

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**ALINE MARIA MACHADO**

**SILENCIAMENTO DO GENE *ITGB3* DE CÉLULAS DE  
TUMOR DE MAMA MURINO TRIPLO NEGATIVO (4T1BM2)**

**SÃO CARLOS – SP**

**2022**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Aline Maria Machado

SILENCIAMENTO DO GENE *ITGB3* DE CÉLULAS DE TUMOR DE MAMA  
MURINO TRIPLO NEGATIVO (4T1BM2)

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado junto à Universidade Federal  
de São Carlos como requisito para a  
obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo

Co-orientadora: Dr.<sup>a</sup>. Wanessa Fernanda Altei

SÃO CARLOS - SP

2022

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, em especial aos meus pais Ana Lúcia e Dorival, pelo imenso carinho e apoio durante todos esses anos, por nunca terem medido esforços para me ajudar e por acreditarem no meu potencial.

Ao meu namorado Lucas que sempre me incentivou a estudar e me amparou nos inúmeros momentos em que pensei em desistir. Agradeço por sua companhia diária, pelas palavras de encorajamento e afeto.

Aos meus amigos da faculdade, em especial Gilberto, Juliana e Marcelo, e também aos amigos de fora dela, pelo companheirismo e pela troca de experiências ao longo de todos esses anos. Agradeço aos momentos de alegria e por sempre estarem do meu lado, torcendo por minhas conquistas.

Aos membros do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM), em especial à minha orientadora Heloísa, pela oportunidade de ingressar no grupo, por sua dedicação em me guiar e sua amizade. Obrigada Ana, Bete, Bianca Caruso, Bianca Pachane, Bruna, Grazielle, Kelli, Larissa, Patty e Wanessa por todo ensinamento cotidiano e vivências que muito contribuíram para meu crescimento.

Ao Dr. Normand Pouliot, integrante do *Matrix Microenvironment & Metastasis Laboratory, Olivia Newton - John Cancer Research Institute* de Melbourne na Austrália, por fornecer a linhagem celular 4T1BM2 para nosso grupo.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC) da Universidade Estadual de Campinas pela aquisição de imagens de microscopia de fluorescência confocal.

Ao CNPq por ter me concedido uma bolsa de iniciação científica para o desenvolvimento do meu trabalho. Pelo apoio das agências de fomento FAPESP e CAPES.

## RESUMO

O câncer de mama é o tipo de tumor mais recorrente no mundo, superando o de pulmão, segundo dados publicados em 2021 pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Quando ocorre o espalhamento ou invasão de células tumorais a tecidos próximos ou distantes são formados tumores secundários e esse processo é denominado metástase. A integrina  $\alpha\beta3$  são receptores heterodiméricos que conectam as células à matriz extracelular (MEC), são cruciais devido ao seu papel nas sinalizações que contribuem para a motilidade celular, proliferação e comportamento celular, sendo um alvo terapêutico de grande relevância. O presente trabalho teve como objetivo principal a produção de uma linhagem celular de câncer de mama murino (4T1BM2) silenciada para a integrina  $\alpha\beta3$  e a análise do efeito desse silenciamento. Para a obtenção deste silenciamento, foram empregados vetores lentivirais produzidos a partir de plasmídeos de envelope e empacotamento em conjunto com o plasmídeo que codifica a síntese de RNA de interferência, o qual tem como alvo parte do gene da subunidade  $\beta3$ , para serem utilizados na transfecção da linhagem celular embrionária de rim humano (293FT). As partículas virais foram transduzidas na célula tumoral e a seleção das células silenciadas foi realizada fazendo uso de antibiótico Puromicina. A verificação do silenciamento parcial da integrina  $\beta3$  foi obtida por meio de *western blotting* e citometria de fluxo, certificando diferentes níveis da integrina nas células parentais e silenciadas. Já a avaliação do comportamento celular foi efetivada por meio de ensaios funcionais de migração em câmara de Boyden e *wound healing*. Além disso, ensaios de zimografia foram realizados para comparar o conteúdo de metaloproteinases de matriz (MMPs) presentes nas células parentais e nas células silenciadas. Os resultados obtidos nesse trabalho indicam o alcance de um silenciamento para a subunidade  $\beta3$  e os ensaios funcionais demonstraram menor taxa de migração das células silenciadas, bem como a diminuição de MMP-9 e aumento de MMP-2 nessas células. Esses dados contribuem para melhorias nos procedimentos de *knockdown* para esse tipo celular e demonstram a complexa atuação das integrinas na progressão tumoral.

**Palavras-chave:** câncer de mama, metástase, silenciamento gênico, integrina  $\alpha\beta3$ , *ITGB3*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Características do câncer	1
Figura 2 - Representação dos componentes do microambiente tumoral	4
Figura 3 - Classificação das principais metaloproteinases de matriz	5
Figura 4 - Dinâmica e ativação das integrinas	7
Figura 5 - Representação tridimensional da proteína DisBa-01	8
Figura 6 - Produção e purificação de DisBa-01	19
Figura 7 - Western blotting	20
Figura 8 - Citometria de fluxo	21
Figura 9 - Ensaio de migração ( <i>wound healing</i> )	22
Figura 10 - Migração em câmara de Boyden	24
Figura 11 - Zimografia	25
Figura 12 - Alinhamento entre sequências de nucleotídeos de RNAm-alvo.	26

## LISTA DE ABREVIÇÕES

BCA	Ácido bicinconínico
BLAST	Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local
BSA	Soro albumina bovina
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DisBa-01	Desintegrina de <i>Bothrops alternatus</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
ERK	Quinases reguladas por estímulos extracelulares
FAK	Quinase de adesão focal
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil $\beta$ -d-1-tiogalactopiranósido
ITGB3	Gene que transcreve para a subunidade $\beta$ 3.
HER2	Receptor do fator de crescimento epitelial humano 2
HIF-1	Fator induzível por hipóxia 1
LB	Luria-Bertani
MAPK	Quinases ativadas por mitógenos
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase de matriz
PBS	Tampão fosfato-salino
PR	Progesterona
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TBS-T	Tampão tris salino com Tween-20
TGF	Fator de crescimento transformador
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFR2	Receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular
TEM	Transição epitelial-mesenquimal

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 CÂNCER E METÁSTASE	1
1.2 MICROAMBIENTE TUMORAL	3
1.3 MATRIZ EXTRACELULAR	4
1.4 METALOPROTEINASES DE MATRIZ	5
1.5 INTEGRINAS	6
1.6 DESINTEGRINAS	8
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>11</b>
3.1 PLAQUEAMENTO, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE DISBA-01	11
3.2 CULTIVO DAS CÉLULAS 4T1BM2	12
3.3 PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS LENTIVIRAIS	13
3.4 TRANSDUÇÃO DAS CÉLULAS-ALVO	13
3.5 LISE CELULAR PARA OBTENÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO	14
3.6 WESTERN BLOTTING	15
3.7 CITOMETRIA DE FLUXO	15
3.8 ENSAIO DE MIGRAÇÃO POR <i>WOUND HEALING</i>	16
3.9 ENSAIO DE MIGRAÇÃO EM CÂMARA DE BOYDEN	17
3.10 ZIMOGRAFIA	18
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>19</b>
4.1 PURIFICAÇÃO DA DESINTEGRINA DISBA-01	19
4.2 VALIDAÇÃO DO SILENCIAMENTO POR WESTERN BLOTTING	20
4.3 VALIDAÇÃO DO SILENCIAMENTO POR CITOMETRIA DE FLUXO	21
4.4 COMPARAÇÃO DA TAXA DE MIGRAÇÃO EM ENSAIO DE <i>WOUND HEALING</i>	22
4.5 COMPARAÇÃO DA TAXA DE MIGRAÇÃO EM ENSAIO DE MIGRAÇÃO EM CÂMARA DE BOYDEN	23
4.6 IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADE DE MMP-2 E MMP-9	24
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>28</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>29</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 CÂNCER E METÁSTASE

O câncer abrange um conjunto de doenças caracterizadas por apresentarem células com crescimento descontrolado levando à formação de tumores. Em tumores malignos, há o espalhamento ou invasão dessas células a tecidos próximos ou distantes, formando tumores secundários, em um processo denominado metástase (National Cancer Institute, 2021). A metástase ocorre devido a alterações nas características celulares, as quais são destacadas inicialmente por Hanahan e Weinberg na publicação de *The Hallmarks of Cancer* no ano de 2000, trabalho que serviu de base para *Defining the Hallmarks of Metastasis*, publicado por Welch e Hurst em 2019. Esses estudos apontam as capacidades adquiridas pelas células para que se convertam a um estado de anormalidade, direcionando a formação de tumores malignos. Em 2022 é lançado o *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*, o qual inclui novos marcos de conhecimento sobre câncer, como a reprogramação epigenética não mutacional, presença de microbiomas polimórficos e ação de células senescentes (Fig.1) (HANAHAN, D., 2022).

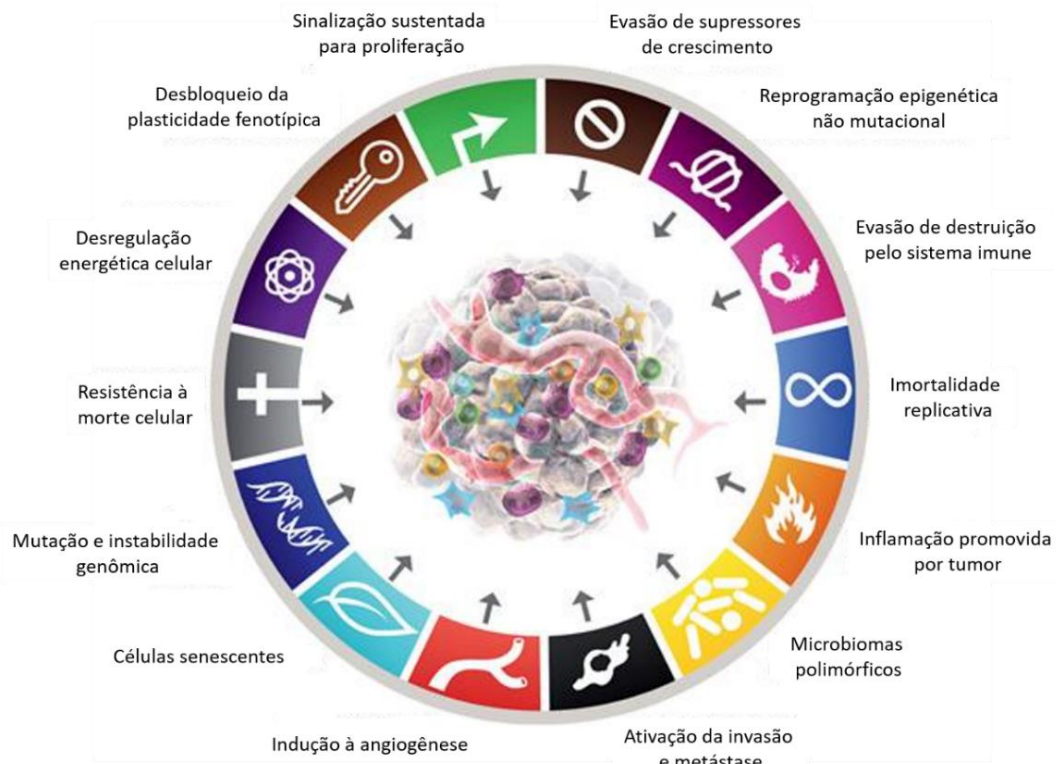




Figura 1 - Características do câncer. Adaptado de HANAHAN, D., *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*, 2022.

