

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

Ana Carolina Caetano Nunes

**ESTUDO DO EFEITO DO SILENCIAMENTO
DO GENE *ITGB3* EM CÉLULAS TUMORAIS
DE MAMA**

São Carlos – SP

2022

Ana Carolina Caetano Nunes

**ESTUDO DO EFEITO DO SILENCIAMENTO DO
GENE *ITGB3* EM CÉLULAS TUMORAIS DE
MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular para obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientação Prof.^a. Dr.^a Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

Co-orientação Dr.^a Wanessa Fernanda Altei

São Carlos - SP

2022



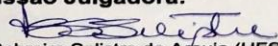
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

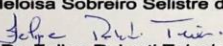
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

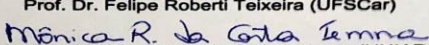
Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Ana Carolina Caetano Nunes, realizada em 01/09/2022.

Comissão Julgadora:


Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo (UFSCar)


Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira (UFSCar)


Profa. Dra. Mônica Rosas da Costa Lemma (UNIARA)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Dedico este trabalho a minha mãe e a todas as mulheres pretas -de ontem, hoje e amanhã-, as quais muitas delas, não tiveram as mesmas oportunidades e “sorte” que eu.

Agradecimentos

Finalizando mais uma etapa importante na minha vida, e não poderia deixar de agradecer às diversas pessoas que contribuíram nesta fase. Ainda assim, esse espaço não transmite toda a gratidão que sinto por cada um.

Primeiramente, agradeço a Deus, pela vida e força que tem me dado. Foram tempos difíceis esse que vivemos, mas graças a Ele, conseguimos passar com vida e saúde.

Em segundo lugar, agradeço a minha família pelo apoio financeiro e emocional, e garantir que eu pudesse permanecer realizando esse sonho pessoal e profissional. Em especial, aos pequeninos da minha vida (Theozinho, Cacau, Lua e o Shiryu estrelinha) cuja fofura aliviavam os sentimentos ruins... E a minha querida irmã e amiga, por TUDO (nem tenho palavras para mensurar o tudo).

Um agradecimento especial às minhas amigas e eternas *lab partners* Anelyse, Julia e Patty, pelas conversas no grupo e os poucos papéis que a pandemia permitiu proporcionar. As minhas BFF's Ana Karla e Josiane, que acompanharam mais proximamente as minhas aventuras pessoais, profissionais, desabafos, e etc. Eu amo vocês! Também ao meu amigo Karcio, por sua amizade e manutenções no meu notebook.

Minhas estimadas chefes, professora Heloísa e Dr^a Wanessa, sou imensamente grata pela oportunidade e por acreditarem no meu potencial. Vocês foram as melhores professoras que eu poderia ter.

Agradeço às minhas parceiras de laboratório e amigas: Aline, Bianca C., Larissa, Kelly e Mônica. Eu amei ter trabalho com vocês, e espero mantê-las na minha vida. Também agradeço a Grazi e a Bete, toda ajuda profissional e pessoal. Não poderia deixar de esquecer também do meu vizinho de laboratório, o Luís e as meninas da Fármaco, pelos incontáveis empréstimos de café (bolachinhas e outros doces), conversas e desabafos trocados na cozinha. Dedico também, um agradecimento excepcional a Bianca P. e a Bruna/Bruníssima, que são grandes amigas e parceiras que o laboratório me trouxe. Bianca com sua super inteligência e organização me ajudou de todas as formas possíveis com meu trabalho, dando sentido às coisas que eu não via mais sentido. E a Bruna (principalmente na sua versão Bruníssima) também

contribuiu com muito insights em diversos momentos de trabalho e na vida! Você é fiel, sincera e ao mesmo tempo sensível, sendo uma amiga para toda hora.

E por último e não menos importante, deixo toda gratidão as parcerias que fiz durante esse trabalho que sem as quais, não conseguiria ter finalizado. A Marina do Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN, UFSCar) pelo uso do citômetro; ao pessoal do Hospital de Amor (Barretos – SP) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica aplicada à Biologia Celular (INFABIC, Campinas - SP) pela utilização dos microscópios.

Obrigada a todos aqui mencionados (e os que acabei esquecendo) por fazerem parte desse momento especial.

“Toda a obra de um homem, seja em literatura, música, pintura, arquitetura ou em qualquer outra coisa, é sempre um auto-retrato; e quanto mais ele se tentar esconder, mais o seu caráter se revelará, contra a sua vontade.

(Samuel Butler)

Resumo

O câncer de mama é a principal doença a acometer mulheres, especialmente o fenótipo triplo negativo, o qual apresenta o pior prognóstico por seu elevado potencial metastático. A metástase ainda consiste na principal causa de mortes de pacientes com câncer e seu desenvolvimento envolve várias etapas e personagens que desempenham papéis importantes, como o microambiente tumoral e a matriz extracelular (MEC). As integrinas, receptores de superfície celular que conectam as células à MEC, também contribuem para as metástases, destacando-se a integrina $\alpha\beta3$ cuja superexpressão está associada a diversas etapas da progressão tumoral. Dentre as moléculas que interagem com integrinas, tem-se as desintegrinas que são pequenas proteínas derivadas de metaloproteases de peçonhas de serpentes. A *DisBa-01* (*Disintegrin of Bothrops alternatus-01*) é uma proteína recombinante derivada da peçonha da serpente *Bothrops alternatus* (urutu-cruzeiro), que possui uma alta afinidade a integrina $\alpha\beta3$. Assim, este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos do silenciamento da subunidade $\beta3$ em células tumorais da linhagem celular de adenocarcinoma triplo negativo de mama (MDA-MB-231). Portanto, os métodos adotados envolveram o cultivo de linhagens de células embrionárias de rim humano (293FT) e de adenocarcinoma triplo negativo de mama (MDA-MB-231) selvagem e modificadas; produção de lentivírus shRNA *ITGB3* bem como a transdução da célula alvo e a validação do silenciamento por RTqPCR e imunofluorescência. Também verificamos possíveis alterações na expressão de outras subunidades de integrinas; ensaios funcionais (inibição da adesão, migração por *wound healing* e *transwell*), e a identificação de metaloproteases de matriz (MMP) (MMP-2 e MMP-9). Confrontamos as respostas celulares da linhagem silenciada com a ação de *DisBa-01* (1000 nM). O silenciamento levou a redução de 69% do mRNA *ITGB3* e 49% da proteína em FN, com aumento das subunidades $\beta1$, $\alpha1$ e $\alpha5$; aumento da adesão a FN (58%) e COL I (83%); diminuição da migração *transwell* (69% de inibição) e da MMP-9, respostas essas, diferentes daquelas obtidas com a *DisBa-01*. A geração dessa nova linhagem celular abre perspectivas de seu uso como ferramenta em estudos futuros da biologia básica do câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer – Metástase - Integrinas – Integrina $\beta3$ - *DisBa-01*

Abstract

Breast cancer is the major disease that affects women, especially the triple negative phenotype, which has the worst prognosis and metastatic potential. Included, metastasis is still the main cause of death in cancer patients and its development involves several stages and characters that play important roles, such as the tumor microenvironment and the extracellular matrix (ECM). Integrins also contribute to metastasis, especially the $\alpha\beta3$ integrin whose overexpression is associated with every step in tumor progression. Among the molecules that interact with integrins, there are disintegrins, which are small proteins derived from snake venom metalloproteases. DisBa-01 (Disintegrin of *Bothrops alternatus*-01) is a recombinant protein derived from the *Bothrops alternatus* venom (urutu-cruzeiro) snake, which has a high affinity for this integrin. Thus, this work aimed to study the effects of silencing the $\beta3$ subunit in tumor cells of the triple negative breast adenocarcinoma cell line (MDA-MB-231). Therefore, the methods adopted involved the cell culture of human kidney embryonic (293FT) and wild and modified triple negative breast adenocarcinoma (MDA-MB-231) cell lines; production of *ITGB3* shRNA lentivirus as well as target cell transduction and the validation of silencing by RTqPCR and immunofluorescence. We also verified possible alterations in the expression of other integrin subunits; functional assays (inhibition of adhesion, migration by wound healing and transwell), and the identification of metalloproteases (MMP) (MMP-2 and MMP-9). We compared the cellular responses of the silenced lineage with the action of DisBa-01 (1000 nM). The silencing took to a 69% reduction in *ITGB3* mRNA and a 49% reduction in FN rich microenvironment, with an increase in $\beta1$, $\alpha1$ and $\alpha5$ subunits; increased adherence to FN (58%) and COL I (83%) proteins; decreased transwell migration (69% inhibition) and MMP-9, responses different from those obtained with DisBa-01. The generation of this new cell line opens perspectives for its use as a tool in future studies of the basic biology of breast cancer.

Keywords: Cancer – Metastasis - Integrins – $\beta3$ Integrin – DisBa-01

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Características das células cancerígenas. Adaptado de Hanahan, 2022.	17
Figura 2 - Distribuição mundial do câncer de mama em mulheres, mostrando ser tipo mais comum em em 154 países em 2020.	18
Figura 3 - Componentes do Microambiente Tumoral	20
Figura 4 -A cascata metastática	22
Figura 5 - Alterações que ocorrem na MEC durante a progressão tumoral	24
Figura 6 - A família das integrinas	25
Figura 7 – Sinalização mediada pelas integrinas.....	26
Figura 8 - Estrutura do Cilengitide	28
Figura 9 - Esquema simplificado do processo de transfecção.....	31
Figura 10 - Validação do silenciamento a nível transcricional e proteico	40
Figura 11 - Análise do perfil da expressão de algumas integrinas nas linhagens celulares MDA-MB 231	42
Figura 12 - Porcentagem de adesão celular a diferentes proteínas da MEC	44
Figura 13 - Alterações na migração celular por Wound Healing, comparando as células silenciadas e células WT tratadas com o inibidor DisBa-01.	45
Figura 14 - Avaliação da migração celular Transwell.....	47
Figura 15 - Detecção das MMPs gelatinases dos ensaios de migração celular.....	48
Figura 16 - Efeitos verificados após silenciamento o gene ITGB3 em MDA-MB-231.....	53
Figura 17 - Mapa do plasmídeo de envelope VSV-G	60
Figura 18 - Mapa do plasmídeo pLP1	61
Figura 19 - Mapa do plasmídeo pLP2	62
Figura 20 - Mapa dos plasmídeos de transfecção.....	63
Figura 21 - Mapa do vetor de transfecção do controle de silenciamento	64

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 - Lista dos plasmídeos de transfecção utilizados para produção de lentivírus.....	32
Quadro 2 - Lista de primers empregados na RTqPCR.....	34
Quadro 3 - Lista de anticorpos utilizados para Citometria de Fluxo	36

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA – *Complementary DNA* (DNA complementar)

COL 1 – Colágeno tipo 1

BCA - *Bicinchoninic acid* (Ácido bicinconínico)

BSA – *Bovine serum albumin* (Albumina de soro bovino)

β3KD – *β3 knockdown*

DAPI - 4',6'-diamino-2-fenil-indol

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Meio Eagle modificado por Dulbecco)

EDTA - *Ethylenediaminetetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

EGF – *Epidermal growth factor* (Fator de crescimento epidermal)

FAK - *Focal Adhesion Kinase* (Quinase de adesão focal)

FITC - *Fluorescein isothiocyanate* (Isotiocianato de fluoresceína)

FGF2 - *Fibroblast growth factor 2* (Fator de crescimento dos fibroblastos 2)

FN – Fibronectina

HER2 - *Human epidermal growth factor receptor-2* (Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano)

HIF - *Hypoxia-inducible factor* (Fator induzido por hipóxia)

IAC - *Integrin adhesion complexes* (Complexos de adesão de integrina)

IF – Imunofluorescência

IPTG - Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

iRNA - *RNA interference* (RNA de interferente)

ITGB3 – gene que codifica a subunidade β3 de integrinas

Kd - Constante de dissociação

LAM - Laminina

MEC – Matriz Extracelular

MMP – Metaloprotease de matriz

MMP-2 – Metaloprotease de matriz 2

MMP-9 – Metaloprotease de matriz 9

mRNA - Messenger RNA (RNA mensageiro)

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

PCR – *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PBS – *Phosphate-buffered saline* (Solução tampão fosfato)

PDL - Poli-D-lisina

PE – *phycoerythrin* (ficoeritrina)

RGD - Arginina-glicina-aspartato

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

rpm – Rotações por minuto

RT-qPCR – *Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction* (Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real)

SFB – Soro Fetal Bovino

shRNA – *Short Hairpin RNA* (RNA em gancho curto)

TGF- β - *Transforming growth factor β* (fator de crescimento transformante β)

VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor* (Fator de crescimento endotelial vascular)

VN – Vitronectina

WT – *Wild type* (Tipo selvagem)

Sumário

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 CÂNCER	17
1.2 CÂNCER DE MAMA	18
1.3 MICROAMBIENTE TUMORAL	19
1.4 METÁSTASE	21
1.5 MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)	23
1.6 INTEGRINAS	25
1.7 DESINTEGRINAS	28
2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE DISBA-01	30
3.2 CULTIVO CELULAR	30
3.3 TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS 293 FT E PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS VIRAIS	31
3.4 TRANSDUÇÃO DAS CÉLULAS ALVO PARA SILENCIAMENTO ESTÁVEL DA INTEGRINA B3	33
3.5 VERIFICAÇÃO DO SILENCIAMENTO DA SUBUNIDADE B3	33
3.5.1 <i>Análise da expressão gênica da subunidade $\beta 3$ por RT-qPCR</i>	33
3.5.2 <i>Análise do conteúdo proteico por Imunofluorescência</i>	34
3.5.3 <i>Análise do conteúdo proteico por Western Blotting</i>	34
3.6 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE INTEGRINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO	35
3.7 ENSAIOS FUNCIONAIS	36
3.7.1 <i>Inibição da adesão celular</i>	36
3.7.2 <i>Migração Celular por Wound Healing</i>	36
3.7.3 <i>Migração Celular Transwell</i>	37
3.8 ZIMOGRRAFIA	37
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4 RESULTADOS	38
	15

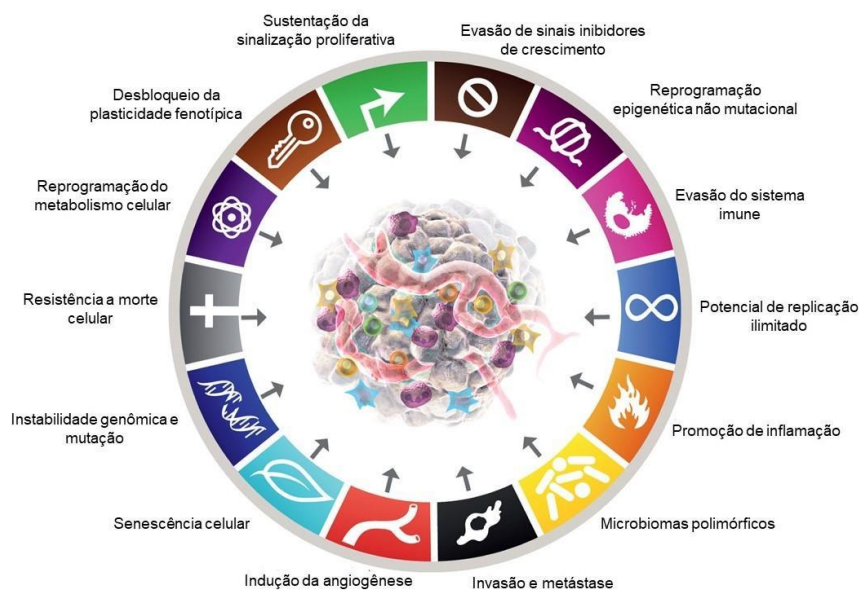
4.1 VALIDAÇÃO DO SILENCIAMENTO DA SUBUNIDADE B3	38
4.2 CITOMETRIA DE FLUXO	41
4.3 ENSAIOS FUNCIONAIS	44
4.3.1 <i>Inibição da Adesão</i>	44
4.3.2 <i>Migração Celular</i>	45
4.4 DETECÇÃO DA ATIVIDADE DE MMPs POR ZIMOGRAFIA	47
5 DISCUSSÃO	48
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
8 ANEXOS	60
8.1 ANEXO 1 – MAPA DO VETOR VSV-G	60
8.2 ANEXO 2 - MAPA DO VETOR PLP1	61
8.3 MAPA DO VETOR PLP2	62
8.4 ANEXO 4 – MAPA DOS VETORES DE TRANSCRIÇÃO DO SISTEMA SHRNA MISSION®	63
8.5 ANEXO 5 – MAPA DO VETOR DE TRANSFECCÃO CONTROLE DE SILENCIAMENTO SISTEMA SHRNA MISSION®	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é uma doença complexa cuja principal característica consiste no crescimento descontrolado de células no organismo (SEYFRIED; SHELTON, 2010, INCA, 2022). Hanahan e Weinberg (2000, 2011, 2022) propuseram um conjunto de capacidades funcionais adquiridas pelas células tumorais que as tornam aptas a formar tumores (Figura 1). Essas características incluem a manutenção de sinais proliferativos, resistência a supressores de crescimento e à morte celular programada (apoptose), imortalidade replicativa, angiogênese sustentada e ativação das vias de invasão e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000) bem como a reprogramação do metabolismo energético e o escape do sistema imune (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Todas essas mudanças, segundo os autores, são sustentadas pela instabilidade genômica das células cancerígenas e pelo estado inflamatório ocasionado principalmente pela resposta de células do sistema imune inato. Recentemente, Hanahan (2022) destaca ainda o papel da plasticidade fenotípica celular e das células senescentes como emergentes no processo de desenvolvimento de tumores. Assim como outras características facilitadoras, o autor destaca novas dimensões que levam a tumorigênese, como a reprogramação epigenética não mutacional (a influência do microambiente tumoral na modulação genética das células tumorais e estromais) e a microbiota polimórfica (HANAHAN, 2022).

