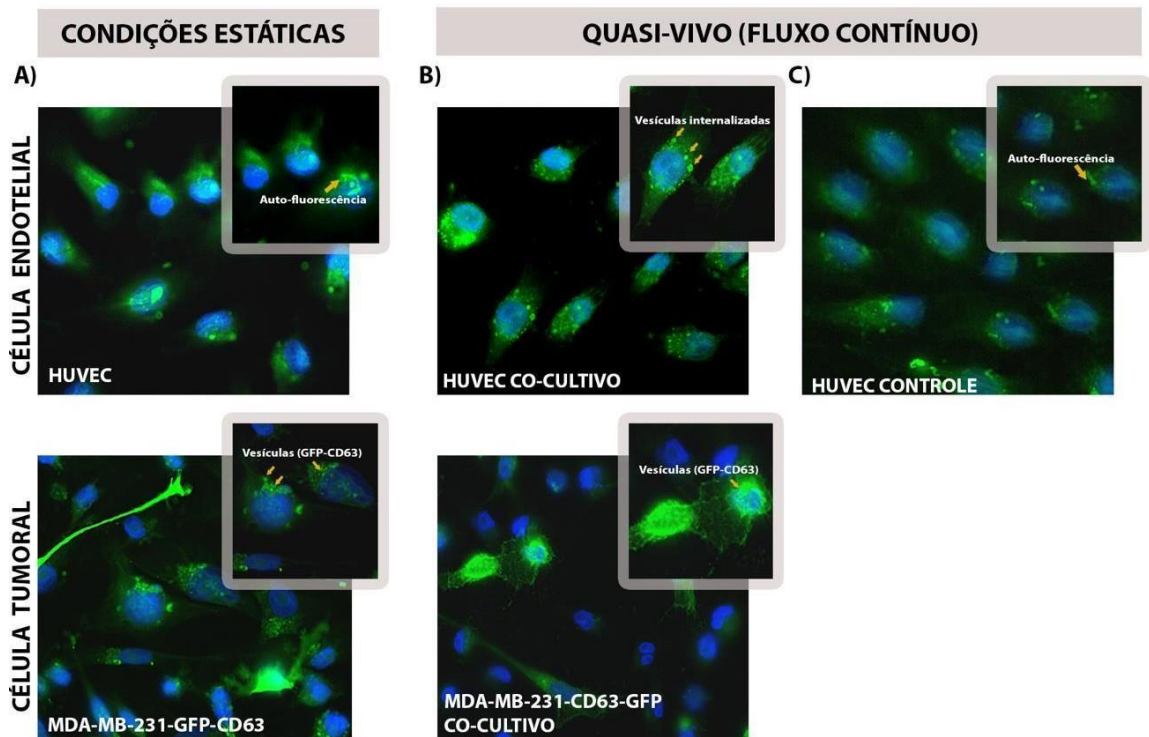


Figura 2. Transferência de vesículas para células endoteliais. A) Célula tumoral e célula endotelial cultivadas separadamente em condições estáticas (placa de 24 poços). B) Superior: HUVECs co-cultivadas com células

MDA-MB-231-GFP-CD63 em câmaras separadas, com indicação da possível internalização de vesículas extracelulares provenientes das células tumorais; inferior: células tumorais co-cultivadas com HUVECs, com ênfase para a expressão de GFP-CD63, indicando a liberação de vesículas fluorescentes para o meio de cultura. C) HUVECs cultivadas em sistema Quasi-vivo, sem contato com células tumorais, com indicação da autofluorescência proveniente destas células. Escala: 20 um.

Uma outra observação possível foi a alteração de morfologia apresentada pelas HUVECs co-cultivadas com a MDA-MB-231-GFP-CD63. Na Figura 3, representamos uma comparação da morfologia das HUVECs submetidas ao sistema *Quasi-vivo*. As células controle apresentam morfologia semelhante a células endoteliais, um formato mais achatado, com um citoesqueleto mais amplo. Já as HUVECs submetidas a co-cultivo com as células tumorais apresentaram nítida alteração morfológica, assumindo um formato mais alongado, que se assemelha ao formato alongado das células MDA-MB-231-GFP-CD63, também demonstradas na Figura. Estes resultados são promissores, porém preliminares, e será necessária a imunomarcagem do citoesqueleto celular com faloidina para comprovar nossa hipótese.