O câncer de mama é o tipo mais recorrente no mundo, superando o de pulmão, segundo dados publicados em 2021 pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Além disso, é o câncer mais diagnosticado em mulheres do mundo todo, sendo que em 2020 apresentou em torno de 2,3 milhões de novos casos registrados (IARC, 2020). Também representa a maior causa de morte entre mulheres e estima-se que até 2025 sejam registrados mais de 20 milhões de novos casos, principalmente em países de baixa e média renda. No Brasil, desconsiderando os tumores de pele do tipo não melanoma, o câncer de mama é o mais recorrente em indivíduos do sexo feminino e estima-se que entre os anos 2020 e 2022 surjam 66.280 novos casos de câncer de mama na população brasileira (INCA, 2022).

A cascata metastática é caracterizada pelas ocorrências de diferentes processos: *i*) transição epitélio-mesenquimal (TEM) de células tumorais; *ii*) migração e invasão da matriz extracelular; *iii*) intravasamento na vasculatura tumoral e sistêmica, sanguínea e linfática; *iv*) sobrevivência ao transporte na circulação, à força de cisalhamento e ao sistema imune. Além disso, requer o extravasamento no parênquima de órgãos distantes formando micrometástases para que ocorra a colonização do novo sítio e crescimento de macrometástases (MASSAGUÉ, J., OBENAUF, A.C., 2016).

O câncer de mama é uma doença heterogênea e pode ser dividida em subtipos com base na expressão de receptores de estrogênio (ER), receptores de progesterona (PR) e receptor do fator de crescimento epitelial humano 2 (HER2) pelas células tumorais (MCCARTHY A., FRIEBEL-KLINGNER, T., EHSAN, S. *et al.*, 2021). É classificada em 5 subtipos, sendo eles *i*) o luminal A, o qual é HER2 negativo e luminal B, que pode ser classificado em *ii*) HER2 positivo ou *iii*) HER2 negativo. Têm-se também o subtipo *iv*) HER2 positivo, o qual é ausente de ER e PR, e o *v*) tipo basal também denominado como triplo negativo, o qual é ausente dos receptores ER, PR e HER2 (BHATTACHARYYA, G. S. *et al.*, 2020).

O subtipo triplo negativo é assim denominado por não apresentar os três receptores e é considerado o mais agressivo por ser o mais recorrente em se tornar metastático (ZHU, Y. *et al.*, 2021). Esse câncer, quando caracterizado

como metastático, invade órgãos e tecidos preferenciais, como ossos, pulmões e cérebro (Breastcancer.org, 2021).

## 1.2 MICROAMBIENTE TUMORAL

O microambiente tumoral consiste em um ambiente dinâmico composto por um sistema físico-químico complexo, incluindo as células tumorais, a matriz extracelular (MEC) e componentes do tecido estromal, como as células imunes, citocinas, tecido vascular e fibroblastos. Esse microambiente é modificado pelas células tumorais, as quais se adaptaram às condições de deficiência de oxigênio, supressão de nutrientes e pH ácido, caracterizados por tumores sólidos (WEBER, C. E., KUO, P. C., 2012). Esse ambiente hipóxico é capaz de ativar fatores de transcrição, como o fator induzível por hipóxia 1 (HIF-1), o qual promove a transcrição de genes que alteram o metabolismo celular e permite a produção de energia pelas células por via fermentativa. Além disso, o HIF-1 ativa a expressão do fator de crescimento endotelial e vascular (VEGF), um dos principais indutores da angiogênese, caracterizada pela formação de vasos sanguíneos desorganizados, que são mais permeáveis e facilitam o intravasamento das células tumorais (BRAHIMI-HORN, M.C., BELLOT, G., POUYSSEGUR, J., 2011).

O dinamismo do microambiente tumoral é dado pela secreção de fatores de crescimento e interleucinas, como fator de crescimento transformador  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), VEGF, interleucina 1 (IL-1) e interleucina 8 (IL-8). Essas moléculas agem nas células mesenquimais fazendo com que secretem metaloproteinases de matriz (MMPs), as quais são capazes de degradar componentes da matriz extracelular, facilitando a invasão de células tumorais no sistema endotelial e vascular (Fig.2) (JOYCE, J., POLLARD, J., 2009).

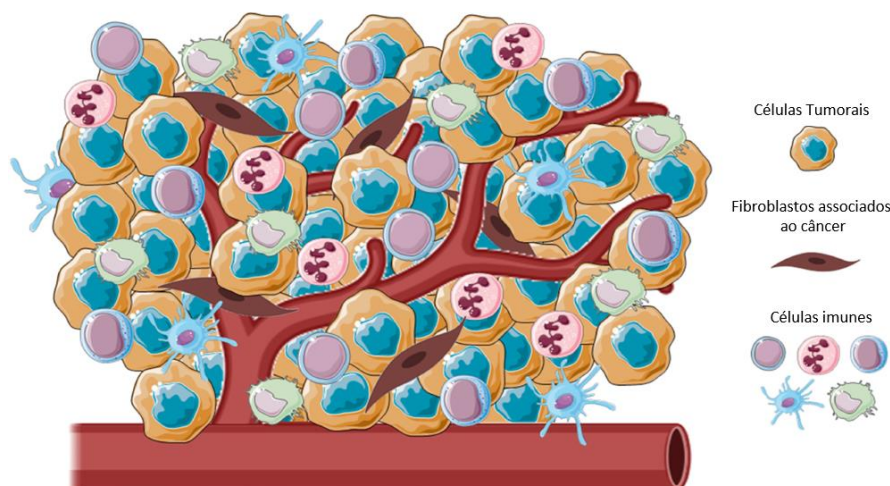


Figura 2 - Representação dos componentes do microambiente tumoral. Adaptada de POLIDORO, M. A., Tumor microenvironment in primary liver tumors: A challenging role of natural killer cells, 2020.

### 1.3 MATRIZ EXTRACELULAR

A matriz extracelular (MEC) consiste em uma complexa rede que fornece suporte bioquímico e estrutural às células circundantes, é responsável pela comunicação célula-célula, adesão celular e proliferação (FRANTZ C., STEWART K.M., WEAVER V.M, 2010). É composta essencialmente por água, minerais, proteoglicanos e proteínas fibrosas. Dentre essas proteínas, destacam-se alguns tipos de colágeno, elastina, fibronectina, vitronectina e laminina, que são secretadas pelas células residentes no tecido (BONNANS C., CHOU J., WERB Z., 2014).

A MEC é altamente dinâmica, sendo constantemente remodelada, depositada ou degradada durante o desenvolvimento tecidual, visando manter a homeostase. Para que ocorra esse dinamismo e a composição e organização sejam mantidas, a matriz extracelular é altamente regulada. Diante disso, a desregulação de sua dinâmica ocasiona o desenvolvimento de doenças, tais como o câncer (WALKER, C., MOJARES, E., DEL RÍO HERNÁNDEZ, A., 2018).

## 1.4 METALOPROTEINASES DE MATRIZ

As metaloproteínases de matriz (MMPs) são grupos de endopeptidases que clivam ligações peptídicas não terminais e necessitam de íons zinco ( $Zn^{2+}$ ) para desempenhar sua atividade enzimática (GONZALEZ-AVILA, G. *et al.*, 2019). Essas enzimas são capazes de degradar moléculas constituintes da membrana basal e da matriz extracelular e podem ser agrupadas de acordo com a organização de seus domínios estruturais e consequente atuação em substratos específicos. São classificadas como colagenases, matrilisinas, estromelisinas, transmembrana tipo I, gelatinases, entre outras (Fig. 3) (MURPHY, G., NAGASE, H., 2008).

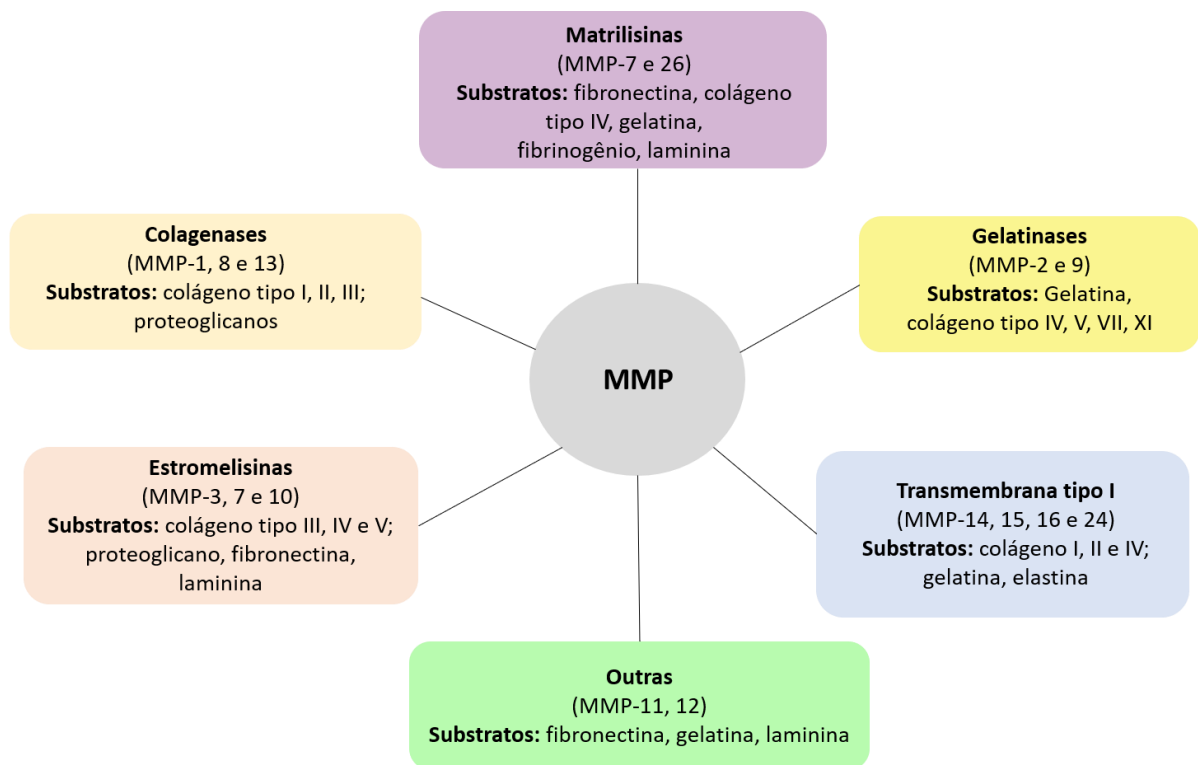


Figura 3 – Classificação das principais metaloproteínases de matriz. Subtipos de MMPs e seus principais substratos. Imagem de própria autoria com adaptação de BERG, G., MIKSZTOWICZ, V., SCHREIER, L. (2011).