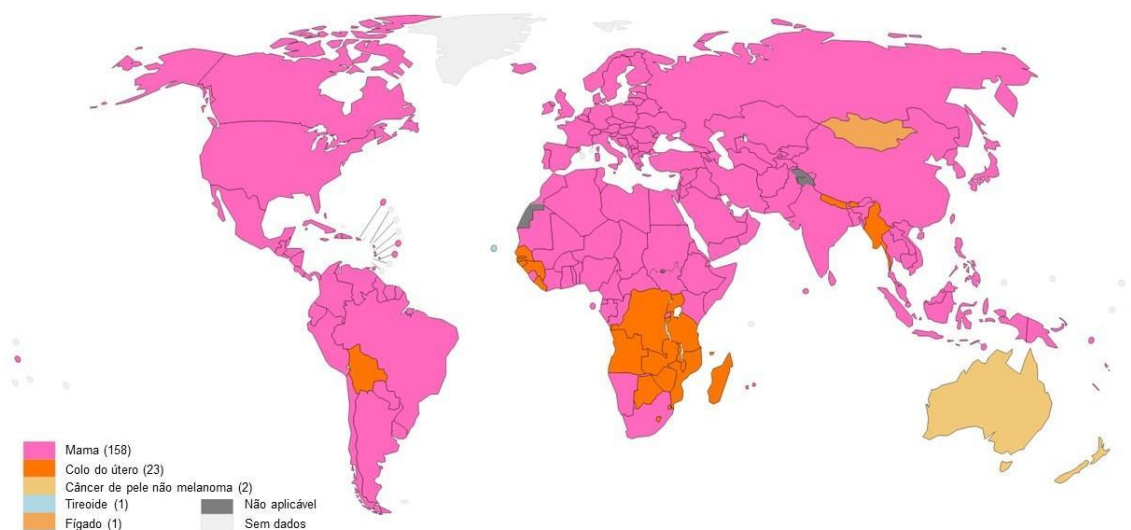
Figura 1 - Características das células cancerígenas. Adaptado de Hanahan, 2022.



1.2 Câncer de Mama

Dentre os diferentes tipos de câncer, o de mama é a principal neoplasia diagnosticada em mulheres em todo o mundo (Figura 2), com cerca de 2,3 milhões de novos casos e 685.000 mortes (HOWARD; OLOPADE, 2021; YIN *et al.*, 2020). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (2022), estimou 66.280 novos casos de câncer de mama para o próximo biênio, bem como 18.032 mortes, sendo 207 de homens e 17.825 de mulheres (INCA, 2022).

Figura 2 - Distribuição mundial do câncer de mama em mulheres, mostrando ser tipo mais comum em em 154 países em 2020.



Mapa de dispersão de câncer globalmente, evidenciando países no qual o câncer de mama (coloração rosa) é predominante. Fonte: UICC.org

Trata-se de uma neoplasia bastante heterogênea que engloba perfis fenotípicos e morfológicos distintos, desencadeando diferentes comportamentos clínicos. De maneira geral, pode-se classificá-lo em três tipos considerando suas propriedades imuno-histoquímicas: positivo para receptores hormonais Luminal A, positivo para receptores hormonais Luminal B e triplo negativo, ou seja, sem a presença de receptores hormonais (JOHNSON; CONANT; SOO, 2021; TANG *et al.*, 2016). Os tumores Luminal A apresentam receptores para os hormônios progesterona e estrogênio, não contendo receptores para o fator epidérmico humano (HER2-). Já os tumores do tipo Luminal B podem apresentar receptores para progesterona e estrogênio, e também para o fator 2 do crescimento epidérmico humano (HER2+). Em ambos os casos, o tratamento consiste em terapias com base hormonal, a fim de bloquear tais

receptores (TANG *et al.*, 2016). Em contrapartida, o câncer de mama triplo negativo não apresenta nenhum dos três receptores citados anteriormente, sendo que o seu tratamento geralmente é mais agressivo, consistindo em uma combinação de cirurgia, radioterapia e quimioterapia cujos efeitos colaterais afetam a qualidade de vida dos pacientes (WAKS; WINER, 2019; WEIGELT; PETERSE; VAN'T VEER, 2005).

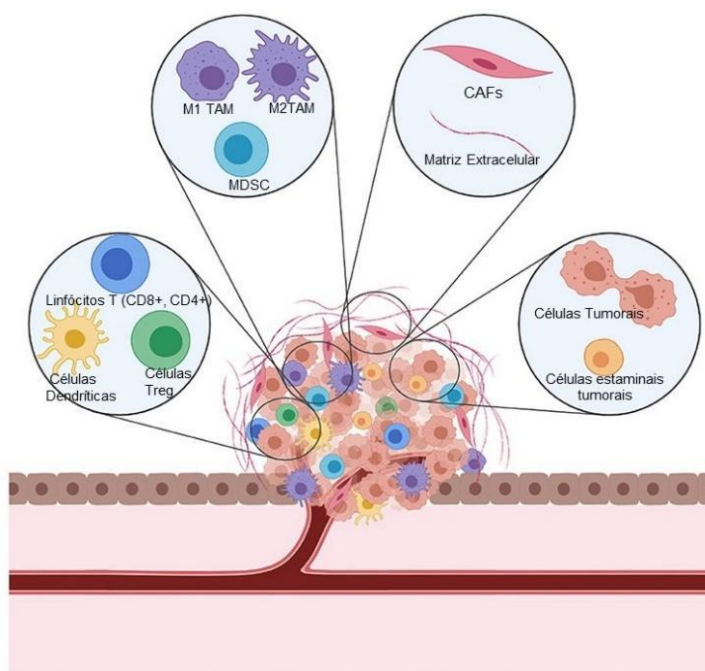
O câncer de mama triplo negativo é bastante agressivo, com alto potencial metastático, podendo chegar a estágios não tratáveis (CHEN; SOSNOSKI; MASTRO, 2010; YIN *et al.*, 2020). Devido à não responsividade aos tratamentos convencionais, apresenta o pior prognóstico, resultado de seu comportamento invasivo e a falta de novos alvos moleculares (FOULKES; SMITH; REIS-FILHO, 2010). Dessa forma, torna-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para esse tipo de câncer.

1.3 Microambiente tumoral

Uma das características elencadas por Hanahan (2022) e diversos autores é a influência do microambiente tumoral na progressão tumoral. O microambiente tumoral engloba as condições dentro e ao redor de uma massa tumoral, sendo composto por componentes celulares e não celulares (Figura 3) que auxiliarão no crescimento do tumor, invasão e posterior metástase, permitindo também escapar do sistema imune (BAGHBAN *et al.*, 2020; NILAND; EBLE, 2020; WHITESIDE, 2008).

Dentre os componentes celulares, estão as células tumorais e estromais como células endoteliais, fibroblastos (*cancer-associated fibroblasts – CAFs*), pericitos e células imunes (granulócitos, linfócitos e macrófagos) (ARNETH, 2019). Além disso, a matriz extracelular, os vasos sanguíneos e linfáticos, fatores solúveis (citocinas, hormônios, fatores de crescimento, entre outros) e outros fatores, como o pH, também afetam o microambiente tumoral (SOYSAL; TZANKOV; MUENST, 2015).

Figura 3- Componentes do Microambiente Tumoral



O microambiente tumoral propicia a manutenção e expansão do tumor, sendo formado por diversas células, como os macrófagos associados ao tumor (TAMs), infiltrados de células T (células T reguladoras infiltrantes tumorais, Treg, e linfócitos T, por exemplo), células dendríticas, células mielóides supressoras (MDSCs); fibroblastos associados ao tumor (CAFs), bem como células endoteliais e pericitos (não representado). Além disso, o componente não celular também desempenha papel fundamental nesse ambiente, como a MEC. Adaptado de BENAVENTE; *et. al.*, 2020.

De maneira geral, a dinâmica dentro do microambiente tumoral funciona da seguinte maneira: as células do estroma secretam fatores de crescimento (fator de crescimento epidermal - EGF, fator de crescimento angiogênico - VEGF, fator de crescimento transformante beta - TGF- β e outros fatores pró-angiogênicos como FGF2), quimiocinas (CXCL12, CXCL10, CCL21, CCL25) e citocinas que promovem a proliferação do tumor, a migração celular e angiogênese tumoral (JOYCE; POLLARD, 2009). Essas células também produzem enzimas de degradação da matriz, incluindo a MMP- 9 e outras proteases de matriz, como cisteíno-proteases, catepsina e heparanase (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A acelerada proliferação celular de células tumorais combinada com um aumento dos vasos sanguíneos resulta em regiões hipóxicas no interior de tumores sólidos (RUAN; SONG; OUYANG, 2009). Esse ambiente propicia a indução da expressão de fatores induzidos

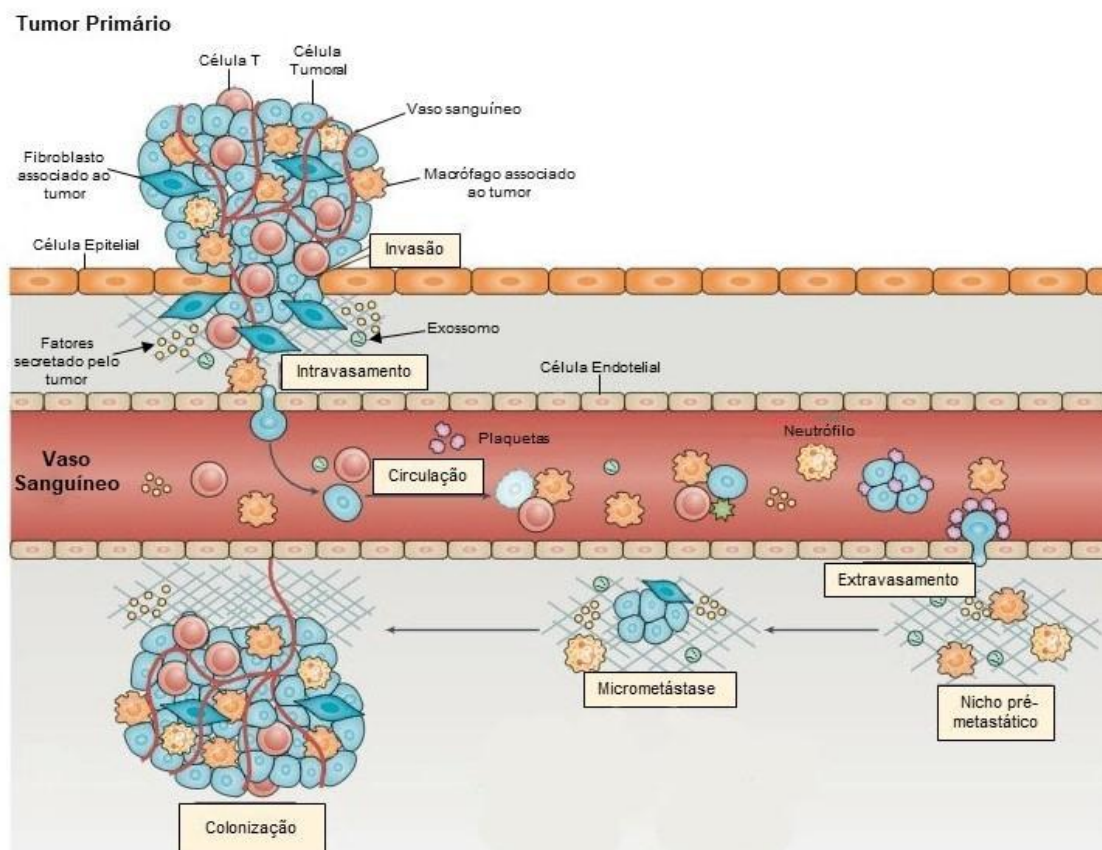
por hipóxia 1 e 2 (HIF1 e HIF2), que adaptam as células às condições de hipóxia, promovendo a transcrição de genes pró-angiogênicos, como o VEGF, que atuará na estimulação da proliferação e migração endoteliais, e no aumento da permeabilidade microvascular (COMINETTI; ALTEI; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2019).

1.4 Metástase

Principal causa de morte de pacientes com câncer, a metástase é a disseminação de células tumorais para outras regiões do corpo, próximas ou não do tumor primário (WELCH; HURST, 2019).

A cascata metastática é um processo complexo que pode ser resumido em cinco etapas (Figura 4): (1) dissociação de células individuais ou grupos de células que se desprendem do tumor primário infiltrando o estroma circundante; (2) processo de invasão no qual as células invadem e migram pela lâmina basal até os vasos sanguíneos ou linfáticos; (3) intravasamento para o interior dos vasos; (4) extravasamento, etapa em que as células deixam a vasculatura e adentram órgãos distantes do tumor primário; (5) colonização dos sítios secundários de tumor (ALIZADEH; SHIRI; FARSINEJAD, 2014; GERASHCHENKO *et al.*, 2019).

Figura 4 -A cascata metastática



A metástase consiste em um processo de várias etapas, em que células do tumor primário se desprendem, invadem o tecido circundante até intravasarem em vasos sanguíneos ou linfáticos, para colonizarem outras regiões do corpo. Durante todo esse processo, vários fatores contribuem para o seu desenvolvimento. Adaptado de ANDERSON; *et al.*, 2019.

Para que a cascata metastática seja completa, uma intrínseca rede de vias sinalizadoras e reguladoras agem garantido plasticidade às células tumorais, evitando sua regulação normal e homeostasia (SHENOY, 2020).

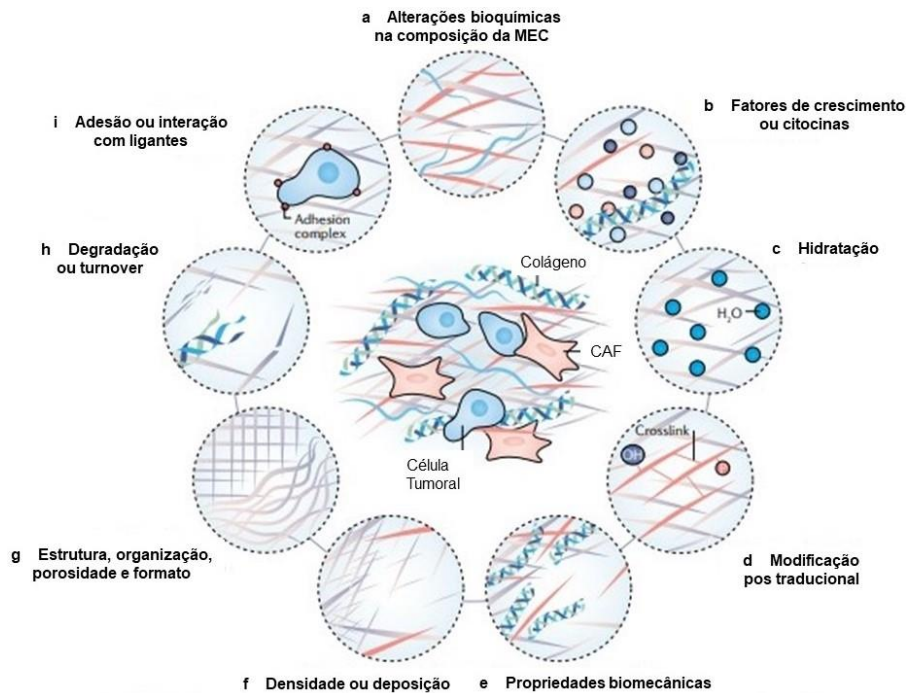
Para a metástase ser “bem sucedida”, é necessário que células do tumor primário preparem a formação de um ambiente de suporte em um órgão secundário, o que é denominado de nicho pré-metastático (LIU; CAO, 2016). Esse ambiente é propiciado por diversos fatores, como celulares (células progenitoras hematopoiéticas, células-tronco mesenquimais, células do sistema imune, etc...), moleculares (fatores secretados derivados de tumores, como VEGF, TNF- α e TGF- β ; quimiocinas, citocinas e fatores inflamatórios) e vesículas extracelulares oriundas de células tumorais (LIU; CAO, 2016; WANG *et al.*, 2021).

No caso das células tumorais de mama, os locais de colonização costumam ser áreas muito vascularizadas como a medula vermelha dos ossos longos e vértebras. Pacientes que apresentam metástases ósseas possuem como sintomas dor, fraturas, hipercalcemia maligna, além de resistência às terapias locais (cirurgia, radioterapia e ablação por radiofrequência) e sistêmicas (terapia endócrina, quimioterapia, terapia baseada em anticorpos monoclonais, terapia de aprimoramento ósseo e terapia com radioisótopos) (TAHARA *et al.*, 2019). Acredita-se que tumores de mama possuam uma sinalização específica que contribuam para a colonização de locais específicos, como os ossos (BURNETT *et al.*, 2015).

1.5 Matriz Extracelular (MEC)

A matriz extracelular (MEC) é formada por uma complexa rede de proteínas e outras moléculas secretadas pelas células, sendo responsável por fornecer suporte estrutural, manter a integridade mecânica do tecido, disponibilizar fatores de crescimento e citocinas além de manter a hidratação e o pH no local de forma a conservar a homeostase tecidual (DE PALMA; BIZIATO; PETROVA, 2017; PICKUP; MOUW; WEAVER, 2014). A MEC é bastante dinâmica, sofrendo diversas alterações durante a carcinogênese (Figura 5). Durante a progressão tumoral, as células são capazes de remodelar a MEC quando necessário, para permitir a sua mobilidade. A degradação da MEC ocorre pela ação de enzimas proteolíticas (proteases) principalmente aquelas pertencentes à família das metaloproteases de matriz (MMPs). Adicionalmente, o aumento na expressão de genes relacionados ao remodelamento da MEC tem sido associado à alta taxa de mortalidade em pacientes com câncer de mama, pulmão e de estômago (CHUNG *et al.*, 2004).

Figura 5 - Alterações que ocorrem na MEC durante a progressão tumoral



A MEC é alterada de diversas maneiras durante a progressão tumoral, incluindo alterações bioquímicas e biofísicas. Adaptado de COX, 2021.

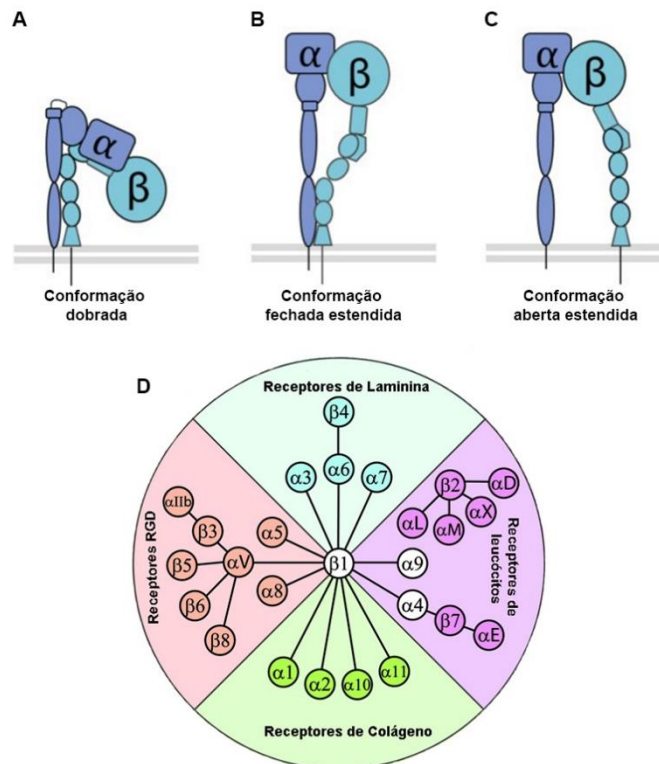
Ademais, alterações na MEC podem intensificar os eventos de migração e invasão das células tumorais, propiciando o desenvolvimento de metástases (HAMIDI; IVASKA, 2018). Esse comportamento é resultado do aumento da rigidez da MEC devido a fibrose tecidual oriunda do descontrole da degradação e acúmulo de certos componentes da matriz extracelular como, por exemplo, o colágeno reticulado (COX, 2021; FATTET *et al.*, 2020; LEVENTAL *et al.*, 2009). Este acúmulo facilita o recrutamento de integrinas, as quais auxiliam na ativação da quinase de adesão focal (FAK), proteína responsável por disparar vias de sinalização intracelular, propiciando a formação de estruturas como lamelipódios, o que resulta por fim no aumento da migração e invasão celular (PICKUP; MOUW; WEAVER, 2014; PROVENZANO; KEELY, 2009). Além de contribuir para a progressão tumoral, a modulação da MEC também auxilia o processo angiogênico associado ao tumor, promovendo a migração de células endoteliais e a liberação de VEGF no microambiente circundante, eventos também assistidos pelas integrinas (PICKUP; MOUW; WEAVER, 2014).