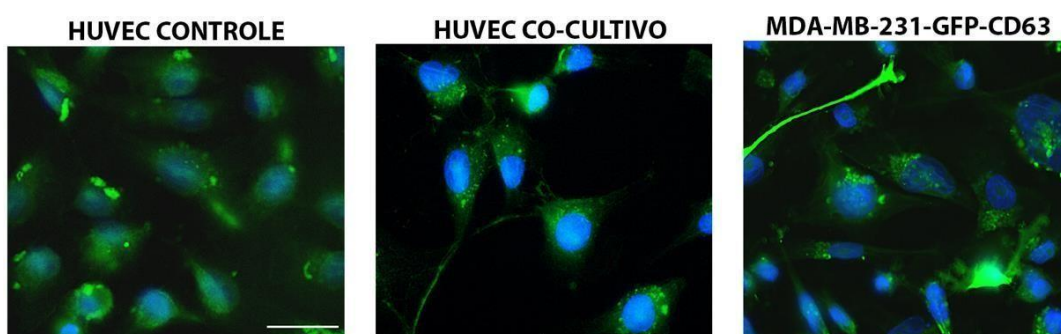


Figura 3. Efeito da comunicação celular na morfologia das HUVECs. As HUVECs controle apresentaram morfologia convencional deste tipo de célula. Já as HUVECs em co-cultivo mostraram um citoesqueleto mais alongado e delgado, que se assemelhou bastante ao formato das células MDA-MB-231-GFP-CD63.

Para uma melhor compreensão se de fato é possível localizar e quantificar vesículas nas células endoteliais, as amostras de experimento de co-cultura foram analisadas em microscópio confocal, que nos permitiu adquirir imagens em três dimensões, avaliando se havia ou não a presença de vesículas no interior das células. Após análise das imagens da HUVEC controle (HUVEC CTRL, cultivada separadamente no sistema QV) e HUVEC co-cultivada com a linhagem tumoral, observamos que embora há uma fluorescência que indique a presença de vesículas, a fluorescência intrínseca da célula impossibilitou uma conclusão de que as vesículas foram transferidas e compartilhadas.