As metaloproteínases de matriz denominadas MMP-2 e MMP-9 são exemplos de gelatinases e estão associadas à capacidade de degradar gelatina e colágeno tipo IV, o qual é predominantemente encontrado na lâmina

basal (DAS, S., AMIN, S. A., JHA, T., 2021). Devido a essas características, as MMP-2 e MMP-9 estão associadas à proliferação celular e favorecimento da metástase. Ainda, essas gelatinases são capazes de degradar outras proteínas depositadas na MEC (como colágeno tipo V, tipo VIII, tipo X, tipo XI e tipo XIV) e liberar fatores de crescimento que promovem a angiogênese tumoral (LARONA, H., CALDEIRA, J., 2020). A degradação do colágeno pelas MMPs expõe moléculas de sinalização embutidas na matriz extracelular, as quais se tornam ativas e capazes de se ligar a seus receptores-alvo. Uma dessas moléculas de sinalização é o TGF- $\beta$ , que após liberado é capaz de agir na modulação da proliferação celular, invasão e resposta imune (DERYUGINA E.I., QUIGLEY J.P., 2006).

## 1.5 INTEGRINAS

As integrinas são receptores de adesão transmembrana heterodiméricos formados pela associação de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , as quais permitem o reconhecimento, por meio de seu domínio extracelular, de uma ampla gama de ligantes pertencentes à MEC, tais como colágeno, laminina e fibronectina (HUMPHRIES, J. D.; BYRON, A.; HUMPHRIES, M. J., 2006). Além disso, seu domínio citoplasmático se conecta com filamentos de actina e permite o acoplamento com as sinalizações intracelulares (ALBERTS, B. *et al.*, 2017), evidenciando que as integrinas desempenham um papel de transdução bidirecional de sinais através da membrana plasmática (Fig.4) (MORSE, E. M., BRAHME, N. N., CALDERWOOD, D. A., 2014).

A interação entre os domínios citoplasmáticos das integrinas com ligantes intracelulares específicos pode induzir seu agrupamento e desencadear rearranjos conformacionais de seus domínios transmembranares e extracelulares, o que pode aumentar sua afinidade para determinados componentes do meio extracelular (CALDERWOOD, D. A., CAMPBELL, I. D., CRITCHLEY, D. R., 2013). Os sinais intracelulares, por sua vez, regulam a adesão celular através de alterações nos domínios extracelulares da integrina. De maneira análoga, a ligação extracelular de ligantes presentes na MEC também pode conduzir a mudanças nas interações do domínio citoplasmático. A ativação das integrinas promove seu agrupamento na base da membrana

plasmática e ocasiona cascatas de sinalização intracelulares. Dentre as sinalizações desencadeadas, tem-se a ativação de enzimas quinases, em especial a quinase de adesão focal (FAK), quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e quinases reguladas por estímulos extracelulares (ERK) (PROVENZANO, P. *et al.*, 2009). Nas células endoteliais, a ativação das integrinas está associada com a do eixo VEGF/VEGFR2 promovendo a modulação da angiogênese (COMOGLIO *et al.*, 2003; DANILUCCI *et al.*, 2019). Devido à influência exercida em diversas vias de sinalização, as integrinas estão envolvidas em processos biológicos moduladores do comportamento celular, como proliferação, migração e manutenção das funções específicas de diferenciação celular (FERRAZ, F.B., FERNANDEZ, J.H., 2014).

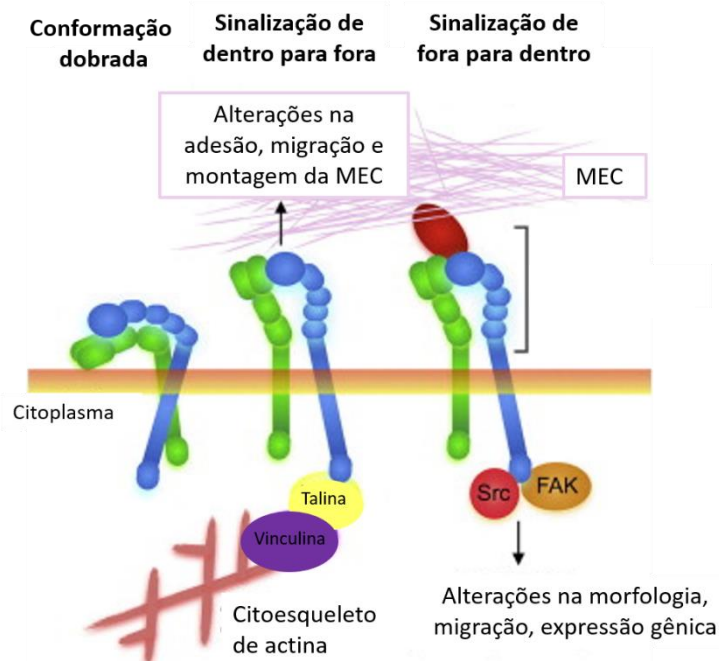


Figura 4 - Dinâmica e ativação das integrinas. Adaptado de LAPOINTE, V. L. S., DE BOER, J., ENGLER, A. J., 2014.

A integrina  $\alpha\beta_3$  exerce funções biológicas que ocasionam mudanças no comportamento de células tumorais e no microambiente tumoral, devido à ativação de grande variedade de vias de sinalização (LEY, K. *et al.*, 2016). Essa integrina reconhece o motivo RGD (Arginina, Glicina, Ácido Aspártico) em proteínas presentes na MEC, como a vitronectina e fibronectina. Além disso, esses heterodímeros podem regular a montagem da MEC e polarização de células em movimento, mediando a metástase e infiltração de tecidos distantes

(SHATTIL, S. J., KIM, C., GINSBERG, M. H., 2010). O gene *ITGB3*, responsável por codificar a subunidade  $\beta 3$ , tem sua expressão e ativação facilitada em ambientes hipóxicos e ácidos, que são característicos dos tecidos tumorais. Ademais, durante a transição epitelial-mesenquimal induzida por TGF- $\beta$ , o gene *ITGB3* é regulado de maneira positiva, aprimorando a invasão e migração (ZHU, C. *et al*, 2019).

## 1.6 DESINTEGRINAS

Algumas toxinas provenientes de veneno de serpentes são capazes de inibir potencialmente a ação de integrinas. As desintegrinas são uma família de peptídeos ricos em cisteína de baixo peso molecular e que usualmente são derivadas do processamento proteolítico de metaloproteases presentes em veneno de serpente (Snake Venom Metalloproteinases - SVMPs). Elas são classificadas em quatro tipos (P-I, P-II, P-III, P-IV) (MCLANE, M. A., *et al.*, 2004). As desintegrinas com motivo RGD são derivadas da classe P-IIa. (SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. *et al.*, 2010).

A proteína recombinante DisBa-01 (*Desintegrin of Bothrops alternatus-01*) (GenBank, acesso: AY259516), caracterizada por nosso grupo no trabalho de RAMOS *et al* (2008), é uma desintegrina com motivo RGD conservado e é proveniente do veneno de *Bothrops alternatus*, a qual possui alta afinidade pela integrina  $\alpha v \beta 3$ . Exibe propriedades antiangiogências, antimetastáticas e antitrombóticas quando aplicada em experimentos *in vivo* (RAMOS *et al.*, 2008). Em experimentos *in vitro*, DisBa-01 inibe a proliferação e migração celular (CASALI *et al.*, 2022).

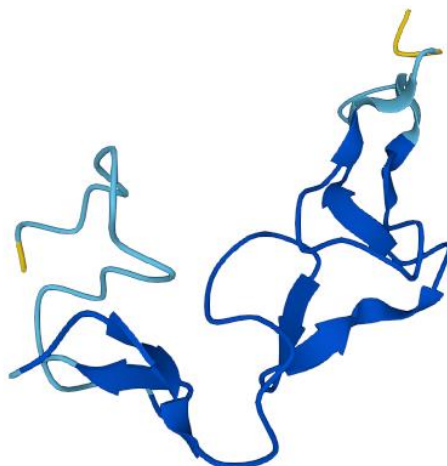


Figura 5 - Representação tridimensional da proteína DisBa-01. A imagem permite a verificação do dobramento da molécula, bem como a composição de sua estrutura secundária. Fonte: RCSB PDB, acesso: AF\_AFQ801Z4F1.

Estudos anteriores em nosso laboratório atingiram com sucesso o silenciamento da subunidade  $\beta 3$  para a linhagem de tumor de mama triplo-negativo humana (MDA-MB-231), mas sua aplicação em modelos experimentais *in vivo* necessita do uso de animais atímicos, os quais possuem resposta imunológica suprimida pela deficiência de linfócitos T, devido ausência de timo. A aquisição destes animais frágeis é custosa e requer uma infraestrutura específica nos laboratórios para poder abrigá-los. Sendo assim, buscou-se a produção de uma linhagem de tumor de mama triplo negativo murino (4T1BM2) silenciada para a integrina  $\beta 3$ .



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Produção de linhagem celular murina de câncer de mama triplo negativo (4T1BM2) silenciada para o gene *ITGB3* visando o uso dessas células em futuros ensaios *in vivo* em camundongos para o estabelecimento de um modelo metastático singênico, possibilitando a ampliação do conhecimento sobre a complexidade da atuação da integrina  $\alpha\beta3$ .