1.6 Integrinas

As integrinas estão envolvidas em diversas etapas da progressão do câncer, devido ao seu papel na adesão a componentes da MEC, na migração, na sinalização e na mecanotransdução das células (HAMIDI; IVASKA, 2018).

Integrinas compreendem uma família de proteínas receptoras transmembrana compostas por uma subunidade α (18 tipos de subunidades) e uma β (8 tipos de subunidade β), formando 24 heterodímeros diferentes associados não covalentemente, com três estados conformacionais (Figura 6-A) (KADRY; CALDERWOOD, 2020; SWITALA-JELEN *et al.*, 2004). Cada subunidade apresenta um domínio extracelular, o qual se liga a sequências específicas de proteínas da MEC; um único domínio transmembrana; e uma curta cauda citoplasmática (com exceção da integrina $\beta 4$) que se conecta ao citoesqueleto de actina. Além disso, cada integrina apresenta especificidades próprias à componentes da MEC, desencadeando sinalizações distintas nas diferentes células (ALTEI; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2018; HAMIDI; IVASKA, 2018; SWITALA-JELEN *et al.*, 2004) (Figura 6-B).

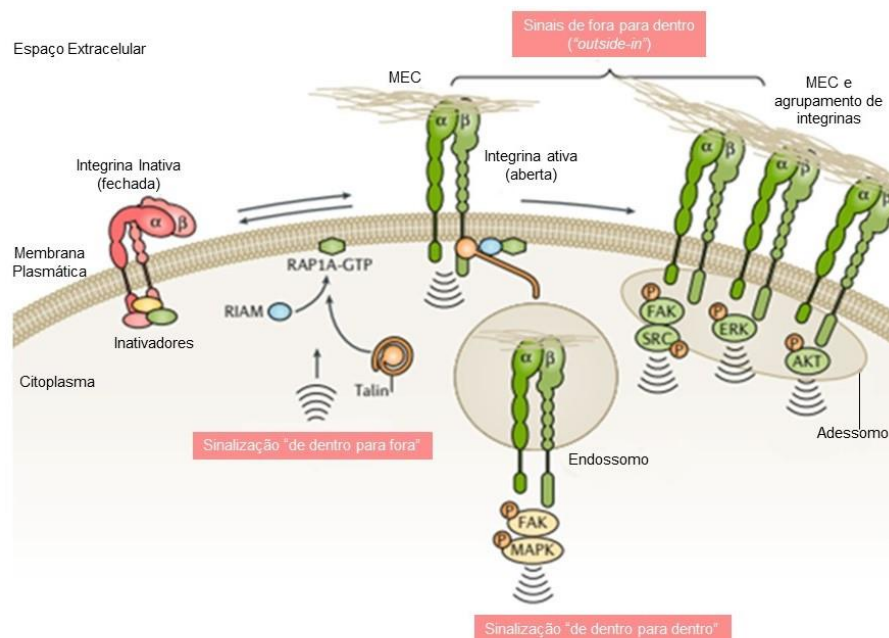
Figura 6 - A família das *integrinas*



Visão geral da estrutura das integrinas, que podem adotar três estados conformacionais, sendo elas **A)** conformação fechada inativa e com baixa afinidade aos ligantes; **B)** uma conformação intermediária, sendo fechada estendida, em que a integrina está ativa, mas apresenta baixa afinidade; por último, **C)** uma conformação aberta estendida, que é ativa e com alta afinidade. **D)** Diferentes combinações das integrinas formam receptores especializados na ligação à laminina (azul), colágeno (verde), leucócitos (roxo) e a moléculas contendo o motivo RGD (vermelho). Adaptado de PETERSON; KOVAL, 2021 e LAFOYA; *et al.*, 2018.

Quando ativas, as integrinas são capazes de reconhecer o ambiente extracelular, convertendo sinais mecânicos, advindos da adesão à componentes da MEC, em sinais bioquímicos intracelulares (CHASTNEY; CONWAY; IVASKA, 2021) (Figura 7). Com isso, elas participam de diversos processos como proliferação, migração, invasão e manutenção das funções específicas de diferenciação celular, sendo consideradas moduladoras do comportamento das células (VALDEMBRI; SERINI, 2021)(WEIGELT; PETERSE; VAN'T VEER, 2005). Contudo, o descontrole na adesão mediada pelas integrinas está associado à diversas doenças, como doenças cardiovasculares e o câncer (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010; HAMIDI; IVASKA, 2018).

Figura 7 – Sinalização mediada pelas integrinas



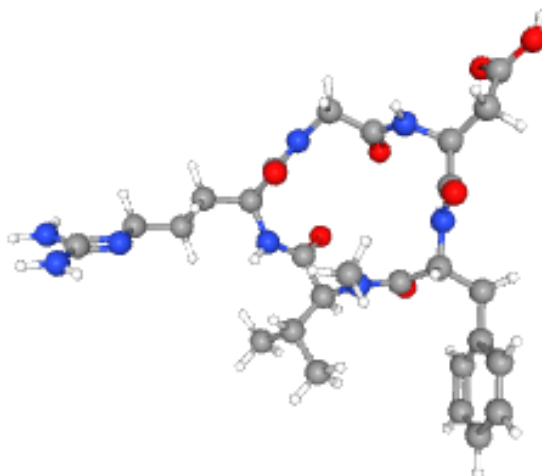
Integrinas são moléculas capazes de realizar sinalização bidirecional. Dependendo do contexto ao qual a célula se encontra (como as propriedades da MEC), haverá o engajamento de integrinas e recrutamento de FAK e SRC, por exemplo, levando a sinalização “de fora para dentro”. Além disso, também participam da sinalização de dentro

para fora, devido a ativação da cauda citoplasmática da subunidade β gerando resposta celular, como a migração. Adaptado de Hamidi; Ivaska, 2018.

Estudos mostraram que durante a carcinogênese, o padrão de expressão de integrinas nas células é modificado e a maioria das células tumorais passa a expressar diferencialmente certos tipos de integrinas. Como exemplo, temos a integrina $\alpha\beta3$, cuja superexpressão está associada à progressão tumoral, estando presente em grande quantidade em diversas células malignas com fenótipo invasivo (COOPER; GIANCOTTI, 2019; DESGROSELLIER; CHERESH, 2010; SWITALA-JELEN *et al.*, 2004). No câncer de mama, sua alta expressão está associada a formação de metástases ósseas (DANHIER; LE BRETON; PRÉAT, 2012). Justamente por sua regulação positiva em células tumorais, a integrina $\alpha\beta3$ vem sendo estudada como alvo terapêutico (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010).

O sítio RGD presente na integrina $\alpha\beta3$ reconhece a sequência tripeptídica arginina-glicina-aspartato (Arg-Gly-Asp; RGD) presente em proteínas da MEC, como a fibronectina, a vitronectina, a laminina, o colágeno, a osteopontina, o fator de von Willebrand, entre outros (SWITALA-JELEN; *et al.*, 2004), apresentando estados de baixa e alta afinidade a esses ligantes por meio de rearranjos conformacionais (NIEBERLER *et al.*, 2017). Com base nessas características de afinidade, diversos estudos têm buscado pequenas moléculas baseadas em RGD para agir sobre as integrinas, inibindo as respostas fisiopatológicas destes receptores transmembrana (NIEBERLER *et al.*, 2017). A fim de atender tal demanda, projetou-se o Cilengitide, um pentapeptídeo RGD cíclico antiangiogênico que interage com as integrinas $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ e $\alpha5\beta1$ (MAS-MORUNO; RECHENMACHER; KESSLER, 2011) (figura 8). O Cilengitide demonstrou eficácia na redução do glioblastoma em camundongos e em ensaios clínicos de fase I e II, porém não apresentou resultados satisfatórios na sobrevida dos pacientes, em ensaios de fase III (SCODELLER; ASCIUTTO, 2020).

Figura 8 - Estrutura do Cilengitide



A figura demonstra a estrutura conformacional em3D, em bola e bastão, do Cilengitide, um peptídeo RGD cíclico, que interage bloqueando as integrinas $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ e $\alpha5\beta1$. As bolas em vermelho representam moléculas de oxigênio e em azul as moléculas de nitrogênio. As moléculas de hidrogênio também estão representadas (em branco) nas extremidades. Fonte: PubChem.

1.7 Desintegrinas

Desintegrinas são pequenas proteínas (40-100 aminoácidos) derivadas de processamento proteolítico de metaloproteases encontradas nas peçonhas de serpentes (SVMPs - Snake Venom Metalloproteinases) da subclasse P-IIa (CALVETE, 2013; SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2010).

A DisBa-01 (*Disintegrin of Bothrops alternatus-01*) é uma proteína derivada da peçonha da serpente *Bothrops alternatus* (urutu-cruzeiro), produzida de maneira recombinante em sistema procarioto em nosso laboratório e que apresenta o motivo conservado RGD na região C-terminal (RAMOS; *et al.*, 2007). Possui afinidade pelas integrinas $\alpha5\beta1$ e $\alpha V\beta3$, sendo 100 vezes mais específica para esta última ($K_d = 7,62 \times 10^{-5}$ M), ligando e bloqueando este receptor. Ela apresenta atividades antiangiogênica, antimetastática e antitrombótica em modelos experimentais em camundongos C57BL6/j (KAUSKOT, 2008; MONTENEGRO *et al.*, 2017; RAMOS *et al.*, 2008).

Além disso, a DisBa-01 demonstrou afetar diversos comportamentos celulares *in vitro*. Ela inibe a proliferação de células endoteliais humanas (HMEC) e de células tumorais de próstata e mama (DU-145 e MDA-MB-231) (SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2010). Também

diminui a migração e a direcionalidade da migração celular de células de carcinoma oral (OSCC) altamente invasivo, em fibronectina (MONTENEGRO *et al.*, 2017). Os achados acerca do mecanismo de DisBa- 01 para a biologia do câncer, reforçam sua aplicação - bem como de outras proteínas do veneno de serpentes - como agentes de interesse científico e terapêutico (ALMEIDA *et al.*, 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos da subunidade $\beta 3$ de integrinas por meio do silenciamento do gene *ITGB3* em eventos da cascata metastática na linhagem celular de adenocarcinoma triplo negativo de mama (MDA-MB-231) *in vitro*, visto o relevante papel dessa integrina em comportamentos celulares que promovem a metástase.

2.2 Objetivos Específicos

- Obtenção da desintegrina recombinante DisBa-01 por meio de técnicas cromatográficas;
- Produção de partículas lentivirais contendo shRNA semelhante ao mRNA da subunidade $\beta 3$ de integrinas;
- Transdução do vírus nas células alvo - adenocarcinoma triplo negativo de mama humana (MDA-MB-231);
- Avaliar a expressão gênica da subunidade $\beta 3$ por meio PCR em tempo real, western blotting e imunofluorescência;
- Verificar alterações no perfil de outras integrinas, após o silenciamento;
- Investigar os efeitos do silenciamento da subunidade $\beta 3$ em ensaios de adesão e migração celular;
- Avaliar alterações na expressão de metaloproteases de matriz (MMP-2 e MMP-9).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Expressão e Purificação de DisBa-01

O procedimento seguiu o método padronizado por nosso laboratório (RAMOS *et al.*, 2008). Cepas de *Escherichia coli* BL21(DE3) transformadas com plasmídeo pET28a contendo o gene da DisBa-01 foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) Broth e induzidas com 10 mM de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo), por 3h em agitação (250 rpm, 37 °C). Após, o meio foi centrifugado a 4200g por 7 minutos a 4°C (Sorvall® RC5C Plus, Kendro Laboratory Products, rotor GSA) e o *pellet* de células lisado em condições desnaturantes com ureia. O conteúdo liberado foi purificado em coluna de níquel (HIS-Select® Nickel Affinity Gel, Sigma-Aldrich®) e posteriormente por coluna de troca iônica (Mono-Q 5/50 GL, GE Healthcare). Ao final do processo, as proteínas foram quantificadas (Pierce™ BCA Protein Assay, Thermo Scientific, 23227) e sua atividade biológica testada.

3.2 Cultivo Celular

Foram empregadas neste trabalho as seguintes linhagens celulares: *i*) células embrionárias de rim humano (293FT); *ii*) células de adenocarcinoma triplo negativo de mama (MDA-MB-231); *iii*) células de adenocarcinoma triplo negativo transduzidas com lentivírus controle, o qual não possui similaridade a qualquer transcrito humano (MDA-MB-231 shRNA controle); e por fim, *iv*) células de adenocarcinoma triplo negativo de mama silenciadas estavelmente para a subunidade $\beta 3$ da integrina $\alpha \beta 3$ (MDA-MB 231 KD $\beta 3$). Todas as linhagens foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Vitrocell), pH 7.4, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell), L-glutamina, bicarbonato de sódio, L- glicose e piruvato (100 mM) sem adição de antibióticos, em estufa com 5% de CO₂ a 37°C.

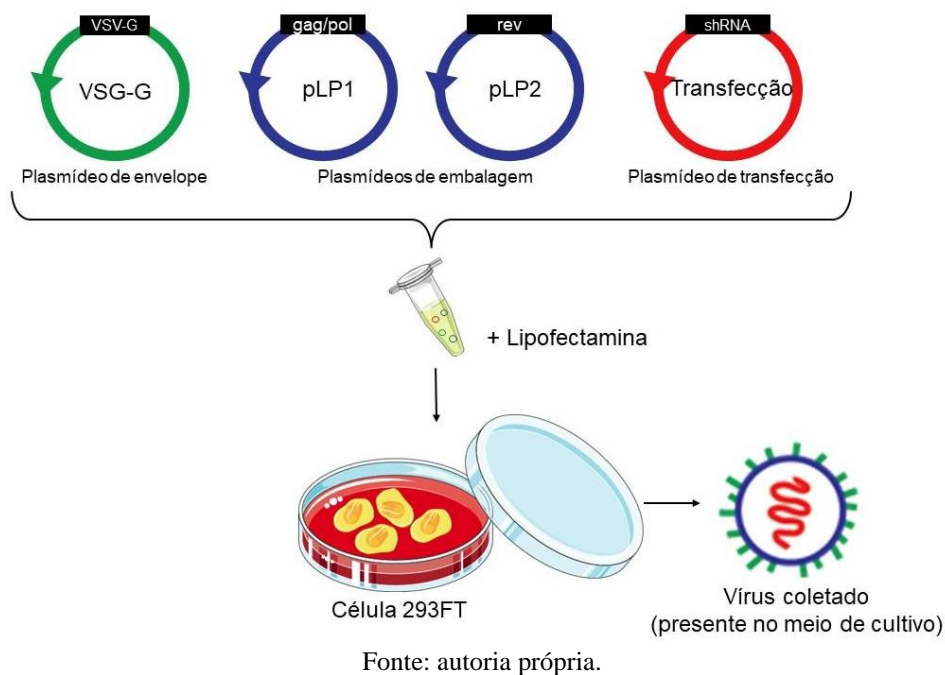
Ao atingirem confluência de 70% - 80%, as células foram desaderidas com solução de tripsina/EDTA, seguida de sua inativação com meio contendo soro e centrifugadas (1200 rpm, 5 minutos - Centrífuga Excelsa, FANEM). Para avaliação da viabilidade celular, essas células então, eram coradas com solução de *trypan blue* (4%) e contadas em um contador automático (TC20; Bio-Rad). Rotineiramente, as células eram checadas para garantir a ausência

de contaminação por *Mycoplasma* sp, utilizando microscopia de fluorescência a partir da coloração com Hoescht 33258 (0,5 µg/ml).

3.3 Transfecção de células 293 FT e produção de partículas virais

Células embrionárias de rim humano (293FT) foram plaqueadas em placa de Petri de 10cm na densidade de 7×10^5 em 5 ml de DMEM alta glicose suplementado com 10% soro fetal bovino e geneticina G418 (50 µg/ml). Utilizou-se o sistema de transfecção de terceira geração, cuja característica consiste na utilização de 4 plasmídeos (mapa dos plasmídeos nos anexos). Dessa forma, ao atingir confluência celular adequada (entre 50% – 70%), uma mistura de 9 µg de plasmídeos contendo 2,77 µg do plasmídeo VSV.G (envelope), 4,23 µg do plasmídeo pLP1 (embalagem) e 1,98 µg do pLP2 (embalagem) foi adicionada a uma segunda mistura formada pelo plasmídeo de transfecção (MISSION® shRNA, Sigma-Aldrich®, quadro 1) em meio Opti-MEM™ *Reduced Serum Medium* (Gibco™, 31985070) sem soro, totalizando um volume de 1,5ml. Em paralelo, uma solução de lipofectamina (Lipofectamine® 3000, L3000001) foi preparada em 1,5ml em Opti-MEM™, sendo em seguida, adicionada a mistura de plasmídeos e incubada a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, a solução foi adicionada às células, previamente incubadas com meio DMEM sem soro e sem antibiótico, sendo incubada a 37° C em 5% CO₂ por 4 horas. Após esse período, o meio contendo lipofectamina foi trocado por meio novo completo (DMEM alta glicose, 10% SFB sem antibióticos). Após 48 horas, o meio de cultivo foi coletado, centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos (Centrífuga Excelsa, FANEM) e armazenado a -80°C (Figura 9). Adicionalmente, realizamos o alinhamento das sequencias de shRNA dos plasmídeos de transfecção ao mRNA da subunidade β3 (*ITGB3*). Para isso utilizamos a ferramenta Blastn (pesquisa em bancos de dados de nucleotídeos usando uma consulta de nucleotídeos - *query*), por meio do programa “*Somewhat similar sequences (blastn)*” com os parâmetros padrões do programa.