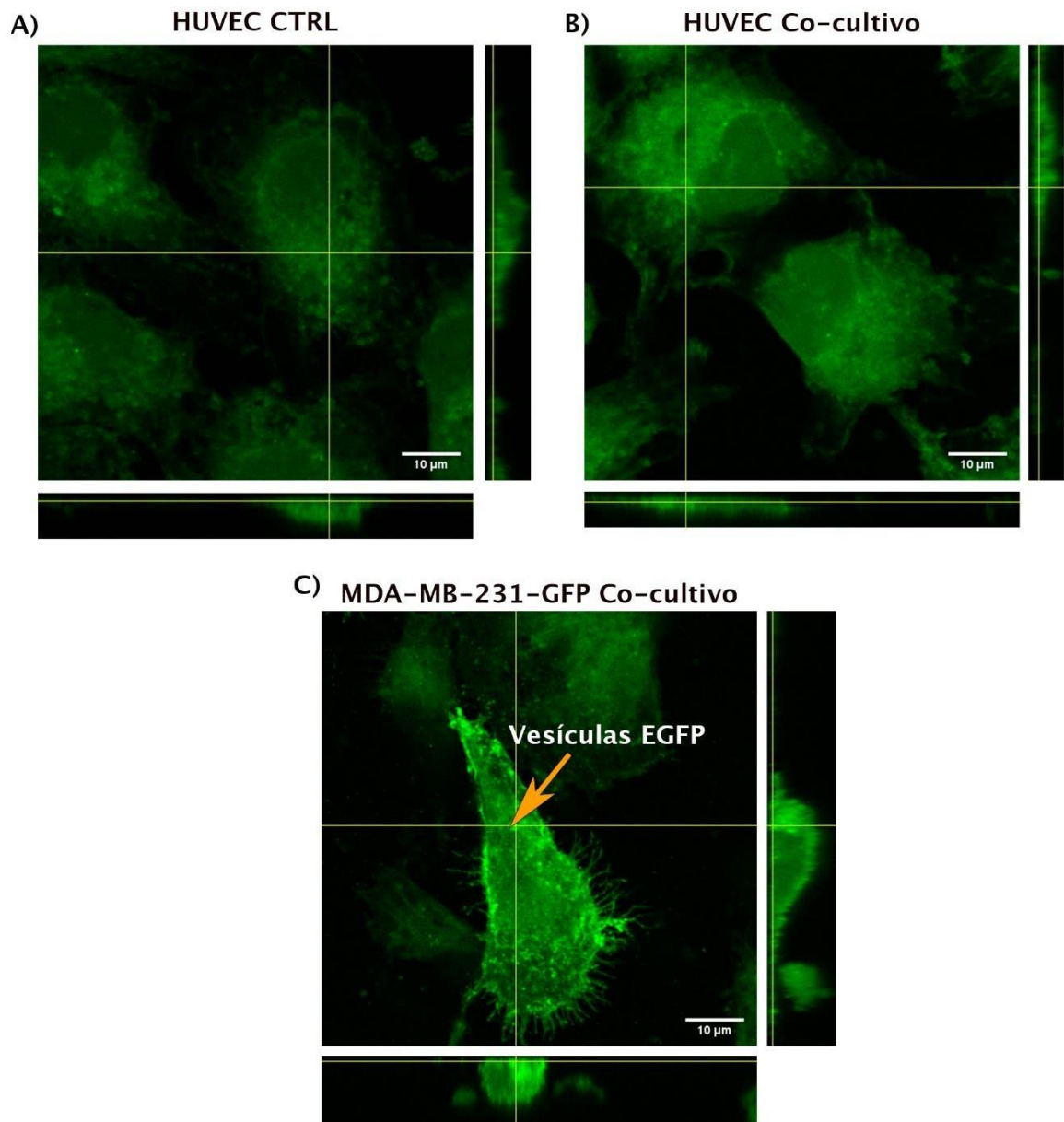


Figura 4. Projeção ortogonal das células cultivadas em sistema *Quasi-vivo*. A) HUVEC cultivada isoladamente em sistema QV. B) HUVEC co-cultivada com MDA-MB-231-GFP-CD63 em sistema QV. C) MDA-MB-231-GFP-CD63 co-cultivada com HUVEC.

5.4 Análise do tratamento com DisBa-01 e morfologia celular.

Para testar o efeito do bloqueio da integrina $\alpha\beta3$ na comunicação celular entre a linhagem tumoral e endotelial pelas vesículas extracelulares, utilizamos a desintegrina recombinante DisBa-01, seguindo metodologia de expressão e purificação padronizada em nosso laboratório (RAMOS *et al.*, 2007).

A desintegrina foi inserida no sistema *Quasi-vivo* de 12 em 12 horas, na concentração de 1000 nM, durante um período total de 24 horas. Ela possuía marcação com Alexa-Fluor 546 e foi adicionada no meio circulante que exerceria o fluxo no sentido da célula MDA-MB-231-GFP-CD63 para a HUVEC.

A DisBa-01 liga-se com alta afinidade à integrina $\alpha\beta3$ ($K_d = 7,62 \times 10^{-5}$ M), inibindo a sua sinalização para o meio intracelular e levando a modificações fenotípicas. Diante disso, a hipótese era de que a transferência de meio de cultura entre as duas células, contendo as vesículas, pudesse ser de alguma forma afetada pelo bloqueio com a desintegrina, podendo por exemplo alterar a morfologia das células endoteliais.

No entanto, ao analisar as imagens de forma qualitativa não observamos diferenças entre a morfologia da HUVEC controle e co-cultivada (Figura 5A). A quantificação da morfologia foi feita por meio de medida da área da célula, circularidade e perímetro, o que confirmou a morfologia similar das duas células (Figura 5 B-D). Além da morfologia da célula endotelial, também avaliamos se a desintegrina seria distribuída para as duas linhagens celulares no sistema QV, tendo em vista que esta foi adicionada ao meio de cultura, compartilhado entre as duas linhagens diferentes por 24 h. A DisBa-01 ligou-se nas duas linhagens, MDA-MB-231 e HUVEC (Figura 5A), comprovando que de fato este sistema permite uma comunicação entre células cultivadas em compartimentos diferentes. Adicionalmente, a quantidade de DisBa-01 na HUVEC e na MDA-MB-231 foi medida por meio de quantificação de fluorescência. Esta quantificação mostrou que a desintegrina se liga preferencialmente à linhagem endotelial, o que é explicado pela maior quantidade de integrina $\alpha\beta3$ expressa nessa linhagem.