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Produzir uma linhagem celular murina de câncer de mama triplo negativo (4T1BM2) silenciada para o gene *ITGB3* que codifica para a integrina  $\beta3$ .
2. Caracterizar a linhagem silenciada por *western blotting* e citometria de fluxo.
3. Comparar a atuação das células parentais e silenciadas por meio da execução de ensaios funcionais de migração e identificar a presença e atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs).
4. Comparar o efeito do silenciamento das células 4T1BM2 utilizando a desintegrina DisBa-01, bloqueadora da atividade da integrina  $\alpha\beta3$ .

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 PLAQUEAMENTO, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE DISBA-01

A cepa de *Escherichia Coli* BL21 (DE3)-pDisBa-01, proveniente do estoque mantido em glicerol (-80 °C) cuja transformação ocorreu em outubro de 2016 com o plasmídeo pET28a-DisBa-01, foi plaqueada por estria de esgotamento em placa de Petri (KASVI, K30-9051) contendo meio LB Ágar (SIGMA, 41K0137) e antibiótico canamicina (30 mg/mL) (SIGMA-ALDRICH, 104K0663). As bactérias foram mantidas em estufa (FANEM, Modelo 002 CB) para crescimento durante 18 h a 37 °C. Escolheu-se uma colônia para a realização do pré-inóculo em 25 mL de meio LB *Broth* acrescido de canamicina (30 mg/mL), o qual foi mantido a 250 rpm por cerca de 16 h a 37 °C em incubadora refrigerada com agitação (TECNAL, TE 4-22). Sucedeu-se com o crescimento bacteriano aplicando o pré-inóculo em 2 L de meio LB *Broth* contendo kanamicina (30 mg/mL) mantido em agitação até atingir a D.O. <sub>660nm</sub> entre 0,4 e 0,6 (Pharmacia Biotech, Ultrospec 2000). Nesse momento a alíquota T<sub>0</sub> foi coletada para análise posterior em gel de SDS-PAGE 15%.

A expressão da proteína recombinante DisBa-01 foi induzida com a adição de 0,5 nM de IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) por 3 h em 100 rpm a 37 °C, após a alíquota T<sub>3</sub> foi retirada e armazenada. A cultura bacteriana foi centrifugada a 4200 g por 7 minutos a 4°C (Sorvall® RC5C Plus, Kendro Laboratory Products, rotor GSA) e o pellet gerado foi homogeneizado em tampão de ligação (5 mM Imidazol, 0,5 M NaCl, 40 mM Tris; pH 7,9). Para a lise bacteriana e extração do conteúdo citoplasmático, a amostra foi submetida a 8 pulsos sônicos com duração de 1 minuto, com intervalo de 30 segundos entre cada pulso (Vibra cell, Sonics and Materials). O conteúdo lisado foi centrifugado por 15 minutos, 27500 g a 4 °C (Sorvall® RC5C Plus, Kendro Laboratory Products, rotor SS-34) e a alíquota denominada S<sub>1</sub> foi coletada. A amostra foi ressuspendida em tampão de ligação (40 mM Tris, 0,5 M NaCl, 6 M ureia e 5 mM imidazol; pH 7,9) acrescido de ureia 6 M e posteriormente centrifugada a 27500 g por 15 minutos a 4°C (Sorvall® RC5C Plus, Kendro

*Laboratory Products*, rotor SS-34). O sobrenadante foi filtrado e armazenado, e dele foi retirado a alíquota S<sub>2</sub>.

A primeira etapa de purificação foi efetuada com a cromatografia por afinidade à Níquel (HIS-Select® Nickel Affinity Gel, *Sigma-Aldrich*®), que foi iniciada pela aplicação do tampão de ligação seguida da aplicação do tampão de lavagem (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,3 M NaCl, 10 mM imidazol, 6 M ureia; pH 7,4). A eluição do conteúdo proteico presente na coluna ocorreu após aplicação de tampão de eluição (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,3 M NaCl, 250 mM imidazol, 6 M ureia; pH 7,4). As amostras contendo a proteína de interesse foram dialisadas em membrana de nitrocelulose (*Spectra/Por*® Membrane MW: 6-8,000; *Spectrum Labs*, *Repligen*) em tampão Tris (20 mM) com ureia (3 M) e posteriormente em solução tampão contendo Tris (20 mM) sem ureia.

O conteúdo proteico foi concentrado para 1 mL (Eppendorf, Concentrator Plus) e foi submetido à segunda etapa de purificação por cromatografia em coluna de troca aniônica (*Mono-Q 5/50 GL*, GE Healthcare) fazendo uso do equipamento ÄKTA Start, *GE Healthcare*. Alíquotas das amostras eluídas em cada processo de purificação foram aplicadas em eletroforese em gel de poli-acrilamida para acompanhamento da presença de DisBa-01. O conteúdo eluído contendo a proteína purificada foi dialisado em água ultra-pura e concentrado para 1 mL. A quantificação proteica foi efetuada por meio da detecção colorimétrica por ácido bicinonínico fazendo uso do kit *Pierce*<sup>TM</sup> *BCA Protein Assay Kit* (*ThermoFisher Scientific*).

### 3.2 CULTIVO DAS CÉLULAS 4T1BM2

As células de câncer de mama triplo-negativo de camundongo (4T1BM2) foram cultivadas em meio  $\alpha$ -MEM (Gibco®), 5% Soro Fetal Bovino (SFB) (Vitrocell®) e mantidas em incubadora a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> (*Model 3110 Spectrum Series II water Jacket CO<sub>2</sub> incubator*, *Thermo Scientific*).

Para o subcultivo celular precedido pelos experimentos, utilizou-se solução de EDTA-PBS 1% para o desprendimento das células da garrafa. Após 10 minutos de incubação a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos (Centrífuga Excelsa, FANEM). O pellet formado,

contendo as células aglomeradas, foi ressuspendido em meio  $\alpha$ -MEM (Gibco®), 5% SFB e a contagem das células, bem como a viabilidade celular foi verificada utilizando *Trypan Blue* 0,4% em contador automático (*TC20™ Automated Cell Counter, BioRad*).

### 3.3 PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS LENTIVIRAIS

Simultaneamente ao cultivo das células 4T1BM2, a linhagem celular embrionária de rim humano (293FT) foi transfectada com a mistura de três plasmídeos para a construção das partículas lentivirais, sendo eles: *i*) psPAX2 (750 ng) para construção do envelope viral, *ii*) PMD2G (25 ng) para garantir o empacotamento do lentivírus e 1  $\mu$ g dos plasmídeos de transfecção *iii*), detalhados na Tabela 1, os quais contêm a sequência-alvo de nucleotídeos equivalente a porção do gene *ITGB3* para garantir seu silenciamento. A essa mistura se adicionou um coquetel preparado previamente de 6  $\mu$ L de lipofectamina (Lipofectamine™ 3000 Reagent, Invitrogen) com 94  $\mu$ L de meio Opti-MEM (Reduced Serum Media, Gibco), totalizando um volume de 100  $\mu$ L. Após 48 h, os vírus produzidos nas células 293FT foram coletados para serem utilizados na transdução.

Tabela 1 - Plasmídeos de transfecção. Dois plasmídeos distintos contendo a sequência de nucleotídeos que têm como alvo o gene *ITGB3*.

Identificação	Fabricante	Sequência-alvo (RNAm <i>ITGB3</i> )
shRNA $\beta$ 3 3235	Sigma-Aldrich, TRCN0000003235	CCACGTCTACCTTCACCAATA
shRNA $\beta$ 3 318548	Sigma-Aldrich TRCN0000318548	CCTTAGCCTTTGTCCCAGAAT

### 3.4 TRANSDUÇÃO DAS CÉLULAS ALVO

Para a efetivação da transdução, a linhagem celular 4T1BM2 foi plaqueada na densidade de  $5 \times 10^4$  células em 3 mL de meio  $\alpha$ -MEM (Gibco®) em placa de cultivo de 6 cm (K12-006, Kasvi), sendo mantida a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>

*overnight*. Com cerca de 50 - 70% de confluência, foi adicionado o meio de cultura oriundo das células 293FT contendo os lentivírus (contendo os plasmídeos de transfecção shRNA 3235) enriquecido com polibreno (8 µg/mL) e mantido por 24 h a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, o meio de cultivo contendo os lentivírus foi substituído por meio α-MEM 5% SFB. No dia posterior, trocou-se o meio de cultivo novamente, mas dessa vez utilizando α-MEM 5% SFB enriquecido com antibiótico de seleção Puromicina (10 µg/mL). Após três semanas da primeira transdução, realizou-se a segunda transdução fazendo uso de vírus contendo o plasmídeo de transfecção shRNAβ3 318548 (Sigma-Aldrich TRCN0000318548, Sequência-alvo: CCTTAGCCTTTGTCCCAGAAT), pois essa combinação havia surtido efeito em outros processos de transdução realizados no laboratório. A seleção foi realizada por um período de três semanas.

### 3.5 LISE CELULAR PARA OBTENÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO

As células 4T1BM2 parentais (wt) e 4T1BM2 transduzidas (kdβ3) foram semeadas em placas de 10 cm (KASVI, K30-9051) e quando atingiram alta confluência foram submetidas à lise celular. Para isso, retirou-se o sobrenadante e prosseguiu-se com três lavagens da placa utilizando-se PBS 1 x. As células aderentes foram desprendidas da base da placa com o uso de *cell scrapers* e PBS 1 x (3 mL) e foram coletadas. Repetiu-se o processo de coleta três vezes e em seguida houve a centrifugação a 7197 g por 10 minutos a 4°C (Eppendorf, *Centrifuge* 5430 R, F-35-6-30). Após o tempo de centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* gerado foi ressuscitado em 100 µL de tampão de lise (50 mM Tris HCl pH 7,4, 1% Tween, 0,25% Deoxicolato, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM Ortovanadato de sódio, 1 mM NaF, 0,1mM PMSF, 1 µg/mL Aproptinina e 1 µg/mL de Leupeptinina). As amostras foram incubadas durante 2 h em gelo e submetidas a agitação suave a cada 15 minutos. Após o tempo de incubação, a solução foi centrifugada a 4 °C, 14.000 g durante 20 minutos (Eppendorf, *Centrifuge* 5430 R, rotor FA-45-24-11-HS) e em seguida, retirou-se o sobrenadante com cuidado para a quantificação pelo método do ácido bicinconínico (BCA) Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

### 3.6 WESTERN BLOTTING

Para realização do *western blotting*, utilizou-se 20 µg/mL (concentração proteica) dos lisados das células 4T1BM2 parentais, 4T1BM2 kdβ3 e de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) como controle positivo para a integrina β3. As amostras foram separadas por eletroforese em SDS-PAGE (10%) e transferidas para membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (*Bio-Rad*). A membrana foi bloqueada em BSA 3% diluído em TBS-T (10 mM Tris-HCl, 150 mM cloreto de sódio, Tween-20 e água deionizada) por aproximadamente 2h e em seguida foi cortada horizontalmente, visando separar o local da banda correspondente à β3 (100 kDa) e o local correspondente à banda GAPDH. Adicionou-se os anticorpos primários correspondentes em cada fração da membrana, sendo eles o Anti-Integrin β3 antibody [EPR2342] (Abcam, ab119992) 1:1000 e o anticorpo constitutivo anti-GAPDH (Abcam, ab181602) 1:10000. No dia seguinte, foi empregado o anticorpo secundário Goat anti-rabbit pAB IgG HRP (Abcam, ab97051) e para revelação das membranas, utilizou-se o Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad) (1:1). As bandas foram fotodocumentadas utilizando o equipamento ChemiDoc™ XRS+ (*Bio-Rad*) e quantificadas fazendo uso do *software* Fiji-ImageJ.