Figura 9 - Esquema simplificado do processo de transfecção



Quadro 1- Lista dos plasmídeos de transfecção utilizados para produção de lentivírus (mapas dos genomas virais em “Anexos”)

Código shRNA	Sequência*	Região (mRNA humano)
TRCN0000003235	CCGGCCACGTCTACCTTCACCAATAC <u>TCGAGTATTGGTGAAGGTAGACGTGG</u> TTTTT	CDS
TRCN0000003236	CCGGCCTTAGCCTTTGTCCCAGAATCT <u>CGAGATTCTGGGACAAAGGCTAAGGT</u> TTTT	3'UTR
TRCN0000003237	CCGGGATGCAGTGAATTGTACCTATC <u>TCGAGATAGGTACAATTC</u> ACTGCATC TTTTT	CDS
TRCN0000003238	CCGGCTCATATAGCATTGGACGGAAC <u>TCGAGTTC</u> CGTCCAATGCTATATGAG TTTTT	CDS

TRCN0000318548	<u>CCGGCCTTAGCCTTTGTCCCAGAATCT</u> <u>CGAGATTCTGGGACAAAGGCTAAGGT</u> TTTTG	3'UTR
SHC002 pLKO.1-puro Non-Mammalian shRNA Controle	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAA CTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTG TTTTT	Nenhum transcrito humano ou de camundongo

* A sequência sublinhada indica o local de loop do shRNA, de acordo com boletim Sigma. Esse *loop* é clivado pela enzima Dicer.

3.4 Transdução das células alvo para silenciamento estável da integrina $\beta 3$

Células da linhagem de adenocarcinoma de mama triplo negativo (MDA-MB 231) foram plaqueadas em placas de cultivo (6 poços) na quantidade de 7×10^4 célula/poço em meio DMEM e incubadas a 37°C , 5% CO_2 , *overnight*. Ao atingir a confluência ideal (entre 50 – 70%), o meio de cultivo foi substituído por um novo meio contendo vírus, com adição de $8 \mu\text{g/mL}$ de polibreno (Sequabrene, Sigma, S2667), o qual foi substituído por meio completo na manhã seguinte. Após 48 h de incubação, se iniciou a seleção com o antibiótico puromicina (Gibco™, A11138-03) nas concentrações de 4 e $8 \mu\text{g/mL}$. As células foram selecionadas por um período de um mês, trocando o meio contendo puromicina a cada três dias.

3.5 Verificação do silenciamento da subunidade $\beta 3$

3.5.1 Análise da expressão gênica da subunidade $\beta 3$ por RT-qPCR

As células MDA-MB 231 (selvagem, shRNA controle e B3KD) foram cultivadas em placas de Petri de 6 cm, na densidade de 1×10^6 célula/placa, incubadas a 37°C , 5% CO_2 . Para extração de RNA total, utilizou-se o reagente TRIZol (Invitrogen, 15596018), seguindo as recomendações do fabricante. Sua concentração foi mensurada por meio do equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Um ($1 \mu\text{g}$) de RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen 18068-015) e posteriormente realizada a transcrição reversa com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (#4368814) de acordo com orientações do fabricante. Para q-PCR, todo

o cDNA foi misturado com 400 nM de cada primer (Tabela 1) e 5 µL de SsoFast™ Evagreen Supermix (Bio-Rad #172-5201) em um volume final de 10 µL. A programação de ciclagem térmica foi configurada sendo 10 minutos a 95 °C, seguida por 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 30 s a 60 °C e 30 s a 72 °C. A expressão relativa dos produtos qRT-PCR foi determinada pelo método $\Delta\Delta C_t$, calculada por meio da equação: $fold\ induction = 2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Quadro 2 - Lista de primers empregados na RTqPCR

Primer	Sequência	
β3	<i>Forward</i>	CTCCGGCCAGATGATTC
	<i>Reverse</i>	TCCTTCATGGAGTAAGACAG
GAPDH	<i>Forward</i>	ACAGTTGCCATGTAGACC
	<i>Reverse</i>	ACAGTTGCCATGTAGACC

3.5.2 Análise do conteúdo proteico por Imunofluorescência

Previamente ao plaqueamento, *coating* de fibronectina (2µg/cm²) foi preparado em uma lamínula de vidro e incubada *overnight*, a 4°C. Após, esse *coating* foi bloqueado com PBS-BSA 2% por 1h. A essas lamínulas, as células (1x10⁴) das linhagens de MDA-MB-231 selvagem e transduzidas foram semeadas e incubadas por 24 horas, 37°C, 5% CO₂. Em seguida, foram fixadas com paraformaldeído 4%, lavadas com PBS, e permeabilizadas com 0,1% Triton X-100, por 10 e 5 minutos respectivamente, seguido de bloqueio (BSA 1% por 1 hora) e incubação *overnight* com anticorpo anti-integrina β3 (ab34409) na diluição de 1:500. Após incubação, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS, por 5 minutos, seguido de incubação com anticorpo secundário Goat Anti-Mouse (AlexaFluor488, ab150113) na diluição 1:1000, por 1 hora. Os núcleos foram corados com DAPI (ThermoFisher Scientific, 62248, concentração de uso 0,7 ng/mL), para contagem. As imagens foram adquiridas com microscópio confocal *Fluoview* v. FV10, Olympus acoplado com o software F10, v.2.1 e analisadas usando ImageJ Fiji (SCHINDELIN *et al.*, 2012).

3.5.3 Análise do conteúdo proteico por Western Blotting

As células de trabalho foram plaqueadas em placa de Petri (6 cm) e incubadas a 37°C, 5% CO₂. Após elas foram removidas das placas de cultura utilizando *cell scraper* e solução

salina tamponada com fosfato (PBS) gelado e logo em seguida centrifugadas por 10 minutos (4°C, 7197g - Eppendorf, *Centrifuge* 5430 R, F-35-6-30). O pellet celular obtido foi ressuspendido em 100 µL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM cloreto de sódio, 1 mM EDTA, 1 mM ortovanadato de sódio, 1 mM fluoreto de sódio, 1% Tween 20, 0.25% deoxicolato de sódio, 0.1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 1 µg/mL aprotinina e 1 µg/mL leupeptina) mantendo incubado por 2h, sendo posteriormente centrifugado (7197g, 4°C, por 20 minutos - Eppendorf, *Centrifuge* 5430 R, rotor FA-45-24-11-HS) e o sobrenadante coletado para determinação do conteúdo proteico por meio de kit de BCA (BCA Protein Assay Kit; Thermo Fisher Scientific). As proteínas do lisado (30 µg) misturadas com tampão *Laemmli* foram separadas por eletroforese em SDS-PAGE (10%) e transferidas para membranas de nitrocelulose de 0,45 µm (Bio-Rad) utilizando sistema de transferência úmida, as quais foram bloqueadas com BSA 3% em TBS-T (10 mM Tris-HCl, 150 mM cloreto de sódio, Tween-20 e água deionizada) por 1 h e logo incubadas com anticorpos primários (Anti-integrin β3 ab119992, 1:1000 e anti-GAPDH ab181602, 1:10000) *overnight*. Em seguida, incubada com anticorpos secundários (Goat Anti-Rabbit ab97051, 1:10000). Para revelação das membranas utilizou o método quimioluminescente (Clarity™ Western ECL Substrate; Bio-Rad), através do equipamento ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad). A quantificação foi realizada por densitometria com ImageJ Fiji.

3.6 Caracterização do perfil de expressão de integrinas por Citometria de Fluxo

A fim de constatar o perfil de expressão de algumas integrinas nas linhagens celulares, realizou-se a imunofenotipagem por citometria de fluxo. Cerca de 1×10^6 células foram plaqueadas em placa de 6 poços, sendo mantidas a 37 °C, 5% CO₂, *overnight*. Em seguida, as células foram retiradas da placa com auxílio de *cell scraper* e solução salina tamponada com fosfato (PBS), centrifugadas (150g, a 4°C por 8 minutos - Eppendorf, *Centrifuge* 5430 R, rotor FA-45-24-11-HS). Após, foram incubadas com os respectivos anticorpos (quadro 3), por 1 hora, em gelo (0 °C), seguida de lavagem com PBS e incubação com anticorpo secundário (1h a 0°C), sendo novamente lavadas para retirada do excesso do marcador. A aquisição e análises foram realizados com BD Accuri C6 (BD Biosciences) e o *software* FlowJo (versão 10.8.1), respectivamente.

Quadro 3 - Lista de anticorpos utilizados para Citometria de Fluxo

Anticorpo	Fabricante	Diluição/Concentração
Anti integrina α v	Santa Cruz (sc53360)	1 μ g por 1×10^6 células
Anti integrina α 4	Santa Cruz (sc13543)	
Anti integrina β 1	Santa Cruz (13590)	
Anti integrina α 1 (FITC)	BD Pharmingen (#559596)	5 μ L (recomendação do fabricante)
Anti integrina α 2 (PE)	BD Pharmingen #555669	
Anti integrina α 5 (PE)	BD Pharmingen #555617	
Anti integrina β 3 (FITC)	BD Pharmingen #555753	
Anti-Mouse PE IgG (clone G18-145)	BD Pharmingen (#560951)	
Goat Anti-Mouse IgG H&L (FITC)	AbCam (ab6785)	1:1000

3.7 Ensaios Funcionais

3.7.1 Inibição da adesão celular

Para esse ensaio, avaliamos a inibição da adesão a diferentes proteínas que compõem a MEC. Placas pretas com fundo transparente de 96 poços (Corning®, código 3603) foram revestidas com VN (0,2 μ g/cm²), FN (2 μ g/cm²), COL 1 (5 μ g/cm²), LAM (1 μ g/cm²) e BSA 2% como controle negativo, preparados previamente ao experimento. No dia seguinte, os *coatings* foram bloqueados com BSA 1% a fim de evitar ligações inespecíficas ao plástico, por 1h e então lavados 2x com meio sem soro. As células (1×10^4 célula/poço) foram plaqueadas aos substratos e incubadas por 1h, 37 °C, 5% CO₂ para permitir a adesão. Os poços foram lavados 3x com PBS e as células fixadas com 4% de paraformaldeído por 10 minutos. Em seguida, os núcleos foram corados com DAPI (0,7 ng/ μ l, Thermo Scientific) por 10 minutos e contados automaticamente usando os microscópios ImageXpress XLS System (Molecular Devices) e IN Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare), ambos em objetiva 10x.

3.7.2 Migração Celular por Wound Healing

O ensaio seguiu protocolo já estabelecido em nosso laboratório (CASALI *et al.*, 2022). As células MDA-MB-231 (selvagem e transduzidas) foram semeadas em placa de 24 poços, na densidade 1×10^5 célula/poço em meio DMEM alta glicose com 10% SFB, a 5% CO₂,

37 °C, por 48h. Foi realizada uma risca na monocamada de células, utilizando uma ponteira de 200 µl estéril. Posteriormente, as células foram tratadas com 10µg/ml de Mitomicina-C (Sigma-Aldrich, M4287) por 4h, seguida de duas lavagens com PBS. Uma parte das células parentais já aderidas foram tratadas com DisBa-01 (1000 nM). Imagens das fendas foram adquiridas em 0h, 16h, 24h e 48h com microscópio Axio Vert.A1 Zeiss, em lente 10x, e a área calculada com ImageJ Fiji (SCHINDELIN *et al.*, 2012). A migração celular foi calculada por meio da porcentagem de abertura da fenda, usando a equação $\Delta h \times 100/T0$, em que Δh é a área da risca em diferentes tempos de incubação, e T0 a área logo após a realização da ferida.

3.7.3 Migração Celular Transwell

Neste ensaio, utilizamos câmara de Boyden contendo insertos de membrana translúcida com poros de 8 µm (ThinCert™ 12 well translucent PET membrane RoTrac®; Greiner Bio-one®) (BOYDEN, 1962). Assim, as células (2×10^5 /poço) foram adicionadas a parte superior do inserto, em meio sem soro. Uma parte das células MDA-MB 231 *wild type* foram tratadas com DisBa-01 (1000 nM). Em seguida, os insertos foram colocados em poços de placa de 12 poços, contendo meio com soro, com exceção do controle negativo, o qual foi inserido em meio sem soro. A migração ocorreu por 16h a 37 °C, 5% CO₂. As células que migraram foram fixadas com paraformaldeído (4%, por 10 minutos) e seus núcleos corados com DAPI. As membranas foram montadas em lâminas histológicas e as imagens foram adquiridas nos microscópios ImageXpress XLS System (Molecular Devices) e Microscópio Invertido Zeiss LSM880 Airyscan (Carl Zeiss AG, Germany), ambos em lente 10x, e os núcleos contados usando ImageJ Fiji.

3.8 Zimografia

Para checar a atividade potencial de metaloproteases de matriz (MMPs), foram utilizados o meio de cultivo celular dos experimentos de migração celular por *wound healing* e em câmara de Boyden, seguindo protocolo já estabelecido em nosso laboratório (CASALI *et al.*, 2022; LINO *et al.*, 2019). Dessa forma, ao final dos ensaios celulares, o meio de cultivo foi coletado e quantificado com o kit de BCA (Pierce™ BCA Protein Assay, Thermo Scientific). 10 µg de amostra foram misturados em tampão sem β-mercaptoetanol (BromoFenol Blue 0,1%,

Tris HCl 1,125 M em pH= 6,8, glicerol, água), e resolvidos em gel poliacrilamida 10% contendo 0,01% gelatina, a 4°C. O gel foi lavado duas vezes com solução de Triton X-100 (2,5% em água) e incubado em tampão de incubação (Tris 50mM, CaCl₂ 5mM, ZnCl₂ 1μM) por 20h, 37°C. Após, o gel foi corado com Coomassie Blue R-250 e descorado com solução de 10% ácido acético: 10% metanol: 80% água. As bandas descoradas/claras foram visualizadas e adquiridas por meio do ChemiDoc™ XRS, Bio-Rad, e quantificadas por densitometria usando ImageJ Fiji (SCHINDELIN *et al.*, 2012).

3.9 Análise Estatística

No mínimo três experimentos independentes (em triplicata ou duplicata técnicas) foram realizados, sendo todos analisados quanto a sua significância estatística pelo *software* GraphPad Prism (versão 8.0.1). Os dados foram submetidos à identificação de *outliers*, bem como a verificação de normalidade. Em caso de lognormalidade, os dados foram transformados em log₁₀ e submetidos à análise como dados paramétricos. Em caso de normalidade, realizou-se o teste paramétrico ANOVA *one-way* com pós-teste de múltiplas comparações de Tukey. Caso os dados fossem não paramétricos, seguiu-se o teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Para ambos os casos, valores de $p < 0,05$ foram considerados com significância estatística.

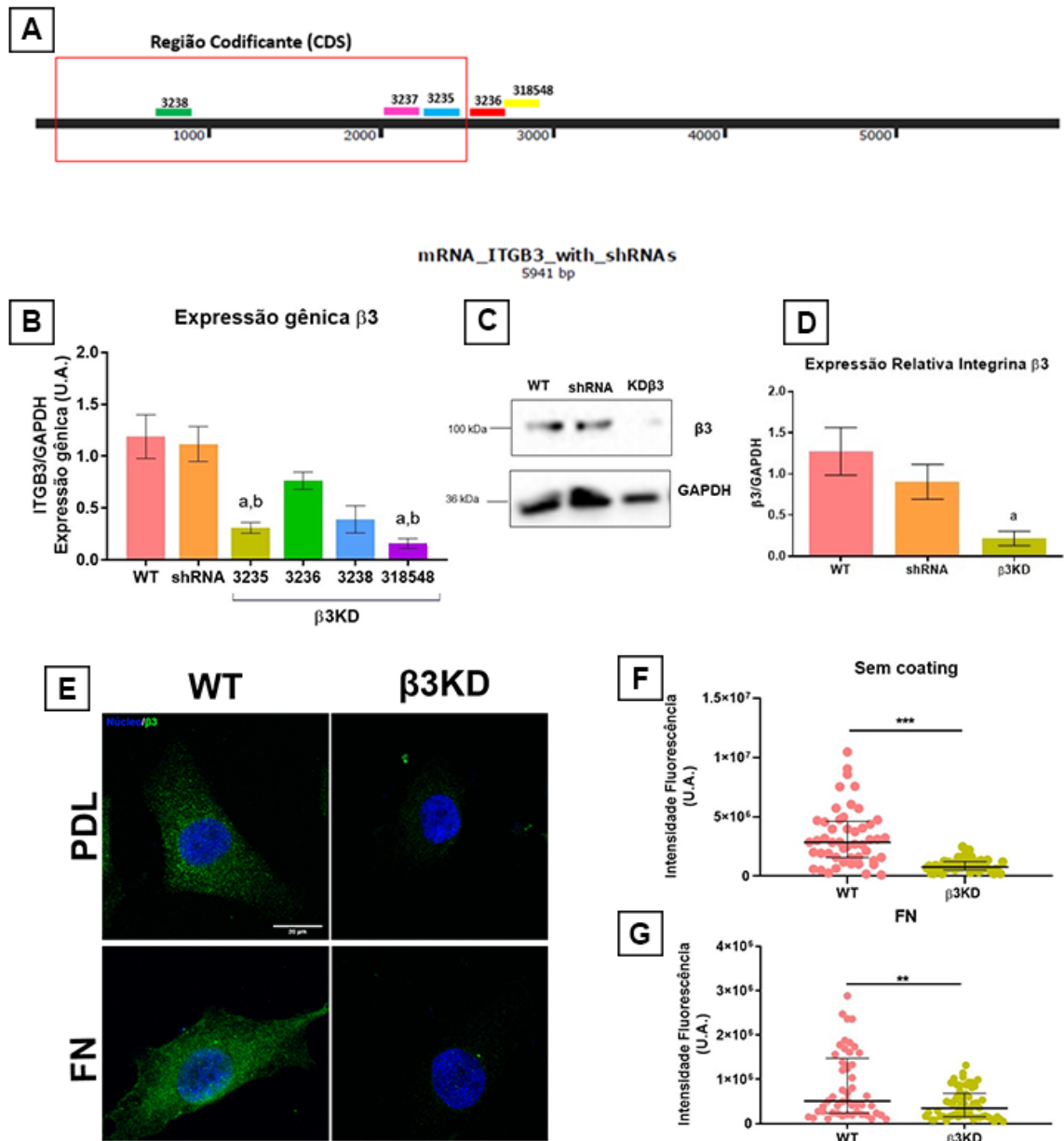
4 RESULTADOS

4.1 Validação do silenciamento da subunidade β3

Neste trabalho, geramos cinco tipos de lentivírus contendo o shRNA *ITGB3*, cada um idêntico a uma região do mRNA da proteína, com 100% de identidade (resíduos similares, ou *matches*), verificados por meio da ferramenta de alinhamento Blastn (Figura 10-A) seguindo o código de acesso referenciado do NCBI: NM_000212.3. Assim, três dos shRNAs possuem similaridade com a região codificante, que se inicia no 36° nucleotídeo estendendo-se até o 2.402. Os outros dois encontram-se na porção não codificante do mRNA.