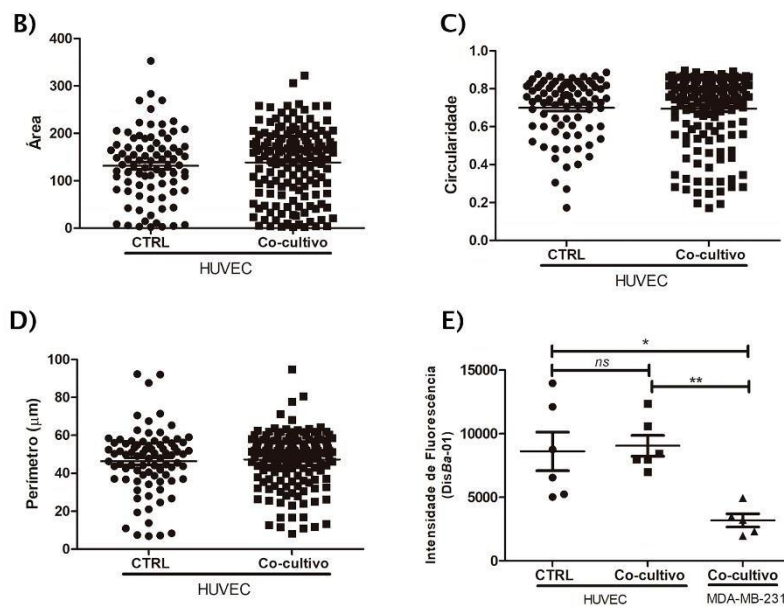
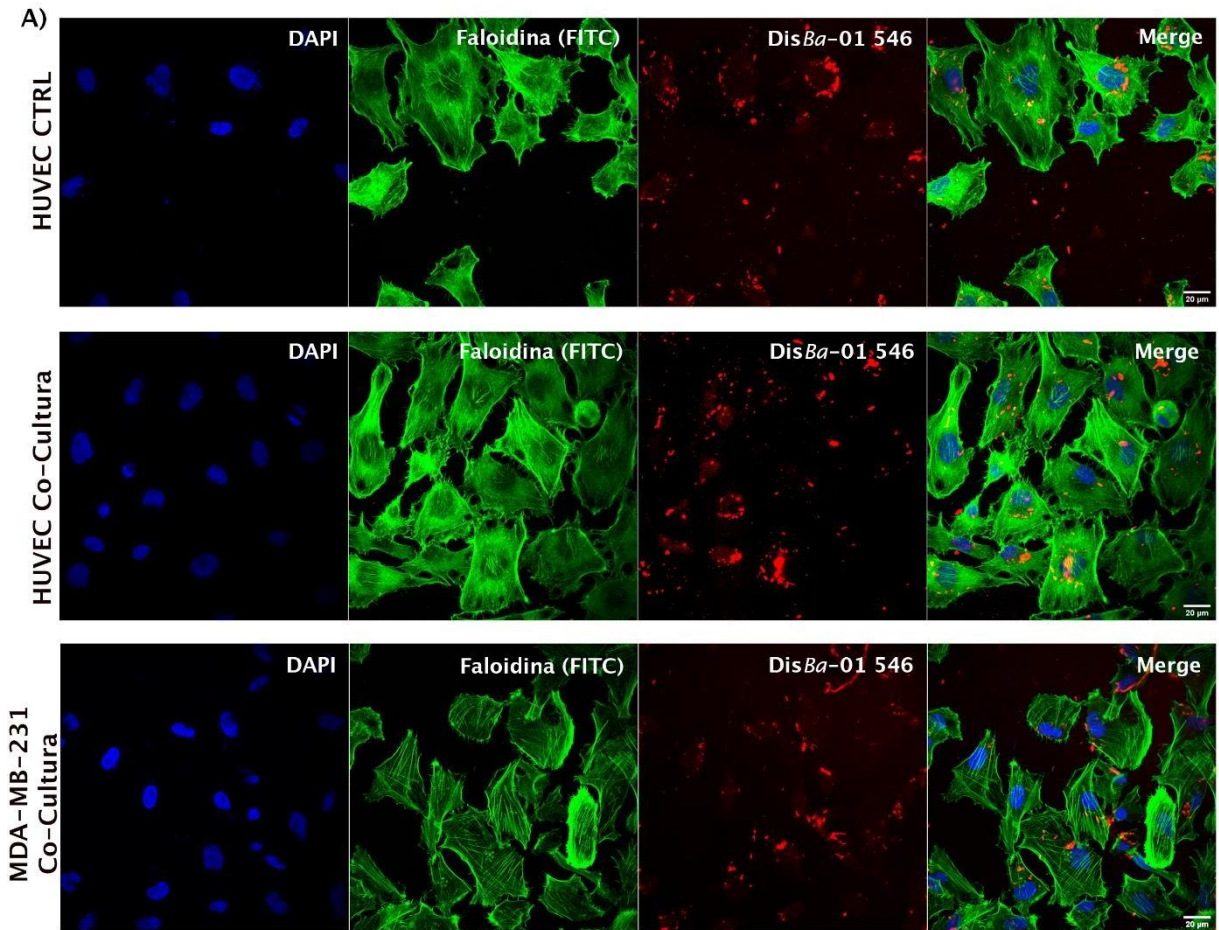