### 3.7 CITOMETRIA DE FLUXO

As células 4T1BM2 wt e 4T1BM2 kdβ3 foram plaqueadas na densidade de  $1 \times 10^6$  em placa de 6 poços (K12-006, Kasvi) e mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 16 h. Prosseguiu-se com a lavagem com PBS 1 x seguida do desprendimento das células aderidas fazendo uso de *cell scraper*, repetindo o procedimento de coleta duas vezes. As células foram então centrifugadas a 150 g por 8 minutos a 4°C (Eppendorf, *Centrifuge* 5430 R, rotor FA-45-24-11-HS) e o pellet resultante após a centrifugação foi ressuscitado em PBS 1 x (100 µL). As células denominadas como controles positivos foram incubadas com anticorpo Anti-Integrina β3 (FITC) (BD Pharmingen #555753) não diluído, os controles negativos foram incubados apenas com o anticorpo secundário Goat Anti-Mouse IgG H&L (FITC) (AbCam, ab6785) 1:1000 e as células não

marcadas não foram incubadas com nenhum anticorpo. Quando findada a incubação em gelo durante 1h, as amostras foram lavadas com a adição de PBS 1 x (1 mL) gelado para retirada do excesso do anticorpo, seguida por nova centrifugação a 150 g por 10 minutos a 4 ° C (Eppendorf, *Centrifuge* 5430 R, rotor FA-45-24-11-HS) e o pellet resultante foi solubilizado em PBS 1 x (1 mL). Essa etapa foi repetida e o pellet final foi então homogeneizado em 200 µL de PBS 1 x para realização da leitura no citômetro de fluxo (BD Accuri™ C6, BD *Biosciences*). A análise do experimento foi realizada no *software* FlowJo™ v10.8.1, considerando o parâmetro *Overton %*, que determina a porcentagem de eventos determinados como tendo fluorescência positiva.

### 3.8 ENSAIO DE MIGRAÇÃO POR *WOUND HEALING*

As células 4T1BM2 wt e 4T1BM2 kdβ3, em uma densidade de  $3 \times 10^5$  células foram semeadas em placa de 24 poços (Kasvi, K12-024) e mantidas a 37 °C e 5 % CO<sub>2</sub> durante 48 h. Após o período de incubação, as monocamadas foram riscadas, criando uma fenda com a utilização de uma ponteira estéril de 100 µL. O meio de cultivo foi removido e os poços foram lavados com meio α-MEM 5% SFB, seguido pela adição de meio α-MEM 5 % SFB acrescido de 5 µg/mL de Mitomicina (Sigma, SLBX4310). A placa foi submetida à incubação por 4 h a 37 °C e 5 % CO<sub>2</sub> e posteriormente os poços foram lavados com PBS 1 x. O novo meio de cultivo foi adicionado distinguindo duas condições: poços com meio contendo SFB e poços com meio de cultivo ausente de SFB, sendo esses poços tidos como controle. A área da fenda foi registrada fazendo uso do microscópio de fluorescência invertido Zeiss (modelo AxioCam MRc, Carl Zeiss AG, Germany) após 4 h da adição da Mitomicina (considerado como tempo 0 h), 24 h e 48 h. A quantificação foi efetuada utilizando o *software* Fiji-ImageJ e, em geral, foram registradas três imagens correspondentes a locais distintos ao longo da ferida de cada poço nos respectivos intervalos de tempo. Ao finalizar a aquisição das imagens após 48 h, o sobrenadante dos poços foi coletado e armazenado para ser utilizado no ensaio de zimografia.

### 3.9 MIGRAÇÃO EM CÂMARA DE BOYDEN

As células 4T1BM2 parentais, 4T1BM2 kd $\beta$ 3 e 4T1BM2 parentais tratadas com DisBa-01 (1000 nM) foram plaqueadas ( $1 \times 10^5$ ) inicialmente em 250  $\mu$ L de meio de cultivo  $\alpha$ -MEM sem SFB e aplicadas na parte superior das câmaras de Boyden com poros de 8.0  $\mu$ m (Greiner bio-one® ThinCert™). Imediatamente após o plaqueamento, a câmara foi inserida em placa de 24 poços (K12-024, Kasvi), os quais continham 750  $\mu$ L de meio  $\alpha$ -MEM 5% SFB, servindo como quimioatraente para estimular a migração celular, com exceção para o controle negativo, no qual se utilizou meio  $\alpha$ -MEM sem SFB para medir a migração basal. A placa foi mantida em incubação por 3 h a 37 °C e 5 % CO<sub>2</sub>. As células que migraram através do inserto foram fixadas com paraformaldeído (4 %) por 10 minutos e, findada a fixação, as câmaras foram lavadas com PBS 1 x por três vezes consecutivas seguida pela marcação com DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) por 10 minutos para coloração dos núcleos celulares. Posteriormente, as câmaras foram lavadas com PBS 1 x e as membranas presentes nas câmaras foram destacadas do sistema para a montagem das lâminas. A migração foi avaliada e registrada por meio do microscópio invertido Zeiss LSM880 Airyscan (Carl Zeiss AG, Germany), o qual gerou imagem com a somatória de todos os quadrantes da membrana. A quantificação dos núcleos celulares foi realizada no *software* Fiji-ImageJ.

### 3.10 ZIMOGRAFIA

Os sobrenadantes coletados após a finalização do ensaio de migração (*wound healing*) foram quantificados e 5  $\mu$ g do conteúdo proteico foram combinados com tampão de amostra não desnaturante (glicerol; 0,1 M EDTA; 1 M Tris-HCl pH 6,8; bromophenol blue) numa proporção de 1:4. As alíquotas foram aplicadas em triplicata no gel SDS-PAGE 10 % contendo gelatina (100 mg/mL) e submetidas à corrente de 85 V por aproximadamente 3 h em 4°C. Findada a separação das amostras no gel, sucedeu-se com a incubação em solução de lavagem (2,5% Triton X-100) por 40 minutos em temperatura



ambiente e em constante agitação para a retirada do excesso de SDS. Em seguida, o conteúdo proteico presente no gel foi renaturado fazendo uso do tampão de incubação (Tris 50 mM [pH 8,0], CaCl<sub>2</sub> 5 mM, NaN<sub>3</sub> 0,02% e ZnCl<sub>2</sub> 10 mM) por 20 h a 37 °C. O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue* (0,25 % *brilliant blue*, 50% isopropanol, 10% ácido acético) por aproximadamente 3 h e depois lavado em solução descorante (10 % ácido acético, 10 % metanol). O registro da atividade proteolítica, caracterizada pela presença de bandas incolores no gel, foi realizada utilizando o fotodocumentador ChemiDoc™ XRS+ (*Bio-Rad*) e a quantificação foi realizada por meio do *software* Fiji-ImageJ.

### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram obtidos em duplicata e em três séries independentes de experimentos. A análise estatística foi realizada no *software* Graphpad Prism. Inicialmente houve a identificação de *outliers* pelo método *Route* 1% e em seguida realizou-se teste de normalidade *Shapiro Wilk*. A análise dos dados paramétricos foi efetuada através da aplicação de teste-t ao avaliar dois grupos ou ANOVA one-way para avaliar três grupos distintos.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 PURIFICAÇÃO DA DESINTEGRINA RECOMBINANTE DISBA-01

Os processos de crescimento e expressão bacteriana para a produção de DisBa-01 foram confirmados mediante SDS-PAGE 15 % (Fig.6A) pela verificação de bandas formadas na altura correspondente a 12 kDa, o que é indicativo da massa molecular da desintegrina de interesse. As etapas subsequentes de purificação em coluna de afinidade ao níquel e cromatografia por troca-aniônica também se mostraram bem sucedidas, visto a identificação da proteína de interesse ausente de contaminantes (Fig. 6B).

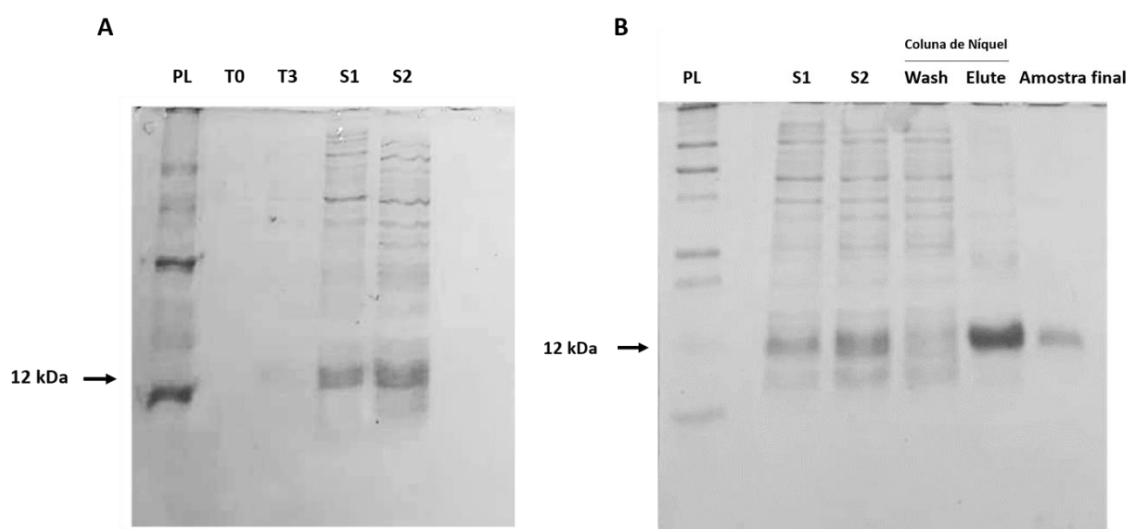


Figura 6 – Produção e purificação de DisBa-01. (A) Gel de SDS-PAGE 15% contendo as alíquotas T<sub>0</sub>, T<sub>3</sub>, S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>, demonstrando que a proteína de interesse está presente no meio extracelular após procedimento de lise celular e após centrifugação procedida de incubação em tampão com ureia. (B) Gel de SDS-PAGE contendo amostras coletadas em diferentes etapas do processo de produção da desintegrina DisBa-01 para elucidar avanço na purificação. As amostras Wash e Elute foram coletadas após a lavagem da coluna de níquel e após a aplicação da solução de eluição. Por fim, a amostra final, colhida durante a diálise em água ultra-pura, demonstra a remoção de contaminantes da amostra após a cromatografia por troca-iônica antes de ser concentrada para 1 mL.