A fim de verificar os efeitos do silenciamento sobre a expressão gênica da subunidade $\beta 3$ nas linhagens de MDA-MB 231 selvagem (WT), controle de transdução (shRNA control) e na *knockdown* ($\beta 3$ KD), realizamos RT-qPCR. A expressão do mRNA da proteína na linhagem controle (shRNA control) não sofreu alterações quando comparada a linhagem selvagem, garantindo assim que a maquinária de silenciamento não interferiu na síntese de $\beta 3$. Por outro lado, as linhagens silenciadas apresentaram uma porcentagem diferenciada de silenciamento: 69% para a $\beta 3$ KD 3235, 24% para a $\beta 3$ KD 3236, 61% para $\beta 3$ KD 3238 e 84% para $\beta 3$ KD 318548. Somente as linhagens 3235 e 318548 obtiveram redução com significância estatística ($p = 0,0002$) da quantidade de RNAm da integrina $\beta 3$ quando comparadas ao tipo selvagem e ao controle (Fig. 10-B). Devido a diferenças e manutenção do silenciamento, empregamos neste trabalho apenas uma das linhagens produzidas, sendo ela a denominada 3235.

Figura 10 - Validação do silenciamento a nível transcricional e proteico



A) Esquema do local de alinhamento dos shRNA's no mRNA da integrina $\beta 3$. A região codificante (CDS) se inicia no nucleotídeo 36 estendendo-se até o 2.402. **B)** Expressão relativa do RNAm da integrina $\beta 3$ em linhagens de MDA-MB 231. Estatística aplicada: One-Way ANOVA, *post test* Tukey, sendo "a" significativamente diferente a WT e "b" significativamente diferente a shRNA. Os dados estão representados como média com o desvio padrão da média. **C)** Foto da membrana mostrando a presença da integrina nos lisados das células MDA-MB-231 selvagem e shRNA, e ausência de bandas nas células silenciadas ($\beta 3$ KD 3235). **D)** Quantificação da intensidade das bandas de $\beta 3$ normalizada com a proteína constitutiva GAPDH. Valores de $p < 0,05$ foram considerados com significância estatística e analisados por meio de variância ANOVA utilizando-se o teste *One Way* com post-hoc de Tukey. Os dados estão representados como média com o desvio padrão da média. **E)** Imagens de microscopia confocal de células MDA-MB-231, linhagem selvagem (esquerda) e silenciada (direita), plaqueadas em coating de poli-D-lisina (acima) e fibronectina (abaixo). Imunomarcagem dos núcleos com DAPI (azul) e da integrina $\beta 3$

(verde), seguido da imagem combinada dos dois filtros. Barra de escala: 20 μm . **F**) Quantificação da integrina $\beta 3$ em condições sem coating ($p < 0,0001$) e **G**) semeadas em FN ($p = 0,0044$), por imunofluorescência. Estatística aplicada: Teste não paramétrico de Mann Whitney. Os dados estão representados como mediana com amplitude interquartil.

Ao analisar a expressão em nível de proteína por western blotting, verificamos redução da $\beta 3$ na linhagem silenciada, de cerca de 83% (Figura 10-C e D).

Além disso, o silenciamento da subunidade de integrina $\beta 3$ foi validado pela aquisição de imagens de imunofluorescência, por microscopia confocal (Figura 10-E). A linhagem silenciada MDA-MB-231 B3KD apresentou visualmente redução de fluorescência referente à integrina $\beta 3$, em comparação ao controle selvagem, em ambas as superfícies de adesão (poli-D-lisina e fibronectina). Ao quantificarmos as imagens, verificou-se redução de 72,2% da fluorescência da integrina nas células silenciadas em PDL, e em aproximadamente 49% em FN, confirmando os resultados obtidos anteriormente de redução importante da produção da integrina $\beta 3$.

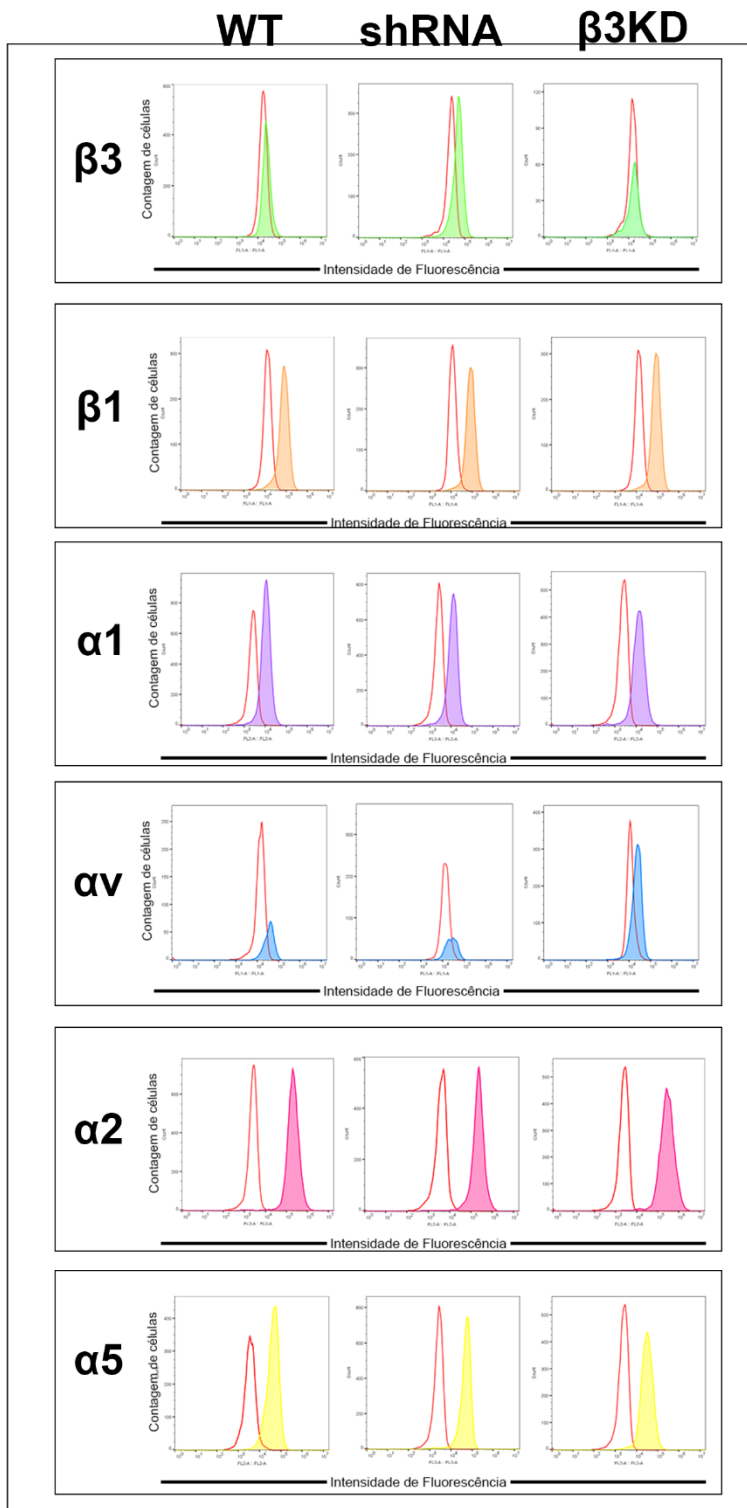
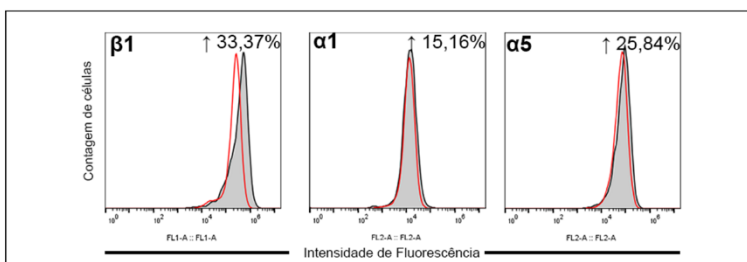
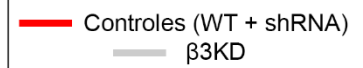
4.2 Citometria de Fluxo

Com o silenciamento da subunidade $\beta 3$, questionamos se esse procedimento afetaria a expressão de outras subunidades de integrina. Para tal, foi realizada a imunofenotipagem das principais subunidades de integrinas por citometria de fluxo.

A figura 11-A sumariza a média das porcentagens das subunidades de integrinas nas diferentes linhagens de MDA-MB-231, comparando as células não marcadas (histogramas vazados) e marcadas (histogramas pintados) para as subunidades $\beta 1$, $\alpha 1$, αv , $\alpha 2$ e $\alpha 5$. O descolamento dos picos dos histogramas para a direita indica a presença das subunidades testadas, sendo que a subunidade $\beta 1$, $\alpha 1$ e $\alpha 5$ mostraram uma porcentagem maior, indicando sua predominância (Figura 11-B). Com relação às três linhagens da MDA-MB-231 (WT, shRNA e $\beta 3\text{KD}$), as quantidades das subunidades mostraram-se semelhantes. As três células apresentaram expressão da subunidade $\alpha 1$ variando de 37% a 55%; já a $\alpha 2$ com cerca de 97%. A expressão da subunidade αv nas linhagens foram próximas a 40% e da subunidade $\alpha 5$ ficou aproximadamente 95% em todas as linhagens. Por fim, a subunidade $\beta 1$ foi de aproximadamente 90%.

Já quando comparamos as populações marcadas para as subunidades entre as diferentes linhagens celulares (β 3KD 3235, WT e shRNA) identificamos um aumento nas subunidades β 1 (33,37%), α 1 (15,16%) e α 5 (25,84%) indicado pelo deslocamento do gráfico cinza para a direita do gráfico vermelho na figura 11-B.

Figura 11 - Análise do perfil da expressão de algumas integrinas nas linhagens celulares MDA-MB 231

A**Legenda****B****Legenda**

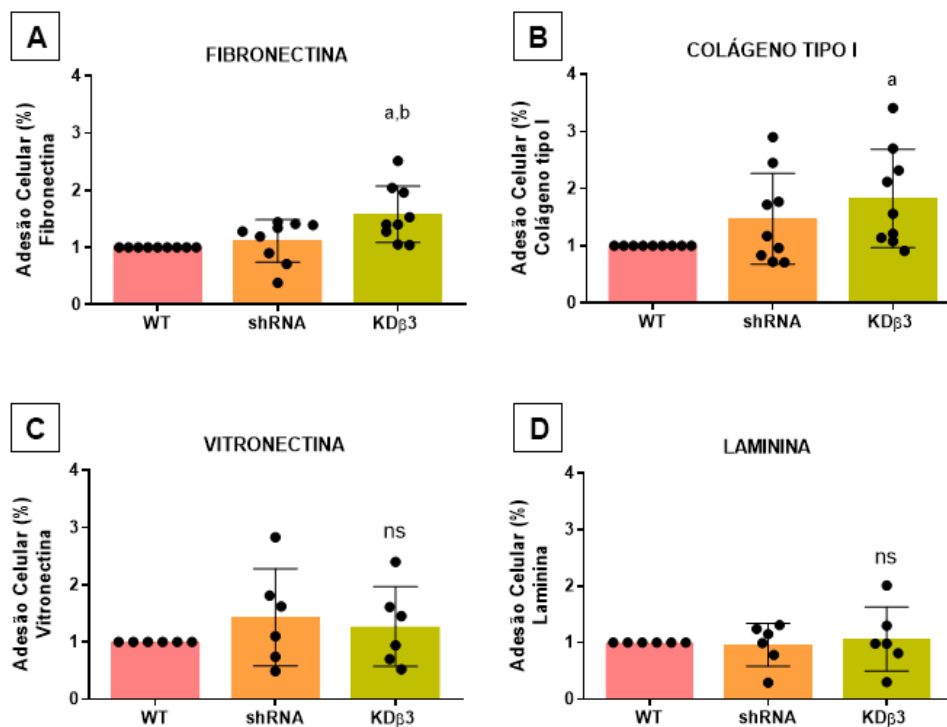
A) Histogramas das subunidades $\beta 3$ (verde), $\beta 1$ (laranja), $\alpha 1$ (roxo), αv (azul), $\alpha 2$ (rosa) e $\alpha 5$ (amarelo) com suas respectivas porcentagens em cada célula. A curva em vermelho representa o controle não marcado, para exclusão da autofluorescência celular. **B)** Histogramas para comparação da expressão entre as células silenciadas (curva em cinza) e os controles (selvagem e shRNA control – média representada pela curva vermelha). A média da porcentagem das diferenças entre as populações está indicada no canto superior direito de cada gráfico. Estatística aplicada: Overton % Positive (inserida na plataforma *Compare Populations* do software FlowJo), que calcula a porcentagem de eventos que são considerados como tendo fluorescência positiva para o parâmetro selecionado subtraindo a fluorescência dos controles.

4.3 Ensaio Funcionais

4.3.1 Inibição da Adesão

Buscando estudar a capacidade de adesão da linhagem silenciada a diferentes proteínas que compõem a MEC, células de três linhagens de MDA-MB-231 (WT, shRNA e $\beta 3$ KD 3235) foram testadas contra quatro componentes de MEC isolados: fibronectina, laminina, colágeno tipo I e vitronectina. A linhagem MDA-MB-231 KD $\beta 3$ 3235 apresentou maior adesão à fibronectina e ao colágeno do tipo I (Figura 12-A e B), com aumento médio de 58% e 83%, respectivamente. Por outro lado, não apresentou diferenças significativas na adesão à laminina (Figura 12-D). A célula silenciada também não apresentou diferenças estatísticas na adesão a vitronectina, principal ligante da integrina $\alpha v\beta 3$, sugerindo que a adesão celular a esse componente pode estar sendo auxiliada por outros fatores.

Figura 12 - Porcentagem de adesão celular a diferentes proteínas da MEC



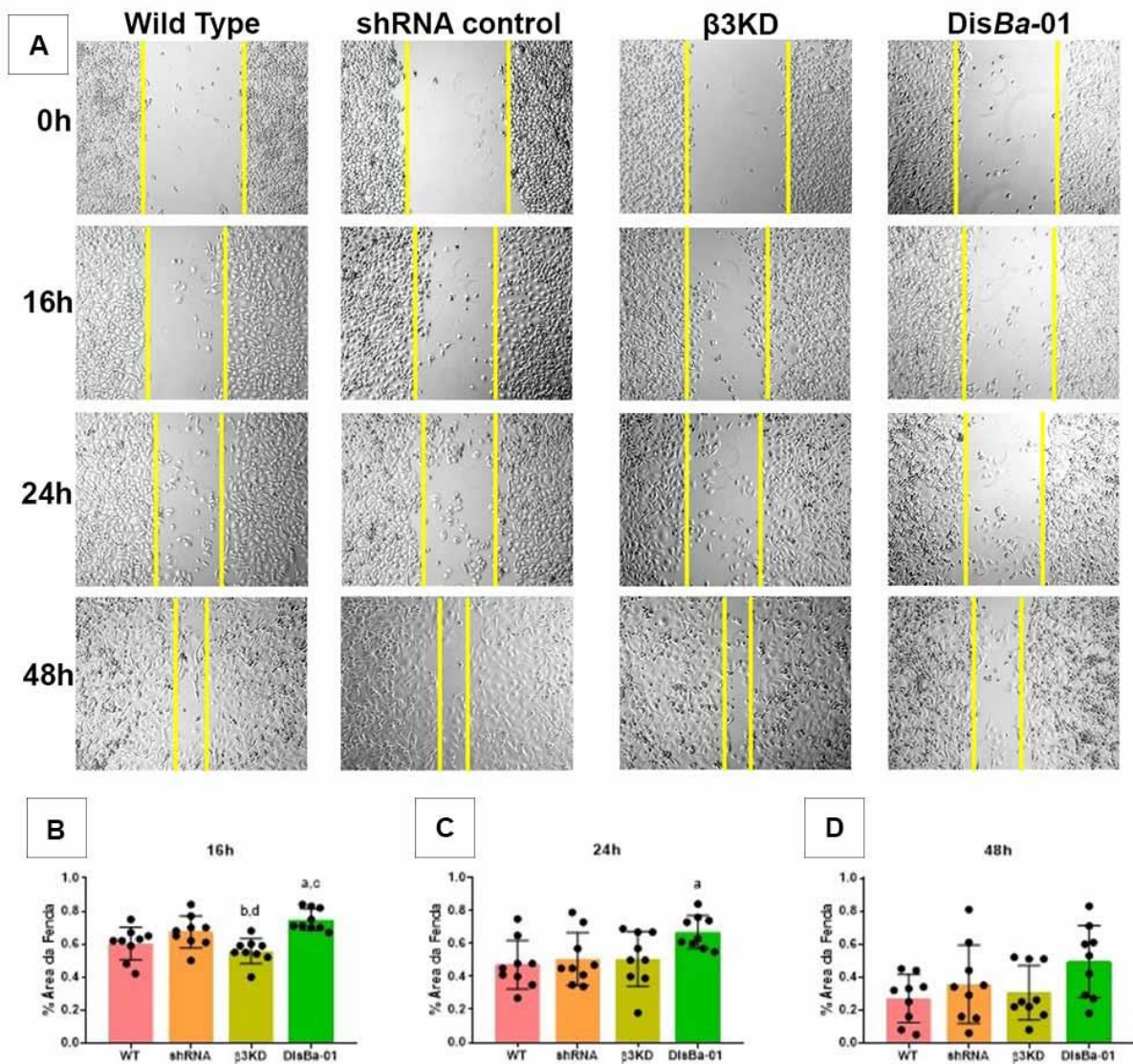
Gráficos indicando a porcentagem da adesão das células empregadas a proteínas da MEC, sendo elas (A) fibronectina e (B) ao colágeno do tipo I, (C) vitronectina e (D) laminina. Estatística aplicada: ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey, sendo “a” significativamente diferente a WT, “b” significativamente diferente a shRNA e “ns” sendo não significativo. Os dados estão representados como média com o desvio padrão da média.

4.3.2 Migração Celular

Investigamos o comportamento de motilidade celular por dois métodos distintos, a fim de averiguar os diferentes mecanismos de migração coletiva e de células individualizadas. A migração celular coletiva é um marco da invasão de células tumorais e metastáticas e foi avaliada por ensaio de *wound healing* (GRADA *et al.*, 2017).

Após 16h, a linhagem silenciada apresentou uma maior porcentagem de migração quando comparada ao controle de silenciamento (shRNA control) e ao tratamento com DisBa-01, nos tempos subsequentes esta linhagem não apresentou diferenças em relação ao controle. As células tratadas com DisBa-01 apresentaram efeito inverso, inibindo a migração celular em 16h e 24 h.