Figura 5. Sistema *Quasi-vivo* com adição de DisBa-01-Alexa Fluor 546. A) Painel de imagens mostrando a linhagem HUVEC controle, e co-cultivada com a linhagem tumoral (*stack* superior e meio), e linhagem MDA-MB-231-GFP-CD63, ambas contendo a desintegrina marcada. B-D) Análise da área celular, circularidade e perímetro das HUVECs controle e co-cultivadas. E) Quantificação de DisBa-01 nas linhagens HUVEC e MDA-MB-231-GF-CD63.

6 CONCLUSÃO

Embora os experimentos tenham sido realizados, os resultados obtidos mostram que experimentos adicionais devem ser feitos. O sistema envolveu uma gama extensa de padronizações e uma demanda elevada de experiência com cultivo celular. Alguns obstáculos encontrados como por exemplo a autofluorescência da linhagem endotelial interferiram na visualização de troca de vesículas. Somado a isso, o tempo total para a realização da pesquisa foi bem reduzido devido à pandemia do COVID-19. O que resultou em paralisação de algumas atividades e restrição de horário para uso do laboratório. Essas paralisações geraram atrasos no cronograma experimental impossibilitando a execução de um número maior de experimentos e otimização dos que não saíram como o esperado pela complexidade e longo tempo que eles exigiam.

Apesar das condições adversas expostas acima, os resultados contribuirão muito para estudos futuros, já que toda a padronização do equipamento já foi feita e poderá aprimorar os métodos e modificar possíveis erros nos experimentos e ser concertados. Assim, o projeto em questão foi fundamental e promissor no que diz respeito à possibilidade de mimetizar um microambiente tumoral com diferentes linhagens celulares.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTEI, WANESSA F.; PACHANE, BIANCA C.; DOS SANTOS, PATTY K.; RIBEIRO, LÍGIA N. M.; SUNG, BONG HWAN; WEAVER, ALISSA M.; **Selistre-de-Araújo, Heloisa S.** Inhibition of $\alpha\beta 3$ integrin impairs adhesion and uptake of tumor-derived small extracellular vesicles. *Cell Communication and Signaling*, v. 18, p. 1-10, 2020.

Ata R.; Antonescu C.N. Integrins and Cell Metabolism: An Intimate Relationship Impacting Cancer, *Int J Mol Sci*, v. 18 n.1, p. 189-220, 2017.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018. doi:10.3322/caac.21492.

Cho EH, Wendel M, Lutgen M, *et al.* Characterization of circulating tumor cell aggregates identified in patients with epithelial tumors. *Phys Biol*. 2012. doi:10.1088/1478-3975/9/1/016001

Cianfrocca M, Gradishar W. New Molecular Classifications of Breast Cancer. *CA Cancer J Clin*. 2009. doi:10.3322/caac.20029.

Cominetti, MR, Altei, WF e Selistre-de-Araujo. Metastasis inhibition in breast cancer by targeting cancer cell extravasation. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 2019, 11: 1-14.

Comoglio PM, Boccaccio C, Trusolino L. Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: Breaking the rules. Vol. 15, *Current Opinion in Cell Biology*. 2003. p.565–71. doi: 10.1016/S0955-0674(03)00096-6

Danilucci TM, Santos PK, Pachane BC, Pisani GFD, Lino RLB, Casali BC, Altei WF, Selistre-de-Araujo HS. Recombinant RGD-disintegrin DisBa-01 blocks integrin $\alpha\beta 3$ and impairs VEGF signaling in endothelial cells. *Cell Commun. Signal*. 2019; 17: 27-42. doi: 10.1186/s12964-019-0339-1.

Dasgupta A, Lim AR, Ghajar CM. Circulating and disseminated tumor cells: harbingers or initiators of metastasis? *Mol Oncol*. 2017. doi:10.1002/1878-0261.12022.