Para a quantificação proteica, a amostra foi aplicada em sua forma pura e nas diluições 1:1 e 1:5. Após leitura no equipamento *SpectraMax i3* (*Molecular Devices*), obteve-se uma curva padrão com coeficiente de correlação ( $R^2$ ) igual a 0,991. Foi constatada uma concentração total de 1,57

mg de DisBa-01, equivalente a 87.222 nM, em volume final de 1 mL.

#### 4.2 VALIDAÇÃO DO SILENCIAMENTO POR WESTERN BLOTTING

A avaliação das bandas correspondentes à subunidade  $\beta 3$  permite confirmar que as células 4T1BM2 transduzidas duplamente com os plasmídeos shRNA $\beta 3$  3235 (CCACGTCTACCTTCACCAATA) e shRNA $\beta 3$  318548 (CCTTAGCCTTTGTCCCAGAAT) apresentaram menor quantidade de integrina  $\beta 3$ , indicativo da obtenção de um silenciamento parcial (72,77%) para o RNA mensageiro alvo (Fig. 7A e B).

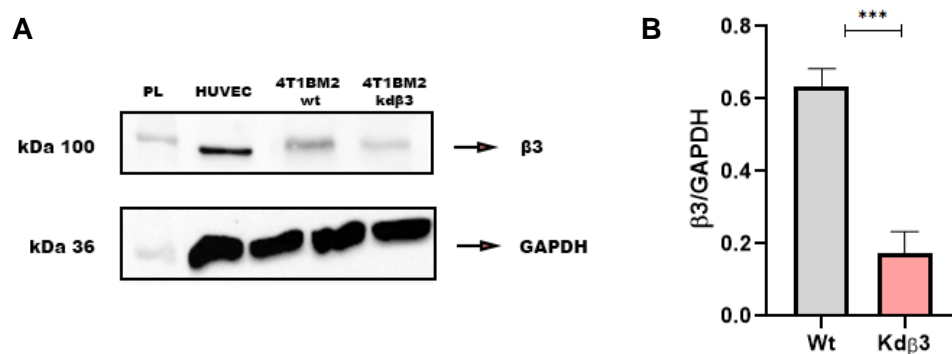


Figura 7 - Western blotting. Em (A) verifica-se a expressão da subunidade  $\beta 3$  e do gene constitutivo GAPDH nas células 4T1BM2 wt e 4T1BM2 kd $\beta 3$  em membrana de nitrocelulose. O lisado da linhagem celular HUVEC foi utilizado como um controle positivo para a verificação da marcação das bandas correspondentes à integrina  $\beta 3$  e ao GAPDH, porém esse lisado não foi considerado na análise estatística. (B) Valores de  $p < 0,05$  foram considerados com significância estatística e analisados por meio de test-t para dados paramétricos.

O silenciamento para a subunidade  $\beta 3$  também foi alcançada por NUNES, A. C. C. (2022) que utilizou os plasmídeos de transfecção shRNA 3235 e shRNA 318548 separadamente em células de tumor de mama triplo negativo humano (MDA-MB-231). Em seu trabalho, obteve-se 69% de silenciamento após a utilização do plasmídeo de transfecção shRNA 3235 e 84% de silenciamento com o uso de partículas lentivirais contendo o plasmídeo shRNA 318548, sendo confirmados mediante RT-qPCR e citometria de fluxo.

### 4.3 VALIDAÇÃO DO SILENCIAMENTO POR CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo elucidou uma discreta diminuição da subunidade  $\beta 3$  nas células silenciadas quando comparadas com as células parentais, indicando que as células 4T1BM2 wt (pico azul) possuem 12,42 % mais integrinas  $\beta 3$  marcadas em relação as células 4T1BM2 kd $\beta 3$  (pico lilás) (Fig. 8A). Realizou-se também a verificação da marcação efetiva dos controles positivos quando confrontados com os controles (controle negativo e células não marcadas) entre as células da mesma linhagem. Foi verificado que o controle positivo 4T1BM2 wt (pico rosa) apresentou 41,02 % a mais da subunidade  $\beta 3$  quando comparada com 4T1BM2 wt controle negativo e 4T1BM2 wt não marcada. Enquanto que as células 4T1BM2 kd $\beta 3$ , tidas como controle positivo (pico rosa), apresentam 36,13 % mais integrinas  $\beta 3$  que as células 4T1BM2 kd $\beta 3$  controle negativo e 4T1BM2 kd $\beta 3$  não marcadas (Fig. 8B).

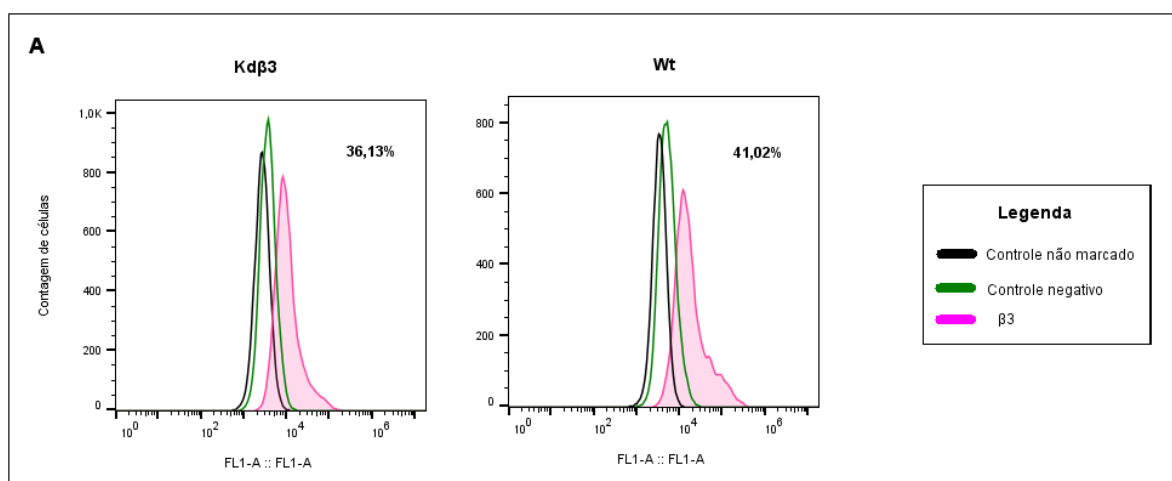
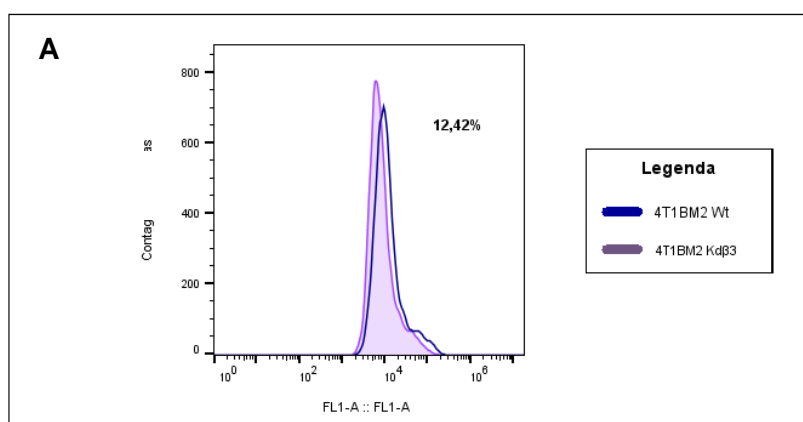


Figura 8 - Citometria de fluxo. (A) Comparação entre os controles positivos das células 4T1BM2 wt e células 4T1BM2 kd $\beta$ 3, indicam que a primeira apresenta 12,42% mais integrinas  $\beta$ 3 marcadas. (B) Certificação da marcação da subunidade  $\beta$ 3 quando comparada com os controles negativos e células não marcadas para cada uma das linhagens.

#### 4.4 COMPARAÇÃO DA TAXA DE MIGRAÇÃO EM ENSAIO DE *WOUND HEALING*

A mensuração da área de abertura da fenda, que indica a porcentagem de migração celular, foi obtida através da medida das áreas registradas em 0 h, 24 h e 48 h após a incubação das células, considerando o tempo 0h como o momento da aquisição da imagem da fenda completa (100 %). Verificamos que as células 4T1BM2 parentais obtiveram um maior fechamento de sua fenda quando comparadas com as células submetidas à transdução, sendo observado nos experimentos alterações significativas em 24h e 48h do início do experimento (Fig. 9A). A quantificação foi realizada por meio do *software* ImageJ, considerando três imagens de locais distintos de cada poço para avaliação da diminuição da área de abertura da fenda (Fig. 9B).