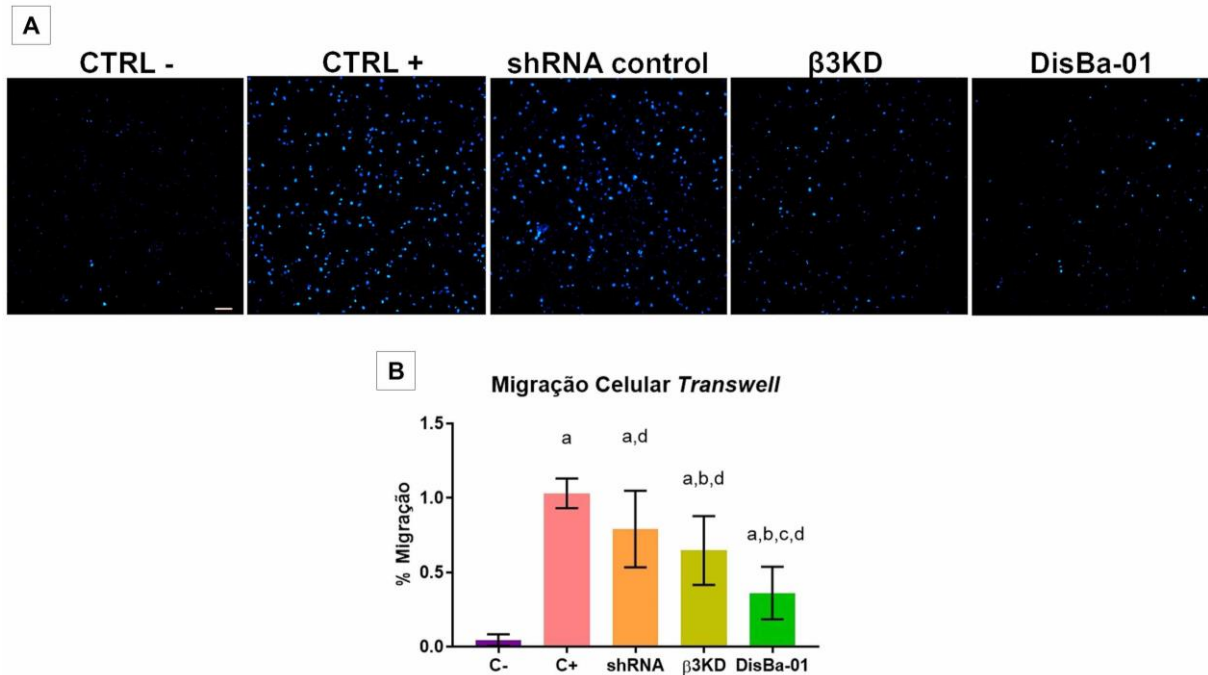
Figura 13 - Alterações na migração celular por *Wound Healing*, comparando as células silenciadas e células WT tratadas com o inibidor DisBa-01.



A) Imagens representativas do fechamento da ferida após 0h, 16h, 24h e 48h. As imagens foram adquiridas por microscopia de campo claro, na objetiva de 10x. Barra de escala de 200 μ M. A migração celular foi determinada pela área da fenda, considerando o momento 0h como 100% e os valores subsequentes como porcentagem da área inicial do risco. Quantificação da área da fenda após **B**) 16h; **C**) 24h; e **D**) 48h. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes quando comparados à linhagem selvagem, WT (a), ao controle de silenciamento shRNA control (b), à linhagem silenciada (c) e à linhagem selvagem tratada com DisBa-01 na concentração de 1000nM (e). Os dados estão representados como média \pm desvio padrão.

Ao avaliar a migração por quimiotaxia pelo ensaio *transwell* observamos uma redução da migração na linhagem silenciada, de 35,4% e 64% de inibição nas células tratadas com DisBa-01 (1000 nM) (Figura 14-A e B).

Figura 14 - Avaliação da migração celular *Transwell*.



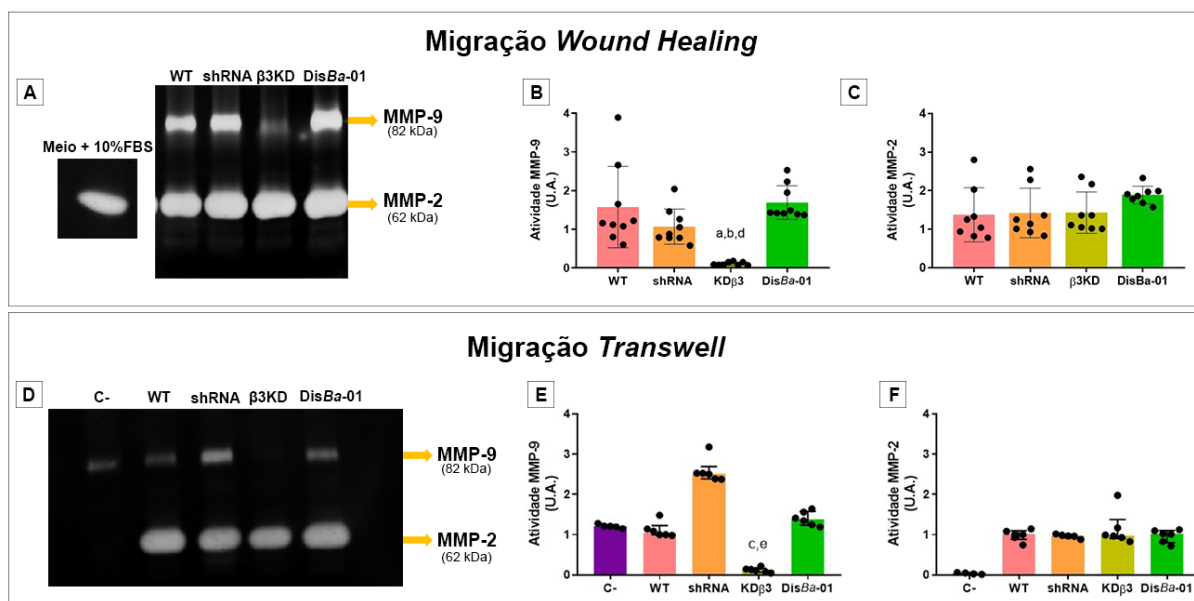
A) Imagens representativas de células MDA-MB-231 plaqueadas em câmara de Boyden para análise de migração celular. Como controles, células MDA-MB-231 WT foram plaqueadas em câmaras sem quimioatraentes (Ctrl -) e câmara com quimioatraentes (Ctrl +) no compartimento inferior. Células MDA-MB-231 da linhagem shRNA control e KDβ3 3235 foram comparadas com células da linhagem WT tratada com *DisBa-01* (1 μM), considerando-se o controle positivo como 100%. Barra de escala: 100 μm. **B)** Quantificação do índice de migração celular, obtido mediante normalização dos resultados obtidos da contagem global de núcleos de cada condição com os valores obtidos pelo controle positivo. Resultados estatisticamente relevantes ($p > 0.05$) quando comparados ao (a) controle negativo, (b) controle positivo, (c) shRNA control, (d) KDβ3. Dados apresentados nos gráficos como média ± desvio padrão.

4.4 Detecção da atividade de MMPs por Zimografia

As metaloproteases de matriz medeiam a migração e invasão das células, por meio da degradação e remodelamento da MEC, modificando o microambiente tumoral para a migração (BAUVOIS, 2012; DAS; *et al.*, 2017). Nesse sentido, avaliamos a atividade proteolítica dos meios condicionados oriundos dos experimentos de migração celular (*Wound Healing* e migração *Transwell*). Identificamos nos dois ensaios atividade de ambas as gelatinases de interesse: a gelatinase A, MMP-2, de 65 kDa e a B, MMP-9 de 82 kDa (BAUVOIS, 2012). A concentração de MMP-9 foi significativamente distinta em ambos os experimentos com a linhagem silenciada apresentando uma drástica redução na atividade desta

gelatinase (Figura 15 A-B e D-E). Por outro lado, o tratamento de *DisBa-01* (1000 nM) em células MDA-MB 231 WT gerou leve aumento na quantidade de MMP-9 (7%). A atividade de MMP-2 não foi alterada entre os grupos testados em ambas migrações.

Figura 15 - Detecção das MMPs gelatinases dos ensaios de migração celular



A) Zimograma representativo identificando atividade das gelatinases MMP-9 (92 kDa) e MMP-2 (72 kDa) do meio condicionado resultante do ensaio de migração celular por *Wound Healing*, bem como o meio de cultivo empregado. **(B-C)** Quantificação das bandas degradadas referentes à **(B)** MMP-9 e **(C)** MMP-2 no ensaio de *wound healing*. Dados apresentados como média \pm desvio padrão. **D)** Zimograma representativo identificando as mesmas gelatinases (MMP-9 e MMP-2) a partir do meio condicionado do ensaio de migração *Transwell*. **(E)** Quantificação das bandas degradadas relativos a MMP-9. Estatística aplicada: Kruskal-Wallis, pós teste de Dunn's. Os dados estão representados como mediana e intervalo interquartil. **(F)** Gráfico da quantificação das bandas degradadas pertinentes a MMP-2. Estatística: *One Way ANOVA*, com teste de múltiplas comparações de Tukey. Dados representados como média \pm desvio padrão. Resultados estatisticamente relevantes ($p < 0,05$) em comparação à linhagem controle (a), ao controle de silenciamento (b), e à linhagem selvagem tratada com *DisBa-01* (1000 nM).

5 DISCUSSÃO

Integrinas são proteínas de adesão e de sinalização celular, que conectam as células à MEC, nos chamados *integrin adhesion complexes* (IACs), os quais estão envolvidos em diversos processos fisiológicos como migração celular, remodelamento da matriz e

mecanosensibilidade (SLACK; *et al.*, 2021, MISHRA; MANAVATHI, 2021). A integrina $\alpha v\beta 3$, particularmente, tem uma função importante na progressão de tumores de mama, atuando no controle de motilidade e adesão à componentes de matriz. Visando evidenciar o papel dessa proteína em comportamentos celulares que promovem a metástase, no presente trabalho desenvolvemos com sucesso uma linhagem tumoral de mama triplo-negativa com silenciamento estável para a subunidade $\beta 3$ de integrinas.

Neste trabalho silenciamos a subunidade $\beta 3$ por meio da técnica de silenciamento com RNAi (*RNA interference*) ou silenciamento pós transcricional (HANNON, 2002) utilizando o sistema de lentivírus como o meio de entrega do transgene. O lentivírus utilizado, da família Retroviridae, permite que os shRNA sejam integrados ao genoma e gerados endogenamente pela maquinaria de transcrição da célula hospedeira (MANJUNATH *et al.*, 2009). Os shRNA estão sob controle do promotor U6 humano, que dirige a transcrição pela RNA polimerase III. Dessa forma, os shRNA transcritos são transportados para o citoplasma pela proteína exportina-5, e neste compartimento, são reconhecidos pela enzima DICER (uma nuclease que cliva moléculas de RNA dupla fita) que quebra o shRNA transformando-o em siRNA. Os siRNA (*small interfering RNA*) são reconhecidos pelo complexo de silenciamento induzido por RNA (Complexo RISC), formado por várias enzimas como a Argonauta (Argo), que se liga ao siRNA. Por similaridade, o complexo siRNA+Argo reconhece a região similar do seu mRNA alvo, levando a sua clivagem e degradação via complexo RISC (MANJUNATH *et al.*, 2009).

A redução na expressão da integrina $\beta 3$ foi constatada a níveis transcricional e proteico, por meio de três técnicas distintas: RTqPCR, western blotting e quantificação da integrina por fluorescência. Em paralelo, desenvolvemos um controle negativo de silenciamento que também desencadeia a ativação do complexo RISC, porém não degrada outros mRNA humano. Dessa forma, atribuímos os resultados obtidos nesse trabalho exclusivamente à redução da expressão da subunidade $\beta 3$. Trabalhos prévios em outras linhagens celulares com estratégias de *knockdown* distintas demonstraram o silenciamento efetivo e não-citotóxico da integrina $\beta 3$ (KOVACHEVA *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2016; PARVANI *et al.*, 2013). A checagem da viabilidade celular anteriormente a cada experimento mostrou que o silenciamento da integrina não foi tóxico para a linhagem. Um ponto importante a ser ressaltado é que não foi possível avaliar potenciais efeitos fora do alvo, ou *off-targets*,

potencialmente intrínsecos ao procedimento, como fenótipos indesejados (QIU, 2005; SEOK *et al.*, 2018)

O silenciamento de integrinas interfere diretamente na adesão celular, que consiste na capacidade de interações diretas entre células ou com a MEC, possibilitando a comunicação e regulação celular para a manutenção dos tecidos (KHALILI; AHMAD, 2015). Observamos que o silenciamento da subunidade $\beta 3$ levou ao aumento da adesão ao COL tipo I e FN, sem alterações em VN e LAM. Sugerimos que o aumento da adesão da linhagem silenciada à FN e COL I possa ser resultante da compensação de integrinas $\beta 1$, $\alpha 5$, considerando-se que a ligação ao colágeno se dá pela ligação a $\alpha 2\beta 1$ e a FN por ligação a $\alpha 5\beta 1$. Há estudos que demonstraram tal comportamento após silenciamento de alguma subunidade (PAN *et al.*, 2018). Parvani e colaboradores (2013) demonstraram que o silenciamento da subunidade $\beta 1$ leva à superexpressão de $\beta 3$ nas células tumorais de mama MDA-MB 231 (humanas e 4T1BM2 (camundongo). Além disso, Sarrazy, *et al.* (2014) demonstraram compensação entre as subunidades $\beta 3$ e $\beta 5$, sem alterar níveis de αv . Dessa forma, o aumento da adesão constatado neste estudo pode estar relacionado a associação da subunidade αv com outras subunidades β diferentes da $\beta 3$. Suspeitamos particularmente das integrinas que contenham as subunidades $\beta 1$ e αv , como as integrinas $\alpha v\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha v\beta 5$ e $\alpha v\beta 6$, que são receptores de fibronectina; e as integrinas $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 1\beta 1$, receptores de colágeno tipo I (BARCZYK; CARRACEDO; GULLBERG, 2010). Aqui, observamos o aumento das subunidades $\alpha 1$, $\alpha 5$ e $\beta 1$, sugerindo assim, a compensação destas integrinas na linhagem silenciada. Entretanto, estudos mais aprofundados serão necessários para comprovar esta compensação e sua influência nos resultados observados nos ensaios funcionais.

Além das integrinas, metaloproteases MMP-9 e MMP-2 são encontradas em níveis elevados no câncer de mama (BAUVOIS, 2012; LI *et al.*, 2017). Particularmente, a expressão de MMP-9 é maior nos subtipos basais ou triplo negativo, contribuindo para o seu desfecho clínico desfavorável (YOUSEF *et al.*, 2014). Neste estudo, verificamos uma tendência ao aumento de MMP-9 no tratamento com DisBa-01 (1000 nM). Estudos anteriores de nosso grupo com essa desintegrina também demonstraram aumento de MMP-9 em células tumorais de mama humano e murino (CASALI *et al.*, 2022; LINO *et al.*, 2019; MONTENEGRO *et al.*, 2012), corroborando nossos resultados. Além disso, os autores demonstraram que DisBa-01 diminui a expressão de MMP-2 nestas linhagens celulares, algo que não foi observado nos nossos ensaios.

Integrinas e MMPs se correlacionam ao promover a migração e invasão celular (DAS *et al.*, 2017). Rolli e colaboradores (2003) demonstraram a relação da integrina $\alpha\beta3$ com a MMP-9 na linhagem tumoral de mama MDA-MB-435 na promoção da migração celular. Os autores verificaram que a integrina ativa libera MMP-9 madura, e as células apresentam uma alta migração em fibrinogênio. Em contrapartida, ao gerarem uma variante de MDA-MB-435 com baixa expressão da subunidade $\beta3$, obtiveram ausência de produção da MMP-9 madura, com baixa capacidade de metastatizar e migrar em direção ao fibrinogênio (ROLLI *et al.*, 2003). Além disso, Carter e colaboradores (2015) também verificaram redução de MMP-9 após o silenciamento de $\beta3$ na linhagem tumoral de mama murino 4T1BM2 (CARTER *et al.*, 2015). Dessa forma, nosso trabalho é corroborado, visto que encontramos baixa atividade de MMP-9 na linhagem silenciada ($\beta3$ KD).

A migração celular é um marco da invasão de células tumorais e do surgimento de metástases, e depende diretamente da interação entre integrinas e a MEC (BUI *et al.*, 2019; GRADA *et al.*, 2017; HAMIDI; IVASKA, 2018). Nesse sentido, buscamos estudar o papel do silenciamento da $\beta3$ em duas formas de migração celular. No trabalho de Ray e colaboradores (2014), os autores demonstraram que a migração coletiva depende das integrinas $\alpha5\beta1$, $\alpha\beta3$ e $\alpha\beta5$, sendo que antagonistas de $\alpha\beta3$ e $\alpha\beta5$ aumentaram a migração na linhagem U87MG. Em contrapartida, o antagonista de $\alpha5\beta1$ reduziu a migração dessa linhagem tumoral (RAY *et al.*, 2014). Neste trabalho, não observamos diferenças na redução da migração celular coletiva, diferentemente de outros estudos (SESÉ *et al.*, 2017); dessa forma, sugerimos que o silenciamento da $\beta3$ provavelmente ativa outras integrinas, como as supracitadas, promovendo assim a migração. Em comparação, ao investigarmos a migração de células individualizadas por método *transwell*, verificamos redução da migração da linhagem silenciada, concordando assim, com trabalhos similares (REUFSTECK *et al.*, 2012). Cada integrina está envolvida com certas características no processo de migração celular, sendo que a integrina $\beta3$ é descrita estar relacionada a direcionalidade da migração (AYAMA-CANDEN *et al.*, 2022; MONTENEGRO *et al.*, 2017; MORGAN *et al.*, 2009). Isso justifica a redução observada na migração *transwell* das células $\beta3$ KD e não no *wound healing*, em que há predomínio da ação de outras integrinas.