Ferrara N. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.11.003

Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: The “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003. doi:10.1038/nrc1098.

Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, *et al.* Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study Global Burden. *JAMA Oncol*. 2017. doi:10.1001/jamaoncol.2016.5688.

Grzelak CA, Ghajar CM. Metastasis ‘systems’ biology: how are macro-environmental signals transmitted into microenvironmental cues for disseminated tumor cells? *Curr Opin Cell Biol*. 2017. doi:10.1016/j.ceb.2017.06.002.

- Hoshino, A. *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527,329–335 (2015).
- Hosseini H, Obradovic MMS, Hoffmann M, *et al.* Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. *Nature*. 2016. doi:10.1038/nature20785.
- Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* [Internet]. 2002;110(6):673–87.
- Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: A new paradigm for combination therapy. *Nat Med*. 2001. doi:10.1038/nm0901-987
- Kenific CM, Wittmann T, Debnath J. Autophagy in adhesion and migration. *J Cell Sci*. 2016;129 (20): 3685–93. doi: 10.1242/jcs.188490
- Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, *et al.* Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012. doi:10.1038/nature11412
- Labelle M, Hynes RO. The initial hours of metastasis: The importance of cooperative host- tumor cell interactions during hematogenous dissemination. *Cancer Discov*. 2012. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0329.
- Lino RLB *et al.*, α v β 3 integrin blocking inhibits apoptosis and induces autophagy in murine breast tumor cells. Submetido ao “BBA Molecular Cell Research” em março de 2019.
- Longmate W, DiPersio CM. Beyond adhesion: emerging roles for integrins in control of the tumor microenvironment. *F1000Research*, 2017; 6:1612.
- Montenegro CF, Casali BC, Lino RLB, Pachane BC, Santos PK, Horwitz AR, *et al.* Inhibition of α v β 3 integrin induces loss of cell directionality of Oral Squamous Carcinoma Cells (OSCC). *PLoS One*. 2017; 12(4):e0176226. doi: 10.1371/journal.pone.0176226.
- Montenegro CF, Salla-Pontes CL, Ribeiro JU, MacHado AZ, Ramos RF, Figueiredo CC, *et al.* Blocking α v β 3 integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. *Biochimie*. 2012; 94(8):1812–20. doi: 10.1016/j.biochi.2012.04.020.
- Ramos OHP, *et al.*, Modulation of in vitro and in vivo angiogenesis by alternagin-C, a disintegrin-like protein from *Bothrops alternatus* snake venom and by a peptide derived from its sequence. *Arch Biochem Biophys*. 2007 May 1;461(1):1-6.
- Ramos OHP, Kauskot A, Cominetti MR, Bechyne I, Salla Pontes CL, Chareyre F, *et al.* A novel α v β 3-blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2008; 25(1): 53–64. doi: 10.1007/s10585-007-9101-y.
- Rankin EB, Nam JM, Giaccia AJ. Hypoxia: Signaling the Metastatic Cascade. *Trends in Cancer*. 2016. doi:10.1016/j.trecan.2016.05.006.
- Sharma P. Biology and Management of Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Oncologist*. 2016. doi:10.1634/theoncologist.2016-0067.
- SHIMODA, M. Extracellular vesicle-associated MMPs: A modulator of the tissue microenvironment. *Advances in Clinical Chemistry*, v. 88, p. 35–66, 2018.

Stricker TP, Brown CD, Bandlamudi C, *et al.* Robust stratification of breast cancer subtypes using differential patterns of transcript isoform expression. PLoS Genet. 2017. doi:10.1371/journal.pgen.1006589.

THÉRY, C. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. Journal of Extracellular Vesicles, v. 8, n. 1, p. 1535750, 2019.

VAN NIEL, G.; D'ANGELO, G.; RAPOSO, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. Nature Reviews Molecular Cell Biology, v. 19, n. 4, p. 213– 228, 17jan. 2018.

Vlahakis A, Debnath J. The Interconnections between Autophagy and Integrin- Mediated Cell Adhesion. Journal of Molecular Biology. 2017, 429: 515–30. doi: 10.1016/j.jmb.2016.11.027

XU, R. *et al.* Extracellular vesicles in cancer — implications for future improvements in cancer care. Nature Reviews Clinical Oncology, p. 1–22, 2018.

Yeung KT, Yang J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. Mol Oncol. 2017.doi:10.1002/1878-0261.12017