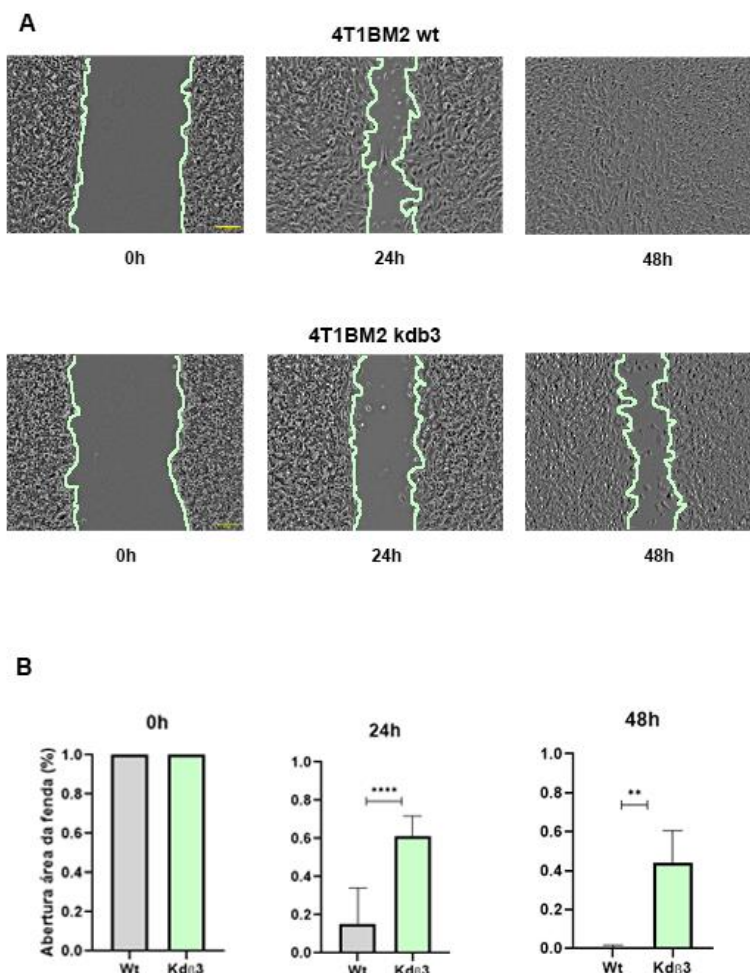


Figura 9 - Ensaio de *wound healing*. (A) Acompanhamento do fechamento *in vitro* da área de ensaio de *wound healing* após 4h (tempo 0h), 24h e 48h do tratamento com mitomicina e obtidas por meio de lente de aumento 10 x. A quantificação foi realizada pelo *software* Fiji-ImageJ para avaliação da redução da fenda, por meio da quantificação de sua área no decorrer do tempo. (B) Observa-se que há uma alteração significativa em 24 h e 48 h do início do experimento, apresentando  $p < 0.05$ . A análise estatística foi feita por meio de teste-t para dados paramétricos no *software* GraphPad Prism.

Os resultados corroboram com estudos que promoveram o *knockdown* do gene *ITGB3*, demonstrando diminuição da migração coletiva de células tumorais de mama triplo negativas (MDA-MB-231) e células epiteliais (MCF10A) (SESÉ *et al.*, 2017). A redução da taxa de migração das células silenciadas é explicada devido o gene *ITGB3* ser descrito com um importante componente para a migração celular em ensaios de *wound healing* (AYAMA-CANDEN *et al.*, 2022).

#### 4.5 COMPARAÇÃO DA TAXA DE MIGRAÇÃO EM ENSAIO DE MIGRAÇÃO EM CÂMARA DE BOYDEN

A migração das células parentais quando comparada com as células transduzidas, resultou em quantidades de núcleos marcados bem variadas em cada réplica e taxa de migração maior das células 4T1BM2 kd $\beta$ 3 do que observada no ensaio de *wound healing* (Fig.10A), apesar da integrina  $\alpha\beta$ 3 contribuir para a direcionalidade da migração (MORGAN *et al.*, 2009). Verificou-se que a desintegrina DisBa-01 se mostrou eficiente inibindo a migração celular, apresentando ação inibitória superior à das células silenciadas (Fig.10B). Essa molécula possui alta afinidade pela integrina  $\alpha\beta$ 3, bloqueando sua ação e ocasionando a diminuição da migração celular e demais alterações relacionadas à adesão e angiogênese. É conhecida na literatura a sua afinidade por integrinas relacionadas com a migração celular, como a  $\alpha$ 5 $\beta$ 1, porém a DisBa-01 possui cerca de 100 vezes mais afinidade pela integrina  $\alpha\beta$ 3, caracterizando-a como um forte bloqueador para esse receptor (Montenegro, C. F *et al.*, 2017).

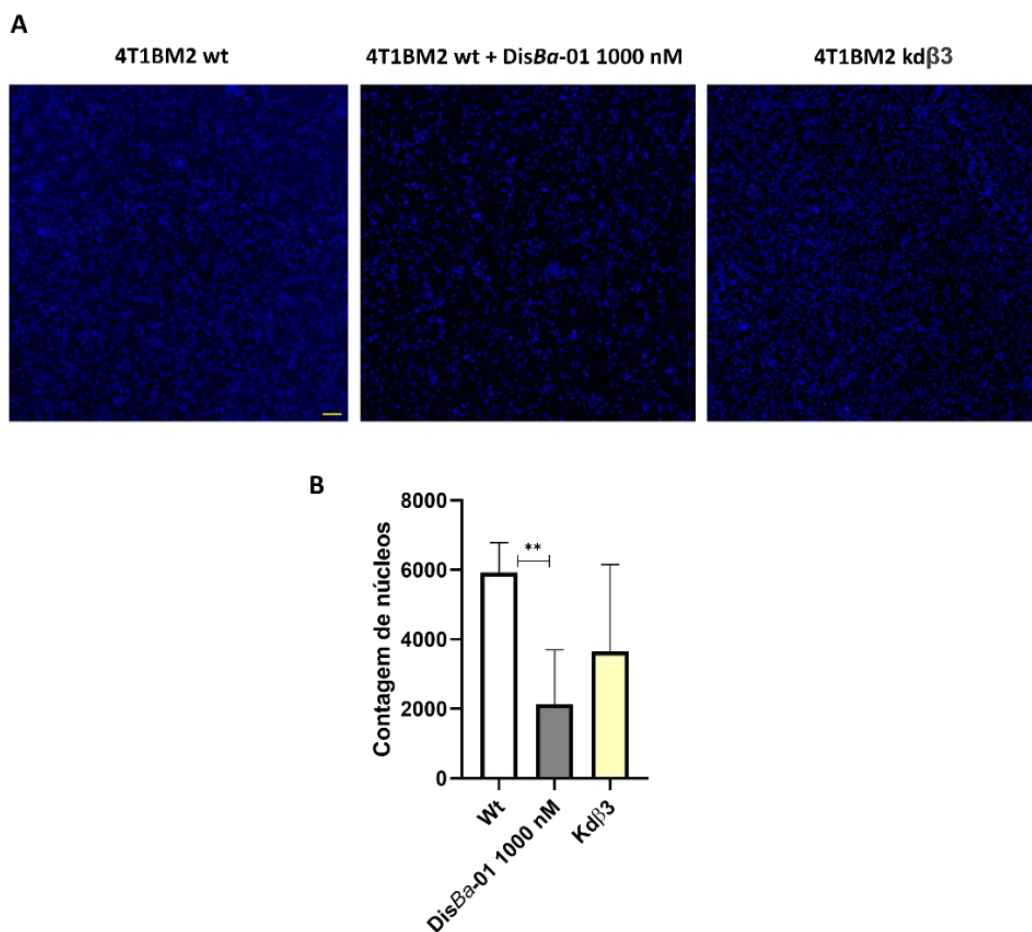


Figura 10 - Migração em câmara de Boyden. (A) Imagens obtidas por microscopia de fluorescência demonstrando os núcleos corados das células que migraram através do inserto. Barra de escala de 50  $\mu$ m. (B) Análise estatística realizada por meio de teste ANOVA one-way para dados paramétricos no *software* GraphPad Prism, com  $p < 0.05$

#### 4.6 IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADE DE MMP-2 E MMP-9

Constatou-se maior expressão de MMP-9 (entre 95 kDa e 130 kDa) nos meios de cultivo oriundos das células 4T1BM2 parentais no ensaio de *wound healing* quando comparadas às células 4T1BM2 kd $\beta$ 3 (Fig. 11A), corroborando com resultados de Carter, R. Z. *et al.* (2015). Essa diminuição pode ser relacionada ao fato da integrina  $\alpha\beta$ 3 estar envolvida em vias de sinalização que induzem à produção de MMP-9. Conforme apontado em estudos, a integrina  $\alpha\beta$ 3 promove a síntese da proteína  $\beta$ -catenina, que induz à expressão de MMP-9 (Barillari, G., 2020). Entretanto foi verificado o aumento de MMP-2 ativa (entre 45 kDa e 55 kDa) nas células 4T1BM2 silenciadas

(Fig.11B). Os níveis de pró-MMP-2 não apresentaram diferença significativa em ambas as células. A identificação da altura das bandas ocorreu por meio da comparação com resultados do trabalho de LINO, R. L. B. *et al.* (2019).

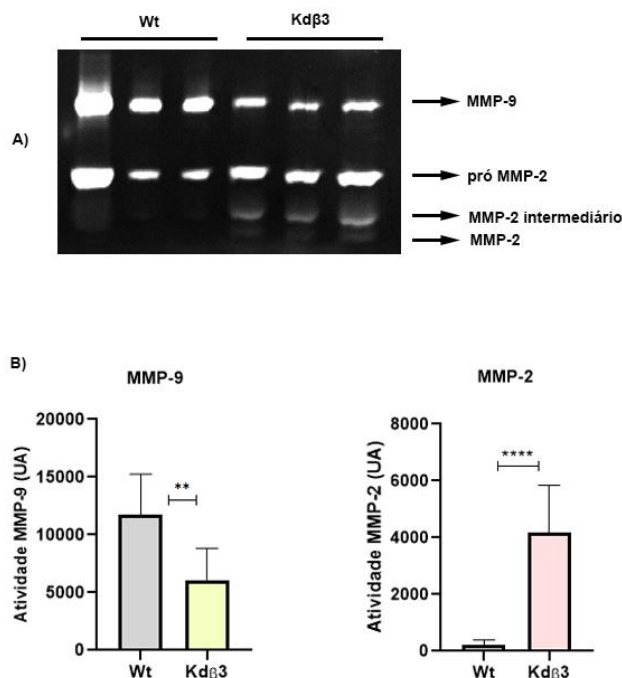


Figura 11 - Zimografia. (A) Perfil de metaloproteinasas de matriz com a identificação de MMP-9 e isoformas de MMP-2 (pró, intermediária e ativa). As amostras foram aplicadas em triplicata para cada linhagem celular. (B) Análise estatística realizada por meio de teste-t para dados paramétricos no *software* GraphPad Prism, com  $p < 0.05$  para ambas MMPs.