Em alguns ensaios, utilizamos a desintegrina DisBa-01 como ferramenta de bloqueio da integrina $\alpha\beta3$, cujos efeitos no comportamento e sinalização celular já são bastante consolidados na literatura (ALTEI *et al.*, 2020; CASALI *et al.*, 2022; DANILUCCI *et al.*, 2019; LINO *et al.*, 2019; MONTENEGRO *et al.*, 2017). Aqui observamos respostas distintas no

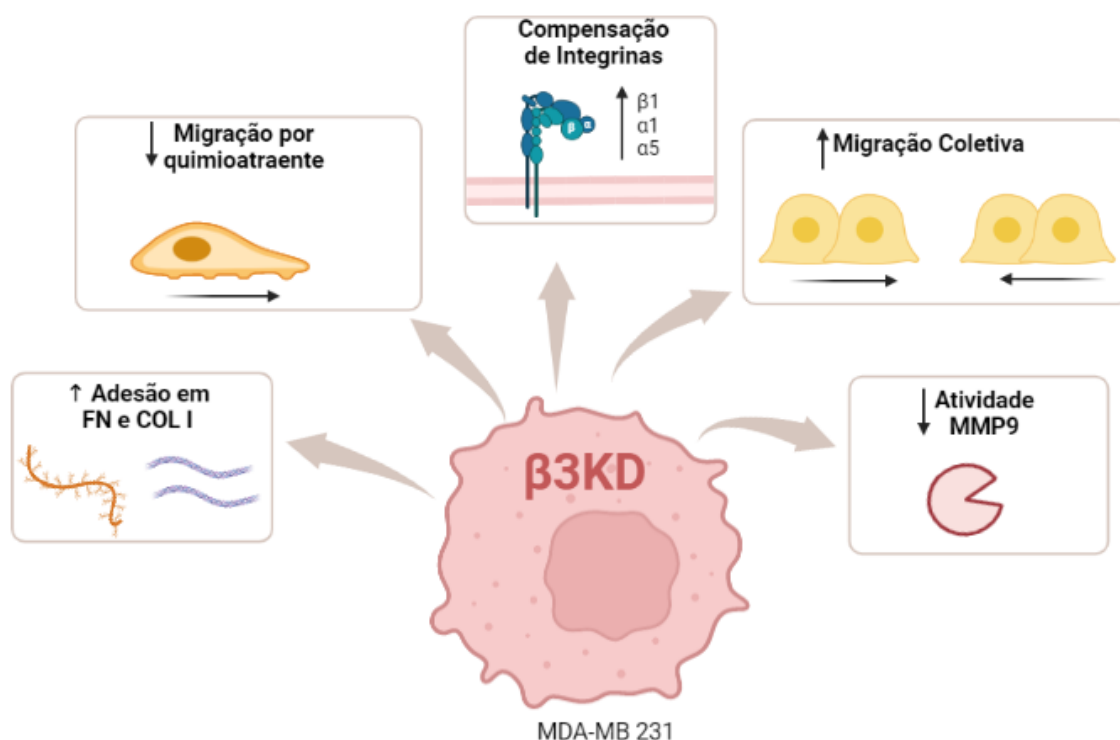
comportamento celular da integrina $\beta 3$ quando silenciada e bloqueada por DisBa-01. Uma possível explicação, é que, cada intervenção adotada neste trabalho, levou a célula a adotar uma reação diferenciada, gerando os resultados observados. No caso do silenciamento, a ausência de $\beta 3$ levou a célula a compensar com outras subunidades de integrinas, que assumiram o controle dos comportamentos analisados. Por outro lado, com a inatividade da integrina $\alpha v\beta 3$ devido ao seu bloqueio, vias de sinalização dependentes dela podem ter sofrido alterações, como FAK/SrC/Paxilina, ERK1/2 e PI3K, desencadeando os eventos significativamente inibitórios, como já bem estudado por nosso grupo (AKHTAR *et al.*, 2021; DANILUCCI *et al.*, 2019; LINO *et al.*, 2019).

Sabe-se que DisBa-01 possui afinidade às integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$, sendo 100x mais efetiva para ligação à $\alpha v\beta 3$ (MONTENEGRO *et al.*, 2017). Entretanto, essa seletividade pode ser perdida em altas concentrações, quando o excesso de proteína pode permitir sua interação com outros ligantes. Assim, os resultados obtidos com DisBa-01 (1000 nM) provavelmente devem-se ao bloqueio de outras integrinas que, em conjunto, geram uma resposta celular bastante significativa.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, pudemos confirmar o sucesso do silenciamento estável da subunidade $\beta 3$ de integrinas em uma linhagem humana triplo-negativa de tumor de mama, MDA-MB-231. A redução desta proteína levou a alterações no comportamento celular (Figura 16), dentre eles: aumento da adesão a componentes específicos da MEC e nos padrões de migração celular. Além disso, levou a uma drástica redução da atividade de MMP-9. Essas respostas verificadas são condizentes com o observado na literatura. Dessa forma, a geração dessa nova linhagem celular abre perspectivas de seu uso como ferramenta em estudos futuros da biologia básica do câncer de mama.

Figura 16 - Efeitos verificados após silenciamento o gene *ITGB3* em MDA-MB-231



Created in BioRender.com

O silenciamento parcial do gene *ITGB3*, que codifica a subunidade $\beta 3$ de integrinas afeta os comportamentos celulares de MDA-MB-231 aumentando a adesão a FN e COL I, bem como aumento da migração celular coletiva. Entretanto, houve diminuição da migração por quimioatratante e da atividade da MMP-9, fatores intimamente relacionados a $\beta 3$. Além disso, verificamos aumentando da expressão de algumas subunidades de integrinas (como

$\beta 1$, $\alpha 1$, $\alpha 2$) que podem estar envolvidas na alteração dos comportamentos celulares observados. Autoria própria, criado em BioRender.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIZADEH, Ali Mohammad; SHIRI, Sadaf; FARSINEJAD, Sadaf. Metastasis review: from bench to bedside. **Tumor Biology**, [s. l.], v. 35, n. 9, p. 8483–8523, 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s13277-014-2421-z>.

ALMEIDA, J.R. *et al.* Snake Venom Peptides and Low Mass Proteins: Molecular Tools and Therapeutic Agents. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 24, n. 30, 2017. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/146810/article>.

ALTEI, Wanessa F. *et al.* Inhibition of $\alpha v \beta 3$ integrin impairs adhesion and uptake of tumor-derived small extracellular vesicles. **Cell Communication and Signaling**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 158, 2020. Disponível em: <https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12964-020-00630-w>.

ALTEI, Wanessa F; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H S. Integrin Inhibition in the Tumor Microenvironment – more complex than expected. [s. l.], v. 3, n. 2, p. 1–6, 2018.

ARNETH, Borros. Tumor Microenvironment. **Medicina**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 15, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1648-9144/56/1/15>.

AYAMA-CANDEN, Sophie *et al.* IGDQ motogenic peptide gradient induces directional cell migration through integrin (αv) $\beta 3$ activation in MDA-MB-231 metastatic breast cancer cells. **Neoplasia**, [s. l.], v. 31, p. 100816, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1476558622000434>.

BAGHBAN, Roghayyeh *et al.* Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. **Cell Communication and Signaling**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 59, 2020. Disponível em: <https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12964-020-0530-4>.

BARCZYK, Malgorzata; CARRACEDO, Sergio; GULLBERG, Donald. Integrins. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], v. 339, n. 1, p. 269–280, 2010.

BAUVOIS, Brigitte. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: Outside-in signaling and relationship to tumor progression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, [s. l.], v. 1825, n. 1, p. 29–36, 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X11000497>.

BOYDEN, Stephen. THE CHEMOTACTIC EFFECT OF MIXTURES OF ANTIBODY AND ANTIGEN ON POLYMORPHONUCLEAR LEUCOCYTES. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 115, n. 3, p. 453–466, 1962. Disponível em: <https://rupress.org/jem/article/115/3/453/3038/THE-CHEMOTACTIC-EFFECT-OF-MIXTURES-OF-ANTIBODY-AND>.

BUI, Tung *et al.* Functional Redundancy between $\beta 1$ and $\beta 3$ Integrin in Activating the IR/Akt/mTORC1 Signaling Axis to Promote ErbB2-Driven Breast Cancer. **Cell Reports**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 589-602.e6, 2019. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124719311726>.

BURNETT, Riesa M. *et al.* Organ-specific adaptive signaling pathway activation in metastatic breast cancer cells. **Oncotarget**, [s. l.], v. 6, n. 14, p. 12682–12696, 2015. Disponível em: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.3707>.

CALVETE, Juan J. The continuing saga of snake venom disintegrins. **Toxicon**, [s. l.], v. 62, p. 40–49, 2013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010112007489>.

CASALI, Bruna C. *et al.* The Effects of $\alpha\beta 3$ Integrin Blockage in Breast Tumor and Endothelial Cells under Hypoxia In Vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 1745, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/3/1745>.

CHEN, Yu-Chi; SOSNOSKI, Donna M; MASTRO, Andrea M. Breast cancer metastasis to the bone: mechanisms of bone loss. **Breast Cancer Research**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 215, 2010. Disponível em: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2781>.

CHUNG, Jun *et al.* Hypoxia-Induced Vascular Endothelial Growth Factor Transcription and Protection from Apoptosis Are Dependent on $\alpha\beta 1$ Integrin in Breast Carcinoma Cells. **Cancer Research**, [s. l.], v. 64, n. 14, p. 4711–4716, 2004. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/64/14/4711/511483/Hypoxia-Induced-Vascular-Endothelial-Growth-Factor>.

COMINETTI, Márcia R; ALTEI, Wanessa F; SELISTRE-DE-ARAÚJO, Heloisa Sobreiro. Metastasis inhibition in breast cancer by targeting cancer cell extravasation. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, [s. l.], v. Volume 11, p. 165–178, 2019. Disponível em: <https://www.dovepress.com/metastasis-inhibition-in-breast-cancer-by-targeting-cancer-cell-extrav-peer-reviewed-article-BCTT>.

COOPER, Jonathan; GIANCOTTI, Filippo G. Integrin Signaling in Cancer: Mechanotransduction, Stemness, Epithelial Plasticity, and Therapeutic Resistance. **Cancer Cell**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 347–367, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610819300418>.

DANHIER, Fabienne; LE BRETON, Aude; PRÉAT, Véronique. RGD-Based Strategies To Target Alpha(v) Beta(3) Integrin in Cancer Therapy and Diagnosis. **Molecular Pharmaceutics**, [s. l.], v. 9, n. 11, p. 2961–2973, 2012. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/mp3002733>.

DANILUCCI, Taís M. *et al.* Recombinant RGD-disintegrin DisBa-01 blocks integrin $\alpha\beta 3$ and impairs VEGF signaling in endothelial cells. **Cell Communication and Signaling**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 27, 2019. Disponível em: <https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12964-019-0339-1>.

DAS, Alakesh *et al.* MMP proteolytic activity regulates cancer invasiveness by modulating integrins. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 14219, 2017. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-14340-w>.

DE PALMA, Michele; BIZIATO, Daniela; PETROVA, Tatiana V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 457–474, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrc.2017.51>.

DESGROSELLIER, Jay S.; CHERESH, David A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 9–22, 2010.

FOULKES, William D.; SMITH, Ian E.; REIS-FILHO, Jorge S. Triple-Negative Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 363, n. 20, p. 1938–1948, 2010. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1001389>.

GEIGER, Benjamin *et al.* Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 2, n. 11, p. 793–805, 2001. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/35099066>.

GERASHCHENKO, Tatiana S. *et al.* Markers of Cancer Cell Invasion: Are They Good Enough?. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 1092, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2077-0383/8/8/1092>.

GRADA, Ayman *et al.* Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 137, n. 2, p. e11–e16, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X16327622>.

HAMIDI, Hellyeh; IVASKA, Johanna. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. 533–548, 2018.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867411001279>.

HANNON, Gregory J. RNA interference. **Nature**, [s. l.], v. 418, n. 6894, p. 244–251, 2002. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/418244a>.

HOWARD, Frederick M.; OLOPADE, Olufunmilayo I. Epidemiology of Triple-Negative Breast Cancer. **The Cancer Journal**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 8–16, 2021. Disponível em: <https://journals.lww.com/10.1097/PPO.0000000000000500>.

INCA. **Câncer de mama**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>. .

JOYCE, Johanna A.; POLLARD, Jeffrey W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 239–252, 2009. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrc2618>.

KAUSKOT, Alexandre. Hemostatic effects of recombinant DisBa-01, a disintegrin from *Bothrops alternatus*. **Frontiers in Bioscience**, [s. l.], v. Volume, n. 13, p. 6604, 2008. Disponível em: <https://imrpess.com/journal/FBL/13/17/10.2741/3176>.

KHALILI, Amelia; AHMAD, Mohd. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 18149–18184, 2015. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/8/18149>.

KOVACHEVA, Marineta *et al.* Conditional knockdown of integrin beta-3 reveals its involvement in osteolytic and soft tissue lesions of breast cancer skeletal metastasis. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, [s. l.], v. 147, n. 2, p. 361–371, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s00432-020-03428-y>.

LEVENTAL, Kandice R. *et al.* Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. **Cell**, [s. l.], v. 139, n. 5, p. 891–906, 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867409013531>.

LI, WENTONG *et al.* Downregulation of $\beta 3$ integrin by miR-30a-5p modulates cell adhesion

and invasion by interrupting Erk/Ets-1 network in triple-negative breast cancer. **International Journal of Oncology**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 1155–1164, 2016. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2016.3319>.

LI, Hai *et al.* The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. **Oncology Letters**, [s. l.], 2017. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.6924>.

LINO, Rafael Luis Bressani *et al.* Alphavbeta3 integrin blocking inhibits apoptosis and induces autophagy in murine breast tumor cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1866, n. 12, p. 118536, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488919301491>.

MANJUNATH, N. *et al.* Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 61, n. 9, p. 732–745, 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X0900060X>.

MAS-MORUNO, Carlos; RECHENMACHER, Florian; KESSLER, Horst. Cilengitide: The First Anti-Angiogenic Small Molecule Drug Candidate. Design, Synthesis and Clinical Evaluation. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 753–768, 2011.

MONTENEGRO, Cyntia F. *et al.* Blocking $\alpha\beta 3$ integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. **Biochimie**, [s. l.], v. 94, n. 8, p. 1812–1820, 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030090841200168X>.

MONTENEGRO, Cyntia F. *et al.* Inhibition of $\alpha\beta 3$ integrin induces loss of cell directionality of oral squamous carcinoma cells (OSCC). **PLOS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. e0176226, 2017. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0176226>.

MORGAN, Mark R. *et al.* Giving off mixed signals-Distinct functions of $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha v \beta 3$ integrins in regulating cell behaviour. **IUBMB Life**, [s. l.], v. 61, n. 7, p. 731–738, 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/iub.200>.

NIEBERLER, Markus *et al.* Exploring the Role of RGD-Recognizing Integrins in Cancer. **Cancers**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 116, 2017. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2072-6694/9/9/116>.

NILAND, Stephan; EBLE, Johannes A. Hold on or Cut? Integrin- and MMP-Mediated Cell–Matrix Interactions in the Tumor Microenvironment. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 238, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/1/238>.

PAN, Boju *et al.* $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins in breast, prostate and pancreatic cancer: A novel implication (Review). **Oncology Letters**, [s. l.], 2018.

PARVANI, Jenny G. *et al.* Targeted inactivation of $\beta 1$ integrin induces $\beta 3$ integrin switching, which drives breast cancer metastasis by TGF- β . **Molecular Biology of the Cell**, [s. l.], v. 24, n. 21, p. 3449–3459, 2013.

PICKUP, Michael W; MOUW, Janna K; WEAVER, Valerie M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. **EMBO reports**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 1243–1253, 2014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/embr.201439246>.

PROVENZANO, Paolo P.; KEELY, Patricia J. The role of focal adhesion kinase in tumor

initiation and progression. **Cell Adhesion & Migration**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 347–350, 2009. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cam.3.4.9458>.

QIU, S. A computational study of off-target effects of RNA interference. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 1834–1847, 2005. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gki324>.

RAMOS, Oscar H. P. *et al.* A novel $\alpha\beta3$ -blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. **Clinical & Experimental Metastasis**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 53–64, 2008. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10585-007-9101-y>.

RAY, Anne-Marie *et al.* Single cell tracking assay reveals an opposite effect of selective small non-peptidic $\alpha5\beta1$ or $\alpha\beta3/\beta5$ integrin antagonists in U87MG glioma cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s. l.], v. 1840, n. 9, p. 2978–2987, 2014.

REUFSTECK, Christina *et al.* Silencing of skeletal metastasis-associated genes impairs migration of breast cancer cells and reduces osteolytic bone lesions. **Clinical and Experimental Metastasis**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 441–456, 2012.

ROLLI, Melanie *et al.* Activated integrin $\alpha\beta3$ cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 100, n. 16, p. 9482–9487, 2003. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1633689100>.

RUAN, Kai; SONG, Gang; OUYANG, Gaoliang. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 107, n. 6, p. 1053–1062, 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.22214>.

SCHINDELIN, Johannes *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 676–682, 2012. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nmeth.2019>.

SCODELLER, Pablo; ASCIUTTO, Eliana K. Targeting Tumors Using Peptides. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 808, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/4/808>.

SELISTRE-DE-ARAUJO, Heloisa S. *et al.* Snake Venom Disintegrins and Cell Migration. **Toxins**, [s. l.], v. 2, n. 11, p. 2606–2621, 2010. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2072-6651/2/11/2606>.

SESÉ, Marta *et al.* Hypoxia-mediated translational activation of *ITGB3* in breast cancer cells enhances TGF- β signaling and malignant features in vitro and in vivo. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 70, p. 114856–114876, 2017. Disponível em: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.23145>.

SHENOY, Santosh. Cell plasticity in cancer: A complex interplay of genetic, epigenetic mechanisms and tumor micro-environment. **Surgical Oncology**, [s. l.], v. 34, p. 154–162, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960740419306632>.

SOYSAL, Savas D.; TZANKOV, Alexandar; MUENST, Simone E. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. **Pathobiology**, [s. l.], v. 82, n. 3–4, p. 142–152, 2015. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/430499>.

SWITALA-JELEN, K *et al.* The biological functions of beta3 integrins. **Folia biologica**, [s. l.], v. 50, n. 5, p. 143–152, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15581065>.

TAHARA, Rie K. *et al.* Bone Metastasis of Breast Cancer. *In*: [S. l.: s. n.], 2019. p. 105–129. *E-book*. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-20301-6_7.

TANG, Yuan *et al.* Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 335–343, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1526820916301082>.

WEIGELT, Britta; PETERSE, Johannes L.; VAN'T VEER, Laura J. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 5, n. 8, p. 591–602, 2005. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrc1670>.

WELCH, Danny R.; HURST, Douglas R. Defining the Hallmarks of Metastasis. **Cancer Research**, [s. l.], v. 79, n. 12, p. 3011–3027, 2019. Disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-19-0458>.

WHITESIDE, T L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**, [s. l.], v. 27, n. 45, p. 5904–5912, 2008. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/onc2008271>.

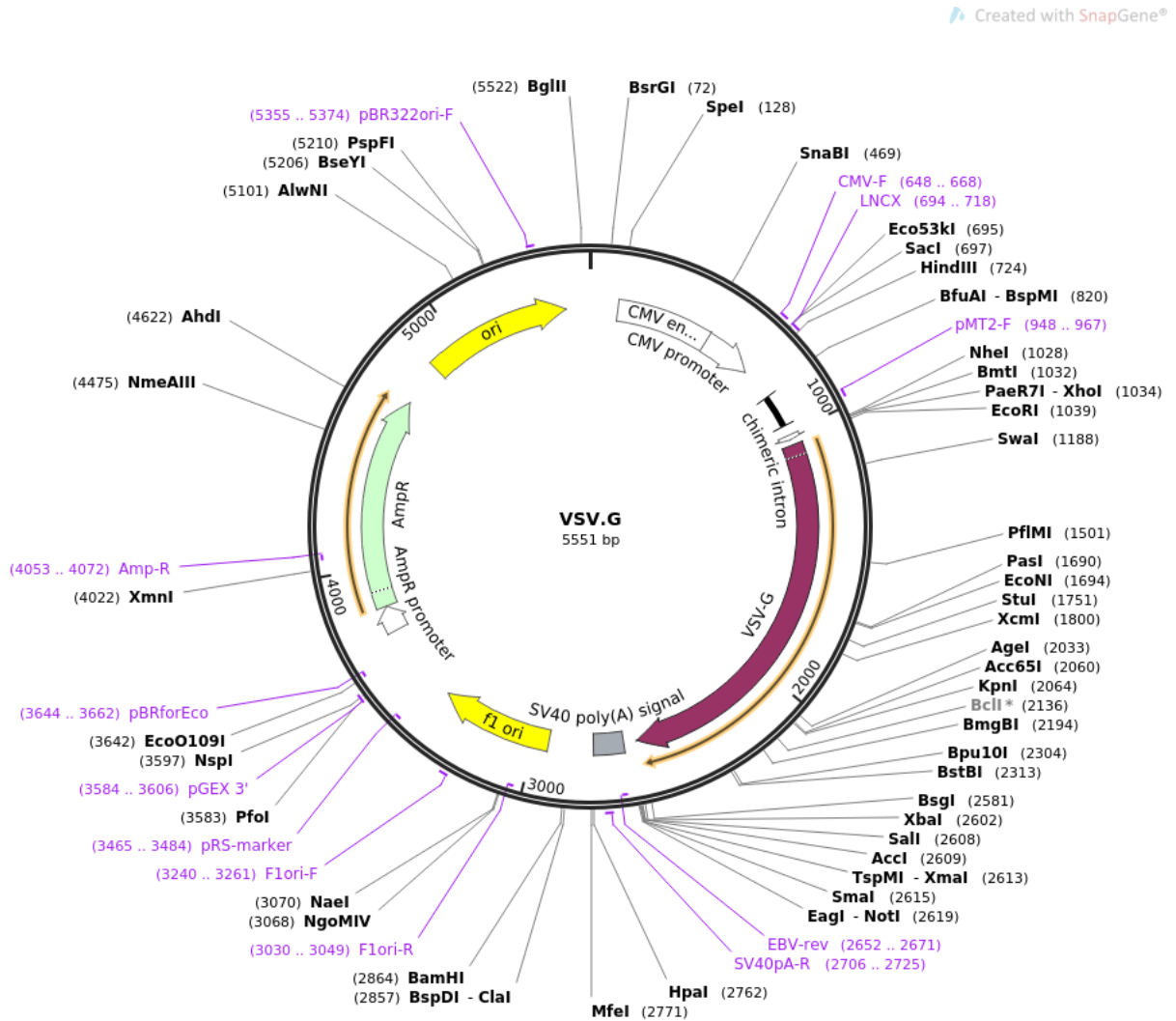
YIN, Li *et al.* Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Research**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 61, 2020. Disponível em: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-020-01296-5>.

YOUSEF, Einas M *et al.* MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 609, 2014. Disponível em: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-14-609>.

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1 – Mapa do vetor VSV-G

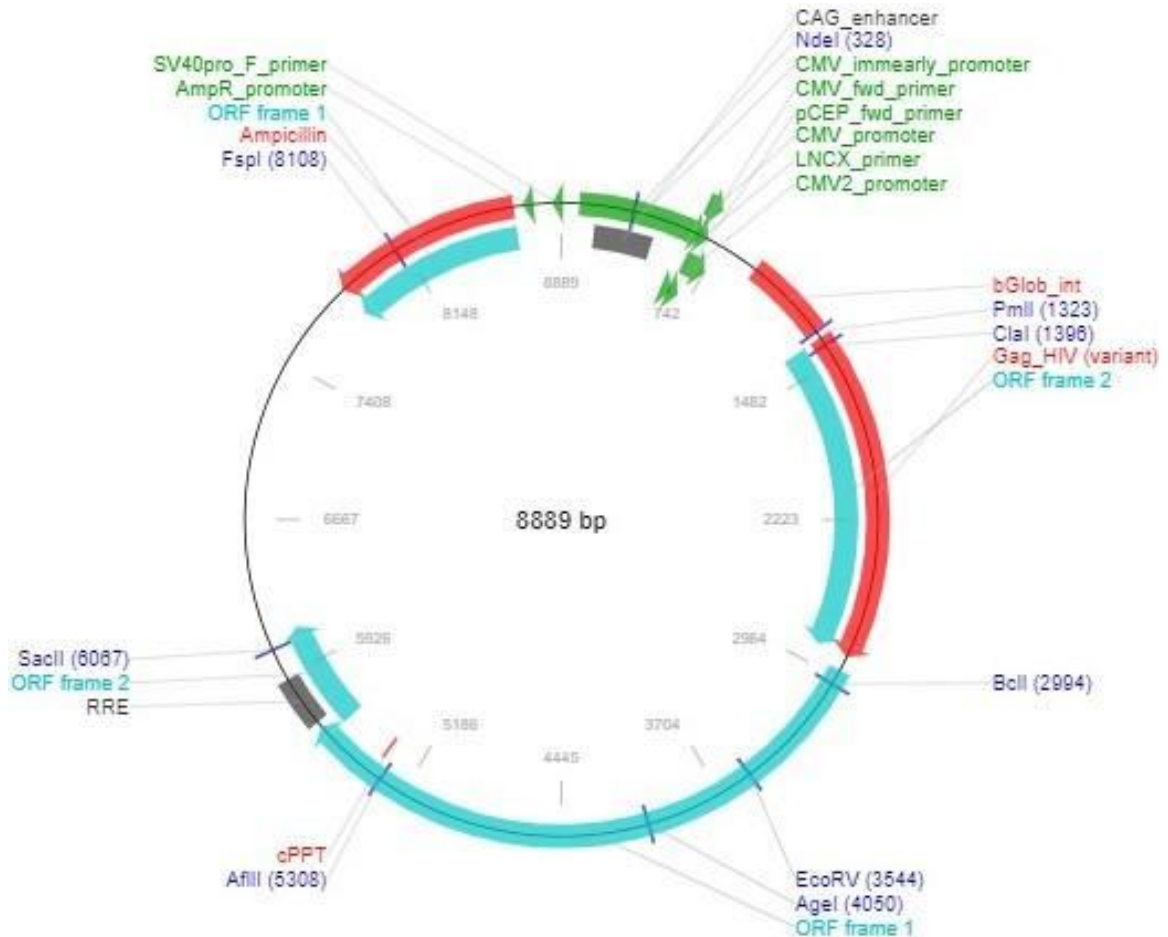
Figura 17 - Mapa do plasmídeo de envelope VSV-G



Mapa do vetor plasmidial de envelope VSV-G, de 5551 bp, contendo as regiões de ligação para enzimas de transcrição, genes de resistência a ampicilina para propagação em bactérias. O plasmídeo expressa a proteína G do vírus da estomatite vesicular (VSV-G) cuja região está representada em vermelho vinho, estando sob o promotor CMV (citomegalovírus humano). Fonte: REYA, *et al.*, 2003 e AddGene.

8.2 Anexo 2 - Mapa do vetor pLP1

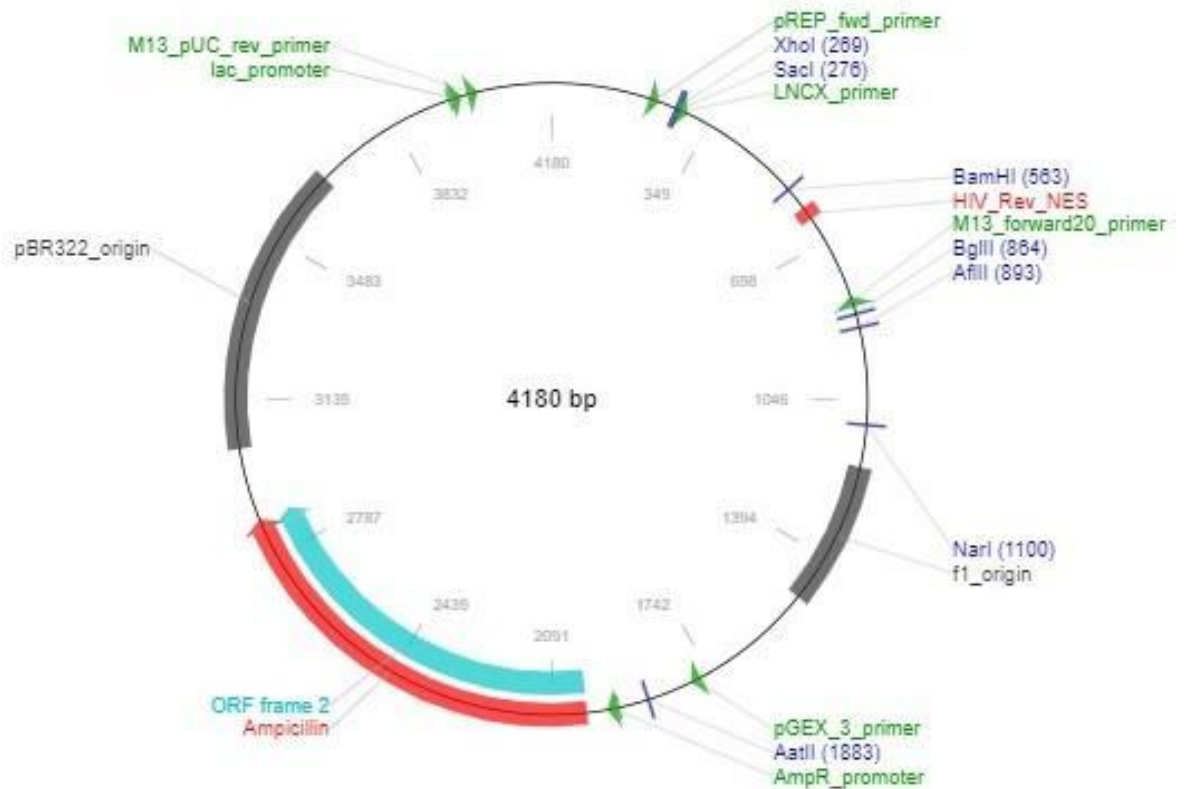
Figura 18 - Mapa do plasmídeo pLP1



Mapa do vetor plasmidial de embalagem, de 8889 bp, contendo as regiões de ligação para enzimas de transcrição, genes de resistência a ampicilina para propagação em bactérias. O vetor possui os genes virais de HIV-1 gag (proteínas essenciais para o capsídeo viral) e pol (expressa as enzimas essenciais para o vírus, como a transcriptase reversa (RT), integrase e uma protease específica viral) que não estão demonstradas na imagem. Fonte: AddGene.

8.3 Mapa do vetor pLP2

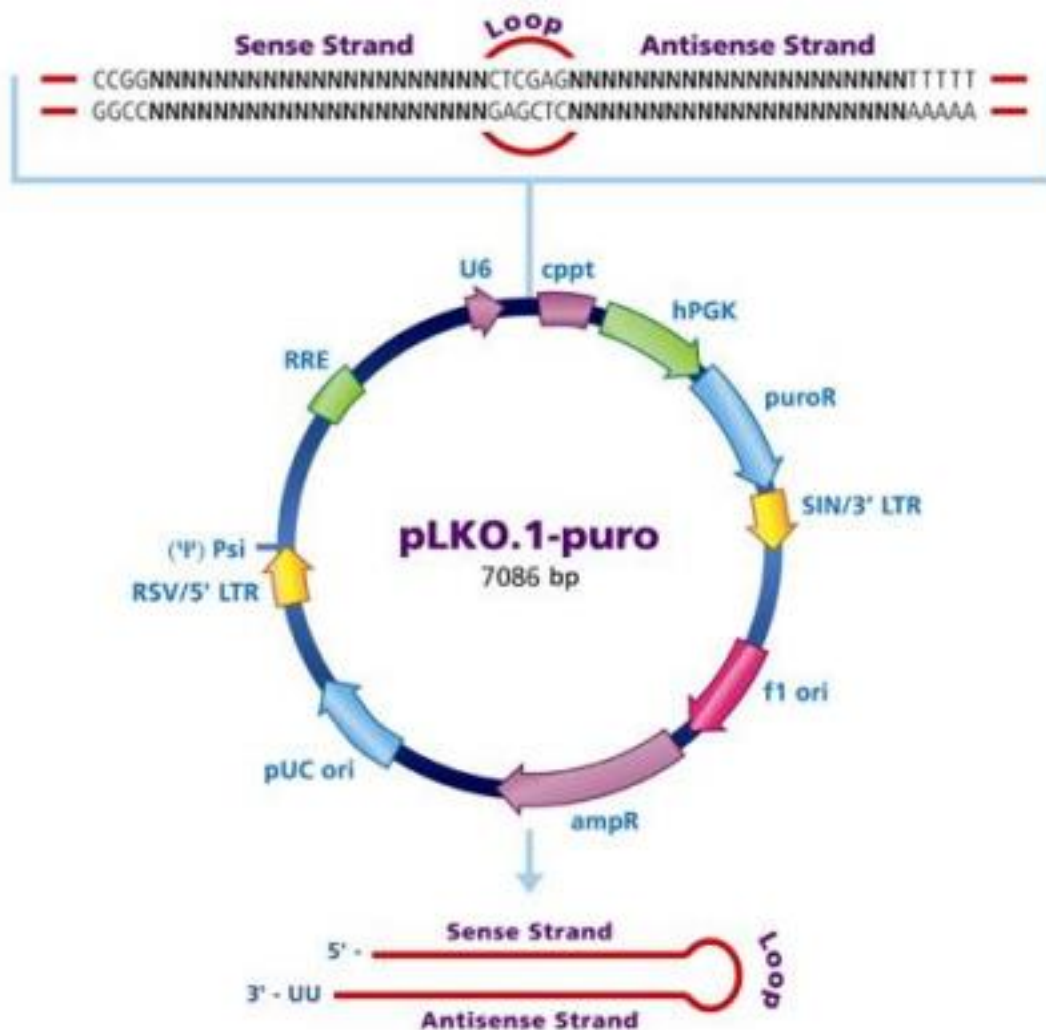
Figura 19 - Mapa do plasmídeo pLP2



Mapa do vetor plasmidial de empacotamento, de 4180 bp, contendo as regiões de ligação para enzimas de transcrição, gene de resistência a ampicilina para propagação em bactérias (região em vermelho). O plasmídeo expressa gene rev HIV-1 (não demonstrado). Fonte: AddGene.

8.4 Anexo 4 – Mapa dos vetores de transcrição do Sistema shRNA MISSION®

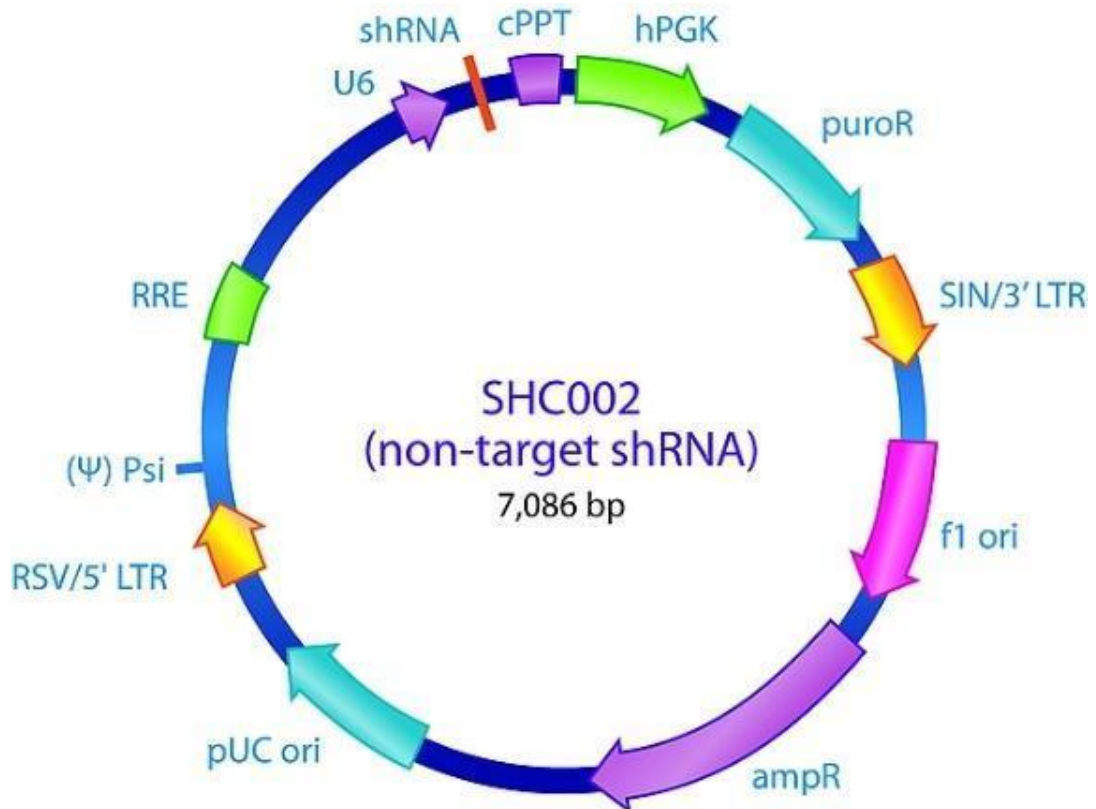
Figura 20 - Mapa dos plasmídeos de transfecção



Esquema geral dos plasmídeos de transfecção empregados neste trabalho, cujo esqueleto é do vetor pLKO.1. Na parte superior, está representada uma sequência qualquer demonstrando o local em que o gene de interesse está clonado, *downstream* ao promotor U6 humano. O plasmídeo também possui gene de resistência a puromicina (azul a direita) sob o promotor da fosfoglicerato quinase 1 (hPGK). Na região inferior da imagem, é demonstrado a estrutura de um shRNA gerado pelo plasmídeo, com o loop para posterior clivagem, e as fitas *sense* e *antisense* para reconhecimento do mRNA alvo. Fonte: Sigma-Aldrich.

8.5 Anexo 5 – Mapa do vetor de transfecção controle de silenciamento Sistema shRNA MISSION®

Figura 21 - Mapa do vetor de transfecção do controle de silenciamento



O vetor de transfecção para produção da linhagem controle de silenciamento (shRNA control) possui a mesma estrutura dos outros plasmídeos de transfecção, com o promotor U6 humano (em roxo na parte superior do plasmídeo), promotor hPGK (verde) e o gene de resistência puromicina (azul). Fonte: Sigma-Aldrich.