Tais resultados, que indicam a obtenção de um silenciamento parcial para a subunidade  $\beta 3$ , podem ser explicados devido aos plasmídeos de transfecção disponíveis em nosso laboratório e utilizados nesse trabalho (shRNA $\beta 3$  3235 e shRNA $\beta 3$  318548) terem como alvo o RNA mensageiro de *Homo sapiens*. Ao realizar um alinhamento no BLAST-NCBI entre as sequências do RNA mensageiro referente ao gene *ITGB3* de *Homo sapiens* e *Mus musculus*, espécie das quais células 4T1BM2 são oriundas, verificou-se 82,01% de identidade entre ambas. Utilizando o *software* Molecular Evolutionary MEGA, inseriu-se as sequências-alvo correspondentes aos plasmídeos de transfecção em formato FASTA, sendo possível constatar que as sequências-alvo dos plasmídeos shRNA $\beta 3$  3235 e shRNA $\beta 3$  318548 apesar





tratadas com o inibidor DisBa-01, colaborando com a discussão da aplicação de métodos de inibição da integrina  $\alpha\beta3$  e seus efeitos na redução da progressão tumoral.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos por este trabalho indicam a obtenção de uma linhagem tumoral triplo negativo de mama murino (4T1BM2) silenciada para o gene *ITGB3*. Os ensaios funcionais demonstraram que a linhagem 4T1BM2 kd $\beta$ 3 exibiu menor taxa de migração e diferentes padrões de produção e atividade de metaloproteinases de matriz, com a diminuição de MMP-9 e aumento de MMP-2. Contudo, demais estudos são necessários visando a utilização de métodos de seleção mais robustos para o isolamento e expansão das células silenciadas. Esse trabalho possibilita entender a complexidade da atuação da integrina  $\beta$ 3 em células tumorais *in vitro*, além de propiciar o aperfeiçoamento das técnicas empregadas e ampliar a discussão da aplicação de tais metodologias visando impedir a progressão tumoral.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. *et al.* Junções celulares e matriz extracelular. In: **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed – Porto Alegre: Artmed, p. 1057-1074, 2017

AYAMA-CANDEN, S. *et al.* IGDQ motogenic peptide gradient induces directional cell migration through integrin ( $\alpha$ v) $\beta$ 3 activation in MDA-MB-231 metastatic breast cancer cells. **Neoplasia**, [s. l.], v. 31, p. 100816, 2022. DOI:

BARILLARI, G. The Impact of Matrix Metalloproteinase-9 on the Sequential Steps of the Metastatic Process. **International Journal of Molecular Sciences**, 21(12), 4526, 2020. doi:10.3390/ijms21124526

BHATTACHARYYA, G.S. *et al.* Overview of Breast Cancer and Implications of Overtreatment of Early-Stage Breast Cancer: An Indian Perspective. **JCO Glob Oncol**. 2020 Jun;6:789-798. DOI: 10.1200/GO.20.00033.

BERG, G., MIKSZTOWICZ, V., SCHREIER, L. Metalloproteinases in metabolic syndrome. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, 2011, 412 19-20, 1731-9. DOI: 10.1016/j.cca.2011.06.013

BONNANS C., CHOU J., WERB Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature Review Molecular Cell Biology**.;15:786–801, 2014. doi: 10.1038/nrm3904.

BRAHIMI-HORN, M. C., BELLOT, G., POUYSSÉGUR, J. Hypoxia and energetic tumour metabolism. **Current Opinion in Genetics & Development**, 21(1), 67–72, 2011. doi:10.1016/j.gde.2010.10.006

CALDERWOOD, D. A., CAMPBELL, I. D., CRITCHLEY, D. R. Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 14(8), 503–517, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm3624>

CARTER, R. Z. *et al.* Tumour but not stromal expression of  $\beta$ 3 integrin is essential, and is required early, for spontaneous dissemination of bone-metastatic breast cancer. **The Journal of pathology**, 235(5), 760–772, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/path.4490>

CASALI, B. C. *et al.* The Effects of  $\alpha$ v $\beta$ 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. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23031745>

COMOGLIO P. M., BOCCACCIO C., TRUSOLINO L. Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: Breaking the rules. Vol. 15, **Current Opinion in Cell Biology**, p. 565–71, 2003. DOI: 10.1016/S0955-0674(03)00096-6

Instituto Nacional Do Câncer (INCA). **Conceito e Magnitude do Câncer de mama**. Controle do câncer de mama. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-de-mama/conceito-e-magnitude> . Acesso em 12 de setembro de 2021.

DANILUCCI T. M. *et al.* Recombinant RGD-disintegrin DisBa-01 blocks integrin  $\alpha\beta 3$  and impairs VEGF signaling in endothelial cells. **Cell Commun. Signal**; 17: 27-42, 2019. DOI: 10.1186/s12964-019-0339-1.

DERYUGINA E.I., QUIGLEY J.P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. **Cancer Metastasis Review**, ;25:9–34, 2006. DOI: 10.1007/s10555-006-7886-9.

DAS, S., AMIN, S. A., JHA, T. Inhibitors of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) for the management of hematological malignancies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 223, 113623, 2021. DOI:10.1016/j.ejmech.2021.113623

FERRAZ, F.B., FERNANDEZ, J.H. Integrinas na adesão, migração e sinalização celular: associação com patologias e estudos clínicos. **Revista Científica da FMC** v. 9, n. 2, p. 25–34 , 2014.

FRANTZ C., STEWART K.M., WEAVER V.M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**;123:4195–4200, 2010. DOI: 10.1242/jcs.023820.

GONZALEZ-AVILA, G., *et al.* Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, 137, 57–83, 2019. DOI:10.1016/j.critrevonc.2019.02.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery** ; 12 (1): 31–46, 1 January 2022. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

HANAHAN, D., WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, 100(1), 57–70, 2000. DOI:10.1016/s0092-8674(00)81683-9

HUMPHRIES, J. D., BYRON, A., HUMPHRIES, M. J. Integrin ligands at a glance. **Journal of Cell Science**, 119(Pt 19), 3901–3903, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.03098>

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CÂNCER (IARC). **Cancer today**. Lyon: WHO, 2020. acesso em 12 set 2021.

JOYCE, J., POLLARD, J. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nature Reviews Cancer** 9, 239–252, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc2618>

LAPOINTE, V. L. S., DE BOER, J., ENGLER, A. J. Cellular Signaling. **Tissue Engineering**, 111–148, 2014. DOI: 10.1016/b978-0-12-420145-3.00004-3

LARONHA, H., CALDEIRA, J. Structure and Function of Human Matrix

Metalloproteinases. **Cells**, 9(5), 1076, 2020. DOI: 10.3390/cells9051076

LEY, K. *et al.* Integrin-based therapeutics: biological basis, clinical use and new drugs. **Nature reviews Drug Discovery**, 15(3), 173–183, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.10>

LINO, R. L. B. *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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.118536>

MASSAGUÉ J, OBENAU F A.C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**;529(7586):298-306, 2016. DOI: 10.1038/nature17038

MCCARTHY, A. M.. Relationship of established risk factors with breast cancer subtypes. **Cancer medicine**, 10(18), 6456–6467, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/cam4.4158>

McLane, M. A. *et al.* (2004). Disintegrins. *Current drug targets. Cardiovascular & haematological disorders*, 4(4), 327–355, 2004. DOI: <https://doi.org/10.2174/1568006043335880>

Metastatic Breast Cancer. **Breast câncer**. Disponível em [https://www.breastcancer.org/symptoms/types/recur\\_metast](https://www.breastcancer.org/symptoms/types/recur_metast). Acesso em 12 de Setembro de 2021

MORGAN, M. 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. DOI: <https://doi.org/10.1002/iub.200>

MORSE, E. M., BRAHME, N. N., CALDERWOOD, D. A. Integrin cytoplasmic tail interactions. **Biochemistry**, 53(5), 810–820, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi401596q>

MONTENEGRO, C. F. *et al.* Blocking  $\alpha v\beta 3$  integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endotelial cells. **Biochimie**, 94(8), 1812–1820, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.04.020>

MURPHY, G., NAGASE, H.. Progress in matrix metalloproteinase research. **Molecular Aspects of Medicine**, 29(5), 290–308, 2008. DOI:10.1016/j.mam.2008.05.002

**National Cancer Institute**. Understanding cancer. Disponível em <https://www.cancer.gov/>. Acesso em 15 Setembro de 2022.

NUNES, A. C. C. **Estudo do efeito da ausência da Integrina  $\alpha v\beta 3$  em células tumorais de mama**. Orientador: Professora Doutora Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo. 2022. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em genética evolutiva e biologia molecular, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), 2022.

POLIDORO, M. A. *et al.* Tumor microenvironment in primary liver tumors: A challenging role of natural killer cells. **World journal of gastroenterology**, 26(33), 4900–4918, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i33.4900>

PROVENZANO, P., INMAN, D., ELICEIRI, K. Matrix density-induced mechanoregulation of breast cell phenotype, signaling and gene expression through a FAK–ERK linkage. **Oncogene** 28, 4326–4343, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/onc.2009.299>

RAMOS, O. H. P. *et al.* A novel  $\alpha v\beta 3$ -blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. **Clinical & Experimental Metastasis** 25, 53–64 (2008). DOI: <https://doi.org/10.1007/s10585-007-9101-y>

ROBINSON, J. P. Particle and Cell Separation. In (Ed.), **Sample Preparation Techniques for Chemical Analysis**, IntechOpen, 2021. DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.99635>

SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. *et al.* Snake Venom Disintegrins and Cell Migration. **Toxins**, [s. l.], v. 2, n. 11, p. 2606–2621, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins2112606>

SESÉ, M. *et al.* Hypoxia-mediated translational activation of ITGB3 in breast cancer cells enhances TGF- $\beta$  signaling and malignant features in vitro and *in vivo*. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 70, p. 114856–114876, 2017. DOI: [10.18632/oncotarget.23145](https://doi.org/10.18632/oncotarget.23145)

SHATTIL, S. J., KIM, C., GINSBERG, M. H. The final steps of integrin activation: the end game. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 11(4), 288–300, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm2871>

WALKER, C., MOJARES, E., DEL RÍO HERNÁNDEZ, A. Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. **International Journal Of Molecular Sciences**, 19(10), 3028, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19103028>

WEBER, C. E., KUO, P. C. The tumor microenvironment. **Surgical Oncology**, 21(3), 172–177, 2012. DOI: [10.1016/j.suronc.2011.09.001](https://doi.org/10.1016/j.suronc.2011.09.001)

WELCH, D. R., HURST, D. R. Defining the Hallmarks of Metastasis. **Cancer research**, 79(12), 3011–3027, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0458>

ZHU, C. *et al.* ITGB3/CD61: A hub modulator and target in the tumor microenvironment. **American journal of translational research**, 11(12), 7195–7208, 2019. PMID: [PMCID: PMC6943458](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33000000/)

ZHU, Y. *et al.* Progress and challenges of immunotherapy in triple-negative

breast cancer. **Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer**, 1876(2), 188593, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188593>